

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

**Ottimizzazione della tecnica radiobiofisica basata sulla colocalizzazione
dei foci γ -H2AX e 53BP1 per la misura del danno radioindotto al DNA
nell'ambito della Proton-Boron Capture Therapy**

Relatori:

Prof. Lorenzo Manti
Dott. Valerio Ricciardi

Candidato:

Rocco Mottareale
Matricola N85001453

A.A. 2020/2021

Indice

Introduzione	5
1 Danno radioindotto al DNA e Proton-Boron Capture Therapy (PBCT)	8
1.1 Danni al DNA indotti da radiazione ionizzante.....	9
1.1.1 Radiazioni ionizzanti: LET e RBE.....	9
1.1.2 Picco di Bragg e Spread-Out Bragg Peak (SOBP).....	10
1.2 Proton-Boron Capture Therapy (PBCT)	12
1.2.1 Adroterapia	12
1.2.2 La reazione p-B.....	13
1.2.3 Prima prova sperimentale della PBCT.....	14
1.2.4 Irraggiamento con protoni a bassa energia	17
1.3 DNA Damage Repair (DDR)	18
1.3.1 Double-strand breaks (DSBs).....	18
1.3.2 Biomarcatori del DDR: 53BP1 e γ -H2AX.....	18
1.3.3 Ionizing Radiation-Induced Foci (IRIF).....	20
1.3.4 Dinamica degli IRIF	21
1.3.5 Questioni aperte.....	22
2 Materiali e metodi	23
2.1 Campioni utilizzati nello studio	24
2.2 Il foci assay.....	24
2.3 Il software Metafer	25
2.4 Il software ImageJ	26
2.4.1 Implementazione di una nuova Macro di ImageJ.....	27
2.4.2 Il plugin FociPicker-3D.....	30
2.5 Analisi dei dati.....	33

3 Risultati e discussione.....35

3.1 Risultati del conteggio manuale.....35

3.2 Confronto tra l’efficienza di rivelazione dei foci tra conteggio manuale e Metafer.....37

3.3 Confronto tra l’efficienza di rivelazione dei foci tra conteggio manuale e Macro di ImageJ40

Conclusioni44

Appendice46

A. La formula di Bethe-Bloch: perdita di energia media della particelle cariche “pesanti”46

B. Protocollo di preparazione dei campioni per il foci assay48

C. Macro di ImageJ con FociPicker plugin.....50

Bibliografia54

Introduzione

La protonterapia è una tecnica di radioterapia che sfrutta fasci di protoni accelerati per il trattamento dei tumori. Il principale vantaggio della protonterapia sulla radioterapia convenzionale, basata su fotoni e/o elettroni, risiede nella maggiore efficacia della prima nell'elevato gradiente della deposizione di dose, che consente di localizzarne la massima parte nel volume tumorale, limitando l'esposizione dei tessuti sani circostanti o degli organi a rischio limitrofi. Ciò è reso possibile dalle proprietà fisiche che caratterizzano la perdita di energia delle particelle cariche lungo la loro traccia nella materia, come descritto dall'equazione di Bethe-Bloch. In particolare, la massima deposizione di energia avviene in prossimità della fine del range delle particelle, nota come 'picco di Bragg' (Bragg Peak): mediante la modulazione in energia di più fasci e quindi la sovrapposizione di molteplici picchi di Bragg, si realizza in clinica uno Spread-Out Bragg Peak (SOBP), che permette di conformare al tumore una distribuzione uniforme di dose. Questa precisione balistica nel differenziare quantitativamente il deposito di dose fra tessuti sani e tumore è il fondamentale razionale fisico della protonterapia.

D'altro canto, la ridotta efficacia radiobiologica dei protoni, rispetto a fasci di particelle più pesanti, come gli ioni carbonio, ne limita la diffusione ed il campo di utilizzo, per esempio nei confronti di tumori radioresistenti: l'efficacia con cui protoni alle energie tipiche del loro utilizzo clinico, cioè comprese nell'intervallo 70/200 MeV, inducono danni al DNA, provocando la morte cellulare, è praticamente uguale a quella degli elettroni e dei fotoni (raggi X e γ) della radioterapia convenzionale. Si associa loro, infatti, un valore di RBE (Relative Biological Effectiveness, RBE) pari a 1,1: ciò vuol dire che, a parità di dose, i protoni mediamente uccidono solo il 10% in più di cellule rispetto ad un fascio di fotoni, a fronte di un RBE, in ambito clinico, pari a 3 per gli ioni carbonio. Tale diversità nell'efficacia biologica relativa dipende dal fatto che il danno biologico radioindotto è fortemente legato al modo in cui l'energia è rilasciata nella materia. Gli ioni carbonio, a differenza dei protoni, sono infatti particelle ad alto LET (Linear Energy Transfer), un parametro che descrive la densità di eventi di ionizzazione lungo la traccia di una particella carica. Al crescere del LET si associa una crescente complessità del danno inferto al DNA, che si traduce in rotture della doppia elica più ravvicinate, che possono raggrupparsi in veri e propri cluster di danno, difficilmente riparabili dai meccanismi enzimatici intracellulari a ciò deputati. Nonostante gli ioni carbonio presentino valori di RBE più elevati, rispetto a fotoni e protoni, il loro utilizzo comporta al contempo complicazioni sia di tipo economico, legate al costo più elevato relativo alla produzione dei fasci rispetto a quelli di protoni, che radiobiologiche relative, invece, ad una conoscenza ancora parziale circa i danni a lungo termine dei tessuti sani esposti a particelle ad alto LET ed alla presenza di fenomeni di frammentazione nucleare con un deposito di dose non trascurabile oltre il SOBP, che inficiano la precisione balistica dell'adroterapia.

In tale contesto la Proton-Boron Capture Therapy (PBCT) è stata proposta qualche anno fa come una possibile strategia per potenziare, alle energie dei fasci terapeutici, l'efficacia biologica relativa dei protoni. Il razionale alla base della PBCT è la reazione di fusione nucleare tra protoni di bassa energia e ^{11}B , da cui deriva la produzione di tre particelle α , che all'energia alla quale sono emesse (intorno ai 4 MeV) presentano un LET di oltre 100 keV/ μm , ben più elevato di quello presentato dai fasci di protoni alle energie utilizzate in ambito clinico, che è di circa 3-4 keV/ μm nella porzione centrale del SOBP (mid-SOBP). In particolare, la sezione d'urto di tale reazione, detta p-B, è massima per energie dei protoni incidenti pari a circa 700 keV: in protonterapia protoni di bassa energia si trovano distribuiti nel SOBP, quindi in corrispondenza del tumore. Ciò significa, quindi, che i tessuti sani non sono coinvolti in tale effetto radiosensibilizzante, mantenendo così inalterato il vantaggio balistico sopra menzionato nella distribuzione di dose in protonterapia. Al contempo, ai valori di LET delle particelle emesse dalla reazione p-B corrisponde il massimo di probabilità di causare quei danni clusterizzati che le cellule tumorali non riescono a riparare. Il corto range delle particelle α , pari ad un paio di diametri cellulari, infine, garantirebbe il confinamento di tale effetto radiosensibilizzante alla sola massa tumorale.

Il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni, presso il Dipartimento di Fisica dell'Università Federico II di Napoli, ha per la prima volta dimostrato sperimentalmente la validità dell'approccio della PBCT mediante studi in vitro con fasci terapeutici di protoni e diversi carrier di ^{11}B e continua ad investigarne i meccanismi radiobiofisici attraverso lo studio dei danni riportati da campioni cellulari utilizzando diversi tipi di saggi, nell'ambito di progetti finanziati dall'INFN (call della CSN V "NEPTUNE") e dal MIUR (Prin bando 2007). È in questo contesto che si colloca questo lavoro di tesi, che si è concentrato in particolare sulla rivelazione delle rotture della doppia elica, ossia i DSBs (Double-Strand Breaks), in una linea cellulare irraggiata con il fascio terapeutico di protoni del CNAO (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica, Pavia) tramite un particolare saggio ad immunofluorescenza, il saggio dei foci. Tale tecnica, che consiste nella marcatura e poi rilevazione delle proteine ingaggiate dal meccanismo di riparazione intracellulare a livello dei siti di rottura del DNA, dovrebbe permettere di distinguere tra i danni dovuti all'esposizione della cellula a radiazione a basso LET (i protoni) e quelli invece dovuti a radiazione ad alto LET (le particelle α prodotte dalla reazione p-B): all'aumentare del LET, infatti, dovrebbe seguire sia una crescita del numero medio dei foci residui per cellula, che corrispondono ad una maggiore frazione di danno non riparato al termine del periodo di analisi, sia una dimensione media maggiore dei siti di rottura dovuta al maggior grado di clusterizzazione del danno radioindotto.

Questo lavoro di tesi ha quindi come obiettivo quello di ottimizzare una tecnica automatizzata per il saggio dei foci colocalizzati di due specifiche proteine utilizzate comunemente nel saggio dei foci, $\gamma\text{-H2AX}$ e 53BP1. Il lavoro di tesi si articola in tre capitoli, più Conclusioni.

Nel primo capitolo sono descritti i principali tipi di lesioni radioindotte al DNA, con particolare attenzione al concetto dei danni clusterizzati, che fungono da marcatore biologico dell'azione della radiazione ionizzante ad alto LET sulla cellula, le caratteristiche generali dell'adroterapia ed i principi teorici alla base della PBCT.

Nel secondo capitolo è racchiusa la parte procedurale relativa all'analisi dei campioni utilizzati, con particolare enfasi sul lavoro effettuato sui software di analisi di immagini per ottimizzarne le prestazioni.

Nel terzo capitolo seguono i risultati ottenuti con i differenti metodi di scoring ed un confronto tra di essi è presentato e discusso.

Le Conclusioni riportano i punti salienti del lavoro svolto insieme ai possibili sviluppi futuri.

1 Danno radioindotto al DNA e Proton-Boron Capture Therapy (PBCT)

Il DNA risente quotidianamente di oltre 10^5 lesioni spontanee causate nel naturale metabolismo della cellula dalle specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS), le specie azotate e carboniliche, nonché i prodotti della perossidazione lipidica, che compromettono la stabilità chimica del materiale genetico; a questi fattori si sommano anche agenti esogeni quali l'esposizione a radiazione ultravioletta (UV) e radiazione ionizzante [1]. La radiazione ionizzante è peculiare in quanto induce simultaneamente una varietà di danni, a differenza di altri agenti genotossici quali le sunnominate radiazioni UV o agenti chimici, che sono noti causare specifiche tipologie di danno (i raggi UV causano per esempio prevalentemente dimeri di timina). La radiazione ionizzante induce con relativa efficienza anche a dosi basse ed in ordine crescente di "severità", cross-link intra e intermolecolari, legami ectopici fra strand e proteine, danni alle basi azotate e Single-Strand Breaks (SSBs), ossia rotture del singolo filamento; meno frequenti, ma più gravi per il mantenimento dell'integrità del patrimonio genetico e, in particolare, per la sopravvivenza della singola cellula, sono le rotture della doppia elica, i Double-Strand Breaks (DSBs), indotti lungo la catena dalla radiazione ionizzante sia in forma isolata che clusterizzata [2]. Per cluster di danno si intendono lesioni complesse o siti di danno locale che si estendono per 10-20 bp (coppie di basi), cui corrispondono sostanzialmente circa 1-2 avvolgimenti della doppia elica. Il grado di complessità delle lesioni clusterizzate è legato non soltanto alla presenza al loro interno di permutazioni di tutti i tipi di danni sopra elencati spazio-temporalmente ravvicinati, ma anche ad una serie di ulteriori fattori, quali: il grado di condensazione della cromatina della sequenza genica coinvolta, la diversa fase del ciclo cellulare della cellula colpita e la potenziale interferenza tra più percorsi di riparazione del DNA indotti dai sistemi di segnalazione del danno. Le mutazioni nelle lesioni clusterizzate possono insorgere direttamente, a causa di una riparazione imprecisa, o indirettamente perché è più probabile che cluster di danno persistenti, intercettati dalle forcelle di replicazione, causino DSBs indotti dallo stress replicativo [1]: in occasione della duplicazione del DNA, la doppia elica è aperta in corrispondenza del sito origine di replicazione da un particolare enzima detto elicasi (che rompe i legami a idrogeno tra le coppie di basi complementari dei due filamenti); su ciascuno dei due singoli filamenti risultanti avverrà a questo punto la sintesi di una nuova molecola di DNA 'figlia' identica all'originale, mediante un meccanismo di polimerizzazione promosso dall'enzima DNA polimerasi. La presenza di eventuali ostacoli lungo la catena di DNA, rappresentati da rotture del singolo filamento o della doppia elica, può causare l'arrestarsi del meccanismo d'azione della forcella replicativa, derivante dall'incapacità del replisoma (complesso degli enzimi preposto alla replicazione) di bypassare gli ostacoli presenti sul DNA. L'accumulo di forche replicative arrestate nel nucleo cellulare può comportare la fine dell'intero processo di replicazione del materiale genetico, con conseguente incapacità della cellula di dividersi (morte replicativa).

Il quadro generale che ne risulta è che l'efficienza e l'accuratezza della riparazione diminuiscono, e la mutazione e la citotossicità aumentano all'aumentare della complessità del danno al DNA, da lesioni isolate a singolo filamento a lesioni clusterizzate a doppio filamento (Figura 1).

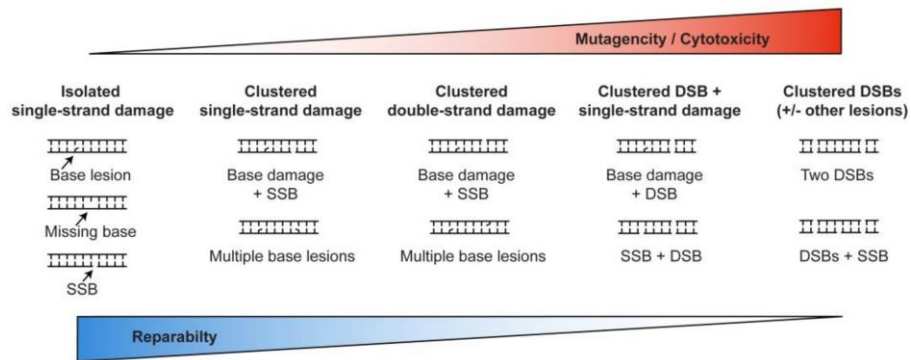


Figura 1. Relazione tra complessità, riparabilità, mutagenesi e citotossicità del danno al DNA. Gli indicatori triangolari sopra e sotto indicano effetti biologici da minori a maggiori che sono inversamente proporzionali alla riparabilità delle lesioni del DNA isolate rispetto a quelle clusterizzate [1].

1.1 Danni al DNA indotti da radiazione ionizzante

Le lesioni clusterizzate sono il segno distintivo del danno prodotto dall'esposizione della cellula a fasci di radiazione ionizzante (nonostante esistano specifiche sostanze quali la bleomicina e la neocarzinostatina noti come agenti "radiomimetici" capaci di produrre lesioni analoghe, seppur molto più raramente), il che rende di notevole rilevanza la loro individuazione e analisi al fine di ottimizzare le tecniche di esposizione ai fasci utilizzate in radioterapia nella cura ai tumori.

1.1.1 Radiazioni ionizzanti: LET e RBE

Le radiazioni ionizzanti danneggiano il DNA interagendo con esso direttamente, o indirettamente, producendo ROS in prossimità del DNA, inclusi i radicali idrossilici (-OH) derivanti dall'idrolisi delle molecole d'acqua, largamente presenti all'interno dei tessuti [3]. Esistono radiazioni ionizzanti di diversa "qualità": i raggi X e γ , cioè fotoni ad alta energia con massa nulla, cui si aggiunge anche una limitata porzione dello spettro ultravioletto; i neutroni e le particelle cariche, come particelle α (nuclei di ^4He , formati da due protoni e due neutroni), particelle β (elettroni o positroni), protoni, ioni carbonio o di elementi più pesanti (es. ioni ferro). La dose assorbita D è la grandezza fisica utilizzata per misurare la quantità di

energia assorbita da un mezzo materiale per unità di massa a seguito dell'esposizione a radiazioni ionizzanti (si misura in Gy, con $1\text{Gy} = 1\text{J/kg}$); questa quantità non è direttamente correlata alla severità (o, appunto, qualità) del danno biologico prodotto ma solo alla sua quantità, dal momento che una stessa dose assorbita produrrà danni biologici di differente severità/complessità a seconda del tipo di radiazione. Un parametro utile per descrivere la qualità della radiazione è il Linear Energy Transfer (LET). Il LET è una misura della densità degli eventi di ionizzazione prodotti lungo una traccia di radiazione, descritta come la quantità di energia (keV) depositata per unità di lunghezza (μm). Raggi X, raggi γ , elettroni e protoni sono radiazioni a basso LET ($0.2 - 0.4\text{keV}/\mu\text{m}$) poiché depositano energia con ionizzazioni che si verificano a bassa densità lungo la loro traccia [4]; gli ioni carbonio, al contrario, sono particelle ad alto LET, capaci dunque di provocare danni complessi al DNA che si raggruppano in forma di cluster. In tal senso è utile introdurre un altro fondamentale parametro legato al modo in cui l'energia è rilasciata nella materia, l'efficacia biologica relativa o RBE (Relative Biological Effectiveness), definita come il rapporto tra la dose nota di fotoni necessaria a provocare un certo danno, e la dose di un altro tipo di radiazione necessaria a provocare lo stesso livello di danno. Come meglio descritto in seguito, i protoni di alta energia (centinaia di MeV) hanno un RBE di 1,1, praticamente analogo a quello dei fotoni usati in ambito clinico ($\text{RBE} = 1$), a fronte, per esempio, di un RBE pari a 3 per gli ioni carbonio alle energie utilizzate in adroterapia.

1.1.2 Picco di Bragg e Spread-Out Bragg Peak (SOBP)

A differenza dei fotoni, la cui perdita di energia all'interno della materia segue un andamento esponenziale decrescente con la profondità (legge di Lambert-Beer), la natura coulombiana dell'interazione delle particelle cariche con gli elettroni degli atomi e delle molecole della materia biologica fa sì che queste rallentino al suo interno rilasciando la maggior parte della loro energia ad una certa profondità, determinata dall'energia iniziale del fascio di particelle incidente. Infatti, l'energia depositata lungo la traccia di radiazione da una particella carica aumenta notevolmente verso la fine del percorso: questo massimo di deposizione di dose a fine range, concentrata cioè a fine range del fascio di particelle, è nota come "picco di Bragg", poiché inizialmente descritta da W.H. Bragg nel 1903 [1] [Appendice A]. Nel caso dei raggi X, la massima deposizione di energia è raggiunta poco dopo l'ingresso nel materiale per poi decrescere esponenzialmente con la profondità; l'energia rilasciata dal fascio adronico, costituito da protoni o ioni carboni ad esempio, aumenta con la profondità.

Come è possibile osservare in figura 2, nel caso di trattamento di un tumore posto ad una certa profondità, l'utilizzo dei raggi X implica un coinvolgimento maggiore dei tessuti sani più esterni che ricevono la maggior parte della dose di radiazione che raggiunge soltanto in parte minore il volume tumorale mentre gli adroni oltrepassano i tessuti sani depositando una dose minima di

energia, raggiungendo il picco di Bragg che può essere fatto coincidere in corrispondenza del tumore, dove il rilascio di energia è massimo, per poi tendere rapidamente a zero.

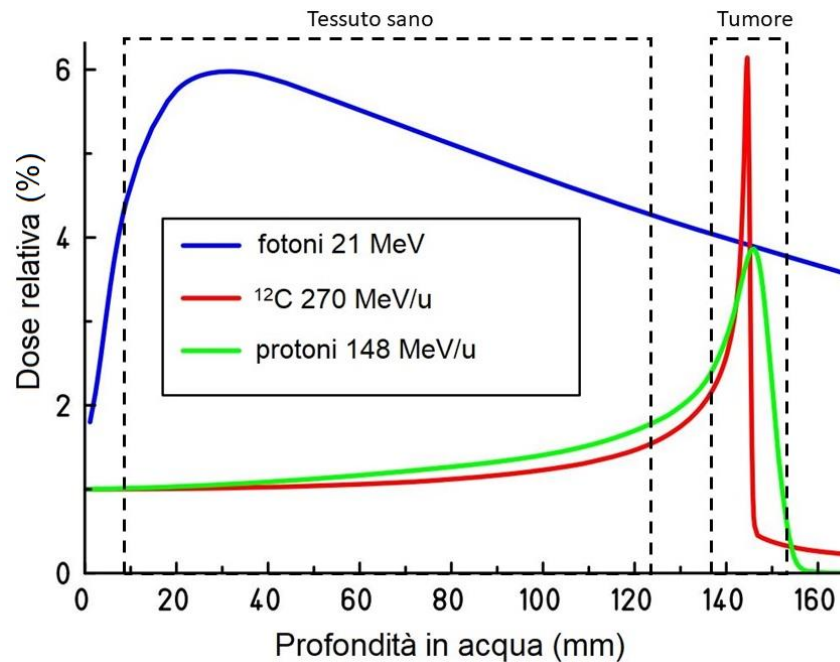


Figura 2. Andamento della percentuale delle radiazioni assorbite in funzione della profondità per diversi tipi di radiazione: i raggi X (curva blu), rilasciano molto della loro dose relativamente in superficie; i protoni (curva verde) e gli ioni carbonio (curva rossa) rilasciano una bassa quantità di radiazioni nei tessuti sani. Il danno maggiore è invece concentrato nel bersaglio (tumore) [5].

Anche se con le moderne tecniche di radioterapia, anche per i fasci di fotoni si riescono a realizzare piani di trattamento con curve isodose tali da massimizzare il rilascio di energia sul bersaglio tumorale, la natura fisica dell'interazione sopra descritta fa sì che in ogni caso i tessuti sani, e gli eventuali organi a rischio, ricevano una dose indesiderata, e tali valori rappresentano quindi un fattore limitante per la dose curativa, ossia quella necessaria per il *tumour local control*. Per le particelle ad alto LET, quali ioni carbonio, nel picco di Bragg si possono raggiungere elevati valori di RBE, data l'esistenza di una diretta correlazione tra LET ed effetti citotossici indotti dalla radiazione [6]. In ambito clinico, la modulazione energetica di più fasci adronici monocromatici consente la realizzazione del cosiddetto Spread-Out Bragg Peak (SOBP) che mira ad ottenere una distribuzione uniforme della dose biologicamente efficace tramite la sovrapposizione di più picchi di Bragg, corrispondenti a fasci di diverse energie: questa tecnica consente di conformare la regione di massima deposizione energetica al volume tumorale (Figura 3).

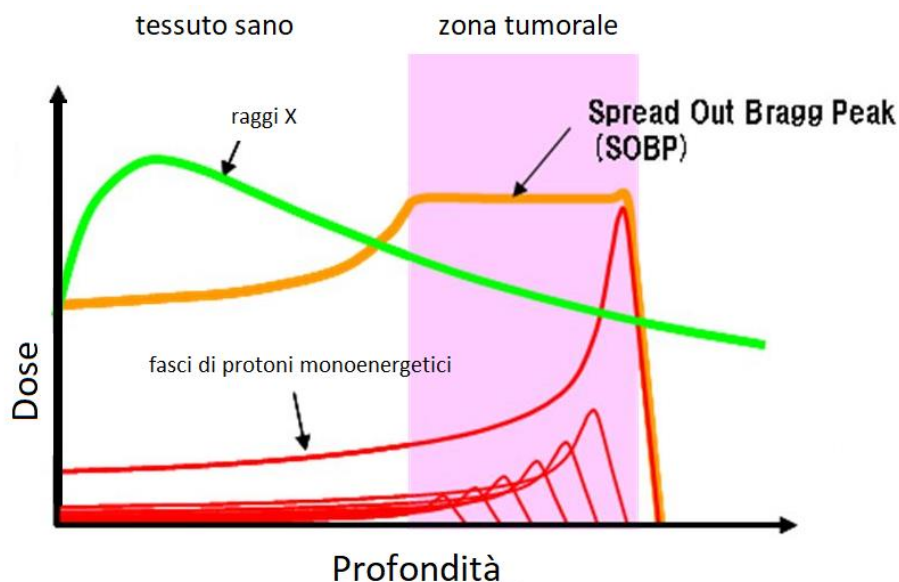


Figura 3. Spread Out Bragg Peak (SOBP): la modulazione di più fasci di protoni a diversa energia consente la realizzazione di un plateau esteso alla regione tumorale di interesse, dato dalla sovrapposizione dei picchi di Bragg [7].

1.2 Proton-Boron Capture Therapy (PBCT)

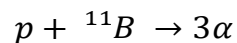
1.2.1 Adroterapia

A differenza della radioterapia tradizionale, che sfrutta fasci di fotoni (X e γ) o elettroni, la terapia adronica o adroterapia si configura come una forma di radioterapia antitumorale alternativa, che impiega fasci accelerati di particelle quali protoni e ioni carbonio. L'utilizzo di particelle adroniche massive consente innanzitutto di massimizzare il numero di rotture clusterizzate al DNA, la cui maggiore complessità rende inefficaci i meccanismi di riparo del danno subito a carico della cellula tumorale, che si inattiva o va in senescenza, rendendo dunque possibile il trattamento di tumori radioresistenti alla terapia tradizionale (in cui il danno al DNA è sicuramente più modesto). L'altro fondamentale vantaggio, ovviamente comune anche a particelle più leggere come i protoni, risiede nella maggiore accuratezza balistica nel rilascio della dose limitatamente alla regione tumorale come descritto sopra. Le proprietà fisiche e radiobiologiche dei fasci di particelle cariche accelerate rende quindi l'adroterapia un trattamento in linea di principio estremamente selettivo in quanto capace di preservare tessuti e organi sani limitrofi alla regione tumorale in chiusura maggiore della radioterapia convenzionale e, nel caso degli ioni carbonio, di migliorare le prospettive di controllo di tumori resilienti. In Italia il CNAO (Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica) di Pavia rappresenta l'unica facility in cui venga praticata oltre alla protonterapia (attiva anche a Catania, presso INFN-LNS, e presso il Centro di Protonterapia di Trento)

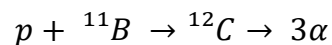
l'adroterapia con ioni carbonio, che dal 2017 è entrata a far parte dei Livelli Essenziali di Assistenza previsti dal Sistema Sanitario Nazionale per la cura dei tumori [8]. In ambito clinico gli adroni sono accelerati fino a raggiungere energie cinetiche di 250 MeV per i protoni e 4800 MeV (400 MeV/n) per gli ioni carbonio. Nonostante gli ioni carbonio presentino un maggiore RBE rispetto ai protoni, con conseguente incremento dell'efficacia contro la radioresistenza esibita da alcuni tumori, quali i gliomi, vi sono complicazioni economiche e radiobiologiche circa il loro utilizzo da tenere in considerazione, legate ai fenomeni di frammentazione dei fasci di ioni carbonio alle energie utilizzate in ambito clinico, unita ad una conoscenza ancora parziale circa le conseguenze dell'esposizione delle cellule dei tessuti sani a radiazioni ad alto LET. Tutto ciò sta indirizzando la ricerca nello sviluppo di soluzioni atte a potenziare l'efficacia radiobiologica dei fasci di protoni a favore di una più ampia gamma di applicazioni della protonterapia a neoplasie radioresistenti: è in questo contesto che si inserisce la Proton-Boron Capture Therapy (PBCT).

1.2.2 La reazione p-B

La Proton-Boron Capture Therapy (PBCT) nasce dall'esigenza di potenziare l'efficacia radiobiologica dei protoni in modo da poter utilizzare la protonterapia anche per il trattamento di tumori radioresistenti. L'idea alla base della PBCT è quella di aumentare l'efficacia con cui i protoni alle energie della protonterapia inattivano le cellule tumorali sfruttando le particelle α a corto range ed alto LET prodotte dalla fusione nucleare che si realizza tra protoni e ^{11}B , secondo l'idea proposta da Do-Kun Y. et al. [9], di utilizzare la reazione:



La reazione di fusione tra protone e ^{11}B è una two-step reaction caratterizzata da tre diverse energie di risonanza (0.162 MeV, 0.675 MeV and 2.64 MeV).



Inizialmente il protone interagente con ^{11}B induce la formazione di un nucleo metastabile di $^{12}\text{C}^*$ nello stato eccitato 2^- o 3^- ; nel primo caso $^{12}\text{C}^*$ decade nello stato eccitato 2^+ di ${}^8\text{Be}$ emettendo una particella α con $l=3$. Se $^{12}\text{C}^*$ si trova nello stato 3^- allora questo può decadere o in ${}^8\text{Be}_{2+}$ con emissione di una particella α con $l=1$, o in ${}^8\text{Be}_{0+}$ con α $l=3$: in entrambi i casi ${}^8\text{Be}$ decade poi in una coppia di particelle α con $l'=2$. Per basse energie comprese tra 0.1 e 5 MeV del fascio di protoni incidente, la sezione d'urto raggiunge il massimo (circa 1.2 barn): protoni di bassa energia sono difatti presenti nel picco di Bragg [10]. Le particelle α prodotte dalla reazione p-B presentano un'energia centrata intorno ai 4 MeV e un range medio in acqua inferiore a 30 μm assimilabile al tipico diametro cellulare [11]. Questo approccio è

molto simile a quello della Boron-Neutron Capture Therapy [12], il cui principale limite è rappresentato dal requisito che i carrier di boro siano selettivamente incorporati dalle sole cellule tumorali in modo che solo in esse avvenga la reazione fra neutroni epitermici e ^{10}B che produce particelle a corto range ed alto LET. Nell'approccio della PBCT, invece, anche se una concentrazione non trascurabile di ^{11}B (non tossica di per sé) fosse presente nei tessuti sani nell'area attorno al tumore, in questa regione gli eventi di fusione p-B (e quindi di produzione di α) sarebbero trascurabili o totalmente assenti, a causa della bassa probabilità di innescare la reazione associata al fatto che l'energia media dei protoni incidenti sarebbe troppo alta.

1.2.3 Prima prova sperimentale della PBCT

La prima prova sperimentale in vitro dell'efficacia della PBCT risale al 2018 ad opera di Cirrone et al. [13] con esperimenti di radiobiologia sperimentale guidati dal Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni utilizzando la linea cellulare DU-145, un tumore prostatico umano. L'irraggiamento dei campioni cellulari fu effettuato utilizzando il fascio di protoni da 62 MeV, impiegato nel trattamento del melanoma oculare, disponibile presso il Centro di AdroTerapia e Applicazioni Nucleari Avanzate (CATANA) dei Laboratori Nazionali del Sud (LNS) dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, a Catania. Il mercaptododecarbonato di sodio (BSH), aggiunto al terreno di coltura cellulare in fase di preparazione dei campioni, fu utilizzato come carrier di ^{11}B .

Innanzitutto fu investigata la citotossicità del carrier di ^{11}B , a due diverse concentrazioni (40 e 80 ppm), per verificare che la presenza dello stesso non risultasse nociva di per sé: ciò fu verificato mediante l'analisi dell'efficienza di piastraggio (Plating Efficiency, PE), misura della capacità proliferativa della cellula in assenza di irraggiamento sia nelle suddette cellule DU145 che mediante la misura della frequenza di aberrazioni cromosomiche (Chromosome Aberrations, CAs) in cellule epiteliali mammarie normali MCF-10A (Tabella 1).

Tabella 1. Efficienza di piastraggio (Plating Efficiency, PE) e frequenza di aberrazioni cromosomiche in funzione della concentrazione di BSH utilizzata in fase di coltura per cellule DU145 (seconda colonna) e MCF-10 (terza colonna), rispettivamente [13].

Sample	Plating Efficiency	Baseline CA frequency
No BSH	$0,58 \pm 0,02$	$0,027 \pm 0,003$
40 ppm ^{11}B	$0,61 \pm 0,04$	$0,027 \pm 0,003$
80 ppm ^{11}B	$0,60 \pm 0,04$	$0,023 \pm 0,003$

Si noti come la presenza del BSH non abbia indotto maggiore morte cellulare o aberrazioni cromosomiche rispetto al controllo in assenza di BSH, indicando che le concentrazioni usate non fossero cito/genotossiche di per sé.

Le cellule tumorali della linea DU-145 furono quindi irradiate in corrispondenza di tre diverse posizioni lungo la distanza di penetrazione del fascio: *entrance*, prima del SOBP, *mid* al centro del SOBP e *distal*, alla fine del SOBP. La sopravvivenza cellulare all'esposizione alla radiazione è stata misurata mediante il saggio clonogenico, una tecnica che permette di quantificare la morte cellulare in termini di perdita di capacità proliferativa della singola cellula in funzione della dose di radiazione: dopo l'irraggiamento le cellule vengono riseminate, con densità crescenti con la dose, lasciate libere di duplicarsi e le eventuali colonie formatesi infine contate; una cellula potrà dirsi sopravvissuta all'irraggiamento se avrà prodotto una popolazione di almeno 50 cellule figlie [14]. I dati mostrano come l'andamento della sopravvivenza cellulare in funzione della dose diminuisca sensibilmente in presenza di carrier di boro man mano che ci si sposta verso la posizione distale del SOBP, verso energie cioè sempre più prossime al massimo della sezione d'urto per la reazione p-B, a dimostrazione dell'innescarsi della reazione prevista dalla teoria e della produzione di particelle α ad alto LET (Figura 4).

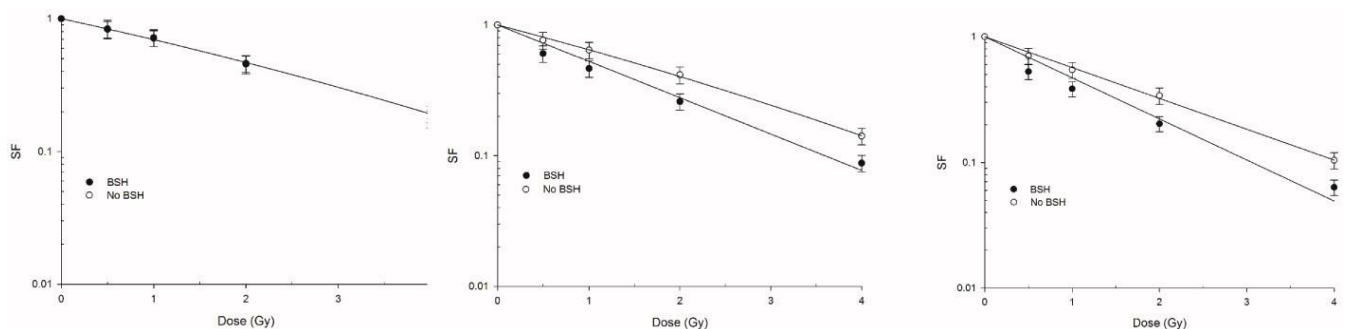


Figura 4. Sopravvivenza clonogenica in funzione della dose lungo le varie posizioni del profilo di fascio: entrance (a sinistra), mid-SOBP (al centro) e distal (a destra). Per entrambi i set di dati, con e senza BSH, in figura sono riportate le curve ottenute eseguendo un fit della funzione lineare-quadratica $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ [13].

La linea cellulare MCF-10, anche essa irradiata nelle stesse posizioni del profilo di fascio elencate precedentemente, fu impiegata per quantificare la frequenza di aberrazioni cromosomiche (Chromosome Aberrations, CAs) in funzione della dose, e in particolare l'occorrenza di scambi cromosomici complessi, i quali fungono da marcatori biologici per l'esposizione della cellula a radiazione ad alto LET [15] utilizzando tecniche citogenetiche come la FISH (Fluorescence In-Situ Hybridization) e la mFISH (multi-colour FISH). I dati confermano ancora una volta come la presenza di BSH implichi, spostandosi lungo il SOBP, l'innescarsi della reazione p-B e quindi la produzione di particelle α ad alto LET, che in virtù

delle rotture prodotte, causano un maggior numero di ricombinazioni cromosomiche per cellula (Figura 5) e, tra queste, la predominanza di riarrangiamenti di tipo complesso nei campioni irraggiati in presenza di BSH (Figura 6).

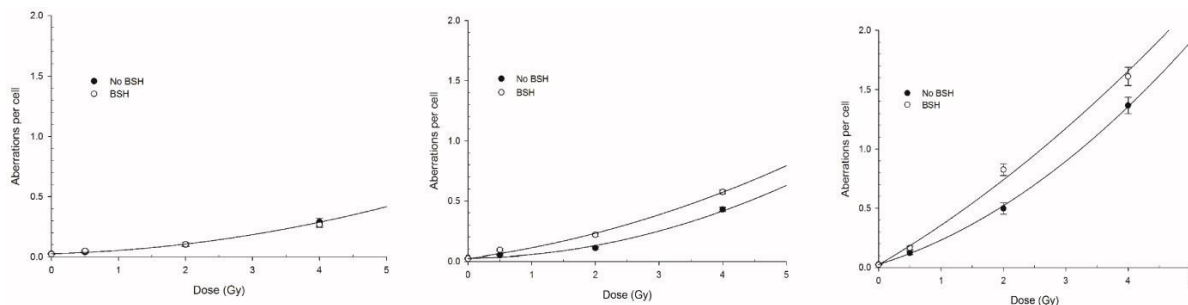


Figura 5. Aberrazioni cromosomiche per cellula in funzione della dose di radiazione lungo il SOBP per il fascio di protoni incidente: entrance (a sinistra), mid-SOBP (al centro) e distal (a destra). Per entrambi i set di campioni, con e senza BSH, in figura sono riportate le curve ottenute adattando ai dati la funzione lineare-quadratica $Y = Y_0 + \alpha D + \beta D^2$ (dove Y_0 rappresenta la frequenza baseline di aberrazioni cromosomiche per cellula valutata a 0 Gy) [13].

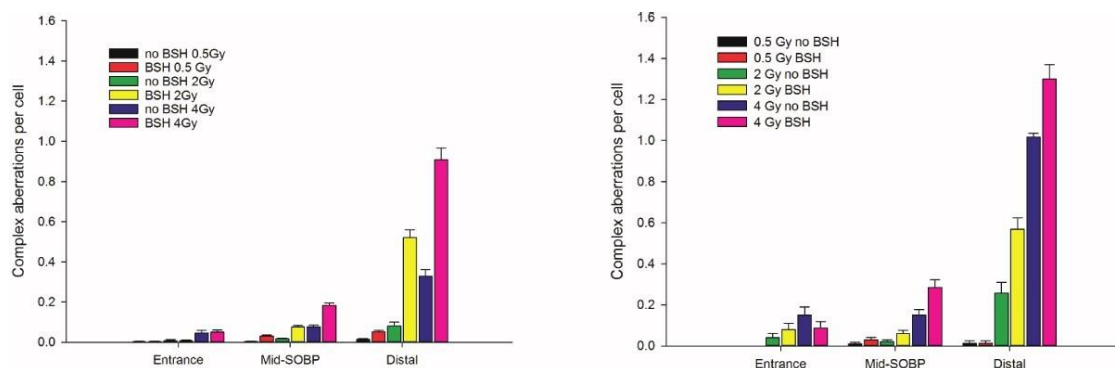


Figura 6. Numero di aberrazioni complesse per cellula per la linea cellulare MCF-10A, in funzione della dose e della posizione lungo il SOBP, in campioni irraggiati in presenza o assenza di BSH e rilevate dall'analisi con tecnica FISH (a sinistra), e dalla m-FISH (Multi-FISH, a destra), [13].

I risultati dello studio del 2018 di Cirrone et al. [13] sono stati estesi nel 2021 nel lavoro di Blaha et al. [16] utilizzando le stesse linee cellulari, ma questa volta irraggiate con fasci di protoni clinici ad alta energia- quindi usati per trattare tumori solidi profondi- disponibili presso il CNAO di Pavia; anche in questo caso, un incremento significativo dell'efficacia radiobiologica del trattamento con protoni ed un aumento del numero di CAs di tipo complesso sono stati osservati in presenza del carrier di ^{11}B BSH, mostrando le potenzialità della tecnica anche in un ambito clinico più vasto di quello usato per i primi esperimenti.

1.2.4 Irraggiamento con protoni a bassa energia

Per entrambi gli studi citati precedentemente, gli incrementi più marcati per l'efficacia radiobiologica ed il numero di CAs sono stati osservati in corrispondenza della posizione distale del SOBP, quindi delle energie minori per i protoni incidenti, indicando un probabile effettivo contributo dovuto alle particelle α ad alto LET prodotte dalla reazione p-B; tuttavia, studi teorici hanno invece previsto una resa di tali particelle molto inferiore a quella ritenuta sufficiente a provocare gli effetti radiobiologici riportati [17-18].

Per provare il principio alla base della PBCT, nel 2021 [19] sono quindi state, per la prima volta, irradiate due linee cellulari tumorali, DU-145 (cellule prostatiche umane) e PANC-1 (cellule pancreatiche) (Figura 7), utilizzando fasci di protoni monoenergetici con energia incidente di 685 keV, prossima alla sezione d'urto massima della reazione p-B (675 keV), in presenza o meno dello stesso carrier di ^{11}B , BSH, utilizzato negli studi succitati. Gli irraggiamenti sono stati effettuati utilizzando una nuova linea sperimentale, appositamente implementata presso il laboratorio CIRCE dell'Università della Campania "Vanvitelli" di Caserta. L'incremento nell'efficacia con cui i protoni hanno indotto morte clonogenica delle cellule tumorali è stata in questo caso la più alta tra quelle osservate finora negli studi radiobiologici condotti sulla PBCT (Figura7). Questi dati confermano il razionale alla base della PBCT.

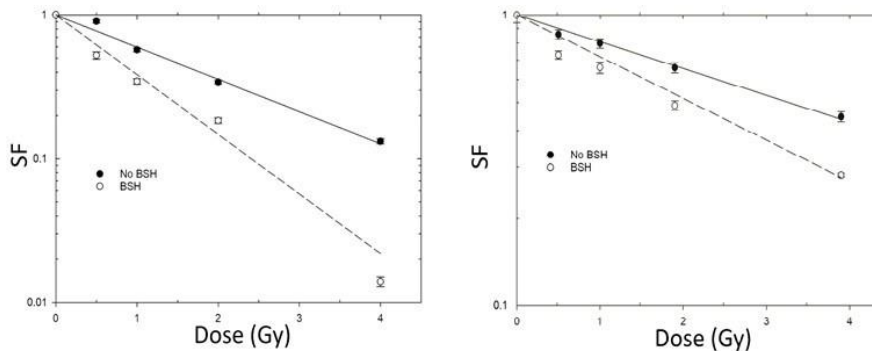


Figura 7. Frazione di cellule sopravvissute in funzione della dose nelle cellule tumorali prostatiche DU-145 (sinistra) e pancreatiche PANC-1 (destra) utilizzando un fascio monoenergetico di protoni da 685 keV; le curve dose-risposta sono ottenute in presenza (cerchi in nero) o assenza (cerchi in bianco) di BS1H [19].

1.3 DNA Damage Repair (DDR)

1.3.1 Double-strand breaks (DSBs)

Le cellule sono costantemente esposte ad agenti endogeni (di origine naturale o artificiale) che potenzialmente compromettono l'integrità del DNA, la cui replicazione e trasmissione è fondamentale per l'omeostasi cellulare e la vita dell'organismo. Delle molteplici lesioni che il DNA può subire, dai danni alle basi alle lesioni del singolo filamento, come precedentemente accennato, le più serie dal punto di vista della capacità della cellula di dividersi e quindi di trasmettere inalterato il patrimonio genetico alle cellule figlie, sono le rotture della doppia elica (Double-Strand Breaks, DSBs), una sola delle quali è infatti, teoricamente capace di innescare la morte cellulare [20]. I DSBs possono indurre riarrangiamenti cromosomici, solitamente denominati aberrazioni cromosomiche, quali delezioni, traslocazioni e amplificazioni, che possono comportare l'attivazione di oncogeni e/o la perdita di soppressori tumorali che favoriscono l'innescarsi di trasformazioni maligne. La cellula reagisce ai DSBs attraverso un complesso meccanismo di signalling noto come *DNA Damage Repair* (DDR), che prevede la riorganizzazione della cromatina e la promozione sul sito di rottura di gruppi di proteine atte alla riparazione del danno.

1.3.2 Biomarcatori del DDR: 53BP1 e γ -H2AX

Un importante regolatore del DDR è la p53-binding protein 1 (53BP1), una catena polipeptidica di 1972 amminoacidi, che funge da binding partner per il soppressore tumorale p53 e che contiene molteplici interfacce di interazione (scaffold molecolare) per svariate *DSB-responsive proteins* [20].

In presenza di un DSB, 53BP1 si accumula rapidamente sulla cromatina attorno al sito dove è presente la rottura; questo processo è avviato da un meccanismo di signalling a cascata, che ha inizio con la mediazione da parte del complesso MRN di ATM (una proteina fosfatidilinositolo 3-chinasi codificata dal gene *Ataxia-Telangiectasia Mutated ATM*), per la fosforilazione dell'istone H2AX (variante dell'istone H2A), a questo punto noto come γ -H2AX, nel sito Serina 139 (S139), seguita dal reclutamento di MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) e dall'attivazione di RNF8-RNF168 cromatina-ubiquitina dipendenti. È a questo punto che può seguire il reclutamento sul sito danneggiato di 53BP1, che svolge un ruolo chiave nella scelta da parte della cellula del pathway di riparo più opportuno da perseguire (Figura 8): il Non-Homologous End Joining (NHEJ, Figura 9, sinistra), dominante durante la fase G1 del ciclo cellulare, in assenza di un duplicato omologo che possa fungere da stampo per il DNA, che ricuce le estremità della molecola di DNA danneggiata, con perdita di parte dell'informazione genetica; l'Homologous

Recombination (HR, Figura 9, destra), che consente la ricostruzione del segmento di doppia elica danneggiato facendo uso di uno stampo di DNA disponibile per la cellula durante la tarda fase S e la fase G2, consentendo di fatto la conservazione del materiale genetico.

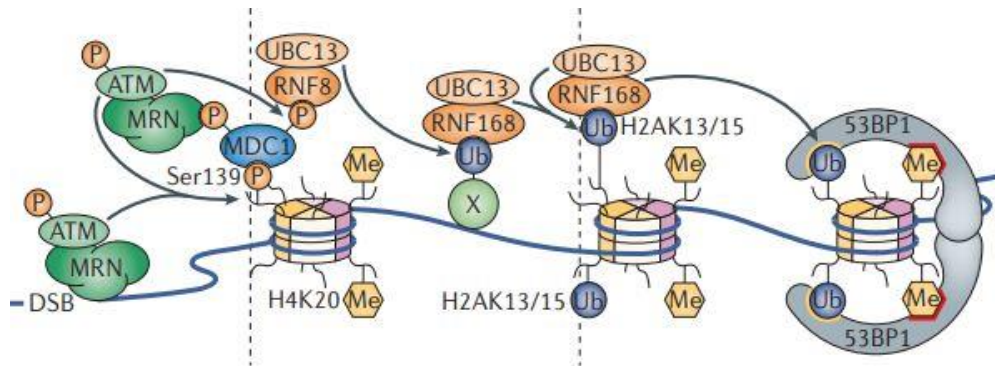


Figura 8. Reclutamento delle proteine atte al riparo del DNA sul sito dei DSBs [20].

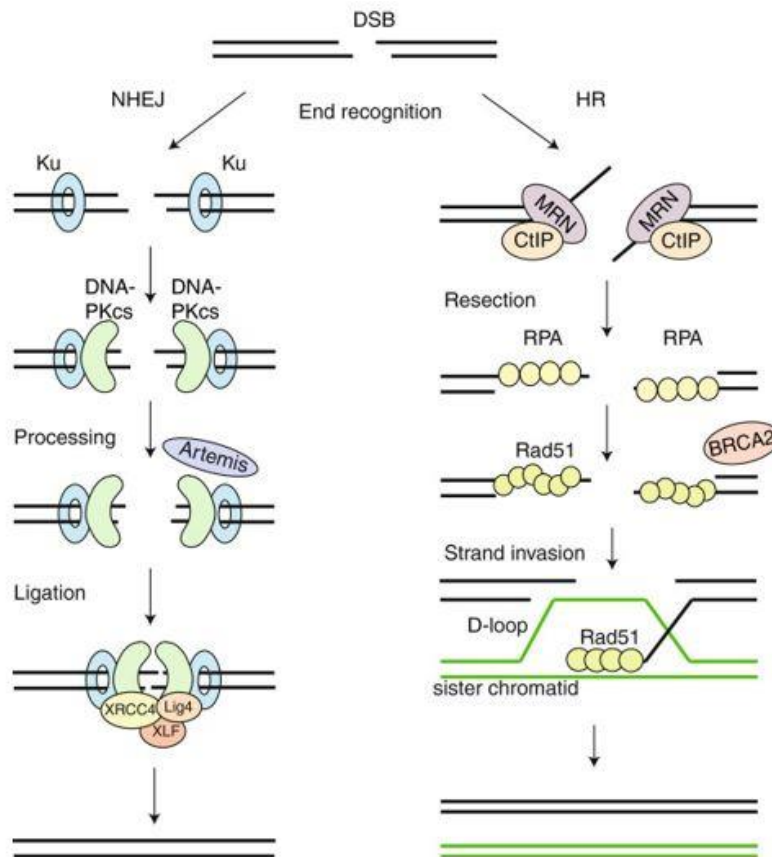


Figura 9. Schema relativo alle varie fasi dei processi di riparo della doppia elica di DNA: Non-Homologous End Joining (sinistra) ed Homologous Recombination (destra) [21].

1.3.3 Ionizing Radiation-Induced Foci (IRIF)

L'importanza di γ -H2AX e 53BP1 nei pathway di riparo del DNA a seguito di DSB, fa sì che questi possano fungere a livello cellulare da marcatori biologici dei siti di rottura della doppia elica anche noti come "*Ionizing radiation-induced foci*" o *IRIF*, vale a dire foci indotti dall'esposizione della cellula alla radiazione ionizzante. I foci possono essere visualizzati attraverso tecniche citogenetiche basate su ibridazione molecolare e microscopia a fluorescenza mediante l'utilizzo di fluorocromi coniugati alle proteine di interesse che legano selettivamente le proteine coinvolte nel DDR: ciò rende i foci visibili come spot discreti fluorescenti all'interno del nucleo cellulare. Una delle principali tecniche utilizzate in tal senso è il cosiddetto saggio dei foci, che utilizza la colocalizzazione di γ -H2AX e 53BP1, opportunamente marcati con anticorpi specifici.

Studi effettuati sui meccanismi citocinetici di riparo post-irradiazione utilizzando raggi X focalizzati [22], mostrano come il numero di foci per cellula nelle ore immediatamente successive all'irraggiamento diminuisca sensibilmente entro le 24 ore, a dimostrazione dell'efficacia dei meccanismi di riparo previsti dal DDR cellulare. Dalle misure effettuate sulla dimensione degli spot si osserva invece come l'area media dei foci tenda ad aumentare nelle ore post-irradiazione: ciò favorisce l'idea secondo la quale la velocità di riparazione di DSB dipenda dalla complessità del danno e che la permanenza di foci dopo un intervallo abbastanza lungo dall'irraggiamento sia indice del fatto che la cellula non riesca a riparare le lesioni dovute a cluster di danni (Figura 10).

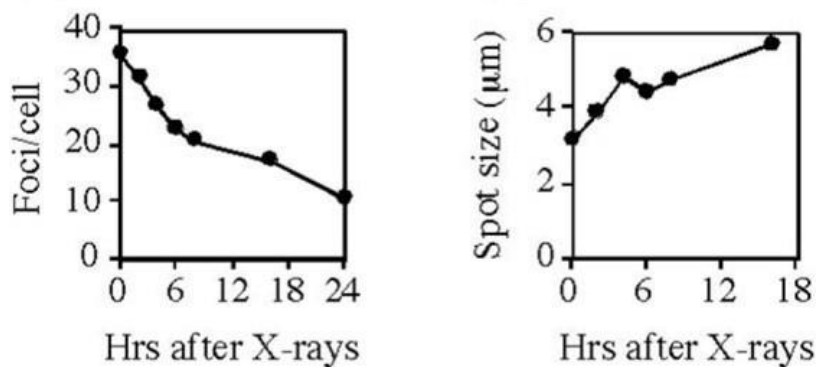


Figura 10. Cinetica di riparo ad opera del DDR cellulare a seguito di esposizione ai raggi X: a sinistra, il numero di foci per cellula in funzione del tempo trascorso dall'irraggiamento; a destra, la dimensione media degli spot fluorescenti, in funzione del tempo trascorso dall'esposizione alla radiazione ionizzante [22].

Una limitazione all'individuazione degli IRIF tramite questa tecnica è legata alle diverse cinetiche di defosforilazione dell'istone γ -H2AX (reclutato nei processi di entrata in apoptosi prematura della cellula) e le rilocalizzazioni di 53BP1 presso il focus di DSB. La diversa cinetica di

localizzazione delle due proteine è da imputarsi all'aumento della fosforilazione dell'istone H2AX anche al di fuori dei siti di DSB dopo l'esposizione a radiazione ionizzante: i foci di γ -H2AX potrebbero ancora persistere dopo che il DSB è stato riparato, a causa della graduale defosforilazione o degradazione dell'istone. Pertanto, la presenza dei soli foci di γ -H2AX potrebbe non necessariamente indicare la presenza di un DSB fisico al momento dell'analisi [23].

1.3.4 Dinamica degli IRIF

A seconda della loro complessità e localizzazione, i DSBs sono soggetti ad un meccanismo di riparazione a cinetica variabile. La maggior parte dei DSBs indotti dalle radiazioni ionizzanti sono soggetti alla riparazione rapida poiché questi, specialmente nel caso di basse dosi e/o radiazione a basso LET, sono singolarmente distanziati (*simple DSBs*): questa cinetica quindi interessa i foci che si formano inizialmente nelle posizioni di DSBs indotti dalla radiazione ionizzante entro i primi 30 minuti post irradiazione. DSBs di tipo complesso (*clustered damage*) richiederanno più tempo per essere riparati ed in corrispondenza di essi si assiste alla formazione di foci di dimensioni maggiori.

Una teoria interessante è quella che prevede la rilocalizzazione delle molecole di 53BP1 dai foci in via di estinzione a quelli in crescita, secondo un meccanismo attivo basato sulla distorsione indotta dal DSB dei processi dinamici naturali nel DNA [23]. In condizioni fisiologiche, infatti, in virtù dei gruppi fosfato presenti nella sua catena, il DNA è carico negativamente. Ci sono indicazioni che questa carica abbia proprietà dinamiche e vari a causa dell'interazione del DNA caricato negativamente con ioni, molecole e proteine della struttura della cromatina. Modelli biofisici per le oscillazioni naturali di lunga durata nei domini carichi DNA/cromatina, che tengono conto di tali proprietà, prevedono che l'intero genoma, compreso il DNA non codificante, supporti uno spettro di oscillazioni (meccaniche, elettromagnetiche) nei domini del DNA, con conseguente organizzazione dinamica topologica specifica e regolazione biofisica del genoma nelle cellule viventi. Il DSB indotto dalle radiazioni ionizzanti blocca completamente le oscillazioni nel corrispondente dominio del DNA, che costituisce circa 2 Mb nelle cellule umane, con conseguente diminuzione locale della carica netta negativa: i domini di DNA contenenti DSB si caricano positivamente rispetto ai siti adiacenti, dando luogo a gradienti locali temporanei (carica, H^+ /ioni), che, a loro volta, facilitano la fosforilazione di H2AX e la rilocalizzazione diretta delle proteine di riparazione del DSB (volta a ripristinare la carica iniziale del dominio) (Figura 11).

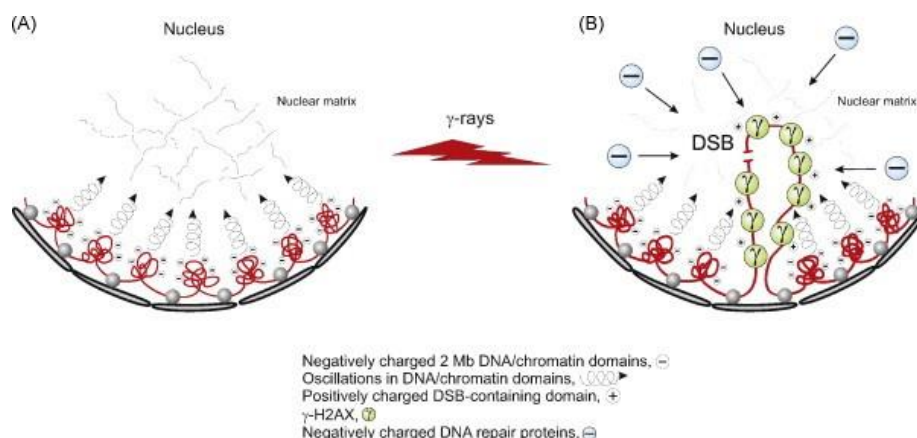


Figura 11. All'interno di un nucleo (A) sono mostrati domini intatti di 2 Mb di DNA/cromatina. Questi domini intatti sono carichi negativamente e supportano oscillazioni naturali di carica e massa. Dopo l'induzione di DSB da parte della radiazione ionizzante in uno dei domini del DNA (B), le oscillazioni naturali vengono interrotte e il dominio contenente DSB acquisisce carica positiva. All'interno del nucleo viene creato un gradiente di carica/pH che dirige la rilocalizzazione delle proteine di riparazione del DNA caricate negativamente verso il dominio contenente DSB. Immediatamente dopo l'induzione di DSB, inizia la fosforilazione di H2AX che compensa parzialmente la carica positiva del dominio contenente DSB [23].

1.3.5 Questioni aperte

L'opportunità dell'utilizzo di γ -H2AX come marcatore di IRIF è stata spesso dibattuta a causa delle difficoltà nel raggiungimento di un chiaro consenso su cosa dovrebbero essere considerati come foci di DSBs, anche all'interno dello stesso laboratorio. Un esperimento pilota basato sullo scambio tra laboratori di vetrini con cellule opportunamente trattate con fluorofori per il saggio dei foci di γ -H2AX, ha rivelato notevoli differenze sia nella qualità delle colorazioni dei campioni sia nei risultati dei conteggi da essi derivanti [24]. L'esistenza di differenze, seppur piccole, nella manipolazione del campione e nella preparazione dei reagenti tra i laboratori può quindi influenzare significativamente sia la qualità che il risultato di un eventuale conteggio. Una regolare ricalibrazione delle curve dose-risposta diventa quindi necessaria per la presa in esame di ogni eventuale variazione nel conteggio dei foci [25]. Accanto alla qualità della preparazione dei campioni, un'altra difficoltà che mina il raggiungimento di una standardizzazione del metodo, è la messa in conto delle caratteristiche delle immagini sottoposte ai software attualmente disponibili per il conteggio automatizzato, che devono tener conto di innumerevoli fattori, dalla sovrapposizione degli spot, a sfumature e colorazioni di fondo che impediscono la netta distinzione degli oggetti da contare rispetto al background. Il conteggio manuale dei foci, che diventa complesso già per campioni sottoposti a dosi medio-alte, tipo 3 Gy, in virtù del numero elevato di spot rilevabili per cellula, risente dunque di tali complicità che pregiudicano il raggiungimento di un criterio oggettivo che guidi la misura.

A tutto ciò si aggiunge la complicità biologica legata, talvolta, all'assenza di una diretta correlazione tra il numero di foci positivi a γ -H2AX e il numero di rotture del doppio filamento

indotte da radiazione ionizzante, a causa della fosforilazione di H2AX legata ai cambiamenti nella struttura della cromatina nei processi già descritti di oscillazione dei domini DNA/cromatina; il numero di foci γ -H2AX dipende inoltre dalle condizioni di coltura, dalla fase del ciclo cellulare e dalla senescenza. È stato inoltre dimostrato che anche la concentrazione di ioni Na^+ ha un effetto significativo sulla dimensione dei foci di γ -H2AX indotti dalla radiazione ionizzante [23]. Tutto ciò ha contribuito a perfezionare l'utilizzo di 53BP1 da solo, o in combinazione con γ -H2AX, come marcatore molecolare più consistente per il conteggio dei IRIF.

Il saggio dei foci colocalizzati è infatti alla base dello studio realizzato in questo lavoro di tesi, che si inserisce nell'ambito della PBCT con l'obiettivo di ottimizzare la tecnica radiobiofisica del conteggio dei foci colocalizzati di 53BP1 e γ -H2AX, fornendo un'ulteriore verifica del potenziamento dell'RBE dei protoni dovuto alla produzione di particelle α prodotte dalla reazione p-B. A tale scopo, le cellule della linea cellulare MCF-10A, pretrattate con un composto a base di ^{11}B , la borofenilalanina (BPA), sono state irradiate nella posizione distale del SOBP di un fascio clinico di protoni presso il CNAO di Pavia. I campioni, colorati con opportuni fluorofori che consentissero, mediante analisi a microscopio a fluorescenza, l'individuazione degli spot delle due proteine, sono stati sottoposti ad un conteggio manuale. I risultati ottenuti da questa prima analisi, in accordo con i presupposti teorici della PBCT, sono stati utilizzati come metro di riferimento per l'ottimizzazione di una Macro per il freeware imageJ, realizzata in modo da consentire l'individuazione automatizzata dei foci colocalizzati mediante le immagini acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza. La Macro è stata implementata utilizzando il plugin FociPicker-3D [26], che è stato adattato per il saggio automatico dei foci colocalizzati poiché inizialmente pensato dall'autore soltanto per il saggio dei foci relativi ad un unico tipo di proteina. Il plugin consente una stima del numero di foci per cellula e dell'area media degli spot (valutata in termini di numero di pixel), che viene realizzata in entrambi i casi a valle dell'impostazione di un opportuno set di parametri, che nel corso del lavoro è stato variato su diverse possibili combinazioni, in modo da migliorare l'accordo con la precedente analisi manuale.

2 Materiali e metodi

2.1 Campioni utilizzati nello studio

Le cellule epiteliali della linea MCF-10A sono state irradiate utilizzando il fascio di protoni ad energie cliniche presso il CNAO di Pavia nell'ottobre del 2020. I campioni sono stati irradiati nella posizione distale del SOBP, per due valori di dose del fascio di protoni incidente, pari a 1 e 3 Gy, in presenza e in assenza di boro, veicolato utilizzando la borofenilalanina (BPA). Lo studio dei campioni cellulari non irradiati (0 Gy), che prevede l'esame dei DSBs prodotti da processi esogeni ed endogeni casuali, in presenza o in assenza di medium di boro, esula dallo scopo di questo lavoro.

2.2 Il foci assay

I campioni cellulari irradiati sono stati marcati con opportuni fluorofori, specifici per le proteine γ -H2AX e 53BP1, mentre il DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo), un colorante organico fluorescente che lega fortemente regioni del DNA ricche in sequenze A-T) è stato utilizzato per la colorazione della regione nucleare nella quale si vuole siano concentrati i foci indotti dalla radiazione ionizzante, e poi fissati a 30 minuti e 24 ore dall'avvenuta esposizione alla radiazione. Terminata la preparazione (Appendice B), i campioni sono stati conservati alla temperatura di -20° in attesa dell'analisi. L'analisi dei vetrini è stata realizzata presso il Laboratorio di Biofisica delle Radiazioni dell'Università Federico II di Napoli, utilizzando un microscopio a fluorescenza (Imager 1, Zeiss, Oberkochen, Germania) collegato ad un computer equipaggiato con il software Metafer (MetaSystem, Germania) per l'acquisizione automatizzata delle immagini; opportuni filtri permettono di eccitare ed osservare la luce emessa dai tre tipi di fluorofori utilizzati, visibili rispettivamente con luce nelle frequenze del blu (DAPI), del rosso (γ -H2AX) e del verde (53BP1). Si osserva che i foci hanno dimensioni e forme variabili e possono anche fondersi in macchie fluorescenti di dimensioni variabili, come conseguenza delle dosi utilizzate.

Il conteggio manuale è stato effettuato per ogni vetrino mediante uno scoring indipendente di 30 cellule, da parte di due diversi operatori (60 cellule/vetrino totali) utilizzando un obiettivo ad immersione con ingrandimento pari a 63x. Per ognuno degli 8 tipi di campione in esame (per le due dosi 1 e 3 Gy, a 30 minuti e 24 ore dall'esposizione al fascio, con e senza BPA) sono stati realizzati due conteggi separati per i foci delle due proteine 53BP1 e γ -H2AX, e per ognuno di essi sono stati calcolati i valori medi e l'errore standard della media (SEM). Per ogni cellula, il numero di foci colocalizzati, (non determinabile attraverso un conteggio diretto, non potendo sovrapporre fisicamente i due canali del microscopio relativi alle due proteine) è stato invece determinato a partire dal minimo valore tra il numero di foci per cellula relativo a 53BP1 e a γ -H2AX: mediante tale approccio operativo, quella che quindi si è ottenuta è una stima dell'estremo superiore del numero di foci colocalizzati per cellula, dal momento che il numero di spot per cellula sovrapposti, relativi ai due canali, potrà al massimo eguagliare il più piccolo tra il numero di foci delle due proteine, considerate separatamente.

L'acquisizione delle immagini tramite Metafer è stata realizzata utilizzando un "Classifier" (insieme dei parametri utilizzati dal software per l'analisi delle immagini) precedentemente

ottimizzato per il saggio dei foci colocalizzati. Il software è in grado di individuare i foci nei nuclei cellulari, effettuarne il conteggio, e raccogliere i dati in gallerie e diagrammi; tuttavia, esso fornisce informazioni solo sul conteggio dei foci e dei colocalizzati, senza dare informazioni sulle loro dimensioni. Questa informazione è particolarmente rilevante per lo studio effettuato, in quanto è stato osservato (in accordo con la teoria del DDR cellulare) che dopo un tempo relativamente lungo dall'irraggiamento i foci di dimensione maggiore persistono, mentre quelli di dimensione inferiore si riducono in numero, poiché i corrispondenti DSBs vengono riparati dalla cellula; da questo si deduce che l'efficienza del meccanismo di riparazione del danno diminuisce con il crescere dell'area del focus residuo. Ne discende che lo studio delle dimensioni dovrebbe permettere, in linea teorica, anche di distinguere i campioni irraggiati in presenza di boro, a causa della maggiore probabilità di danni clusterizzati ad opera delle particelle α prodotte durante la reazione p-B.

Per ottenere tale informazione è stato usato un altro software, ImageJ [27], già utilizzato in diversi studi [28-29] nell'analisi del saggio dei foci.

2.3 Il software Metafer

Il software Metafer consente di automatizzare diverse procedure nell'ambito dell'analisi delle immagini relative a preparati citogenetici, dato che può essere adattato al tipo di operazione da eseguire mediante l'ottimizzazione di un opportuno "Classifier", vale a dire un set di parametri che il software adopera per analizzare le immagini acquisite.

L'acquisizione delle immagini dei vetrini avviene in due fasi distinte: nella prima viene effettuata una scansione con un obiettivo con ingrandimento pari a 10x, utilizzando soltanto il filtro relativo all'emissione del DAPI (blu), che consente di individuare la regione di interesse sul vetrino ed i nuclei contenuti in essa, e successivamente, mediante una scansione ad alto ingrandimento con obiettivo da 63x su diversi piani focali, per acquisire, con alta risoluzione, i segnali provenienti dai singoli nuclei rivelati precedentemente nei canali RGB (red, green, blue). Terminata la scansione, Metafer realizza una galleria per le immagini dei singoli nuclei acquisiti, fornendo anche una stima del numero di foci per cellula di 53BP1, γ -H2AX e colocalizzati; in figura 12 un esempio di schermata della galleria prodotta da Metafer dopo una scansione.

Metafer, tuttavia, non è in grado di fornire una misura delle aree dei foci individuati, pertanto, è stato necessario adoperare un secondo software, ossia ImageJ.

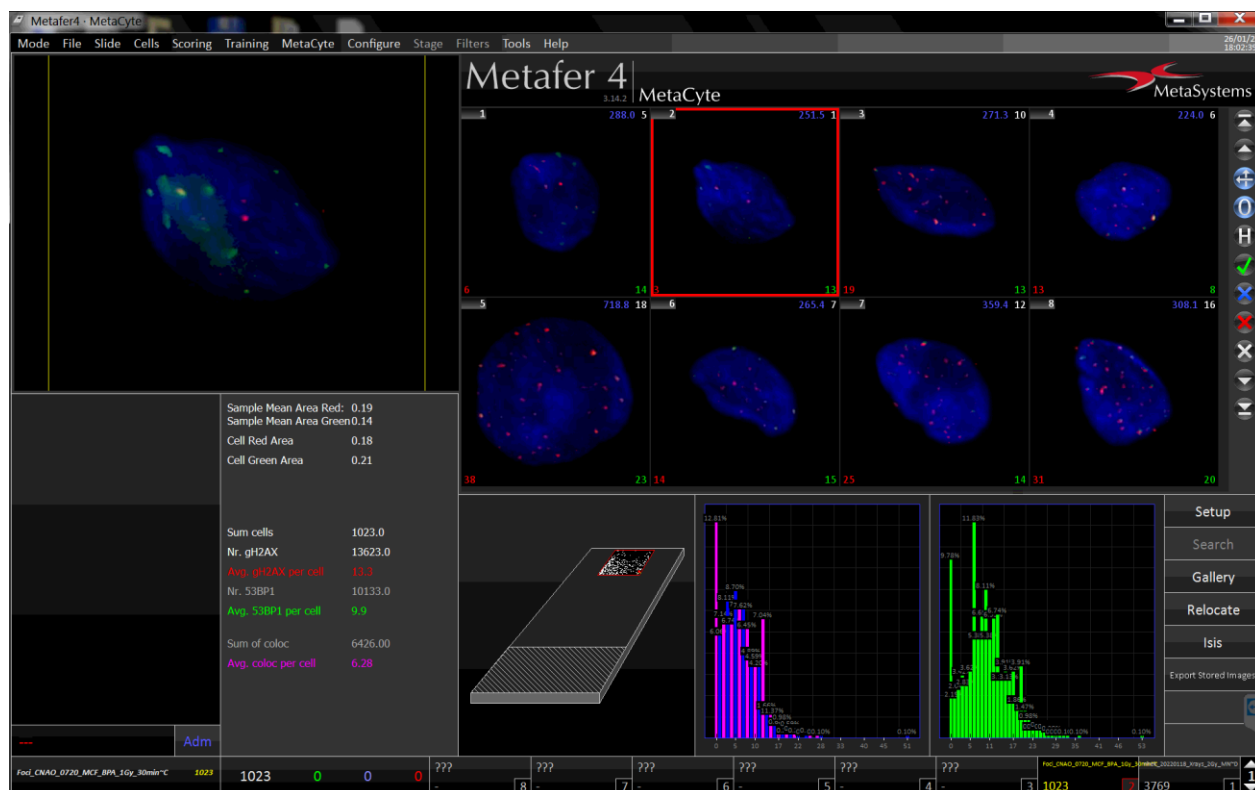


Figura 12. Esempio di galleria prodotta dal software Metafer dopo la scansione di un vetrino.

2.4 Il software ImageJ

Primo obiettivo è stato verificare l'accordo nel conteggio tra i due software, usati sullo stesso campione. A tale scopo, è stata scritta una Macro (Appendice C) capace di effettuare un conteggio automatizzato dei foci colocalizzati analizzando le foto dei vari campioni, e grazie alla quale si ricavano le informazioni ricercate.

ImageJ [27] è un software open source, sviluppato in ambiente JAVA dal National Institutes of Health (NIH Clinical Center, Bethesda, MD, USA), con l'obiettivo di garantire le funzionalità dei più comuni software commerciali per *image processing*. Esso permette la visualizzazione, modifica, analisi e processamento dei più comuni formati di immagini. La sua architettura aperta, che ne consente l'estensione mediante l'implementazione di sottoprogrammi (plugin) e Macro implementabili dall'utente, permette di utilizzare ImageJ per svolgere molteplici funzioni di calcolo aritmetico o logico e trasformazioni sulle immagini da analizzare, che presta quindi il software ad una vasta gamma di applicazioni nell'ambito dell'analisi per immagini.

Al fine di ottenere le informazioni necessarie per lo studio oggetto di questa tesi, le immagini delle cellule sono state esportate dalla galleria di Metafer ed analizzate con ImageJ per ricavare informazioni sulle dimensioni dei foci rilevati, e dunque trarre informazioni utili dal punto di vista radiobiologico nell'ambito della PBCT.

L'analisi è stata effettuata tramite la scrittura di una Macro in grado di effettuare autonomamente il conteggio dei foci colocalizzati, cercando di ottenere un risultato efficace, in termini di tempi di esecuzione (run), ed accurato, ovvero che garantisca una maggiore oggettività dell'analisi, nello stabilire cosa considerare o meno come foci di DSB (punto, questo, ancora lasciato alla soggettività dello sperimentatore, con l'analisi manuale nel foci assay). Altra questione fondamentale che ci si propone di risolvere è quella di realizzare un programma capace, oltre all'automatizzare il conteggio dei foci colocalizzati, di fornire una stima dell'area media degli spot (in termini di numero di pixel).

2.4.1 Implementazione di una nuova Macro di ImageJ

Alla base di questo lavoro di tesi si configura l'attività di implementazione di una Macro sul freeware ImageJ (per l'analisi grafica di immagini) che consenta di automatizzare il conteggio dei foci colocalizzati di 53BP1 e γ -H2AX, così da ottenere una migliore stima degli IRIF ed ovviare alle complicità, di un eventuale conteggio dei soli foci di 53BP1 (la cui individuazione manuale degli spot è apparsa più vivida e chiara in sede di misura sperimentale) o di γ -H2AX (maggiormente a-specifico e complesso da individuare a microscopio). Il conteggio degli spot e la misura delle aree sono stati realizzati utilizzando all'interno della Macro prodotta il plugin FociPicker-3D [26], utilizzato nel lavoro di Du et al. [30] per l'analisi separata dei foci delle proteine 53BP1, γ -H2AX e phospho-NBS1 nel ceppo cellulare BJ1-hTERT irraggiate con ioni carbonio da 55 MeV. La complicazione fondamentale nell'implementazione della Macro per ImageJ ha riguardato la formulazione di una strategia efficace che consentisse di adattare questo plugin alla ricerca dei foci colocalizzati di 53BP1 e γ -H2AX, essendo stato pensato invece per la ricerca dei foci relativi ad un unico tipo di proteina.

Il primo step, da parte della macro realizzata, consiste nell'apertura in ImageJ dell'immagine RGB acquisita precedentemente con il software Metafer (Figura 13).

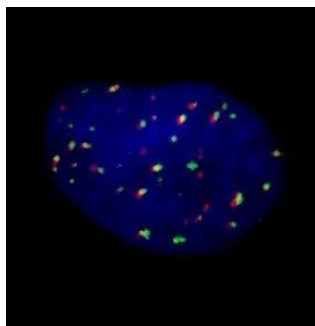


Figure 13. Immagine iniziale RGB di Metafer aperta da ImageJ: nucleo in blu, γ -H2AX e 53BP1 in rosso e verde.

La funzione “SplitChannel” separa i tre canali dell’immagine iniziale RGB (DAPI blu per il nucleo, fluorocromi rosso e verde rispettivamente per le proteine γ -H2AX e 53BP1), in tre immagini in scale di grigio (Figura 14).

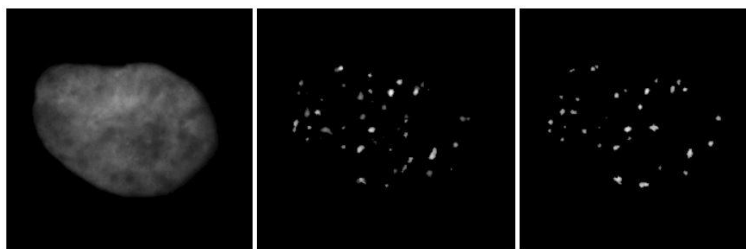


Figura 14. Esempio delle immagini in scale di grigio ottenute separando i tre canali costituenti le immagini RGB acquisite dal software Metafer: nucleo (sinistra), γ -H2AX (centro) e 53BP1 (destra).

A questo punto, per ogni immagine è fissata, tramite la funzione “SetThreshold”, una soglia (*threshold*) minima e massima per i valori di intensità dei pixel da considerare per il proseguo dell’analisi; i pixel al di fuori di questa finestra saranno automaticamente fissati in corrispondenza dei valori del limite più vicino (rispettivamente, nero se inferiori al valore minimo, bianco se superiore al valore massimo). Per ciascuna delle tre immagini così ottenute, viene creata poi una maschera binaria (comando “ConvertToMask”), per tutti i pixel delle immagini con valore di intensità non nullo; in figura 15 è mostrato un esempio delle maschere binarie ottenute, con i pixel “non nulli” riportati in nero su sfondo bianco per una migliore visibilità.



Figura 15. Esempio di maschere binarie ottenute per i tre canali: nucleo (sinistra), γ -H2AX (centro) e 53BP1 (destra).

Successivamente, la funzione “FillHoles” è applicata sulle maschere in modo da riempire tutte le eventuali regioni di intensità nulla presenti all’interno di regioni di intensità non nulla, permettendo, ad esempio, di riempire vuoti causati da zone dei nuclei cellulari per le

quali la “colorazione” con i fluorofori possa essere avvenuta in maniera meno efficiente. A questo punto, una serie di operazioni logiche sono effettuate su maschere ed immagini in scale di grigio per consentire di effettuare il conteggio dei foci colocalizzati. Utilizzando la funzione “ImageCalculator (AND)” si effettua un AND, cioè un’intersezione tra le maschere dei canali rosso e verde, così da ottenere una maschera contenente solo le posizioni in cui entrambi i segnali siano presenti (colocalizzati); un AND successivo tra la maschera così ottenuta e la maschera binaria relativa al segnale proveniente dal nucleo permette di escludere un eventuale segnale aspecifico proveniente da zone extra-nucleari (Figura 16).

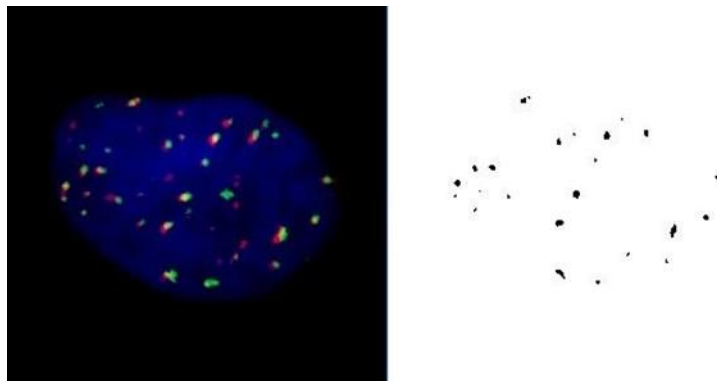


Figura 16. Confronto tra la maschera ottenuta tramite intersezione tra i canali rosso e verde e successiva intersezione con canale blu (destra) con immagine RGB di partenza (sinistra).

La maschera binaria così ottenuta viene utilizzata, con un’ulteriore operazione di intersezione, con le immagini in scala di grigio nei singoli canali rosso e verde, rispettivamente, per ottenere due immagini dei due canali in cui siano presenti solo i segnali relativi ai pixel “colocalizzati” preservando però le informazioni di intensità per i singoli spot nei due canali (Figura 17).

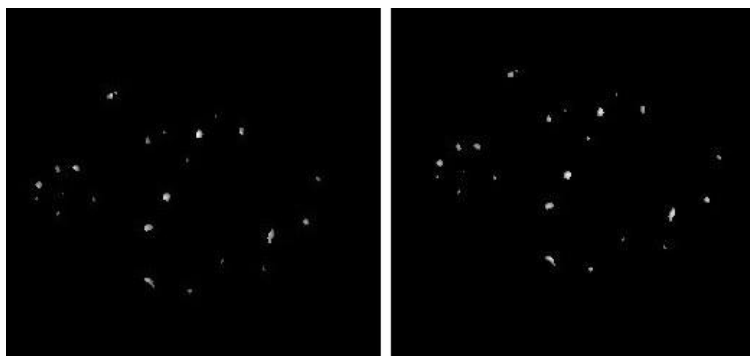


Figura 17. Esempio di immagini in scala di grigio per i due canali rosso (γ -H2AX, a sinistra) e verdi (53BP1, a destra) dopo l’intersezione con la maschera binaria contenete le informazioni sulla colocalizzazione dei segnali.

Infine, le due immagini così ottenute, insieme all'immagine in scala di grigi relativa al canale blu (nucleo), sono ricombinate in una immagine RGB, tramite la funzione "Composite", nella quale saranno presenti, oltre al nucleo in blu, i soli spot dei foci colocalizzati verdi e rossi. Il vantaggio di questa operazione di passaggio per una maschera binaria 'rimuovibile' è stato infatti quello di ottenere un'immagine RGB in cui i pixel dei foci delle due proteine colocalizzate mantenessero i valori di intensità iniziale. Con le immagini così ottenute (Figura 18), sarà poi effettuato il conteggio dei foci utilizzando il plugin FociPicker-3D [26], descritto nella sezione seguente.

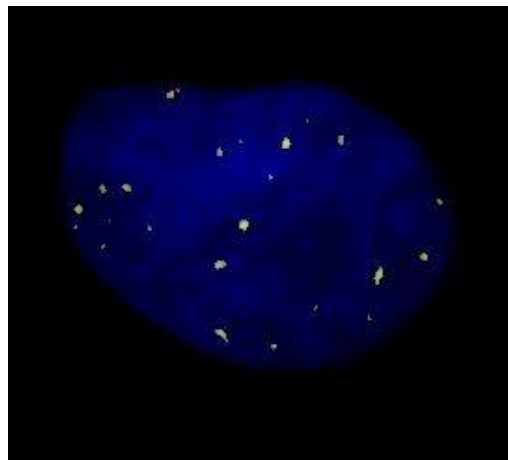


Figura 18. Esempio di immagine RGB finale in cui, oltre al segnale proveniente dal nucleo (DAPI, blu), compaiono i soli foci in cui i segnali provenienti dalla proteina γ -H2AX (rosso) e 53BP1 (verde) sono sovrapposti.

2.4.2 Il plugin FociPicker-3D

FociPicker-3D [26] è un plugin scritto in linguaggio Java da Guanghua Du dell'Institute of Modern Physics (Zhejiang University, Zhejiang, Cina), rilasciato in una prima versione nel 04/2010 e successivamente aggiornato nel 01/2012. L'algoritmo di FociPicker si basa su due fondamentali assunzioni:

- a) Ciascun focus è rappresentato da unico massimo locale di intensità luminosa;
- b) Per massimo locale di intensità si intende un singolo pixel o un gruppo continuo di pixel adiacenti aventi uguale intensità H_i (maggiore rispetto a quella di ogni altro pixel adiacente).

L'algoritmo prevede l'inserimento di una coppia di parametri di input:

- 1) il parametro t_{bkg} (*background threshold*) che definisce i valori di intensità dei pixel costituenti il background attorno a un focus; dato il t_{bkg} , il range di intensità dell' i -esimo massimo locale h_i calcolata come $h_i = H_i - t_{bkg}$;
- 2) il parametro f (*fraction*), che individua una soglia o threshold percentuale (variabile tra 0 e 1) che definisce per un certo focus la frazione di pixel aventi la maggiore intensità; ciò significa

che lo i -esimo focus conterrà intensità compresa tra $H_i - fh_i$ e l'intensità massima locale H_i , dove $H_i - fh_i$ definisce una threshold locale t_i .

Il valore della soglia di background t_{bkg} può essere impostato come uniforme (*Absolute mode*), cioè uguale per ogni oggetto processato dal programma, o come automatico (*Relative to Maximum mode*), cioè calcolato di volta in volta dal programma per ogni singolo oggetto in analisi. Questo secondo l'approccio, utilizzato per le analisi presentate in questo lavoro, consiste nel settare un raggio massimo in termini di numero di pixel (*Automatic Background Radius*), entro il quale il programma valuterà i valori di intensità dei pixel intorno ad un massimo così che per ogni focus abbia localmente un valore di t_{bkg} diverso. Come si può osservare in figura 19, l'algoritmo prima cerca il massimo locale di intensità per ogni focus, e successivamente espande la regione di interesse dal centro di ogni picco sino al limite di ogni focus che è individuato dal threshold t_i : a questo punto gli oggetti sono rappresentati con diversi colori in un'immagine separata (Figura 20), mentre numero di foci, area, volume e coordinate di ogni focus sono riportati in una tabella Excel.

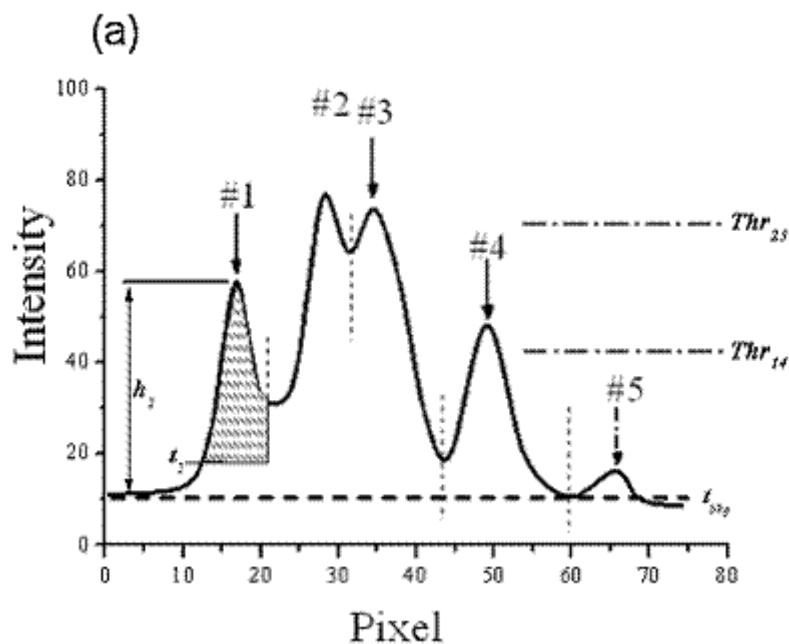


Figura 19. Nel grafico è riportata l'intensità in funzione del numero di pixel, con rappresentati i parametri di input del plugin [26].

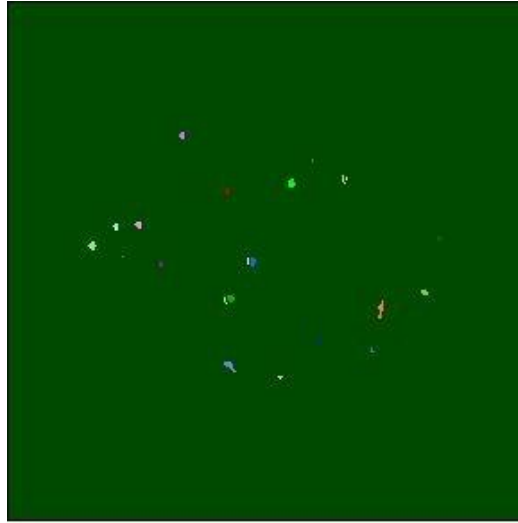


Figura 20. Foci colocalizzati individuati da FociPicker-3D.

Dopo che i foci sono stati riconosciuti, i risultati possono essere filtrati secondo differenti parametri:

- 1) “Tolerance” T , definisce il minimo range di intensità dei pixel all’interno del focus (in particolare un valore di $T = 0$, ammetterà soltanto foci caratterizzati da un unico valore di intensità);
- 2) “Minimum” V , definisce il volume o l’area minimi per ogni focus, in termini di numero di pixel;
- 3) “Contrast Balance”, parametro che può variare tra 0-1, consente di incrementare l’area dei foci di intensità maggiore, diminuendo invece quella dei foci aventi intensità minore.

Il plugin prevede anche la definizione di eventuali parametri avanzati per l’analisi di immagini tridimensionali (stack di immagini), non utilizzati nell’analisi realizzata in questo lavoro.

Come parte della Macro di imageJ utilizzata durante la fase di ottimizzazione, i seguenti parametri sono stati fatti variare iterativamente per cercare di ottenere il massimo accordo tra i conteggi automatizzati e quelli manuali:

- 1) *Contrast Balance*: per i valori 0, 0.2, 0.4;
- 2) *Minimum*: per i valori 2, 4, 6;
- 3) *Tolerance*: per i valori 10, 30, 50;
- 4) *Fraction*: per i valori 0.1, 0.3, 0.5;
- 5) *Automatic Background Radius*: per i valori 6, 12, 18.

Dopo una prima fase di raccolta dati finalizzata all'individuazione dei range di valori in cui far variare i cinque parametri selezionati, ciascuno di essi è stato fatto variare su tre differenti valori di riferimento, in combinazione con gli altri quattro, per un totale di 243 iterazioni totali.

L'area minima di ciascun focus (*Minimum*) è stata fatta variare tra 2 e 6 pixel così da evitare un'eccessiva sovrastima del dato legata alla presa in considerazione da parte del programma di foci costituiti da un unico pixel (che in linea di principio potrebbero essere dovuti a semplici limiti di risoluzione dell'immagine). Il massimo raggio in termini di numero di pixel (*Automatic Background Radius*), entro il quale il programma valuterà i valori di intensità dei pixel attorno ad ogni massimo di intensità, analogamente, è stato fatto variare da 6 a fino a un massimo di 18 pixel. I valori dei parametri *Tolerance*, *Contrast Balance* e *Fraction*, invece, sono stati settati in modo da tener conto del grado di intensità luminosa dei campioni, in funzione del numero di spot e della dimensione media degli stessi, entro limiti che tenessero conto della necessità di eventuali 'attenuazioni' dell'intensità dell'immagine (in cui un'eccessiva luminosità dei foci potrebbe compromettere l'individuazione di altri spot adiacenti), o viceversa della necessità di incrementare l'intensità di un pixel rispetto ad un background che non ne consentisse la visualizzazione.

2.5 Analisi dei dati

Il numero di foci per cellula, sia nel caso dei conteggi manuali che per i conteggi automatizzati, è stato calcolato per ciascun campione come rapporto tra la somma del numero di foci n conteggiati ed il numero di cellule del campione N :

$$\text{Numero medio di foci per cellula} = \frac{n}{N}$$

mentre gli errori per questi dati sono stati calcolati mediante la seguente formula come errore standard sulla media, assumendo una distribuzione poissoniana (conteggi):

$$\sigma_{\text{Numero medio di foci per cellula}} = \frac{\sqrt{n}}{N}$$

La stima della dimensione media dei foci è stata effettuata, per ogni campione scansionato utilizzando la Macro di ImageJ, attraverso il rapporto tra la l'area totale data dalla somma delle aree dei foci rilevati misurata in pixel, ed il numero totale n dei foci contati; quindi:

$$\text{Area media} = \frac{\text{Area totale}}{n}$$

mentre gli errori sono stati calcolati attraverso la formula:

$$\sigma_{Area\ media} = \frac{\sqrt{Area\ totale}}{n}$$

L'accordo tra i valori misurati per il numero medio di foci per cellula (delle proteine valutate prima separatamente e poi colocalizzate) con conteggio manuale ($cMan$) ed automatizzato ($cAuto$), è stato valutato calcolando lo scarto percentuale rispetto ai valori del conteggio manuale, sia rispetto ai risultati forniti dal software Metafer che rispetto a quelli forniti dalla Macro di ImageJ :

$$\Delta\% = \frac{|cMan - cAuto|}{cMan} \cdot 100$$

mentre gli errori sono stati calcolati attraverso la formula:

$$\sigma_{\Delta\%} = \sqrt{\left(\frac{\partial\Delta\%}{\partial cAuto}\right)^2 \sigma_{cAuto}^2 + \left(\frac{\partial\Delta\%}{\partial cMan}\right)^2 \sigma_{cMan}^2}$$

Metafer non fornisce un'incertezza per $cAuto$, per cui la $\sigma_{\Delta\%}$ si ottiene propagando l'incertezza su $cMan$; posto infatti $\sigma_{cAuto} = 0$ si ottiene:

$$\sigma_{\Delta\%} = \left(\frac{\partial\Delta\%}{\partial cMan}\right) \sigma_{cMan}$$

La $\sigma_{\Delta\%}$ si ottiene quindi sia per Metafer che per la Macro di ImageJ dalla seguente relazione:

posto $X = |cMan - cAuto|$, $\sigma_X = \sqrt{\sigma_{cMan}^2 + \sigma_{cAuto}^2}$ che per Metafer diventa $\sigma_X = \sigma_{cMan}$

a questo punto posto $Y = \frac{X}{cMan} \cdot 100$, si ottiene $\sigma_Y = Y \sqrt{\left(\frac{\sigma_X}{X}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{cMan}}{cMan}\right)^2}$.

3 Risultati e discussione

3.1 Risultati del conteggio manuale

In questa sezione sono riportati i risultati del conteggio manuale per i foci relativi alle proteine γ -H2AX e 53BP1, valutati separatamente, con le relative stime, per ogni campione, per numero di foci colocalizzati per cellula: questo, a sua volta, è stato valutato come minimo tra il numero di foci delle due proteine in esame (Tabella 2); i valori riportati si riferiscono al numero medio di foci per cellula.

Tabella 2. Risultati del conteggio manuale, espresso come numero medio di foci per cellula: (sinistra) γ -H2AX, (centro) 53BP1, (destra) colocalizzati; il numero di foci colocalizzati per cellula è stimato come minimo tra il numero di foci di γ -H2AX e 53BP1, così da ottenere una stima per il massimo valore possibile numero di foci colocalizzati per le due proteine. I risultati sono presentati come valore medio $\pm$ SEM.

Sample	γ -H2AX	53BP1	Colocalizzati
1 Gy 30 min BPA	16,8 $\pm$ 0,5	20,1 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 0,5
1 Gy 30 min noBPA	12,9 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,5	12,7 $\pm$ 0,5
1 Gy 24h BPA	3,2 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,2
1 Gy 24h noBPA	2,5 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2
3 Gy 30 min BPA	37,6 $\pm$ 0,8	40,0 $\pm$ 0,8	35,6 $\pm$ 0,8
3 Gy 30 min noBPA	31,1 $\pm$ 0,7	33,5 $\pm$ 0,7	29,6 $\pm$ 0,7
3 Gy 24h BPA	4,0 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2
3 Gy 24h noBPA	3,5 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2

Dai grafici relativi al numero di foci per cellula delle due proteine, ottenuti dal conteggio manuale (Figura 21, per le proteine 53BP1 e γ -H2AX, e figura 22, per i conteggi colocalizzati), si osserva innanzitutto che per entrambi i valori di dose, 1 e 3 Gy, sia per cellule irraggiate in assenza che in presenza di BPA, i campioni fissati 30 minuti dopo l'irraggiamento sono caratterizzati da un numero di foci per cellula maggiore rispetto ai campioni fissati a 24 ore: ciò conferma, come atteso, che il numero di foci per cellula, a parità di dose, si riduce all'aumentare del tempo intercorso dall'avvenuta esposizione alle radiazioni per effetto della riparazione di una parte dei danni di minore entità ad opera del DDR cellulare. Il numero di foci per cellula mostra infatti un chiaro incremento all'aumentare della dose di radiazione passando da 1 a 3 Gy per i campioni fissati a 30 minuti, mentre tale incremento tende ad attenuarsi per i campioni fissati dopo 24 h, in cui, l'avvenuta riparazione dei danni non clusterizzati ad opera del DDR, abbassa per entrambi i valori di dose il numero di foci per cellula su valori praticamente confrontabili; le differenze, seppur minori, restano osservabili a dimostrazione della permanenza di cluster di danno che la cellula non è in grado di riparare. I dati del conteggio manuale mostrano, inoltre, risultati in accordo con quanto previsto teoricamente dalla PBCT: i campioni pretrattati con BPA, valutati sia a 1 che a 3 Gy di dose di esposizione per entrambi i tempi di fissaggio, sono caratterizzati da un numero di foci per cellula superiore rispetto a quelli irraggiati in assenza di boro: questo dato conferma quindi l'avvenuto

innescarsi della reazione p-B, per effetto della quale il rilascio di particelle α ad alto LET ha determinato un aumento del numero di DSBs.

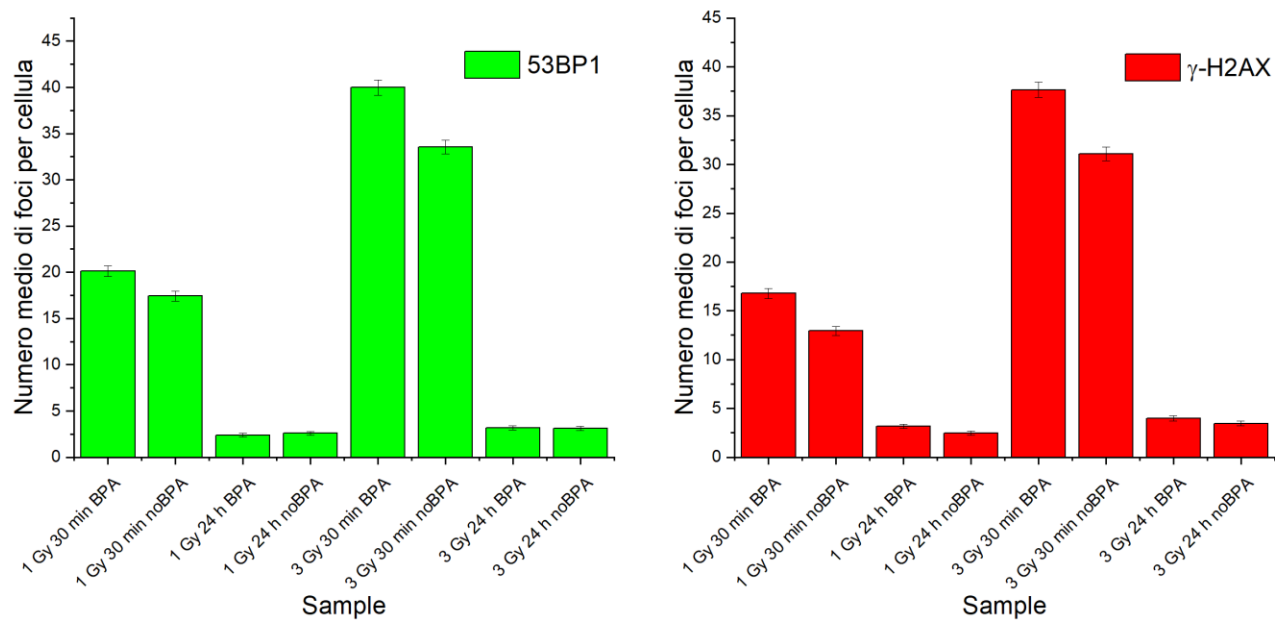


Figura 21. Numero medio di foci per cellula, ottenuto tramite conteggio manuale relativo alle proteine 53BP1 (verde, sinistra) e γ -H2AX (rosso, destra).

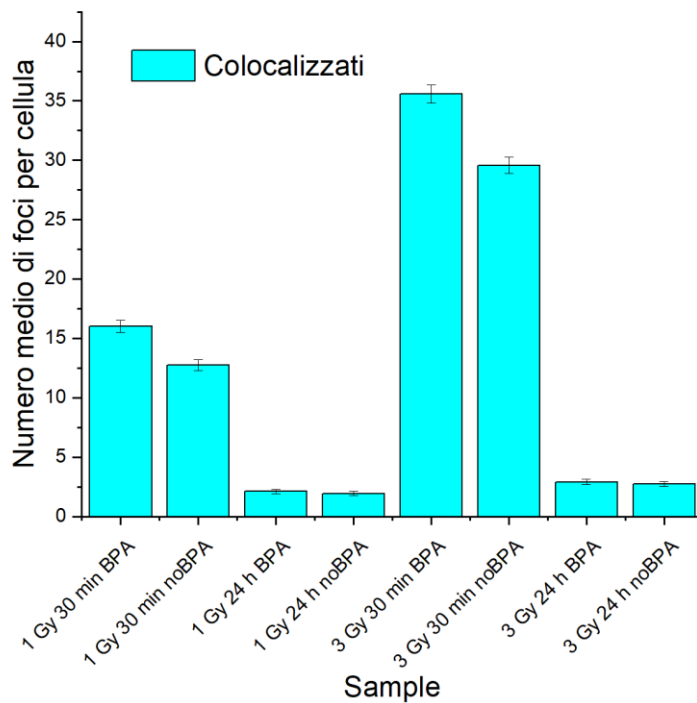


Figura 22. Numero medio di foci colocalizzati per cellula, ottenuto, tramite conteggio manuale.

3.2 Confronto tra l'efficienza di rivelazione dei foci tra conteggio manuale e Metafer

In tabella 3 sono riportati i valori forniti dalla rivelazione automatizzata effettuata tramite il software Metafer per i diversi tipi di campioni; in tabella sono inoltre riportate le differenze percentuali rispetto ai valori misurati con il conteggio manuale così come descritto nella sezione 2.2.

Tabella 3. Risultati del conteggio effettuato tramite il software Metafer, per i diversi tipi di campioni, espresso in numero medio di foci per cellula: (sinistra) γ -H2AX, (centro) 53BP1, (destra) colocalizzati; sono riportati inoltre i valori di variazione percentuale misurati rispetto al conteggio manuale.

Sample	γ -H2AX	$\Delta\% \gamma$ -H2AX	53BP1	$\Delta\% 53BP1$	Colocalizzati	$\Delta\% Colocalizzati$
1 Gy 30 min BPA	13	22 ± 2	15,9	21 ± 2	9,03	44 ± 2
1 Gy 30 min noBPA	12,7	2 ± 4	13,9	20 ± 2	8,13	36 ± 2
1 Gy 24h BPA	4,5	42 ± 10	2,7	13 ± 9	1,12	47 ± 5
1 Gy 24h noBPA	9,1	270 ± 30	3,6	39 ± 11	2,38	23 ± 11
3 Gy 30 min BPA	18,3	$51,4 \pm 1,0$	20,9	$47,7 \pm 1,1$	11,96	$66,4 \pm 0,7$
3 Gy 30 min noBPA	16,8	$45,9 \pm 1,3$	25	25 ± 2	12,65	$57,2 \pm 1,0$
3 Gy 24h BPA	4,2	5 ± 7	2,2	31 ± 5	1,02	65 ± 3
3 Gy 24h noBPA	6,5	88 ± 13	2,4	23 ± 6	1,72	37 ± 5

I dati forniti da Metafer, riportati in figura 23, mostrano a 30 minuti e 24 ore dall'avvenuto fissaggio dei campioni, per entrambe le dosi di esposizione, valori per il numero medio di foci colocalizzati per cellula, tra loro confrontabili, che sembrano non risentire dell'aumento dell'energia rilasciata dal fascio di protoni incidenti; inoltre, il trend previsto dalla teoria della PBCT, risulta rispettato solo per il campione '1Gy 30min' e invertito per tutti gli altri.

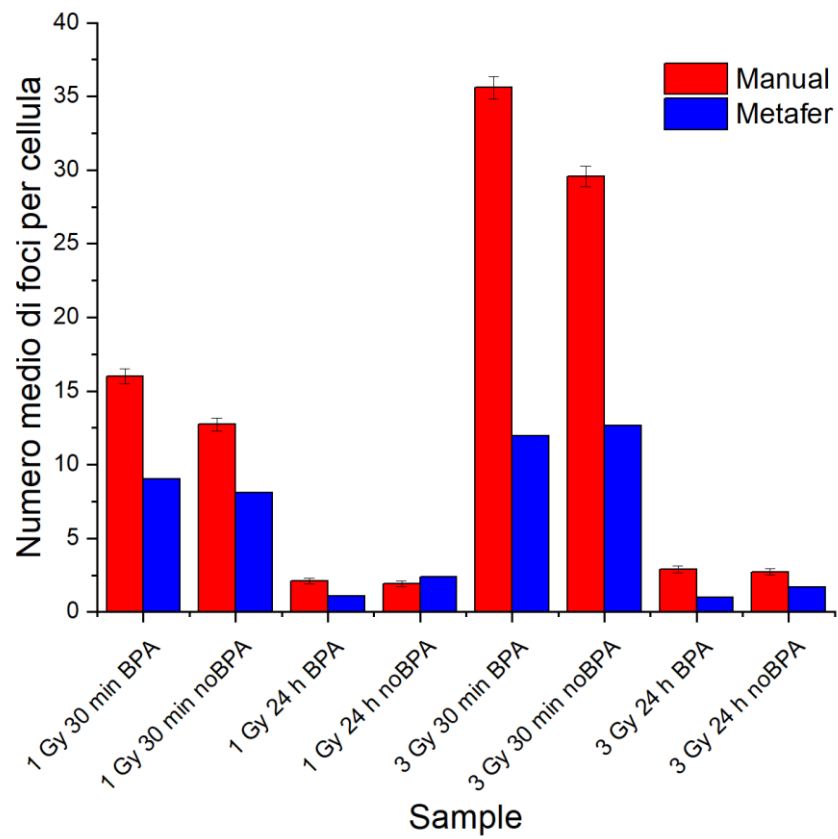


Figura 23. Confronto tra il numero medio di foci colocalizzati per cellula ottenuto, per i diversi tipi di campioni, tramite conteggio manuale (rosso) e conteggio effettuato con software Metafer (blu).

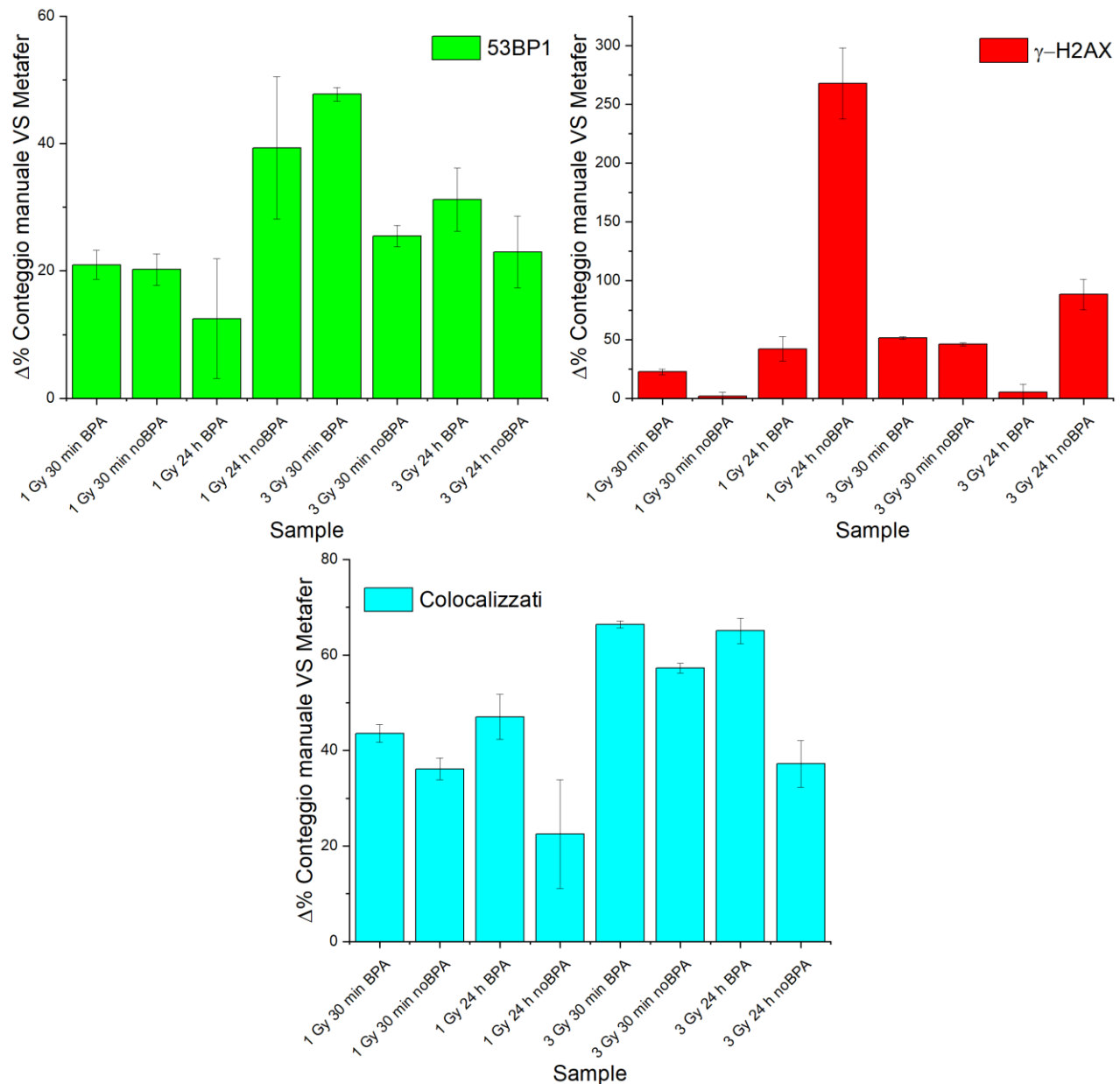


Figura 24. Variazione percentuale del numero medio di foci per cellula tra Metafer e conteggio manuale, per le proteine isolate (53BP1, in alto a sinistra; γ -H2AX, in alto a destra) e colocalizzate (al centro, in basso).

La figura 24 mostra, in termini di differenza percentuale, il confronto tra i valori proposti da Metafer e quelli invece forniti dal conteggio manuale, per il numero medio di foci per cellula, relativi alle due proteine, valutate prima separatamente e poi colocalizzate. Il gap tra i risultati forniti dalle due procedure, trovato per γ -H2AX, sembra ridursi per i foci relativi a 53BP1 (a dimostrazione della maggiore possibilità di accordo tra il software e lo sperimentatore, in virtù della maggiore qualità dell'immagine, relativamente all'individuazione degli spot di 53BP1 rispetto ai foci relativi alla sola proteina γ -H2AX). Il numero medio di foci colocalizzati per cellula, calcolato da Metafer, presenta una sottostima rispetto ai dati ottenuti con il conteggio manuale con variazioni che vanno dal 20% al 70%; le variazioni inoltre non sembrano seguire un

andamento riconoscibile, sia in relazione alla dose che al tempo di fissaggio; pertanto, si è deciso di utilizzare i valori ottenuti dal conteggio manuale come principale metro di riferimento per la valutazione dei risultati ottenuti dall'implementazione della Macro per ImageJ.

3.3 Confronto tra l'efficienza di rivelazione dei foci tra conteggio manuale e Macro di ImageJ

La macro realizzata per il software ImageJ, implementata con il plugin FociPicker-3D, è stata eseguita su tutte le possibili 243 iterazioni dei parametri scelti per l'analisi automatizzata delle immagini (descritta nel paragrafo 2.4.2), alla ricerca del miglior accordo con i risultati ottenuti dal conteggio manuale. Il miglior accordo è stato ottenuto per il seguente pattern di parametri del plugin: *Automatic = 6; Fraction = 0.5; Tolerance = 50; Minimum = 4; Contrast Balance = 0.2*. I risultati ottenuti dal conteggio automatico sono stati riportati in tabella 4.

Tabella 4. Risultati del conteggio automatico realizzato mediante la macro di ImageJ: numero medio di foci colocalizzati per cellula (sinistra) e area media per focus espressa in pixel (centro); sono riportati inoltre i valori di variazione percentuale misurati rispetto al conteggio manuale (destra).

Sample	Colocalizzati	Area (pixel)	$\Delta\%$ Colocalizzati
1 Gy 30 min BPA	$10,6 \pm 0,5$	$34,3 \pm 0,3$	34 ± 4
1 Gy 30 min noBPA	$10,2 \pm 0,5$	$29,6 \pm 0,2$	20 ± 5
1 Gy 24 h BPA	$2,3 \pm 0,2$	$37,5 \pm 0,6$	9 ± 13
1 Gy 24 h noBPA	$2,0 \pm 0,2$	$29,6 \pm 0,5$	2 ± 14
3 Gy 30 min BPA	$13,6 \pm 0,5$	$25,0 \pm 0,2$	62 ± 3
3 Gy 30 min noBPA	$11,1 \pm 0,5$	$29,5 \pm 0,2$	63 ± 3
3 Gy 24 h BPA	$2,9 \pm 0,2$	$55,3 \pm 0,6$	2 ± 11
3 Gy 24 h noBPA	$3,4 \pm 0,3$	$44,1 \pm 0,5$	26 ± 13

La figura 25 mostra il confronto tra i dati ottenuti per il numero medio di foci colocalizzati per cellula tra il conteggio manuale e il conteggio automatico realizzato mediante la macro di ImageJ. In figura 26 è poi riportata la differenza percentuale tra i risultati ottenuti. I dati rivelano che per i campioni fissati a 30 minuti dall'esposizione a 1 e 3 Gy di radiazione, il conteggio automatico sottostima i valori ottenuti dal conteggio manuale di circa il 35% e 20% per i campioni a 1 Gy 30 minuti con e senza BPA, e si ha una sottostima invece del 62-63% relativamente ai campioni a 3 Gy 30 minuti con e in assenza di boro. A 24 ore il numero medio di foci per cellula si riduce per entrambe le dosi di esposizione, e migliora l'accordo con i valori ottenuti dal conteggio manuale: i dati differiscono di circa il 9% e 2% per i campioni a 1 Gy con e senza BPA, mentre si ha una differenza di 2% e 26% per i campioni esposti a 3 Gy di radiazione con e senza BPA. I dati ottenuti dal conteggio automatico mostrano, nonostante la sottostima

descritta, un andamento in accordo con il trend previsto dalla teoria della PBCT, almeno per quanto riguarda il danno iniziale (30 min)

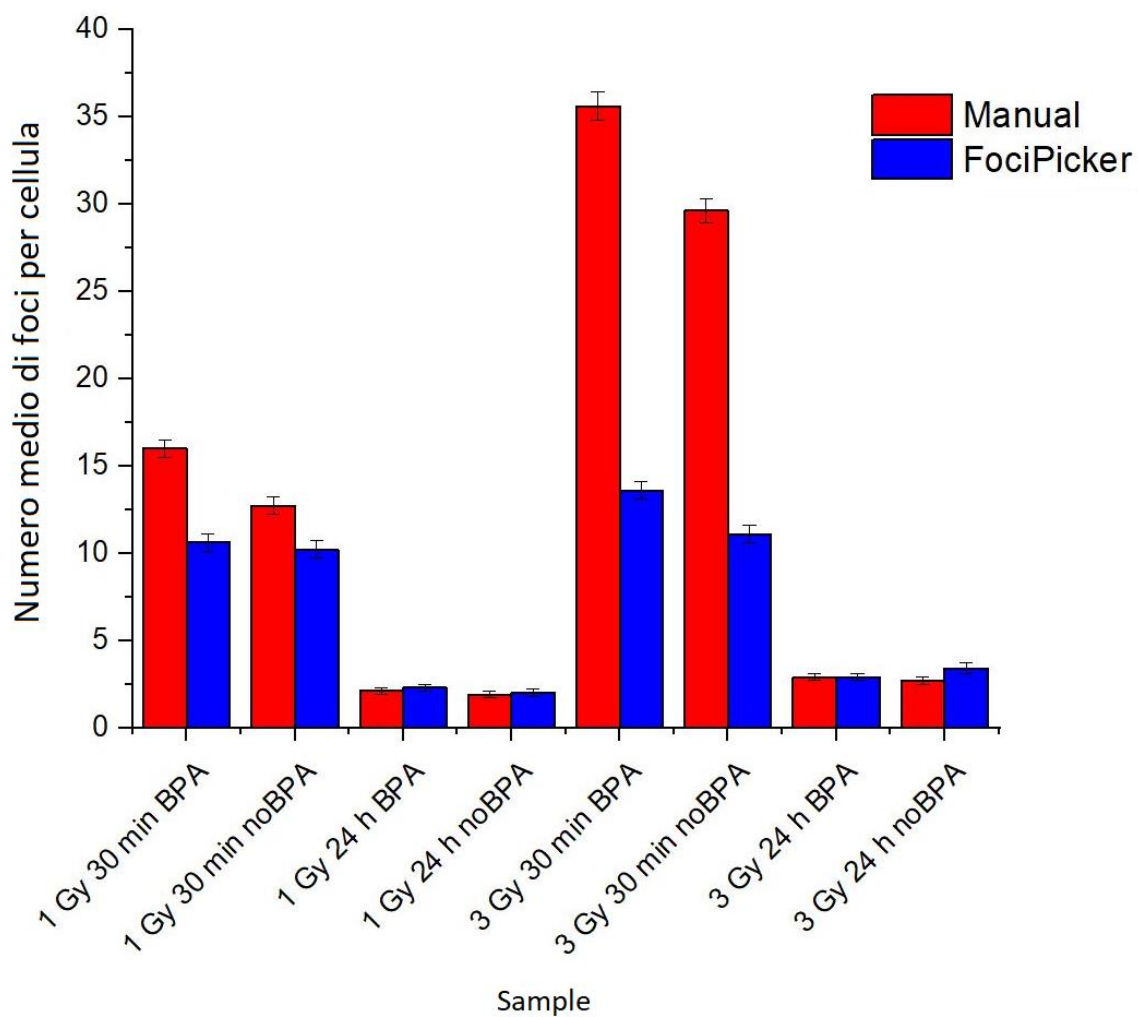


Figura 25. Confronto tra il numero medio di foci colocalizzati per cellula ottenuto, per i diversi campioni, tramite conteggio automatizzato realizzato con la macro di ImageJ implementata con il plugin FociPicker (blu) e conteggio manuale (rosso).

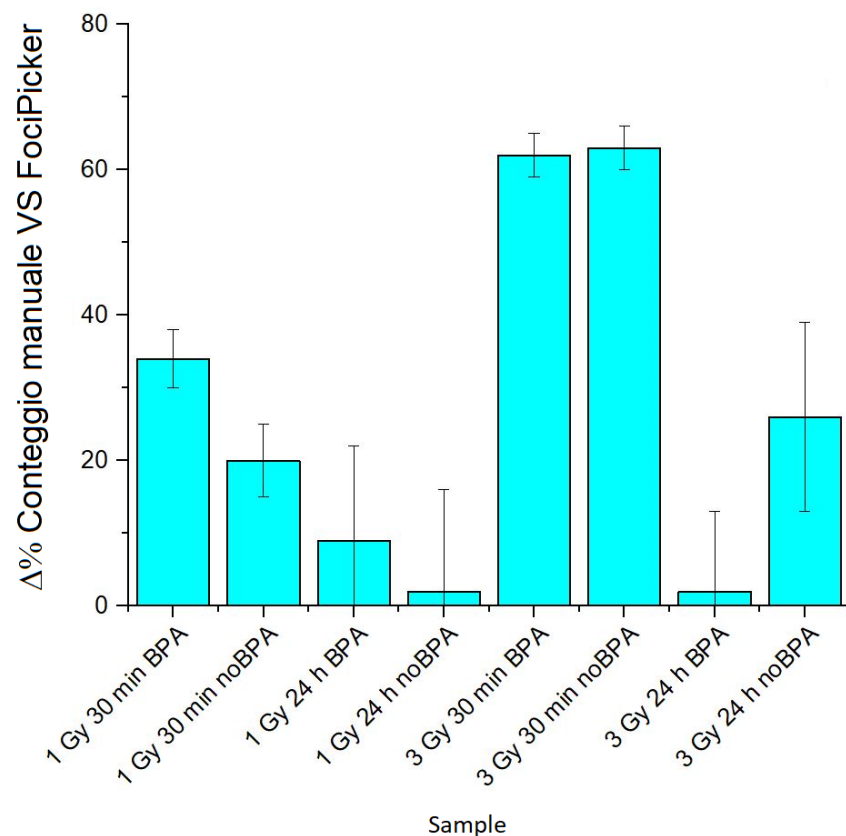


Figura 26. Variazione percentuale del numero medio di foci per cellula tra ImageJ e conteggio manuale, per le proteine colocalizzate.

Il plugin FociPicker-3D consente, come già detto, di ottenere anche una stima dell'area media degli spot: si è dunque deciso di riportare in figura 27 i dati relativi all'area media di ciascun focus, in corrispondenza del set di parametri per il plugin per cui è stato ottenuto il miglior accordo con i dati del conteggio manuale relativamente al numero medio di foci per cellula.

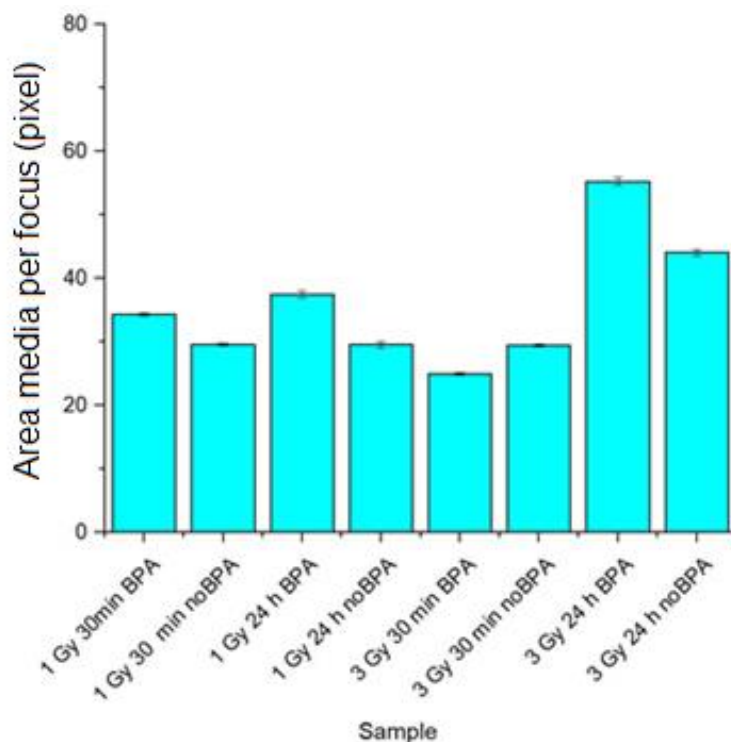


Figura 27. Area media di ciascun focus di proteine colocalizzate per cellula, ottenute per i diversi campioni, mediante analisi automatizzata con il plugin FociPicker.

Le aree medie per focus di proteine colocalizzate ottenute mostrano per i campioni fissati a 30 minuti dall'esposizione a radiazione a 1 e 3 Gy, valori tra loro confrontabili, intorno ai 25-30 pixel, con una chiara tendenza ad una maggiore area nel caso di campioni irraggiati in presenza di BPA (ad eccezione del punto a 3 Gy); Va detto che a 3 Gy il numero di foci indotti è molto elevato e ciò espone l'analisi a maggiori incertezze. A 24 ore dall'esposizione a radiazione l'area media aumenta soprattutto per il campione esposto a 3 Gy: ciò sembrerebbe dimostrare l'entrata in azione dei meccanismi di riparazione del DDR cellulare, che in accordo con la teoria, agirebbe prima sui danni di minore entità per poi passare alla riparazione dei danni clusterizzati di area media maggiore, quelli effettivamente rivelabili all'aumentare del tempo trascorso dall'irradiazione dei campioni. I risultati mostrano poi dati in accordo con il trend previsto dalla teoria della PBCT, con valori per l'area media degli spot maggiore nei campioni pretrattati con boro, a dimostrazione del maggior grado di clusterizzazione del danno provocato dalla produzione di particelle α (a seguito dell'innesco della reazione p-B). Infatti, sia dopo 1 Gy che 3 Gy, l'area media per focus è significativamente maggiore a 24 h nei campioni irraggiati in presenza di BPA.

Conclusioni

Questo lavoro di tesi si colloca nell'ambito della ricerca sulla Proton-Boron Capture Therapy (PBCT), con l'obiettivo di ottimizzare una tecnica automatizzata per il saggio dei foci colocalizzati delle proteine γ -H2AX e 53BP1, una tecnica utilizzata per quantificare il danno radioindotto al DNA. Il razionale è la valutazione dell'efficacia radiobiologica della reazione $^{11}\text{B}(p,3\alpha)$ per potenziare la protonterapia. L'analisi sperimentale è stata realizzata su cellule epiteliali MCF-10A, irradiate in corrispondenza della posizione distale del SOBP, a 1 e 3 Gy, in presenza e in assenza di boro (BPA), utilizzando il fascio di protoni ad energie cliniche presso il CNAO di Pavia nell'ottobre del 2020.

I foci sono stati prima valutati mediante un conteggio manuale, per le due proteine valutate prima separatamente poi colocalizzate, e i risultati sono stati confrontati con i valori forniti dal software Metafer per l'analisi delle immagini ottenute dalla scansione mediante microscopia a fluorescenza. I valori forniti da Metafer sembrano essere in disaccordo con quelli ottenuti dal conteggio manuale, che hanno invece mostrato risultati in linea con quanto atteso per la PBCT. I dati del saggio manuale sono stati quindi utilizzati come principale metro di riferimento per lo sviluppo di una Macro per il free software di analisi immagini ImageJ. La Macro realizzata è stata implementata utilizzando il plugin FociPicker-3D, che, oltre a fornire il numero medio di foci per cellula, consente anche di ottenere una stima dell'area media degli spot valutata in pixel. L'ottimizzazione del saggio automatizzato dei foci colocalizzati è stata realizzata eseguendo il programma su diversi pattern di possibili parametri per il plugin alla ricerca del set che mostrasse risultati per il numero medio di foci per cellula il più possibile vicini a quelli ottenuti dall'analisi manuale. Il pattern scelto ha mostrato valori in generale in accordo con quanto previsto dalla teoria della PBCT, seppure complessivamente in sottostima rispetto ai dati ottenuti dal conteggio manuale preliminare.

I valori ottenuti per le aree medie di ciascun focus di proteine colocalizzate, per il set di parametri finale selezionato, hanno, invece, evidenziato innanzitutto, un'area media maggiore, a parità di dose, passando da 30 minuti a 24 ore dall'esposizione a radiazione: ciò risulta in accordo con la teoria del DDR che prevede il riparo da parte della cellula dapprima dei danni isolati di minore entità, che avranno quindi area media minore, per poi passare alla riparazione dei danni clusterizzati di maggiore entità, che la cellula non è più capace di riparare; tutto ciò quindi a favore di un aumento nel tempo dell'area media degli spot. Allo stesso tempo, i campioni cellulari pretrattati con il carrier di ^{11}B BPA evidenziano un'area media superiore rispetto ai campioni irradiati in assenza di boro: ciò supporta la PBCT. L'accordo è risultato positivo per tutti i campioni esaminati eccetto il campione a "3 Gy 30 minuti", per cui è stata invece osservata un'inversione del trend atteso. I limiti dell'analisi realizzata circa il conteggio del numero medio di foci per cellula, e l'area media degli spot, indicano principalmente la necessità di disporre di un microscopio ad alta risoluzione che

consenta una più chiara individuazione dei foci: ciò garantirebbe innanzitutto una maggiore oggettività dell'analisi manuale, da utilizzare come principale metro di riferimento per la valutazione dei risultati ottenuti invece dall'analisi automatizzata effettuata mediante una qualunque Macro per l'immagine processing, come quella utilizzata in questo lavoro. Soltanto a quel punto sarà possibile chiarire cosa considerare o meno come DSBs, tenuto conto delle problematiche biologiche legate alle dinamiche IRIF descritte nella tesi (che rendono, ad esempio, come appreso in fase di analisi γ -H2AX più aspecifico rispetto a 53BP1).

Altri problemi da considerare sono quelli relativi alla conservazione dei campioni cellulari per periodi di tempo prolungati che potrebbero alterare lo stato di adesione delle sonde fluorescenti agli anticorpi utilizzati nei processi di ibridizzazione cellulare, per l'individuazione a microscopio degli IRIF. A tutto ciò vanno sommati i limiti tecnici dei software utilizzati, che rendono aperta la strada innanzitutto ad ulteriori possibili ottimizzazioni del classifier di Metafer utilizzato per il saggio dei foci; a ciò si aggiunge la possibilità di adattare la Macro ad immagini a maggiore risoluzione (utilizzando lo stesso o altri pattern per i parametri di FociPicker fissati), o di aggiornarla mediante l'implementazione di altri plugin disponibili in letteratura, con l'obiettivo di migliorare l'accordo con i valori manuali ad oggi ottenibili (con le potenze di risoluzione a disposizione), per il numero medio di foci per cellula, unito a risultati in accordo con la PBCT per quanto concerne l'analisi delle aree medie degli spot.

Appendice

A. La formula di Bethe-Bloch: perdita di energia media delle particelle cariche “pesanti”

La formula di Bethe-Bloch descrive la perdita media di energia per distanza percorsa delle particelle cariche ‘pesanti’ (protoni, ioni, α) attraverso la materia o, alternativamente, il potere d’arresto (stopping power) della materia nei confronti della radiazione incidente. Le particelle cariche pesanti, attraversando un materiale, possono perdere energia mediante due processi:

1) le collisioni anelastiche con gli elettroni atomici del materiale (stopping power elettronico); 2) lo scattering elastico dai nuclei bersaglio (stopping power nucleare, che produce il trasferimento di energia dalla particella agli atomi del materiale).

Lo stopping power elettronico, che conferisce il contributo maggiore alla perdita di energia totale della particella carica, è dovuto all’interazione di natura Coulombiana proiettile-bersaglio, tra la particella carica ‘pesante’ incidente e gli elettroni atomici nel materiale, producendo la ionizzazione o l’eccitazione degli atomi del materiale bersaglio. Per gli elettroni (e positroni) la perdita di energia deve tener conto dell’aggiunta di correzioni relativistiche, a causa della loro piccola massa, dell’indistinguibilità rispetto agli elettroni atomici (eventuali effetti di deflessione dalla traccia iniziale non più trascurabili) e di ulteriori perdite per Bremsstrahlung (radiazione e.m. di ‘frenamento’, prodotta dalla decelerazione di una particella carica quando deflessa da un’altra).

$$-\frac{dE}{dx} \left[\frac{\text{MeV}}{\text{cm}} \right] = 4\pi N_A r_e^2 m_e c^2 z^2 \rho \frac{Z}{A} \frac{1}{\beta^2} \left(\ln \frac{2m_e c^2 \gamma^2 \beta^2}{I} - \beta^2 - \frac{\delta}{2} \right)$$

Formula di Bethe-Bloch: z è la carica della particella incidente (in unità di carica elementare); Z , A sono numero atomico e peso atomico dell’assorbitore; $4\pi N_A r_e^2 m_e c^2 = D = 0.3071 \text{ MeV}/(\text{g}/\text{cm}^2)$, con m_e massa dell’elettrone, r_e raggio classico dell’elettrone e N numero di Avogadro; I è l’energia di eccitazione media dell’assorbitore, $I = 16Z^{0.9} \text{ eV}$; $\beta = v/c$; γ , fattore di Lorentz; δ , è un parametro che descrive la schermatura del campo elettrico della particella incidente dovuta alla polarizzazione del mezzo (effetto densità).

Per valori di $\beta < 0,96$, domina il termine $1/\beta^2$; a questo punto la perdita di energia diminuisce rapidamente all’aumentare del momento della particella, sino ad arrivare ad un minimo per $\beta \gamma \simeq 4$, noto come minimo di ionizzazione (MIP) al quale la perdita di energia è la stessa per ogni particella; dopo il MIP la perdita di energia torna ad aumentare come $2\ln \gamma$ nella cosiddetta ‘risalita relativistica’ (relativistic rise), crescita limitata dal termine δ (correzione di densità, importante ad alte energie).

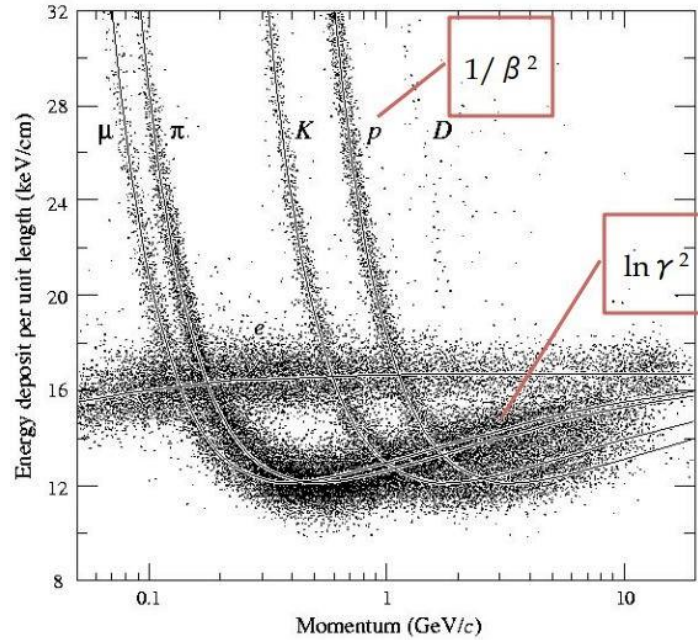


Figura A.1. Perdita di energia media per unità di percorso in funzione del momento della particella, per diversi tipi di particelle derivata dalla formula di Bethe-Bloch [31].

La relazione di inversa proporzionalità tra perdita di energia media della particella carica e momento, descritta dalla formula di Bethe-Bloch, implica che la perdita di energia vari man mano che la particella penetra all'interno del materiale, raggiungendo un massimo ad una determinata profondità, in corrispondenza del picco di Bragg (Bragg peak). Le curve che mostrano la dipendenza della perdita di energia (stopping power del materiale) dE/dx , in funzione della distanza percorsa dalla particella carica nel materiale (path length) sono dette curve di Bragg (figura A.2). Il fatto che la maggior parte della deposizione di dose si abbia in corrispondenza del picco di Bragg fa sì che in protonterapia la calibrazione energetica del fascio di protoni incidenti renda il range di quest'ultimo adattabile alla regione tumorale da trattare.

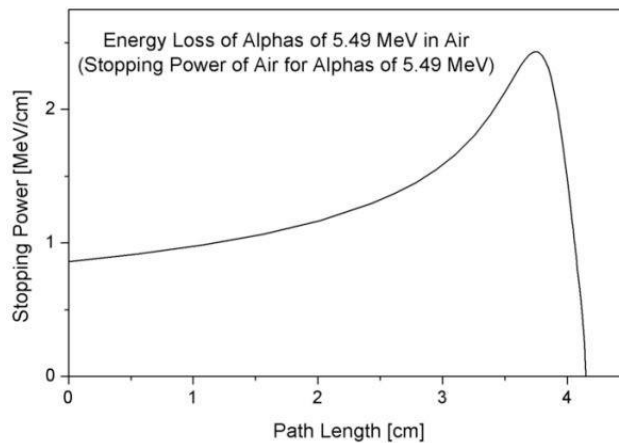


Figura A.2. Curva di Bragg: al picco di Bragg le particelle perdono una quantità di energia circa costante per unità di lunghezza, per poi essere rallentate a $\beta\gamma < 4$: la perdita di energia cresce con $1/\beta^2$ e le particelle si portano rapidamente a riposo [31].

B. Protocollo di preparazione dei campioni per il foci assay

In seguito, è riportato in dettaglio il protocollo utilizzato per la preparazione dei campioni utilizzati in questo lavoro:

Supporto utilizzato per la coltura cellulare: camera di coltura cellulare “Slide flask”;

Soluzioni utilizzate:

- *Soluzione di permeabilizzazione (PB):* 0.25 % Triton X-100 in PBS

o 1 ml per campione → 10 ml (per 10 flask) = 25 µl Triton X-100 + 10 ml PBS;

- *Soluzione di bloccaggio (BB):* 10 % goat serum, 1 % BSA, 0.3 M Glycine, 0.1 % Tween 20 in PBS

o Per 100 ml → 10 ml siero di capra, 1 g BSA, 2.25 g Glycine, 0.1 ml Tween 20 + 90 ml PBS;

o 3 ml richiesti per campione;

o Filtrare, in condizione di sterilità prima dell'uso;

- *Soluzione di lavaggio (WB):* 0.2 % Triton X-100 in PBS

o Per 100 ml → 0.2 ml Triton X-100 + 99.8 ml di PBS;

o 12 ml richiesti per campione (1.5 ml per il lavaggio) (→ 4 lavaggi);

- *PBS:* 10.5 ml richiesti per campione (1.5 ml per il lavaggio)

Reagenti:

Anticorpi primari

Anti γ -H2AX – Merck-Millipore – 05-636

- mouse – monoclonale – 200 µg (1 mg/ml);

- Diluizione - 1:1000 → 1 µg/ml → 1 µl + 999 µl;

Anti 53BP1 – ThermoFisher-Invitrogen - PA1-16565

- Rabbit – policlonale – 100 µl (1 mg/ml);

- Diluizione – 1:1000 → 1 µg/ml → 1 µl + 999 µl;

Anticorpi secondari

Anti-mouse (γ -H2AX) – Alexa Fluor 555, TF-Invitrogen A21422

- Goat anti-mouse – 2 mg/ml; 0,5 ml;

- 2 µg/ml → 1 µl + 999 µl PBS;

Anti-rabbit (53BP1) – Alexa Fluor 488, TF-Invitrogen A11008

- Goat anti-rabbit - 2 mg/ml; 0,5 ml;

- 4 µg/ml → 2 µl + 998 µl PBS;

ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI – TF-Invitrogen P36931

- 2 ml;

Non versare alcun liquido direttamente sul monostrato – sempre sul lato vuoto o sul fondo.

Fissaggio

- 1) Rimuovere il mezzo di coltura dalle slide flask;
- 2) Effettuare per due volte uno sciacquo del contenuto delle flask con PBS (1.5 ml);
- 3) Aggiungere 1 ml di soluzione al 4 % di paraformaldeide e lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente;
- 4) Effettuare per tre volte uno sciacquo del contenuto delle flask con PBS (1.5 ml) – a questo punto le cellule possono essere conservate alla temperatura di 4° in PBS;

Permeabilizzazione

- 5) Rimuovere il PBS ed aggiungere 1 ml di soluzione di permeabilizzazione ad ogni slide flask e lasciare agire per 15 minuti a temperatura ambiente;
- 6) Rimuovere la soluzione e sciacquare le flask con PBS;

Bloccaggio

- 7) Rimuovere il PBS ed aggiungere 1 ml di soluzione di bloccaggio per ogni flask;
- 8) Incubare per 1 h a 37° C;

Ibridizzazione con anticorpi

- 9) Rimuovere la soluzione di bloccaggio (non effettuare sciacqui!);
- 10) Aggiungere 1 ml di 0,75 – 1 µg/ml mix di anticorpi primari (diluizione 1: 1000) in BB;
 - a. Per ogni campione: 0,75 µl di Anti gH2AX + 1 µl di Anti 53BP1 + 998 µl BB (agitare gentilmente per mescolarli);
 - b. Prima dell'utilizzo tutte le provette contenenti gli anticorpi devono essere tenute qualche minuto (circa 10 minuti) a temperatura ambiente e poi brevemente centrifugate (30 s);
- 11) Incubare per 1 h a 37° (oppure per un'intera notte alla temperatura di 4°);
- 12) Rimuovere la soluzione con gli anticorpi e sciacquare per 4 volte in 1,5 ml di soluzione di lavaggio (WB) – 5 minuti per risciacquo;
- 13) Rimuovere la soluzione di lavaggio ed aggiungere 1ml del mix di anticorpi secondari in BB – da questo momento lavorare con luci basse, senza esposizione diretta dei campioni);
 - a. 2 µg/ml Anti-mouse (γ-H2AX) e 4 µg/ml Anti-rabbit (53BP1)
 - b. Per ogni campione: 1 µl Anti-mouse (γ-H2AX) + 2 µl Anti-rabbit (53BP1) + 997 µl BB (agitare gentilmente per mescolarli);
- 14) Incubare per 1 h a 37° C al riparo dalla luce;
- 15) Rimuovere la soluzione con gli anticorpi e sciacquare per 4 volte in 1,5 ml di soluzione di lavaggio (WB) – 5 minuti per risciacquo;

Post-ibridizzazione

- 16) Rimuovere la soluzione di lavaggio ed aggiungere 1.5 ml di PBS in ogni flask;
- 17) Una per una, rimuovere la parte superiore delle slide flask, lasciare defluire il PBS scrollando dolcemente ed asciugare il PBS residuo intorno agli angoli utilizzando della carta (evitando di toccare la superficie dove sono presenti le cellule (non è necessario che le slide sia perfettamente asciutte, uno strato sottile di PBS dovrebbe sempre essere presente));)
- 18) Aggiungere 2-3 gocce di "Prolong Gold antifade" con DAPI sulle slide;
- 19) Adagiare sulle slide i coprivetrini da 18x50 mm e lasciare attaccare per qualche minuto;

- 20) Premere gentilmente i coprivetrini per eliminare le bolle d'aria eventualmente presenti;
- 21) Lasciare le slide (posizionate orizzontalmente) al riparo dalla luce fino al giorno successivo;
- 22) Sigillare le slide lungo i bordi utilizzando dello smalto per le unghie trasparente;
- 23) Le slide possono essere osservate al microscopio oppure conservate in freezer a -20° C;

C. Macro di ImageJ con FociPicker plugin

```
//FOCI SCORING

// INITIALIZATION

string_results = "Result of ";

red_string = " (red)";

green_string = " (green)";

blue_string = " (blue)";

file_results_1Gy_30min_BPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_1Gy_30min_BPA.csv";

file_results_1Gy_30min_noBPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_1Gy_30min_noBPA.csv";

file_results_1Gy_24h_BPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_1Gy_24h_BPA.csv";

file_results_1Gy_24h_noBPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_1Gy_24h_noBPA.csv";

file_results_3Gy_30min_BPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_3Gy_30min_BPA.csv";

file_results_3Gy_30min_noBPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_3Gy_30min_noBPA.csv";

file_results_3Gy_24h_BPA = "_ResultsCNAO_MCF10_102020_3Gy_24h_BPA.csv";

file_results_3Gy_24h_noBPA = "Results_CNAO_MCF10_102020_3Gy_24h_noBPA.csv";

filepath_folder = "C:/Users/valri/Google Drive/File Tesi Rocco Mottareale/20211028_CNAO_MCF10_DISTAL_2020_10/";

filepath_subfolder_part_1Gy_24h_BPA = "1Gy_24h_BPA/";

filepath_subfolder_part_1Gy_24h_noBPA = "1Gy_24h_noBPA/";

filepath_subfolder_part_1Gy_30min_BPA = "1Gy_30min_BPA/";

filepath_subfolder_part_1Gy_30min_noBPA = "1Gy_30min_noBPA/";

filepath_subfolder_part_3Gy_24h_BPA = "3Gy_24h_BPA/";

filepath_subfolder_part_3Gy_24h_noBPA = "3Gy_24h_noBPA/";

filepath_subfolder_part_3Gy_30min_BPA = "3Gy_30min_BPA/";

filepath_subfolder_part_3Gy_30min_noBPA = "3Gy_30min_noBPA/";

filepath_subfolder_1Gy_24h_BPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_1Gy_24h_BPA;

filepath_subfolder_1Gy_24h_noBPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_1Gy_24h_noBPA;

filepath_subfolder_1Gy_30min_BPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_1Gy_30min_BPA;

filepath_subfolder_1Gy_30min_noBPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_1Gy_30min_noBPA;

filepath_subfolder_3Gy_24h_BPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_3Gy_24h_BPA;

filepath_subfolder_3Gy_24h_noBPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_3Gy_24h_noBPA;
```

```

filepath_subfolder_3Gy_30min_BPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_3Gy_30min_BPA;

filepath_subfolder_3Gy_30min_noBPA = filepath_folder+filepath_subfolder_part_3Gy_30min_noBPA;

// STRING FOR FOCIPICKER

fp_str1 = "background=";

fp_str2 = " uniform=";

fp_str3 = " automatic=";

fp_str3bis = "automatic_";

fp_str4 = " minitype=";

fp_str5 = " minisetting=";

fp_str5bis = " _minisetting_ ";

fp_str6 = " tolerancesetting=";

fp_str6bis = " _tolerancesetting_ ";

fp_str7 = " minimum=";

fp_str7bis = " _minimum_ ";

fp_str8 = " voxelx=1.000 voxely=1.000 voxelz=1.000 contrast=";

fp_str8bis = " _contrast_ ";

fp_str9 = " useztolerance=No ztolerance=5 useshapevalidation=No focishaper=6 computingthread=1";

fp_str9bis = " _";

// PARAMETERS

par1_background = "automatic";

// par1_background = "uniform";

// par1_background = "balanced";

par2_uniform = "1500"; // 6 worked

par3_automatic = "6";

par4_minitype = "RelativetoMaximum";

//par4_minitype = "AbsoluteBrightness";

par5_minisetting = "0.5"; // from 0 to 1

par6_tolerance = "50"; // from 0 to 100

par7_minimum = "4";

par8_contrast = "0.2"; // from 0 to 1

foci_picker_string =
fp_str1+par1_background+fp_str2+par2_uniform+fp_str3+par3_automatic+fp_str4+par4_minitype+fp_str5+par5_minisetting+fp_str6+par6_toleran
ce+fp_str7+par7_minimum+fp_str8+par8_contrast+fp_str9;

// NR NUCLEI TO EXAMINATE

num_cell = 50;

// 1 Gy 30 min BPA Distal

for (i=1; i<(num_cell+1); i++) {

```

```

// FOLDER AND FILE NAME DEFINITION

// MAIN

filename = "Foci_CNAO_1020_MCF_BPA_1Gy_30min_Dist~F."+i+"-"+i+". RGB.TIF";

complete_filename = filepath_subfolder_1Gy_30min_BPA+filename;

open(complete_filename);

selectWindow(filename);

makeRectangle(2,2,288,288);

run("Crop");

run("Split Channels");

filename_red = filename + red_string;

filename_green = filename + green_string;

filename_blue = filename + blue_string;

setThreshold(1, 255);

selectWindow(filename_red);

run("Convert to Mask");

selectWindow(filename_green);

run("Convert to Mask");

selectWindow(filename_blue);

run("Convert to Mask");

run("Fill Holes");

imageCalculator("AND create", filename_red,filename_green);

filename_red_results = string_results+filename_red;

filename_green_results = string_results+filename_green;

imageCalculator("AND create", filename_red_results,filename_blue);

filename_red_results_results = string_results+filename_red_results;

selectWindow(filename_red_results);

close();

selectWindow(filename_red_results_results);

rename("Mask");

selectWindow(filename_red);

close();

selectWindow(filename_green);

close();

selectWindow(filename_blue);

close();

open(complete_filename);

```

```

selectWindow(filename);

makeRectangle(2,2,288,288);

run("Crop");

run("Split Channels");

imageCalculator("AND create", filename_red,"Mask");

selectWindow(filename_red);

close();

imageCalculator("AND create", filename_green,"Mask");

selectWindow(filename_green);

close();

s1 = "c1=[";
s2 = "]" c2=[";
s3 = "]" c3=[";
s4 = "]" create";

merge_string = s1+filename_red_results+s2+filename_green_results+s3+filename_blue+s4;

run("Merge Channels...", merge_string);

selectWindow("Composite");

rename(filename);

//run("8-bit");

run("Foci Picker3D", foci_picker_string);

run("Close All");}

// SAVE FILES

results_folder = "C:/Users/valri/Desktop/Valerio/Assegno Napoli/Metafer/FociPicker/Foci_CNAO_MCF10_1020/Colocalization/";

results_string =
fp_str3bis+par3_automatic+fp_str5bis+par5_minisetting+fp_str6bis+par6_tolerance+fp_str7bis+par7_minimum+fp_str8bis+par8_contrast+fp_str9bis;

//results_save_path = results_folder+file_results_1Gy_30min_BPA;

results_save_path = results_folder+results_string+file_results_1Gy_30min_BPA;

saveAs(file_results_1Gy_30min_BPA, results_save_path);

// CLOSE ALL THE WINDOWS

selectWindow("Log");

//run("Close");

selectWindow("Results");

run("Close");

//selectWindow("ROI Manager");

//run("Close");

```

***Io stesso script è stato eseguito su tutti gli altri campioni cellulari**

Bibliografia

- [1] L. Taylor, J.A. Nickoloff, N. Sharma. "Clustered DNA double-strand breaks: Biological effects and relevance to cancer radiotherapy". *Genes*, 11 (1-99), 2020.
- [2] N. Shikazono, E. Sage. "Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis". *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 2017.
- [3] R.D. Stewart, A.G. Georgakilas, P. O'Neill. "Induction and repair of clustered DNA lesions: what do we know so far?". *Radiation Research*, 180 (1), 2013.
- [4] A. Brahme. "Physical and biologic aspects on the optimum choice of radiation modality". *Acta Radiological Oncology*, 21 (6), 1982.
- [5] M. Krämer, M. Durante. "Ion beam transport calculations and treatment plans in particle therapy". *The European Physical Journal*, 60, 2010.
- [6] S. Nielsen, N. Bassler, L. Grzanka, J. Swakon, P. Olko, C.N. Andreassen, J. Overgaard, J. Alsner & B. Singers Sørensen. "Differential gene expression in primary fibroblasts induced by proton and cobalt-60 beam irradiation". *Acta Oncologica*, 56 (11), 2017.
- [7] Aarhus University Hospital (Arhus Sygehus), Lars Hjorth Præstegaard "Medical application of proton accelerators". Accessibile online: <https://slideplayer.com/amp/10693091>.
- [8] Fondazione CNAO. Accessibile online: <https://fondazionecnao.it>.
- [9] Y. Do-Kun, J-Y. Jung, T.S Suh. "Application of proton boron fusion reaction to radiation therapy: A Monte Carlo simulation study". *Applied Physics Letters*, 105 (22), 2014.
- [10] M.H. Sikora, H.R. Weller. "A New Evaluation of the $^{11}\text{B}(\text{p},3\alpha)$ Reaction Rates". *Journal of Fusion Energy*, 35, 2016.
- [11] M. Durante, G. Grossi, M. Pugliese, L. Manti, M. Nappo, G. Gialanella. "Single-Charged Particle Damage to Living Cells: A New Method to Detect Traversals Based on Track-Etch Detectors". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section*, 94 (3), 1994.
- [12] R. Barth, A. Soloway, R. Fairchild. "Boron neutron capture therapy of cancer". *Cancer Research*, 50 (4), 1990.
- [13] D. Margarone, G. Petringa, L. Giuffrida, A. Minopoli, A. Picciotto, G. Russo, F. Cammarata, P. Pisciotta, G.A.P. Cirrone, L. Manti. "First experimental proof of proton boron capture therapy (p-Bct) to enhance protontherapy effectiveness". *Scientific reports [Nature Publishing Group]*, 8 (1), 2018.
- [14] T.T. Puck, P.I. Marcus. "Action of X-rays on mammalian cells," *Journal of Experimental Medicine*, 103 (5), 1956.

- [15] R.M. Anderson et al. "Complex chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker of exposure to high-LET alpha particles". *International Journal of Radiation Biology*, 76 (1), 2000.
- [16] S. Agosteo, M. Calvaruso, F.P. Cammarata, R. Catalano, M. Ciocca, G.A.P. Cirrone, V. Conte, G. Cuttone, A. Facoetti, G.I. Forte, L. Giuffrida, G. Magro, D. Margarone, L. Minafra, G. Petringa, G. Pucci, V. Ricciardi, E. Rosa, G. Russo, L. Manti, P. Blaha, C. Feoli. "The proton-boron reaction increases the radiobiological effectiveness of clinical low- and high-energy proton beams: Novel experimental evidence and perspectives". *Frontiers in Oncology*, 11, 2021.
- [17] N. Khaledi, X. Wang, R. Hosseinabadi, F. Samiei. "Is the proton–boron fusion therapy effective?" *Journal of Radiotherapy in Practice*, 20 (2), 2021.
- [18] D. Mazzucconi, D. Bortot, A. Pola, A. Fazzi, L. Cazzola, V. Conte, G.A.P. Cirrone, G. Petringa, G. Cuttone, L. Manti, et al. "Experimental investigation at CATANA facility of n-10B and p-11B reactions for the enhancement of proton therapy". *Physica Medica*, 89, 2021.
- [19] R. Buompane, G. Crescente, G. Cuttone, L. Gialanella, K. Michaličková, S. Pacifico, G. Porzio, L. Manti, V. Ricciardi, P. Bláha. "A new low-energy proton irradiation facility to unveil the mechanistic basis of the proton-boron capture therapy approach". *Applied Sciences*, 11 (24), 2021.
- [20] S.J. Boulton, S. Panier. "Double-strand break repair: 53bp1 comes into focus". *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15 (1), 2014.
- [21] I. Brandsma, D.C. Gent. "Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act". *Genome integrity*, 3 (1), 2012.
- [22] N. Hamada, G. Schettino, G. Kashino, M. Vaid, K. Suzuki, S. Kodama, B. Vojnovic, M. Folkard, M. Watanabe, B.D. Michael, K.M. Prise. "Histone H2AX Phosphorylation in Normal Human Cells Irradiated with Focused Ultrasoft X Rays: Evidence for Chromatin Movement during Repair". *Radiation Research*, 166 (31–38), 2006.
- [23] I.Y. Belyaev. "Radiation-induced DNA repair foci: Spatio-temporal aspects of formation, application for assessment of radiosensitivity and biological dosimetry". *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704 (1), 2010.
- [24] K. Rothkamm, S. Barnard, E.A. Ainsbury, J. Al-hafidh, J-F. Barquinero, C. Lindholm, J. Moquet, M. Perälä, S. Roch-Lefèvre, H. Scherthan, H. Thierens, A. Vral, V. Vandersickel. "Manual versus automated γ -H2AX foci analysis across five European laboratories: Can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident?". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 756 (1-2), 2013.

- [25] K. Rothkamm, S. Barnard, J. Moquet, M. Ellender, Z. Rana, S. Burdak Rothkamm. "DNA damage foci: Meaning and significance". *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56 (6), 2015.
- [26] G. Du. "3dand2dparticlecounter". Institute of Modern Physics CAS China *Java, First Version: 2010-04-16(multi – thead); Second Version: 2012-01-16.*
- [27] C.A. Schneider, W. S. Rasband, K.W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods*, 9 (7), 2012.
- [28] N. Lengert, J. Mirsch, R.N. Weimer et al. "AutoFoci, an automated highthroughput foci detection approach for analyzing low-dose DNA double-strand break repair". *Scientific Reports*, 8 (1), 2018.
- [29] S. Oeck, N.M. Malewicz, S. Hurst, J. Rudner, V. Jendrossek. "The Focinator - a new open-source tool for high-throughput foci evaluation of DNA damage". *Radiation Oncology*, 4 (10), 2015.
- [30] W. Friedland, C. Greubel, V. Hable, R. Krücken, A. Kugler, L. Tonelli, A.A. Friedl, G. Dollinger, G. Du, G.A. Drexler. "Spatial dynamics of DNA damage response protein foci along the ion trajectory of high-let particles". *Radiation Research*, 176 (6), 2011.
- [31] Carlin, Checchia, Pisent. "[Introduzione ai rivelatori di particelle] Parte I: la perdita di energia delle particelle cariche". AA 2011/2012. Accessibile online: <https://www2.pd.infn.it/~carlin/riv/Slides/parte1.pdf>.

Ringraziamenti

Al Prof. Manti e al Dott. Ricciardi, per i loro insegnamenti, la loro pazienza e disponibilità.

Ai miei genitori e mio fratello Daniele, per i loro sacrifici quotidiani e vicinanza.

A Dalila per essere sempre al mio fianco ogni giorno.