Indice

Introduzione

Spesso, quando si auspicano nuove cure contro il cancro, si parla di questa malattia come di qualcosa da cui mai nessuno è guarito. Ma la realtà, fortunatamente, è diversa. La maggior parte dei pazienti con melanoma e circa la metà delle persone sottoposte a terapia per tumori interni guarisce completamente. Quasi la metà delle guarigioni avviene in seguito ad un trattamento radioterapico da solo o congiuntamente ad un intervento chirurgico.

Accanto alla radioterapia convenzionale con raggi X ed elettroni si stanno sviluppando nuove tecniche di irraggiamento con adroni, i quali hanno il vantaggio di offrire una alta selettività balistica e una maggior Efficacia Biologica Relativa (RBE). La protonterapia è divenuta pratica clinica per vari tipi di tumore, mentre per particelle più pesanti quali gli ioni Carbonio esistono ancora pochi studi clinici completi, anche se i primi tattamenti, in Giappone e in Germania, hanno dato risultati promettenti.

In questa tesi si è cercato di capire quale fosse il meccanismo di inattivazione cellulare per adroni; attraverso lo studio dell'interazione delle particelle con la materia si è tentato di collegare quantità fisiche, come la dose, ad effetti biologici come la sopravvivenza delle cellule. Nella definizione dei piani di trattamento un aspetto cruciale è infatti l'inclusione quantitativa dello RBE degli ioni, che dipende dal tipo di cellula e dalla carica e energia della particella incidente. Specificatamente, in questa tesi si è implementato un modello che calcola l'RBE di ioni Carbonio, al fine di poter passare nei piani di trattamento dalle superfici di isodose, che definiscono i volumi in cui viene depositata la stessa dose fisica, alle superfici di isoeffetto cioè i volumi in cui si ottiene lo stesso effetto in termini di sopravvivenza cellulare.

Nel capitolo 1 vengono descritte le principali interazioni delle radiazioni con la materia.

Nel capitolo 2 sono analizzate in dettaglio gli effetti della radiazione su un tessuto con i vari fattori che influenzano la radiosensibilità.

Nel capitolo 3 si presenta la adroterapia come soluzione da alcuni problemi presenti nella radioterapia e si analizzano due modelli per il calcolo dello RBE di ioni.

Nel capitolo 4 viene analizzato in dettaglio il modello di Scholz e Kraft, utilizzato in questa tesi per calcolare lo RBE di ioni Carbonio e viene studiata una sua implementazione per tener conto della specificità delle cellule da irradiare.

Nel capitolo 5 l'algoritmo per il calcolo dello RBE viene applicato alla determinazione della sopravvivenza di diversi tipi di cellule irradiate con fasci monocromatici di ioni Carbonio di diverse energie e a differenti profondità nel tessuto. L'algoritmo viene quindi confrontato con i dati sperimentali disponibili in letteratura e ne viene analizzata approfonditamente la dipendenza dai parametri. Inoltre viene eseguito uno studio per determinare come la dose e la sopravvivenza varino usando valori diversi per la sezione d'urto di frammentazione per gli ioni Carbonio. Infine allo scopo di descrivere meglio la popolazione di cellule da sottoporre ad irraggiamento viene descritto un modello di sviluppo cellulare che fornisce alla simulazione informazioni relative alle dimensioni e alla radiosensibilità delle cellule.

Capitolo 1

Interazione delle radiazioni con la materia

Gli effetti biologici determinati dal passaggio della radiazione nel tessuto devono essere correlati con la deposizione fisica dell'energia nello stesso; considerato che, in questa tesi, si è concentrata l'attenzione sul ruolo terapeutico degli ioni Carbonio, in questo capitolo verranno descritte le interazioni a cui vanno incontro nella materia le radiazioni direttamente ionizzanti. Si precede però prima questa trattazione con una breve analisi della perdita di energia delle radiazioni indirettamente ionizzanti.

1.1 Le interazioni delle radiazioni indirettamente ionizzanti con la materia

Si indicano col nome di radiazioni indirettamente ionizzanti quelle che non depositano direttamente la loro energia nella materia, bensì mettono in moto particelle cariche secondarie in grado di produrre ionizzazione.

Le radiazioni indirettamente ionizzanti di maggior importanza pratica sono i raggi X e γ[1], che mettono in moto elettroni e positroni, e i neutroni, i quali, interagendo con i nuclei, provocano l'emissione di particelle cariche o neutre e di raggi γ.

[1] La distinzione tra raggi X e γ riguarda soltanto la loro origine. Si parla di raggi X per la radiazione elettromagnetica di origine atomica e di raggi γ per quella che accompagna le transizioni nucleari.

1.1.1 Raggi X e γ

A seconda dell'energia e del mezzo attraversato i raggi X e γ vanno incontro ad un numero notevole di processi: i più importanti sono l'effetto fotoelettrico, l'effetto Compton e la produzione di coppie, meno importanti sono la diffusione coerente (o Rayleigh) e l'effetto fotonucleare; altri processi quali la diffusione elastica nucleare, la fotoproduzione di mesoni, la diffusione Delbruck, etc... sono trascurabili.

Effetto fotoelettrico L'effetto fotoelettrico consiste nell'urto tra un fotone ed un atomo, con assorbimento del fotone ed emissione di un elettrone di energia E_e pari alla differenza tra l'energia del fotone hν e l'energia di legame dell'elettrone E_b.

La sezione d'urto del processo richiede una trattazione teorica piuttosto complessa, tanto che non esiste un'espressione analitica che sia in accordo con i dati sperimentali per ogni energia.

Per $E_b \ll h\nu \ll m_e c^2$ e per elettroni nella shell K di un atomo con numero atomico Z si può usare la sezione d'urto:

$$\sigma_{ph} = 4\sqrt{2}\sigma_T \alpha^4 Z^5 \left(\frac{m_e c^2}{h\nu}\right)^{\frac{7}{2}} \tag{1.1}$$

dove ν è la frequenza del fotone, h la costante di Planck, α è la costante di struttura fine, σ_T la sezione d'urto classica di Thomson, m_e la massa dell'elettrone e c la velocità della luce nel vuoto.

Il processo fotoelettrico è dominante alle basse energie ($h\nu \lesssim 0.5\ MeV$) e negli elementi pesanti, per i quali è ancora apprezzabile ad energie di 4-5 MeV.

Effetto Compton Consiste nell'interazione tra un fotone ed un elettrone libero, a patto che l'energia del fotone sia molto maggiore dell'energia di legame dell'elettrone $h\nu \gg E_b$.

L'espressione analitica per la sezione d'urto è di Klein e Nishina:

$$\sigma_C = \pi r_e^2 \frac{1}{\varepsilon}\left[\left(1 - \frac{2(\varepsilon+1)}{\varepsilon^2}\right)\ln(2\varepsilon+1) + \frac{1}{2} + \frac{4}{\varepsilon} - \frac{1}{2(2\varepsilon+1)^2}\right] \tag{1.2}$$

con $\varepsilon = \frac{h\nu}{m_e c^2}$ e r_e il raggio classico dell'elettrone.

L'effetto Compton domina per energie comprese tra 0.8 e 4 MeV.

Creazione di coppie Avviene nel campo coulombiano di un nucleo o di un elettrone e consiste nella trasformazione dell'energia di un fotone in una coppia elettrone-positrone.

Per $1 \ll \frac{h\nu}{m_e c^2} \ll \frac{1}{\alpha Z^{\frac{1}{3}}}$ si può usare la sezione d'urto:

$$\sigma_{pc} = \alpha r_e^2 Z^2 \left[\frac{28}{9} \ln \left(\frac{2h\nu}{m_e c^2} \right) - \frac{218}{27} \right] \tag{1.3}$$

e per $\frac{h\nu}{m_e c^2} \gg \frac{1}{\alpha Z^{\frac{1}{3}}}$, tenendo conto dell'effetto di screening:

$$\sigma_{pc} = \alpha r_e^2 Z^2 \left[\frac{28}{9} \ln \left(\frac{183}{Z^{\frac{1}{3}}} \right) - \frac{218}{27} \right] \tag{1.4}$$

Il processo avviene per $h\nu \geq m_e c^2$ ed è dominante per energie superiori a 5 MeV.

Sezione d'urto totale A partire dai processi precedenti si può definire una sezione d'urto totale per l'interazione dei fotoni data dalla somma delle sezioni d'urto parziali:

$$\sigma_{tot} = \sigma_{ph} + \sigma_C + \sigma_{pc} \tag{1.5}$$

di cui è mostrato un andamento in fig.1.1.

L'assorbimento di fotoni nel mezzo ha un andamento esponenziale e il numero N di fotoni che non hanno subito interazioni in una distanza l è:

$$N = N_0 e^{-\mu l} \tag{1.6}$$

dove N_0 è il numero iniziale di fotoni e il **coefficiente di attenuazione lineare** è definito come:

$$\mu = \rho \frac{N_A}{A} \sigma_{tot} \tag{1.7}$$

con ρ densità e A numero di massa dell'assorbitore; N_A è il numero di Avogadro.

1.1.2 Neutroni

Data l'assenza di carica i neutroni procedono senza interazioni nella materia fino a quando non incontrano un nucleo e provocano reazioni nucleari. Interagendo con un nucleo[2] ${}_Z\mathrm{X}^A$ un neutrone crea un nucleo composto in uno stato eccitato:

[2] Con ${}_Z X^A$ si indica un nucleo dell'elemento X con numero atomico Z e numero di massa A.

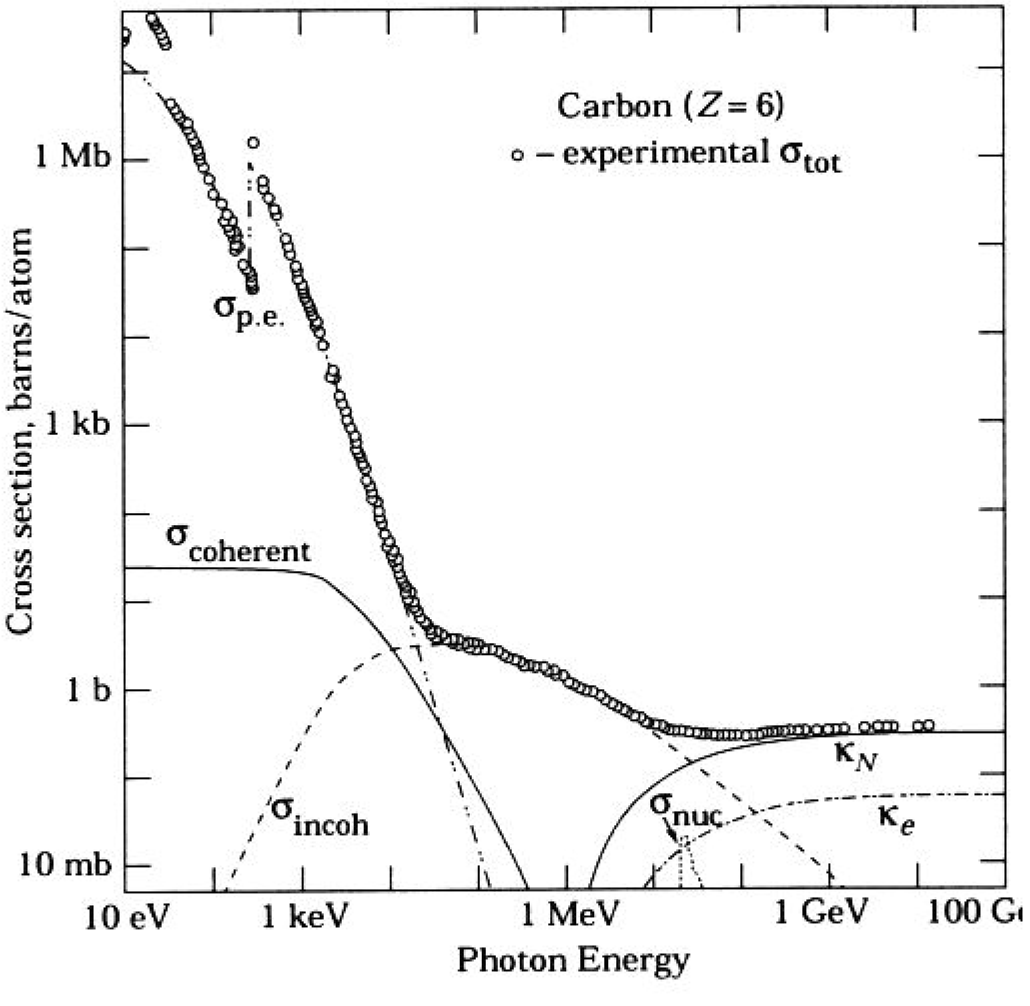

Figura 1.1: Contributi delle sezioni d'urto dei singoli processi alla sezione d'urto totale in Carbonio in funzione dell'energia dei fotoni.

$$_ZX^A +_0 n^1 = (_ZX^{A+1})^* \tag{1.8}$$

che in un tempo compreso tra i 10^{-12} e 10^{-20} s si diseccita emettendo particelle a diverse energie.

A seconda dell'energia dei neutroni sono possibili diversi canali di reazione, quali ad es.:

diffusione elastica	(n,n)
diffusione inelastica	(n,n) (n,nγ) (n,2n)
cattura radiativa	(n,γ)
emissione di particelle cariche	(n,p) (n,He) ...
fissione	(n,f)
spallazione	(n,sciame)

1.2 Le interazioni delle radiazioni direttamente ionizzanti con la materia

Si dicono radiazioni direttamente ionizzanti quelle per cui la perdita di energia avviene per processi quasi-continui di ionizzazione ed eccitazione.

Questo è caratteristico delle particelle cariche le quali interagiscono elettromagneticamente con la materia principalmente attraverso:

collisioni coulombiane inelastiche con gli elettroni,

collisioni coulombiane elastiche con i nuclei.

Nel primo caso la perdita di energia è dovuta ad eccitazione e ionizzazione. Il riassestamento degli atomi eccitati avviene tramite emissione di fotoni o di elettroni Auger. Talvolta gli elettroni liberati durante la ionizzazione hanno essi stessi energia sufficiente per provocare ulteriore ionizzazione; in questo caso è consuetudine chiamarli raggi δ.

Nel secondo caso si ha la diffusione laterale del proiettile senza apprezzabili perdite di energia.

Inoltre particelle cariche perdono energia per irradiazione di fotoni (bremsstrahlung) in maniera inversamente proporzionale alla loro massa.

1.2.1 Particelle cariche leggere: elettroni

Particelle cariche leggere come gli elettroni, a causa della diffusione multipla, hanno un percorso molto tortuoso nella materia, come si vede ad esempio in fig.1.2, dove sono rappresentate le tracce di elettroni di 5 e 10 keV in acqua.

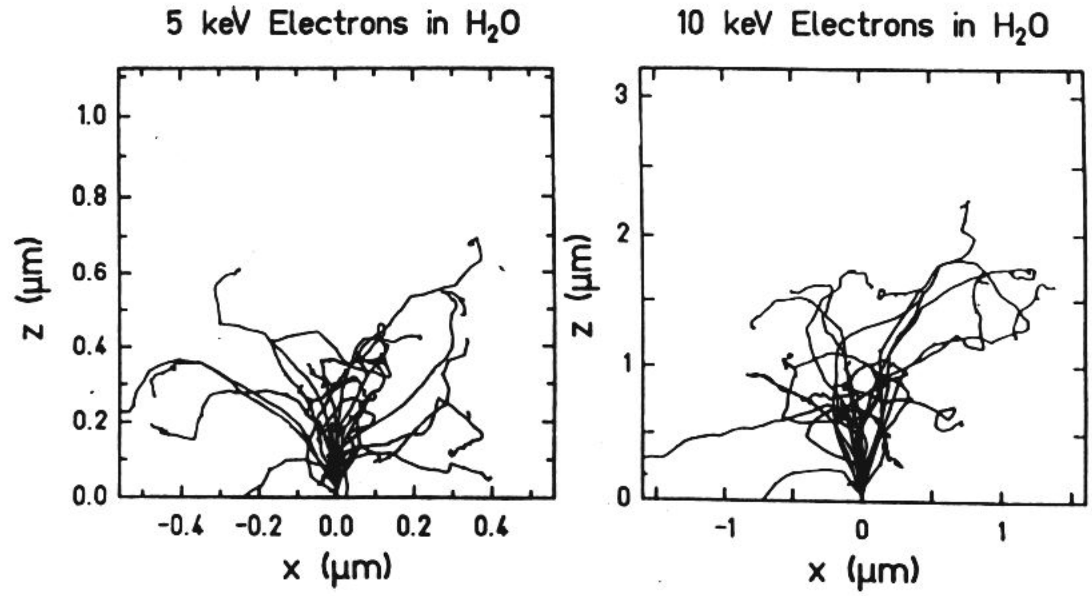

Figura 1.2: Cammini calcolati per elettroni di 5 e 10 keV in acqua.

Al di sotto dei 200 eV lo scattering elastico è il processo dominante.

La perdita di energia degli elettroni nella materia è dovuta principalmente alla bremsstrahlung e alla ionizzazione.

Si definisce il **potere frenante**, ovvero il valor medio della perdita di energia per unità di percorso, come somma dei due contributi:

$$\frac{\partial E}{\partial x} = \left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{ion} + \left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{brem} \tag{1.9}$$

La perdita di energia per ionizzazione, derivata dalla formula di Bethe-Bloch in un mezzo di numero atomico Z e numero di massa A di un elettrone di velocità v, si può scrivere come:

$$-\left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{ion} = \frac{2\pi e^4 N_A}{m_e c^2}\frac{1}{\beta^2}\frac{Z}{A}\rho\left(\ln\frac{2m_e c^2\beta^2\gamma^{\frac{3}{2}}}{I} - \frac{1}{2}\ln 8 + \frac{1}{16} - \frac{\delta}{2} - \frac{C}{Z}\right) \tag{1.10}$$

dove con I viene indicato il potenziale di ionizzazione medio effettivo del mezzo assorbitore, con δ si tiene conto della polarizzazione del mezzo (effetto densità), con $\frac{C}{Z}$ della schermatura dovuta agli elettroni, $\beta = \frac{v}{c}$ e $\gamma = \sqrt{1-\beta^2}$.

La perdita di energia per bremsstrahlung si scrive invece come:

$$-\left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{brem} = 4N_A\alpha\frac{Z^2}{A}r_e^2 E \ln\frac{183}{Z^{\frac{1}{3}}} \tag{1.11}$$

Introducendo la **lunghezza di radiazione** X_0 del mezzo si usa riscrivere l'ultima equazione come:

$$-\left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{brem} = \frac{E}{X_0} \tag{1.12}$$

La perdita di energia per ionizzazione decresce come $\frac{1}{\beta^2}$ mentre quella per frenamento cresce con E, per cui, come si vede in fig.1.3, a basse energie predomina la ionizzazione ed ad alte la bremsstrahlung.

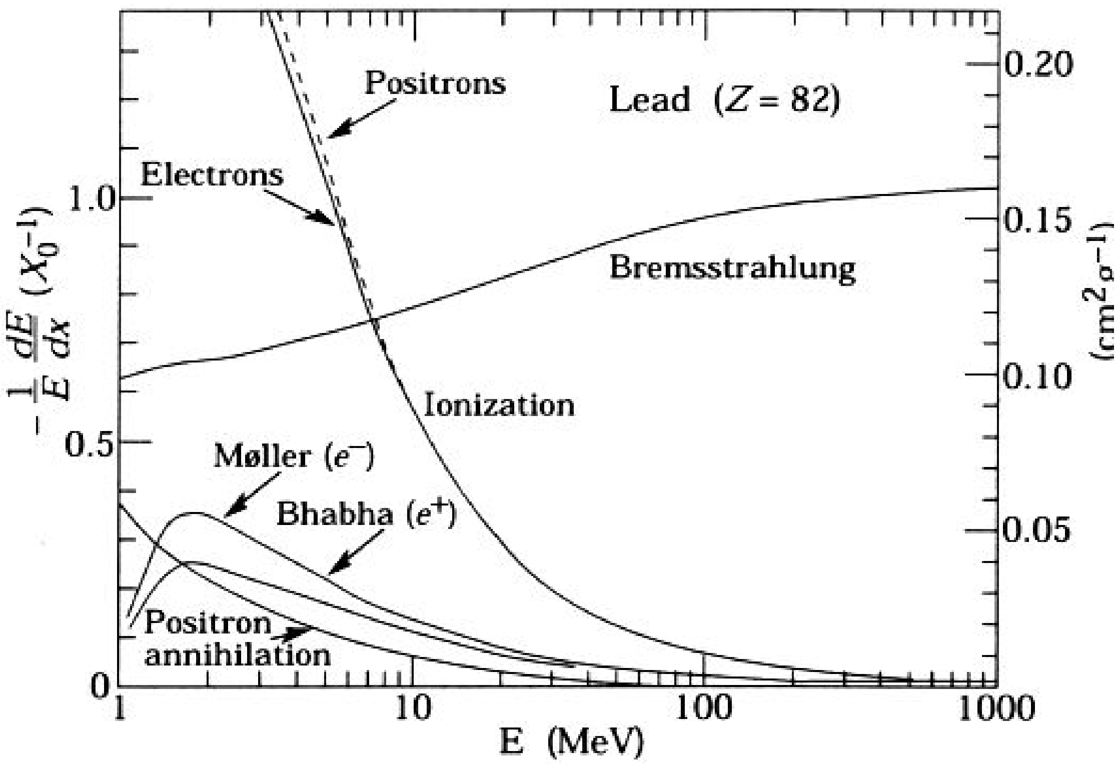

Figura 1.3: Frazione di energia persa per lunghezza di radiazione in Piombo in funzione dell'energia degli elettroni o dei positroni.

1.2.2 Particelle cariche pesanti

Discorso più ampio è riservato in questa tesi al passaggio di particelle cariche pesanti nella materia e in particolare anche alle eventuali interazioni nucleari.

Ionizzazione ed eccitazione La prima formulazione quantistica della ionizzazione è di Bethe (1930), successivamente espansa da Bloch (1933) in quella che ora conosciuta **formula di Bethe-Block** per la ionizzazione, valida anche a velocità relativistiche:

$$-\left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{ion} = \frac{4\pi e^4 N_A}{m_e c^2}\frac{z^2}{\beta^2}\frac{Z}{A}\rho\left(\ln\frac{2m_e c^2\beta^2\gamma^2}{I} - \beta^2 - \frac{\delta}{2} - \frac{C}{Z}\right) \tag{1.13}$$

dove ze è la carica della particella incidente.

L'andamento del potere frenante in funzione dell'energia è mostrato in fig.1.4.

A basse energie la perdita di energia diventa grande ($\propto 1/E$) ed è ciò che si osserva verso la fine del percorso di uno ione nella materia (picco di Bragg) prima che l'energia della particella diventi inferiore all'energia di ionizzazione.

La perdita di energia dipende quindi primariamente solo dalla velocità e dalla carica del proiettile; per questo, di solito, introducendo la variabile $\xi = \rho x$, si riscrive la formula in maniera semplificata come:

$$-\left(\frac{\partial E}{\partial \xi}\right)_{ion} = z^2\frac{Z}{m}f(\beta) \tag{1.14}$$

dove m è la massa del nucleo del materiale e $f(\beta)$ una funzione che dipende solo dalla velocità $\beta = \frac{v}{c}$.

A basse energie ($\lesssim 0.1\ MeV/u$) bisogna anche tener conto dell'interazione col campo elettromagnetico del nucleo che porta ad un leggero aumento del potere frenante. L'andamento completo della perdita di energia per uno ione Carbonio in acqua in un grande intervallo di energia è mostrata in fig.1.5.

Il percorso delle particelle cariche pesanti nella materia è soggetto a fluttuazioni statistiche; si usa definire il **range** come la distanza raggiunta dal 50% di tali particelle; integrando la formula di Bethe-Bloch si ottiene:

$$R(E_0) = -\int_{E_0}^{0}\left(\frac{\partial E}{\partial x}\right)_{ion}^{-1} dE \tag{1.15}$$

Inserendo la 1.14 si può descrivere il range in funzione della velocità come:

$$R(\beta) = \frac{m}{z^2 Z}F(\beta) \tag{1.16}$$

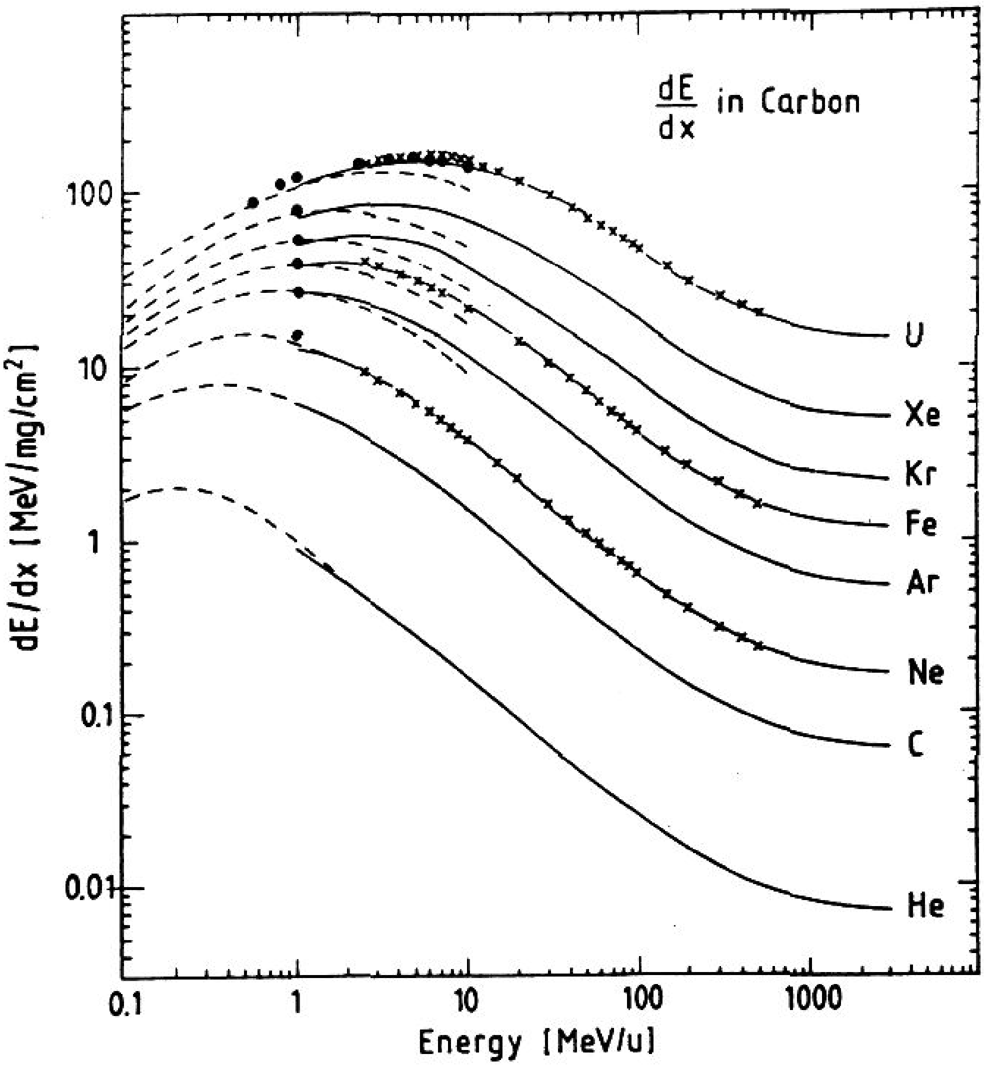

Figura 1.4: Paragone fra le perdite di energia in Carbonio per diversi ioni.

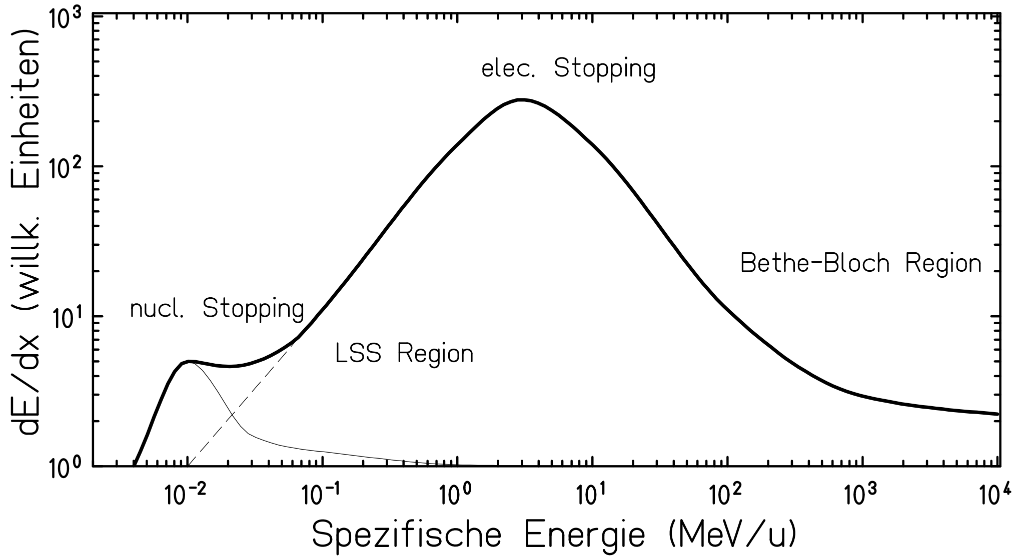

Figura 1.5: Confronto tra i contributi di perdita di energia nucleare ed elettronica in funzione dell'energia.

dove $F(\beta)$ è anch'essa una funzione che dipende solo dalla velocità.

La fig.1.6 mostra la deposizione di energia in funzione della distanza per ioni Carbonio di diverse energie in acqua; la maggior parte dell'energia viene depositata in prossimità della fine del percorso dello ione.

Emissione di raggi δ Data la particolare importanza degli elettroni secondari quali portatori di danno biologico alle cellule, viene qui analizzata l'emissione dei raggi δ nella materia dovuta a particelle cariche pesanti.

L'energia massima degli elettroni eccitati dal passaggio dello ione di massa M e velocità $\beta = \frac{v}{c}$ si può esprimere come:

$$T_{max} = \frac{2m_e c^2 \beta^2 \gamma^2}{1 + 2\gamma \frac{m_e}{M} + \left(\frac{m_e}{M}\right)^2} \tag{1.17}$$

Questa espressione è stata calcolata con l'**approssimazione di urto binario** (binary encounter approximation: BEA) in cui si suppone che tutta l'energia cinetica della particella carica pesante venga trasferita all'elettrone libero nell'urto.

La distribuzione di elettroni secondari per $T \gg I$ è data da:

$$\frac{\partial^2 N}{\partial T \partial x} = \frac{1}{2} K z^2 \frac{Z}{A} \frac{1}{\beta^2} \frac{F(T)}{T^2} \tag{1.18}$$

dove F(T) è una funzione che dipende dallo spin e approssima l'unità per $T \ll I$ e $K = 4\pi N_A r_e^2 m_e c^2$.

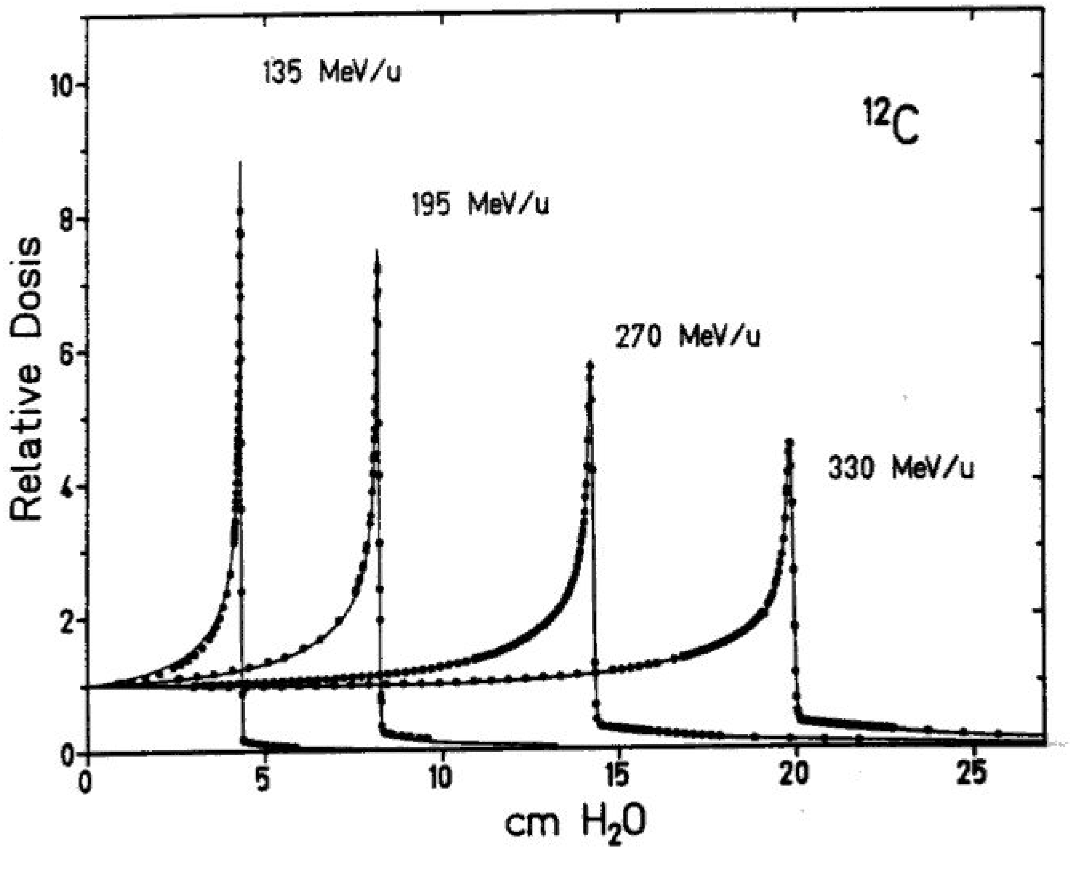

Figura 1.6: Perdita di energia in funzione della distanza in acqua per fasci monocromatici di ioni Carbonio. Gli ioni con energia cinetica maggiore hanno un percorso più lungo nella materia.

Per un elemento di numero atomico Z si è ricavata una espressione per il potenziale medio di ionizzazione espressa dall'equazione:

$$I(Z) = \begin{cases} 19.0 & \text{per} \quad Z = 1 \\ 11.2 + 11.7Z & \text{per} \quad 2 \leq Z \leq 13 \\ 52.8 + 8.71Z & \text{per} \quad Z > 13 \end{cases} \tag{1.19}$$

Interazioni nucleari inelastiche Nella terapia con ioni ad alte energie l'effetto della frammentazione nucleare causa un'alterazione della curva di deposizione di energia nel mezzo in funzione della profondità, infatti oltre a venire a mancare particelle a carica maggiore, e quindi con LET più alto, si formano frammenti a basso Z con range più lungo, che depositano la propria energia oltre il picco di Bragg.

Ad alte energie le collisioni nucleari non sono più trascurabili; l'urto tra due nuclei è elastico, se non si modificano dopo l'urto, inelastico se si osservano nuove particelle (frammenti).

I frammenti sono prodotti in collisioni periferiche, dove solo pochi nucleoni partecipano all'urto, e sono emessi ad angoli piccoli nella direzione di incidenza del proiettile con circa la sua stessa velocità.

Ad energie nel centro di massa comprese tra i GeV e il centinaio di GeV si può assumere che la sezione d'urto rimanga pressoché costante al variare dell'energia. Se si fanno incidere $N_Z(0)$ particelle su di un assorbitore si può scrivere il numero di proiettili N_Z che arrivano ad una distanza x come:

$$N_Z(x) = N_Z(0)e^{-\frac{x}{\lambda_Z}} \tag{1.20}$$

La lunghezza di interazione λ_Z è definita a partire dalla sezione d'urto totale:

$$\sigma_Z^{tot} = \frac{1}{N_M \lambda_Z} \tag{1.21}$$

dove N_M è il numero di atomi per unità di volume dell'assorbitore di massa atomica M e densità ρ:

$$N_M = \frac{N_A \rho}{M} \tag{1.22}$$

In fig.1.7 è mostrata la sezione d'urto totale per urto protone-protone ottenuta sperimentalmente.

A partire dalle sezioni d'urto sperimentali di adrone-adrone si possono costruire le sezioni d'urto adrone-nucleo utilizzando, ad esempio, il **modello di Glauber**:

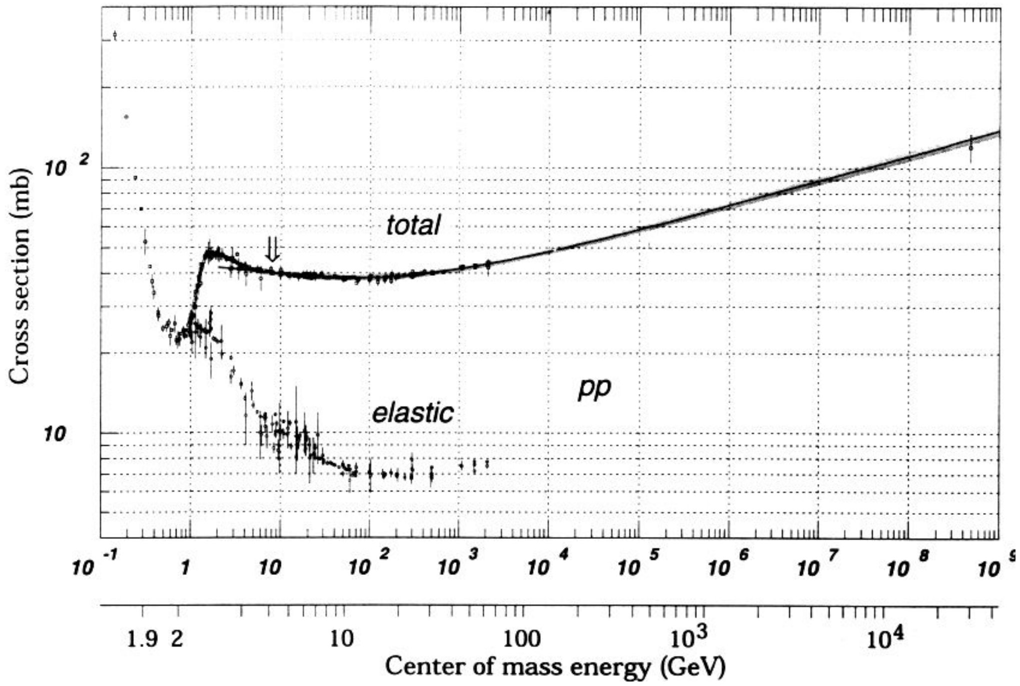

Figura 1.7: Sezione d'urto totale ed inelastica per urti pp in funzione dell'energia al centro di massa o dell'impulso nel sistema del laboratorio.

$$\sigma_{inel}^{hN} = \int \left(1 - e^{-\sigma_{inel}^{hh} T(b)}\right) db \tag{1.23}$$

dove T(b) è una funzione chiamata **spessore nucleare** per cui esistono diverse parametrizzazioni teoriche.

Nel limite di sezioni d'urto σ_{inel}^{hh} piccole non c'è shadowing e:

$$\sigma_{inel}^{hN} \approx A\sigma_{inel}^{hh} \tag{1.24}$$

nel limite opposto per sezioni d'urto grandi, c'è screening completo e la sezione d'urto è proporzionale all'area del bersaglio:

$$\sigma_{inel}^{hN} \approx \pi R_A^2 \tag{1.25}$$

col raggio del nucleo $R_A = r_0 A^{1/3}$ e raggio del nucleone r_0=1.47 fm.

Valori della sezione d'urto per reazioni nucleo-nucleo possono essere ottenute con un semplice **modello di sovrapposizione**.

Una parametrizzazione molto usata per la sezione d'urto di due nuclei N_1 e N_2 di numeri di massa A_1 e A_2 ad un energia intorno alle decine di GeV/u è quella data da Westfall [14]:

$$\sigma^{N_1 N_2} = \pi r_0^2 \left(A_1^{1/3} + A_2^{1/3} - \delta\right)^2 \tag{1.26}$$

con δ=1.12.

Ad energie tra il centinaio di MeV e le decine di GeV solo pochi nucleoni del proiettile e della targhetta partecipano effettivamente alla collisione dinamica (i **partecipanti**) mentre gli altri non interagiscono (gli **spettatori**). I partecipanti del nucleo proiettile e del nucleo targhetta si sovrappongono in un volume geometrico (**volume d'interazione**) in cui quasi tutta l'energia del proiettile si trasforma in calore, raggiungendo altissime temperature. Gli spettatori, invece, rimangono relativamente freddi e possono essere eccitati dall'energia di superficie o da qualche partecipante che li raggiunge.

Usando il modello di Glauber, Sihver [15] scrive la sezione d'urto protone-nucleo, per energie del protone $E_p \geq 200\ MeV$, come:

$$\sigma^{pN} = \pi r_0^2 \left[1 + A_N^{1/3} - b_0 \left(1 + A_N^{-1/3}\right)\right]^2 \tag{1.27}$$

dove A_N è il numero atomico del nucleo e:

$$b_0 = 2.247 - 0.915 \left(1 + A_N^{-1/3}\right) \tag{1.28}$$

Per le reazioni nucleo-nucleo esiste una formulazione simile alla precedente, sempre ricavata da Sihver:

$$\sigma^{N_1 N_2} = \pi r_0^2 \left[A_{N_1}^{1/3} + A_{N_2}^{1/3} - b_0 \left(A_{N_1}^{-1/3} + A_{N_2}^{-1/3} \right) \right]^2 \tag{1.29}$$

con:

$$b_0 = 1.581 - 0.876 \left(A_{N_1}^{-1/3} + A_{N_2}^{-1/3} \right) \tag{1.30}$$

In tab.1.8 sono indicati alcuni valori per la lunghezza di interazione λ_z in acqua per nuclei di diverse energie calcolati a partire dalle misure di attenuazione, ottenute al GSI (Geselleschaft für Scwerionenforschung) di Darmstadt [16]; da qui si sono ottenute le sezioni d'urto di frammentazione mostrate in fig.1.9 che concordano con il modello di Sihver.

Nucleo	$E_c(MeV/u)$	λ_z (mm)
^{20}Ne	405	166
^{19}Ne	400	163
^{18}F	671	153
^{16}O	300	215
^{16}O	469	202
^{16}O	672	193
^{15}O	463	199
^{14}N	303	209
^{14}N	674	199
^{12}C	305	248
^{12}C	676	237
^{10}B	676	223

Figura 1.8: Liberi cammini medi per ioni leggeri di energia cinetica E$_c$ in acqua.

Per quanto riguarda le sezioni d'urto parziali, ovvero le probabilità dei possibili stati finali, esiste una relazione semiempirica, formulata da Silberberg e Tsao sulle basi di un lavoro di Rudstam [21] [22]:

$$\sigma = \sigma_0 f(A) f(Z) e^{-P\Delta A} e^{-R(Z - SA + TA^2)^\nu} \omega \eta \xi \tag{1.31}$$

in cui σ_0 è un fattore di normalizzazione, Z e A sono il numero atomico e di massa del prodotto, $-P\Delta A$ descrive la diminuzione di σ con l'aumentare di ΔA, che è la differenza tra il numero di massa del bersaglio e del frammento. $f(A)$ e $f(Z)$ intervengono nel caso di bersagli ad alto Z. $e^{-R(Z-SA+TA^2)^\nu}$ è la distribuzione delle sezioni d'urto per la produzione di isotopi, con R e S

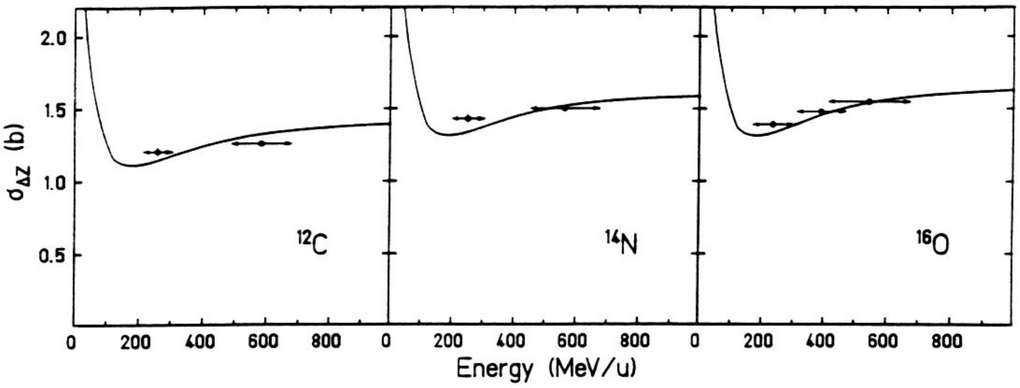

Figura 1.9: Sezione d'urto totale per ioni C, Ne e O in acqua. I risultati sperimentali sono ottenuti da Schall [16] mentre le linee sono il modello di Sihver.

che sono parametri della distribuzione e T è una correzione sul numero di neutroni. Il parametro ω è legato al numero di livelli stabili del frammento prodotto, η dipende dalla parità di protoni e netroni del nucleo prodotto e ξ è legato all'emissione evaporativa dei frammenti leggeri.

Capitolo 2

Radiobiologia

In questo capitolo l'attenzione è focalizzata nel tentativo di collegare le quantità fisiche misurabili come l'energia depositata, la ionizzazione o la dose, all'effetto ultimo che si vuole ottenere irradiando cellule tumorali: la loro morte.

Questo è in effetti un punto molto delicato che vede la sovrapposizione di molte discipline diverse come fisica, biologia e oncologia.

Anche se la ricerca in questo campo è ancora in completa evoluzione, si cerca qui di dare un piccolo contributo di sintesi della materia.

2.1 Effetti fisici e chimici delle radiazioni

Il passaggio di radiazioni ionizzanti nel tessuto produce molecole ionizzate o eccitate; poiché un organismo vivente è composto per lo più di acqua ($70-85\%$), i processi più probabile sono quelli di *radiolisi*:

$$H_2O \overset{radiazione}{\rightsquigarrow} H_2O^+ + e^- \tag{2.1}$$

ed *eccitazione*:

$$H_2O \overset{radiazione}{\rightsquigarrow} H_2O^* \tag{2.2}$$

delle molecole d'acqua. Questi processi avvengono in regioni molto vicine alla traccia in un tempo $\lesssim 10^{-15}$ s dal passaggio della radiazione.

Le tre specie, $\mathrm{H_2O^+}$, $\mathrm{H_2O^*}$ e $\mathrm{e^-}$, iniziano a diffondere nel mezzo e possono dare origine ai seguenti fenomeni:

a) in $\sim 10^{-14}$ s una molecola d'acqua ionizzata interagisce con una molecola vicina:

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH^\bullet \tag{2.3}$$

b) la molecola d'acqua eccitata si libera dell'energia in eccesso allontanando un elettrone oppure dissociandosi in un tempo caratterizzato dai periodi vibrazionali ($\sim 10^{-14}$ s) della molecola:

$$H_2O^* \rightarrow \begin{cases} H_2O^+ + e^- \\ H^\bullet + OH^\bullet \\ H_2 + O^\bullet \end{cases} \tag{2.4}$$

c) gli elettroni generati dalla ionizzazione o dalla dissociazione dell'acqua dissipano la loro energia cinetica in collisioni e quando sono sufficientemente rallentati vengono catturati dalle molecole di H_2O (in circa $\sim 10^{-11}$ s) le quali, data la loro polarità, tendono a disporsi con gli atomi di idrogeno, piú positivamente carichi, verso l'elettrone, e gli atomi di ossigeno lontano da esso (vedi fig.2.1a). In questa configurazione l'elettrone prende il nome di *elettrone acquoso* (e^-_{aq}) e costituisce una specie molto reattiva:

$$H_2O + e^-_{aq} \rightarrow H_2O^- \tag{2.5}$$

Le due molecole H_2O^+e H_2O^- create in 2.4 e 2.5 sono instabili e si dissociano dando uno ione e un radicale libero:

$$H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH^\bullet \tag{2.6}$$

$$H_2O^- \rightarrow H^\bullet + OH^- \tag{2.7}$$

Dopo $\sim 10^{-11}$ s dal passaggio della particella carica rimangono quattro specie chimicamente attive $H_3O^+, OH^\bullet, H^\bullet$ e e^-_{aq}; $\mathrm{H_2}$ non reagisce ulteriormente e O forma perossido d'idrogeno stabile.

$OH^\bullet, H^\bullet$ e e^-_{aq} sono *radicali liberi* [23], atomi o molecole elettricamente neutri aventi l'orbita più esterna non completa. Tali radicali sono altamente reattivi poiché tendono ad accoppiare l'elettrone spaiato con un altro simile di un altro radicale, oppure ad eliminare l'elettrone con una reazione di trasferimento.

I reagenti diffondono nell'acqua in moto termico per una distanza media λ:

$$\lambda = \sqrt{6\tau D} \tag{2.8}$$

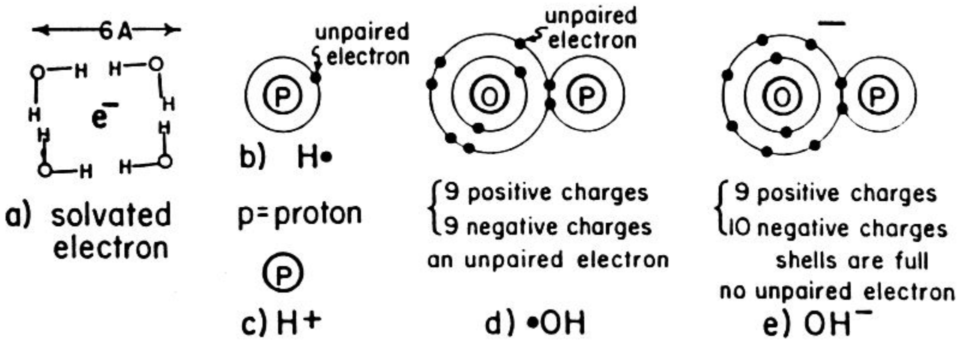

Figura 2.1: Specie reattive prodotte nella radiolisi dell'acqua: a) elettrone acquoso o solvatato e^-_{aq}, b) radicale idrogeno $H^\bullet$, c) ione idrogeno H^+, d) radicale idrossile $OH^\bullet$, e) ione idrossile OH^-.

Specie	$D\ 10^{-5} cm^2/s$	$R(\mathring{A})$
$OH^\bullet$	2	2.4
e^-_{aq}	5	2.1
H_3O^+	8	0.3
$H^\bullet$	8	0.42

Tabella 2.1: Costanti di diffusione e raggi di interazione per diverse specie chimiche. Per paragone, il diametro della molecola d'acqua è 2.9 Å.

in un tempo τ, dove le costanti di diffusione in acqua D per i vari reagenti sono mostrati in tab.2.1.

Le principali reazioni chimiche a cui i radicali vanno incontro sono:

$$
\begin{aligned}
OH^\bullet + OH^\bullet &\rightarrow H_2O_2 && (2.9)\\
OH^\bullet + H^\bullet &\rightarrow H_2O && (2.10)\\
OH^\bullet + e^-_{aq} &\rightarrow OH^- && (2.11)\\
H_3O^+ + e^-_{aq} &\rightarrow H^\bullet + H_2O && (2.12)\\
e^-_{aq} + e^-_{aq} + 2H_2O &\rightarrow H_2 + 2OH^- && (2.13)\\
e^-_{aq} + H^\bullet + H_2O &\rightarrow H_2 + OH^- && (2.14)\\
H^\bullet + H^\bullet &\rightarrow H_2 && (2.15)
\end{aligned}
$$

Tutti questi radicali possono interagire (in $\sim 10^{-11}\ s$) con molecole organiche RH (dove H indica un atomo di idrogeno, R gli altri componenti della molecola) formando radicali secondari:

$$RH + OH^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2O \tag{2.16}$$

$$RH + H^\bullet \rightarrow R^\bullet + H_2 \tag{2.17}$$

I radicali liberi primari e secondari possono interagire con molecole biologicamente significative provocando danni radiobiologici indiretti.

Vi è inoltre, anche se meno frequente, un'azione diretta della radiazione:

$$RH \overset{radiazione}{\rightsquigarrow} RH^+ + e^- \rightarrow R^\bullet + H^+ + e^- \tag{2.18}$$

Dal punto di vista del danno biologico è indifferente se l'azione sulla molecola è diretta o indiretta.

I radicali liberi possono interagire anche con molecole di ossigeno, dando origine ad altri radicali dannosi; in presenza di ossigeno pertanto aumentano gli effetti biologici provocati dal passaggio di radiazioni (*effetto ossigeno*):

$$O_2 + H^\bullet \rightarrow HO_2^\bullet \tag{2.19}$$

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- \tag{2.20}$$

$$O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2^\bullet \tag{2.21}$$

L'ossigeno può anche reagire con i radicali liberi delle molecole organiche RH, dando origine ad una reazione a catena:

$$R^\bullet + O_2 \rightarrow RO_2^\bullet \tag{2.22}$$

$$RO_2^\bullet + RH \rightarrow RO_2H + R^\bullet \tag{2.23}$$

2.2 Effetti molecolari

Vari studi hanno finora dimostrato che i siti sensibili alla radiazione sono localizzati nel nucleo. In particolare le molecole di DNA sono i bersagli principali, il cui danneggiamento può provocare la morte cellulare, anche se non si esclude che altre strutture, come per esempio le membrane, siano critiche per la sopravvivenza. Diversi esperimenti [23] dimostrano che per uccidere una cellula è sufficiente una dose nel nucleo 100 volte più piccola rispetto a quella che dovrebbe essere rilasciata al citoplasma.

Per meglio capire le modificazioni che il DNA può subire è opportuno dedicare un momento alla sua struttura.

2.2.1 Il DNA

Il DNA, **acido desossiribonucleico**, è costituito da nucleotidi; questi sono formati da tre parti distinte:

- una base azotata pirimidinica (citosina e timina) o purinica (adenina e guanina);
- uno zucchero: il desossiribosio;
- un gruppo fosfato.

Una molecola di DNA è composta da due catene polinucleotidiche con andamento antiparallelo che si avvolgono in una struttura chiamata **doppia elica** (vedi fig.2.2). Questa è stabilizzata da legami di Van der Waals (ponti idrogeno tra basi complementari) e dalla interazione idrofobica tra le basi e le molecole di acqua circostanti.

Il diametro medio del DNA è di circa 2.3 nm, con 0.32-0.33 nm di distanza tra una base e la successiva sulla stessa catena, in tab.2.2 sono riportate il numero di coppie di basi (bp: base pair) del genoma aploide di alcuni organismi eucarioti.

2.2.2 La cromatina

La struttura fondamentale della cromatina è il nucleosoma, composto da cinque tipi di istoni e dal DNA.

La struttura del nucleosoma è mostrata in fig.2.3, dove il DNA si avvolge intorno ad un ottamero di istoni per 1,8 volte, interagendo con esso tramite forze elettrostatiche. La cromatina si avviluppa ulteriormente in una struttura che si suppone essere a solenoide (vedi fig.2.3), con 6-8 nucleosomi per avvolgimento e un diametro di circa 34 nm.

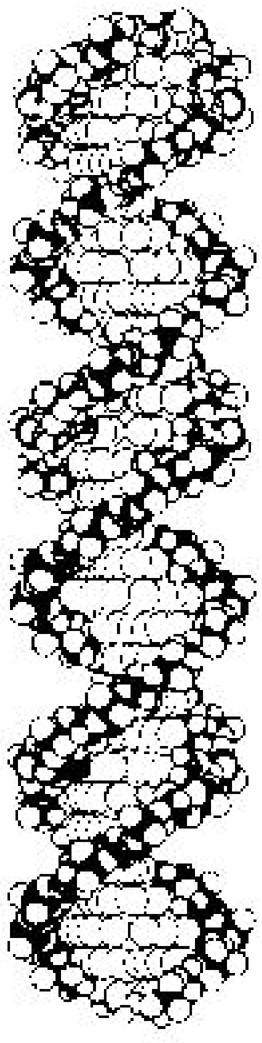

Figura 2.2: Struttura del DNA a doppia elica.

Tipo di cellule	Dimensioni del genoma (Mbp)
Homo Sapiens	3000-3300
Criceto cinese	2341
Mammiferi	1400-5700
Drosophila melanogaster	176
Saccharomyces cerevisiae	12.069404

Tabella 2.2: Dimensioni del genoma di alcuni organismi eucarioti.

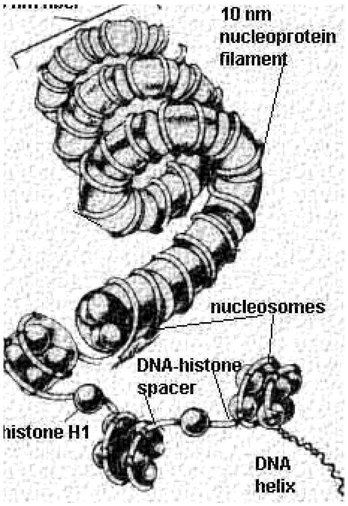

Figura 2.3: Modello a solenoide di una fibra di cromatina avvolta intorno ai nucleosomi.

La cromatina in una cellula (vedi fig.2.4), è divisa principalmente in due tipi:

eterocromatina (cromatina superavvolta)

eucromatina (cromatina non condensata)

Il DNA condensato è relativamente inaccessibile alle DNA polimerasi e alle proteine di trascrizione e affinchè la polimerasi possa trascrivere il DNA in RNA (acido ribonucleico), la eterocromatina deve disavvolgersi in eucromatina; non tutta l'eucromatina è però trascrizionalmente attiva.

Il DNA, nella sua forma superavvolta e condensata, è organizzato in strutture chiamate *cromosomi* (vedi fig.2.5). Il nucleo di una cellula umana contiene circa un metro di DNA diviso in 46 cromosomi. Il cromosoma ha una tipica forma a bastoncello ed è diviso in due braccia di diverse lunghezze uniti dal centromero. Le dimensioni dei cromosomi sono dell'ordine di decine di *micron*.

2.2.3 Danni al DNA

Vari esperimenti hanno dimostrato che le basi pirimidiniche sono facilmente attaccate dai radicali liberi, mentre le basi puriniche non sono particolarmente soggette all'azione delle specie reattive. Una classificazione abbastanza immediata dei diversi tipi di danni che sono provocati al DNA è:

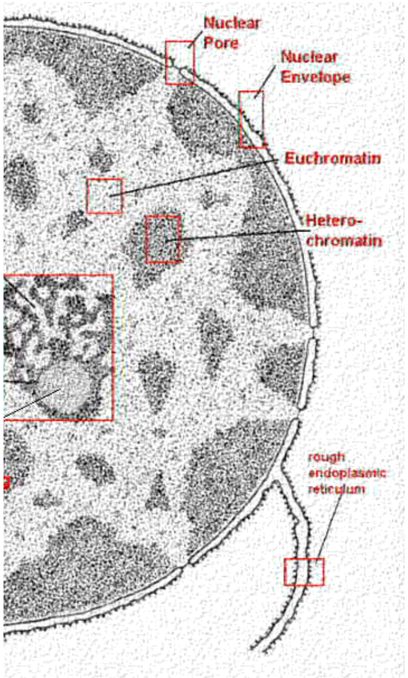

Figura 2.4: Struttura del nucleo di una cellula eucariota.

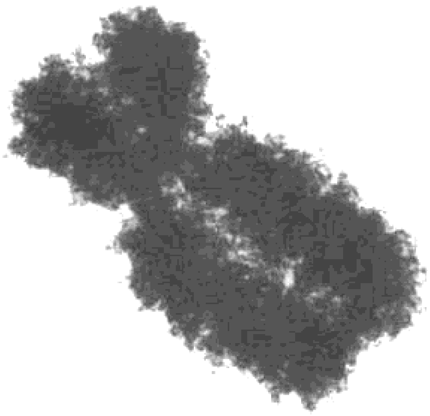

Figura 2.5: Fotografia di un cromosoma presa al microscopio elettronico.

Alterazione di una base (Ba: base alteration): cambiamento delle proprietà chimiche di una base organica (A,T,G o C);

Cancellazione di una base (Bd: base deletion): una base è rimossa dal nucleotide;

Alterazione di uno zucchero (Sa: sugar alteration): cambiamento delle proprietà chimiche del desossiribosio;

Rottura di catena (Sb: strand break): rottura del legame covalente tra lo zucchero desossiribosio e i gruppi fosfato;

Appaiamento erroneo di base (Mb: mismatched base): viene alterato il naturale accoppiamento tra basi A-T e G-C.

2.2.4 Risposta molecolare e cellulare

Non tutti questi danni sono letali per la cellula, anzi essi sono legati alle fasi di trascrizione e ai controlli presenti sull'integrità del genoma.

Alcuni danni arrecati dalla radiazione alla cellula sono riparati immediatamente in loco:

- gruppi solfidrici presenti sul glutatione sopperiscono alla mancanza di Idrogeno (vedi fig.2.6) formando un doppio legame fra gli atomi di Zolfo;

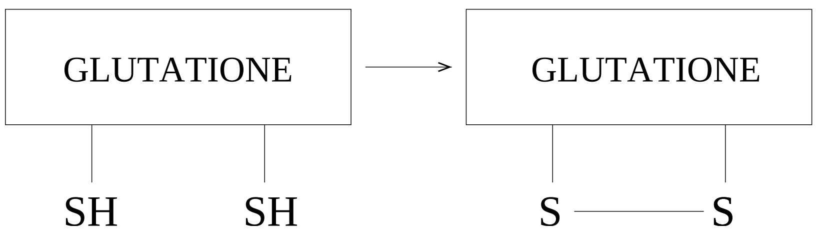

Figura 2.6: Il glutatione ha potere ossidoriducente ed è in grado di cedere Idrogeno.

- il radicale superossido O_2^- altamente reattivo è neutralizzato dall'azione successiva di due enzimi: la superossido dismutasi

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{S.D.} H_2O_2 + O_2$$

e la catalasi

$$2H_2O_2 \xrightarrow{C.} 2H_2O + O_2$$

La riparazione di un danno al DNA da parte da parte della cellula è un processo complesso che si svolge però attraverso alcune fasi principali (vedi fig.2.7) di cui non si conoscono i dettagli ma che può essere interessante descrivere grossolanamente.

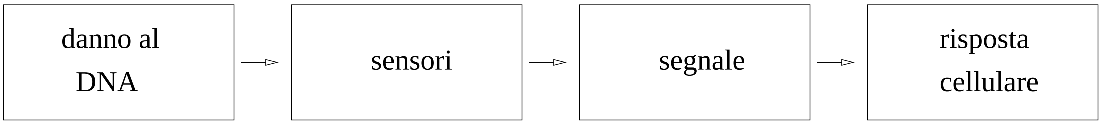

Figura 2.7: Catena di reazioni che portano alla risposta cellulare in seguito ad un danno al DNA.

1. Un danno frequentemente causato dalla radiazione ionizzante (cosi come da raggi UV e dal Platino) è la sostituzione di un ponte idrogeno tra basi pirimidiniche complementari con un legame covalente, per cui si genera una distorsione dell'elica del DNA (vedi fig.2.8). Al momento della trascrizione le proteine riconosceranno il danno e partirà il segnale per la riparazione.

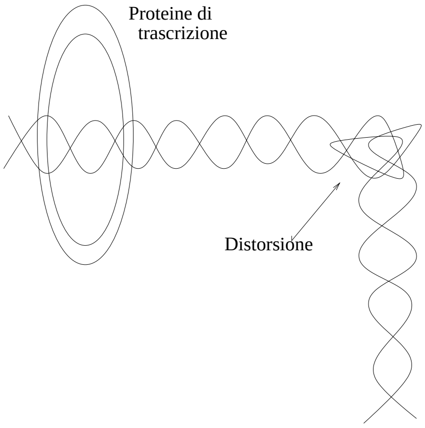

Figura 2.8: Distorsione fisica del DNA in seguito a danneggiamento delle basi.

2. I sensori per i danni al DNA sono le proteine. Non si conosce ancora il modo in cui il danno della radiazione venga riconosciuto se non in pochi casi: si suppone ad esempio che per la linea cellulare CHO xrs-6 la proteina Ku80 riconosca i DSB (double strand break).

3. I sensori inviano il segnale che principalmente può essere di tre tipi:
    - arresto del ciclo cellulare
    - apoptosi
    - riparazione

4. Il ciclo cellulare è regolato da **punti di restrizione** (checkpoints) biochimici in G1/S e G/M principalmente[1]. Cellule irradiate nella fase G1 si fermano al punto di restrizione G1/S, regolato dalla proteina p53[2]; si suppone che la sosta nella progressione alla fase S dia tempo alla cellula di riparare il danno (almeno nel caso di danneggiamento non letale indotto da ionizzazione). Effetti citotossici (forse anche i SSB) non sono fermati in G1/S e sono probabilmente riparati in S o G2. Cellule irradiate in G2 vengono bloccate, non si sa esattamente come, in G2/M.

Arresto del ciclo cellulare

In alcuni casi le cellule danneggiate vengono bloccate nella loro progressione nel ciclo cellulare e in tal modo viene inibita la capacità di duplicazione.

Apoptosi

L'apoptosi è un meccanismo indotto geneticamente che determina la morte di cellule difettose o vecchie senza che intervengano i processi infiammatori tipici della necrosi.

Linfociti, cellule germinali e cellule delle cripte intestinali rispondono alla ionizzazione con l'apoptosi piuttosto che con l'arresto del ciclo o la riparazione.

L'apoptosi e un processo complesso che può essere indotto da molteplici fattori in tempi diversi.

Molte cellule rispondono al danno da DNA con un'apoptosi p53 dipendente e si è scoperto che alcune cellule radioresistenti hanno perso la capacità della p53 di indurre apoptosi.

Riparazione

La eventuale riparazione di un danno al DNA avviene in tre fasi successive:

[1] Per capire il significato delle abbreviazioni fare riferimento al paragrafo 2.3.1.

[2] Per capire l'importanza di questa proteina si osservi che viene usualmente chiamata "il guardiano del genoma" in quanto impedisce la riparazione del DNA mutato.

1. incisione,
2. digestione,
3. sintesi.

L'endonucleasi riconosciuto il sito danneggiato, determina un taglio della catena in questo punto; quindi una esonucleasi digerisce il frammento ed una DNA polimerasi sintetizza il segmento mancante usando come stampo la sezione complementare.

2.2.5 Lesioni fatali

Da questo meccanismo di riparazione si capisce come possano esser potenzialmente letali le *rottura di catena doppia (DSb o DSB o Sb_2: double strand break)*, in quanto viene a mancare lo stampo con cui la DNA-polimerasi ricostruisce il DNA. Un DSB è creato quando una lesione composta da 2 o più Sb spezzetta la molecola di DNA in piccoli frammenti e ciò succede quando successive *rotture di catena singola (SSB o SSb o Sb: single strand break)* avvengono ad una distanza tale per cui le polimerasi non le riconoscono più come separate.

Considerato che il numero iniziale di DSB creati da radiazioni ionizzanti è dalle 40 alle 100 volte maggiore del numero di eventi letali ([10], [11] e fig.2.21) chiaramente non tutti i DSB sono letali.

Un altra prova del fatto che le rotture della doppia elica non sono sempre fatali è che le cellule sono capaci di riunire i segmenti spezzati con un meccanismo chiamato *ricombinazione*; ad esempio le proteine elicasi sono capaci di trasformare un DSB in un SSB che viene ulteriormente riparato da proteine ligasi.

In conclusione si può stimare che circa dall'1 al 2.5% dei DSB provocati dalle radiazioni ionizzanti sono coinvolti nella morte della cellula.

Aberrazioni cromosomiche

Il tentativo di riparare una lesione al DNA (*restitutio ad integrum*) può creare una o più *mutazioni puntiformi*[3], un movimento (*traslocazione*) o una duplicazione (*amplificazione*) di una grande porzione di DNA tra cromosomi diversi o tra diverse braccia del cromosoma stesso. Modificazioni di questo tipo sono usualmente chiamate *aberrazioni o anomalie cromosomiche.* In figura

[3]Una tripletta di tre nucleotidi che codifica un'informazione genetica si chiama *codone*. Una mutazione puntuale avviene quando una sequenza di codoni è cambiata (ad es. AGC in AGA).

2.9 sono rappresentati i principali meccanismi che portano alle aberrazioni cromosomiche.

Indizi esistono che la probabilità di avere anomalie aumenta al diminuire della distanza fra DSB [51].

Le aberrazioni cromosomiche alterano le caratteristiche espresse delle cellula (fenotipo), questo può indubbiamente alterare il normale sviluppo di una cellula e portarla all'apoptosi.

Non è ancora del tutto chiaro se la presenza di aberrazioni cromosomiche sia sufficiente per spiegare la morte cellulare anche se vi è qualche prova che la dose media per uccidere una cellula è approssimativamente la stessa che per indurre una aberrazione cromosomica per cellula [12].

I risultati in letteratura sono contradditori: alcuni autori riportano una correlazione forte tra l'assenza di aberrazioni e la sopravvivenza cellulare [25]. Altri invece hanno trovato un'efficienza più grande per l'inattivazione cellulare rispetto a quella relativa all'induzione di scambi cromosomici, suggerendo l'esistenza di altri tipi di danno in grado di provocare la morte delle cellule [26]. In altri casi si è trovato che il numero di cellule non danneggiate sottostima il numero di cellule sopravvissute, indicando che qualche aberrazione può essere non-letale [27].

2.2.6 Effetti cellulari.

Come visto nel paragrafo precedente la risposta della cellula al danno da radiazione può indurre un processo apoptotico che porta alla morte immediata della cellula (morte non mitotica) o può in qualche modo ledere la sua capacità riproduttiva (morte riproduttiva).

Dal punto di vista clinico le morti sono equivalenti in quanto entrambe portano al controllo locale del tumore.

Curve di sopravvivenza

Per determinare la capacità clonogenica residua di popolazioni cellulari irradiate vengono utilizzati metodi *in vitro* e *in vivo*. I risultati sono presentati mediante le *curve di sopravvivenza* che raffigurano il logaritmo della frazione di cellule sopravvissute in funzione della dose assorbita. Esempi di tali curve sono riportati in fig.2.10.

L'andamento delle curve di sopravvivenza dipende da due fattori: il tipo di radiazione usata e il tipo di cellula. In molti sistemi cellulari si osserva una "spalla" iniziale in risposta a radiazioni debolmente ionizzanti. La spalla tende a scomparire per radiazioni densamente ionizzanti e ad alte dosi. Sono possibili due tipi di interpretazione per questo tipo di curva:

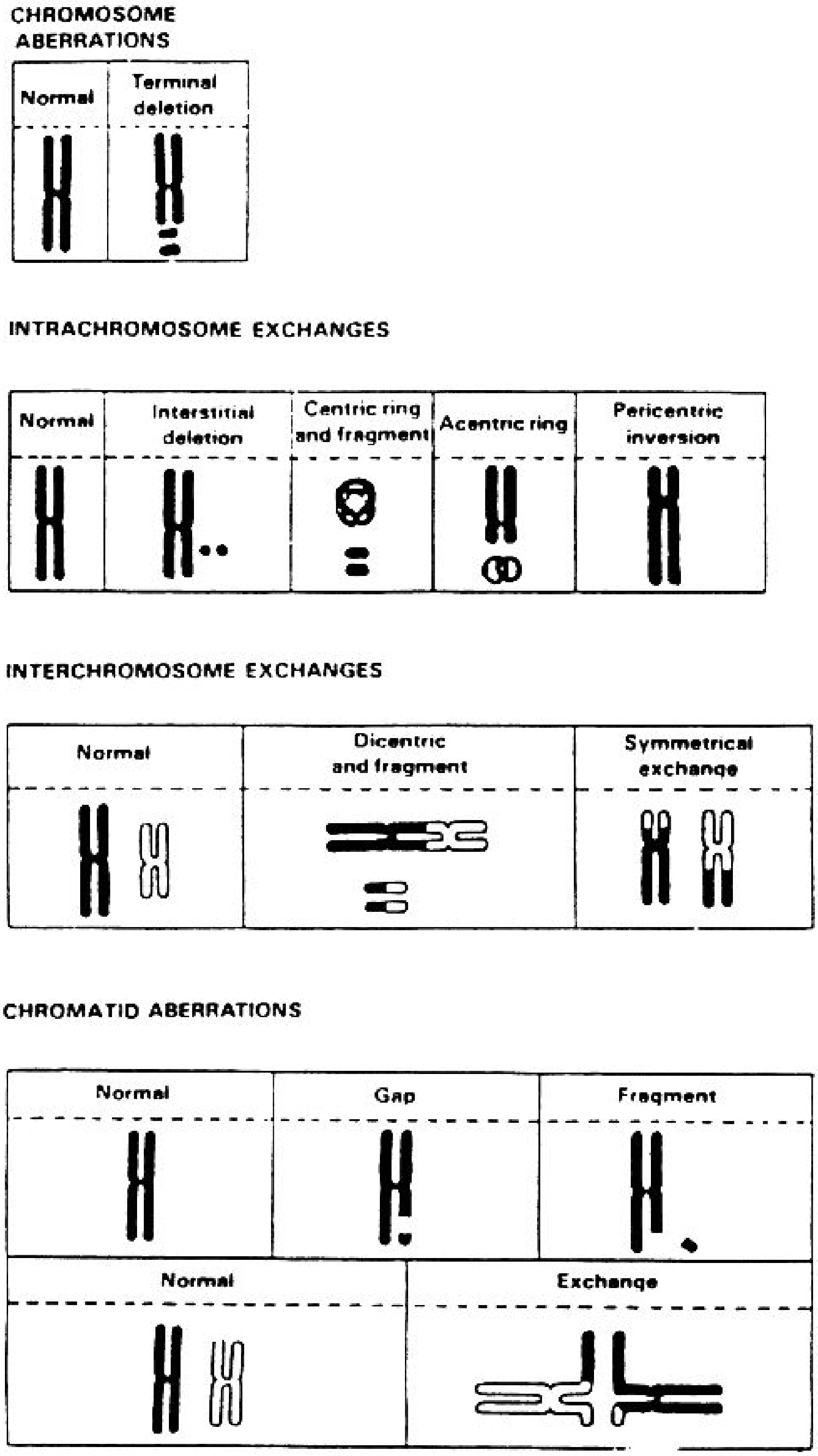

Figura 2.9: Principali tipi di aberrazioni cromosomiche.

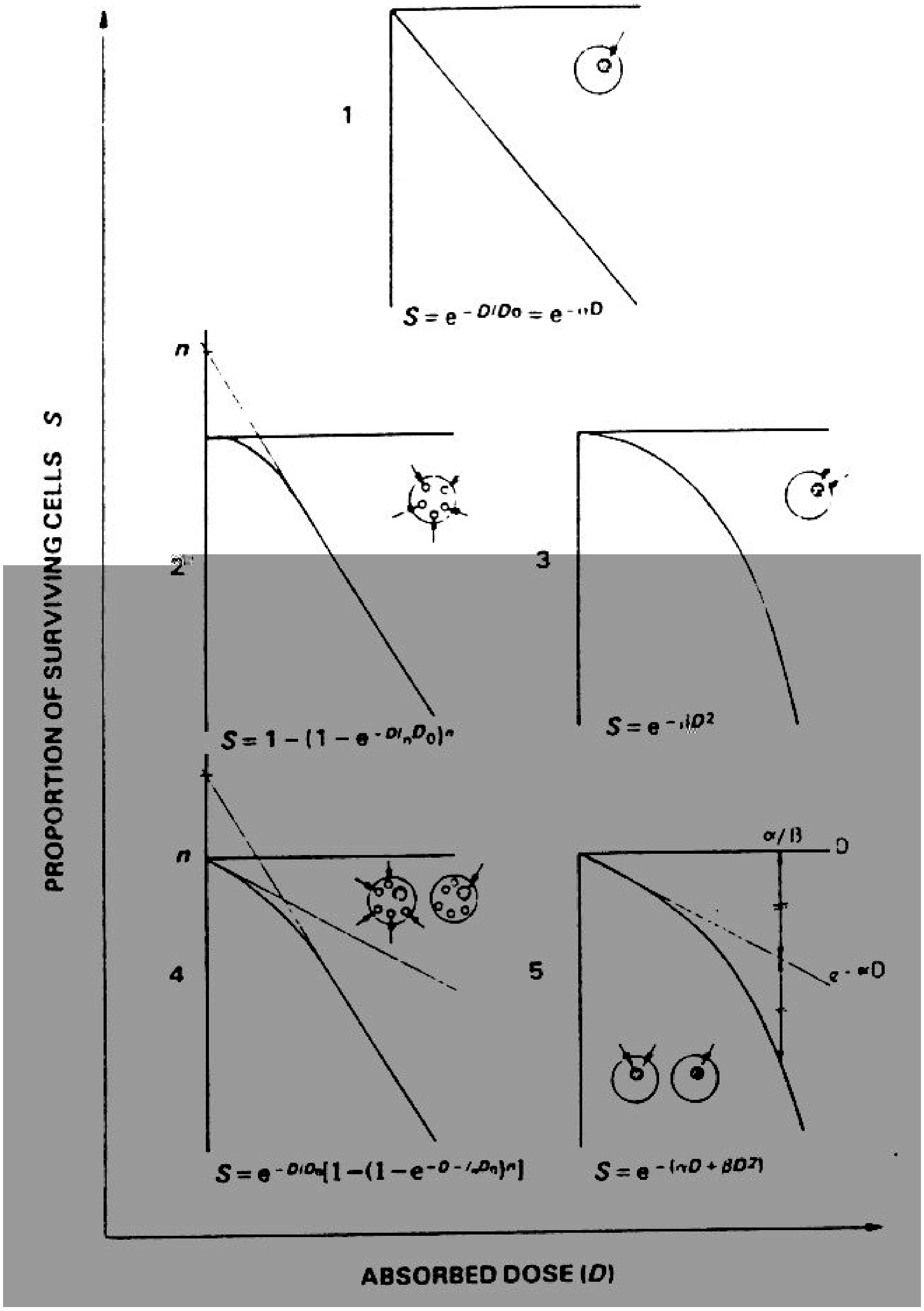

Figura 2.10: Curve di sopravvivenza cellulare: 1) modello single hit, single target (esponenziale); 2) modello single hit, multi traget; 3) modello two hit, multi target; 3) modello two hit, single target (quadratico), 4) modello single hit, single target, plus single hit, multitarget; 5) modello lineare quadratico (LQ)

1. la morte della cellula risulta dalla sovrapposizione di eventi singolarmente non letali che diventano letali se sommati insieme (modelli a bersaglio);

2. a basse dosi le lesioni sono singolarmente riparabili, ma l'efficienza del meccanismo di riparazione peggiora all'aumentare della dose. La spalla diventa quindi un indice della possibilitá di recupero del danno da parte del sistema biologico irraggiato; curve di tipo lineare indicano quindi una mancanza di tale capacità (modelli basati sulla riparazione).

Sono stati proposti diversi modelli matematici per rappresentare le varie curve di sopravvivenza; la funzione matematica dipende dal modello scelto.

Curva di sopravvivenza esponenziale

Virus, batteri e alcuni tipi di cellule di mammifero presentano una semplice relazione esponenziale tra sopravvivenza e dose assorbita:

$$S \; = e^{-\alpha D} \tag{2.24}$$

dove $\alpha = 1/D_0$ (vedi curva 1 in fig.2.10), D_0 è detto *dose letale media* ed è la dose per cui il numero di cellule sopravvissute si è ridotto di un fattore 1/e.

Questo tipo di curva è spiegabile con una semplice teoria di bersaglio: ogni particella ionizzante che attraversa una cellula può produrre un evento letale. La distribuzione di eventi letali, proporzionale alla dose, segue la statistica di Poisson:

$$P(n_i, N) = \frac{e^{-N} N^{n_i}}{n_i!} \tag{2.25}$$

dove N(D) è numero medio di eventi letali per cellula e n_i il numero di eventi letali sulla cellula i-esima.

La sopravvivenza della i-esima cellula corrisponde a $n_i = 0$ e quindi:

$$P(0, N) = S(D) = e^{-N(D)} \tag{2.26}$$

Dal confronto con il modello esponenziale $N(D) = D/D_0$, per cui per $D = D_0$ il numero medio di eventi letali per cellula è uguale a 1. Il fatto che, in totale, il 37% delle cellule sopravviva significa che in alcune cellule c'è una sovrapposizione di eventi letali, mentre alte non sono colpite.

In termini biologici la morte cellulare è un evento "uno o zero": la cellula sopravvissuta è intatta e la sua radiosensibilità non è cambiata, mentre un singolo danno al bersaglio è sufficiente ad uccidere la cellula.

Modello single hit, multi target

La teoria del bersaglio ipotizza che le cellule contengano una o più sedi critiche (*bersagli*) che possono essere disattivate indipendentemente l'una dall'altra da eventi ionizzanti. La disattivazione di un bersaglio rappresenta un evento subletale; la cellula è uccisa quando tutti i bersagli sono disattivati.

La probabilità che un bersaglio sia disattivato è:

$$P = 1 - e^{-D/D_0}$$

Quindi la probabilità che n bersagli nella stessa cellula siano disattivati, cioè che la cellula sia uccisa, è data da $(1 - e^{-D/D_0})^n$ e la sopravvivenza da:

$$S = 1 - (1 - e^{-D/D_0} exp(-D/D_0))^n \tag{2.27}$$

(Curva 2 in fig.2.10).

Il parametro n (*numero di estrapolazione*) rappresenta il numero di bersagli per cellula; per n=1 si riottiene la curva esponenziale.

Modello two hit, single target (quadratico)

La mortalità della cellula risulta dall'azione indipendente di due eventi subletali, generati da due distinte particelle, su un solo bersaglio. Il numero medio di eventi letali per cellula sarà quindi proporzionale al quadrato della dose e la sopravvivenza sarà data dalla relazione:

$$S = e^{-\beta D^2} \tag{2.28}$$

(vedi curva 3 in fig.2.10).

Modelli a due componenti

Questi ultimi due modelli danno una rappresentazione ragionevole delle curve per alte dosi, ma sottostimano l'effetto di dosi piccole. Infatti le due equazioni danno curve a tangente orizzontale nell'origine, cioè prevedono mortalità quasi nulla a basse dosi, in disaccordo con i risultati sperimentali.

Nei modelli a due componenti la cellula può essere uccisa in due modi: o con un singolo evento letale o per l'accumulazione di più eventi subletali. Le due modalità di inattivazione cellulare sono considerate indipendenti, quindi la probabilità di sopravvivenza è data dal prodotto delle probabilità per ciascun tipo di evento letale:

$$S = S_1 \cdot S_n \tag{2.29}$$

dove $S_1 = exp(-\alpha D)$ è la frazione di sopravvivenza dovuta agli eventi single hit, α il relativo coefficiente e S_n è la componente dovuta all'accumulazione di eventi subletali.

A seconda dell'espressione usata per S_n si ottengono gli ultimi due modelli matematici:

1) inserendo la relazione 2.27 al posto di S_n si ottiene il modello **single hit single target, plus single hit multi target**:

$$S \ = e^{-\alpha D}[1-(1-e^{-D/{}_nD_0})^n] \tag{2.30}$$

dove ${}_nD_0$ è il coefficiente per la produzione di eventi subletali (curva 4 in fig.2.10).

2) inserendo invece la relazione 2.28 si ottiene il modello **lineare quadratico (LQ)**:

$$S = e^{-\alpha D-\beta D^2} \tag{2.31}$$

(vedi curva 5 in fig.2.10).

I due coefficienti α e β sono legati ai due modelli di inattivazione cellulare e il loro rapporto α/β è un indice della loro importanza relativa: è alto quando la curva di sopravvivenza è quasi esponenziale, è basso se la spalla è molto ampia.

Le ultime due relazioni sono entrambe compatibili con i risultati sperimentali. Il modello lineare-quadratico ha però il vantaggio di dipendere da due soli parametri (α e β) anziché da tre (α, ${}_nD_0$ e n); per questo motivo è il più utilizzato in letteratura.

Joiner e Johns [5], osservando che a basse dosi ($\lesssim$ 1 Gy) la sopravvivenza calcolata col modello LQ (o con modelli equivalenti) sovrastima la sopravvivenza hanno scritto la curva di sopravvivenza (vedi fig.2.17) come:

$$S = e^{-\alpha_R\left[1+\left(\frac{\alpha_S}{\alpha_R}-1\right)e^{-\frac{D}{D_C}}\right]D-\beta D^2} \tag{2.32}$$

dove α_R è la pendenza iniziale come da modello LQ, α_S è la "pendenza iniziale ipersensibile", D$_C$ è la dose a cui $1-1/e$ della transizione da α_S a α_R è occorsa, β il termine quadratico del modello LQ. Se $\alpha_S = \alpha_R$ il modello **lineare quadratico con riparazione indotta (LQ/IR)** coincide con quello LQ.

I modelli matematici finora descritti, sebbene molto usati, hanno tuttavia dei limiti: innanzitutto il termine *bersaglio* non indica una struttura reale della cellula che, se danneggiata, porta all'inattivazione; inoltre i vari coefficienti che compaiono in questi modelli non sono costanti ma dipendono da vari parametri, quali temperatura, presenza di ossigeno, fase del ciclo cellulare, in cui le cellule si trovano. Questi fattori (fisici, chimici o biologici) saranno descritti nel prossimo paragrafo.

2.3 Fattori che influenzano la radiosensibilità cellulare

2.3.1 Cicli cellulari

Le cellule non germinali in divisione vanno incontro ad una sequenza regolare di crescita e di divisione detto *ciclo cellulare* che consiste di quattro fasi principali rappresentate in fig.2.11; il completamento del ciclo richiede tempi diversi, che vanno da poche ore a parecchi giorni, a seconda sia del tipo di cellule che di fattori esterni, come la temperatura o le sostanze nutritive disponibili.

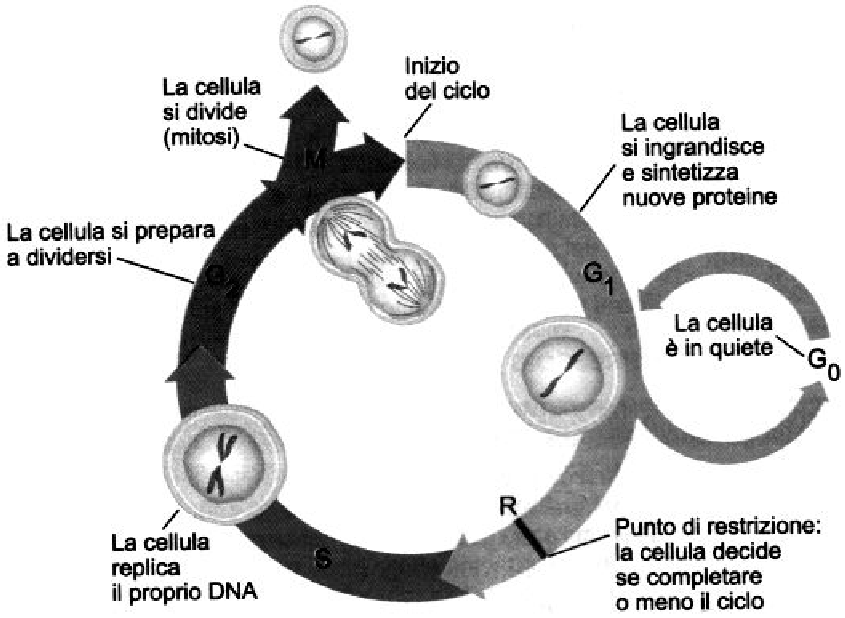

Figura 2.11: Fasi del ciclo cellulare.

G1 (gap 1): è una fase di intensa attività biochimica, la cellula raddoppia la sua grandezza, i suoi enzimi, i ribosomi, i mitocondri e altre molecole e strutture citoplasmatiche; altre strutture come i microtubuli , i microfilamenti, i corpi di Golgi, i lisosomi, i vacuoli e le vescicole vengono invece sintetizzate ex novo. Quando le cellule finiscono di crescere, per avere esaurito, ad esempio, le sostanze nutritive, si arrestano nella fase G1; si ritiene che anche fattori interni possano decidere o meno il progredire della cellula alla fase S.

S (sintesi): qui avviene la duplicazione del materiale cromosomico.

G2 (gap 2): in questa fase la cellula assembla le strutture speciali necessarie per poter spartire un assetto completo di cromosomi tra le cellule figlie.

M (mitosi): in questa fase avviene la divisione del DNA in due parti perfettamente uguali (ogni cellula figlia conterrà lo stesso patrimonio genetico della cellula madre), e la seguente separazione del citoplasma con la formazione dalla membrana per due cellule figlie che si spartiranno in parti uguali le strutture interne della cellula.

Alcuni tipi di cellula, come le cellule del midollo osseo che danno origine ai globuli rossi, passano in continuazione attraverso successivi cicli cellulari per tutta la vita dell'organismo, altre, come le cellule nervose, perdono la capacità di replicarsi una volta raggiuntà la maturità, altre ancora, come le cellule del fegato, mantengono la capacità di dividersi solo in determinate circostanze: ad es. se una porzione di fegato viene rimossa chirurgicamente.

La fase di stasi della cellula, chiamata fase **G0 (gap 0)**, è controllata da stimoli esterni come: la comunicazione tramite recettori posti sulla membrana con le cellule circostanti, la temperatura, la presenza di sostanze nutritive etc...

Il progredire della cellula attraverso il ciclo è controllato nei punti di restrizione da proteine chiamate cicline. Lo studio dettagliato del così denominato orologio cellulare è molto importane, sia per lo studio del cancro, in quanto per il cancro ci sono evidenti alterazioni dei controlli, sia per il futuro di una cellula danneggiata da radiazioni.

La risposta della cellula al danno da radiazione è diversa a seconda della fase, con differenze anche all'interno della stessa fase, sia per questioni geometriche, visibilità dei cromosomi e loro condensamento, sia per le diverse reazioni nei diversi punti di restrizione.

Terasima et alia [4] hanno rivelato per cellule HeLa

radioresistenza in fase S e radiosensibilità in fase G2.

Zaider [6] rielaborando i dati degli esperimenti compiuti da Sinclair e Morton [7] e di Gillespie [8] su cellule V79 trova un andamento della sopravvivenza in funzione dell'età cellulare illustrato un fig.2.12, osservando che la riparazione avviene prevalentemente se non completamente, nella fase S.

Una normale popolazione cellulare include cellule in ogni fase del ciclo. È possibile però ottenere delle popolazioni *in vitro* in cui le cellule si dividono sincronamente; in questo modo si può quindi studiare la radiosensibilità delle cellule nelle varie fasi, ottenendo le curve in fig.2.13 e 2.14.

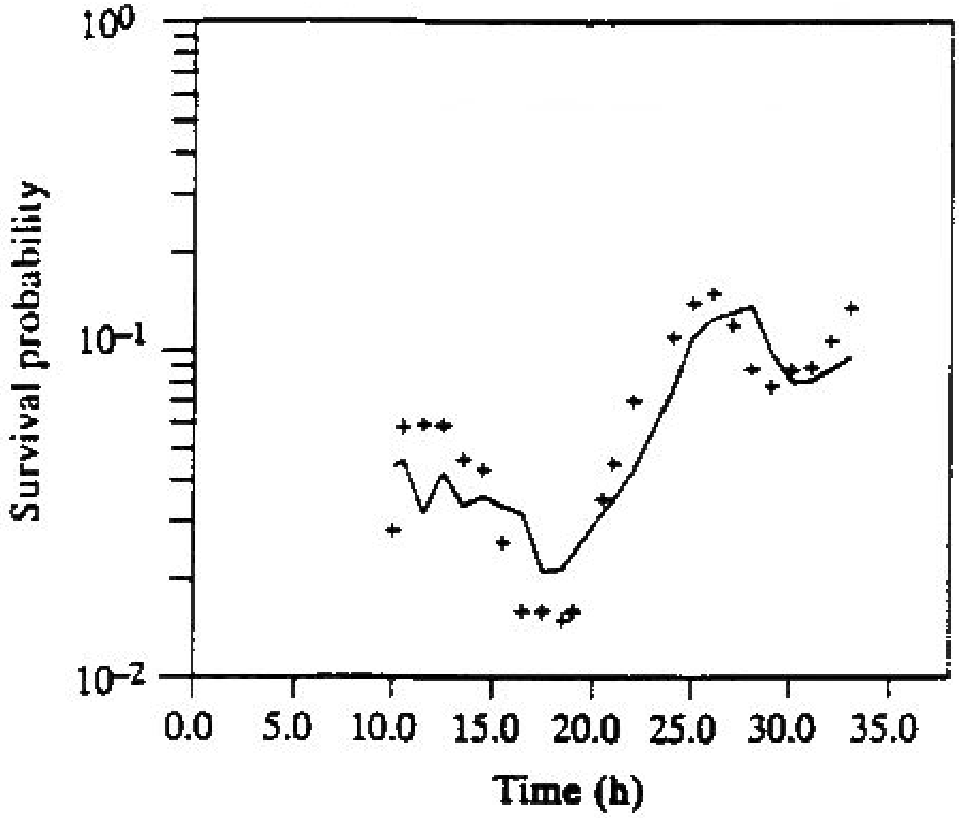

Figura 2.12: Sopravvivenza di cellule V79 irradiate in fase diverse del ciclo cellulare. I dati sperimentali di Gillespie sono stati rielaborati da Zaider per tenere conto della sincronizzazione.

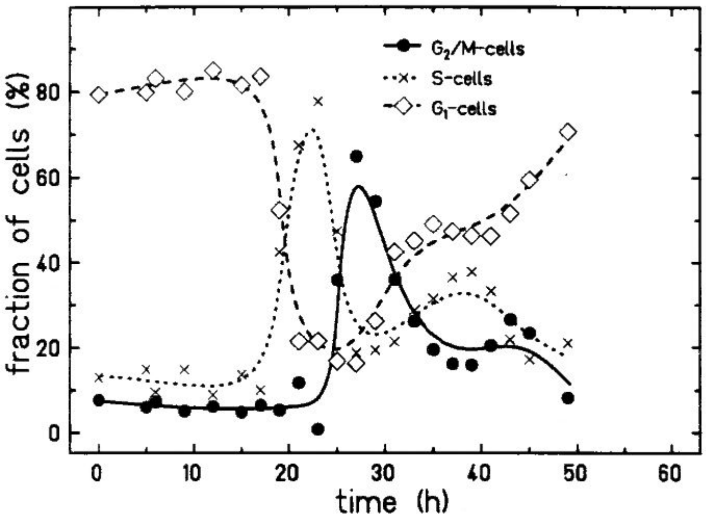

Figura 2.13: Cicli cellulari per cellule inizialmente sincronizzate di fibroblasti umani (CDL24) non irradiati. La frazione delle cellule nelle varie fasi è data in funzione del tempo.

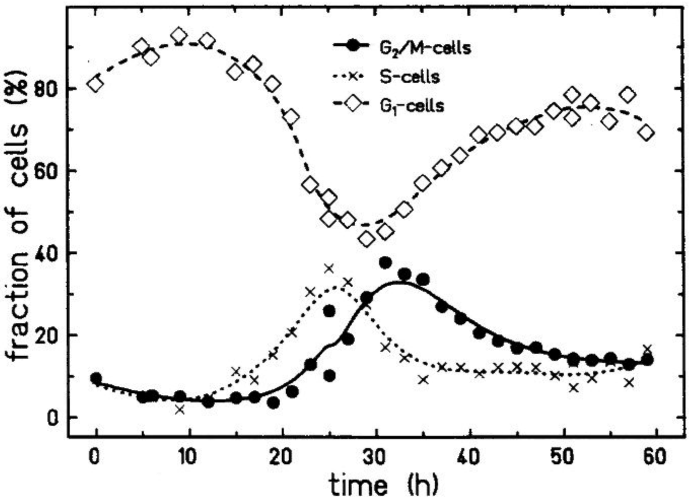

Figura 2.14: Cicli cellulari per cellule inizialmente sincronizzate di fibroblasti umani (CDL24) irradiati con 2 Gy da ioni Carbonio di 85 Mev/u. Si può vedere che rispetto alla fig.2.13 la frazione di cellule in G1 raggiunge un minimo di solo il 40% rispetto al 17% dei controlli.

2.3.2 Irradiazione frazionata

La sopravvivenza di cellule irradiate con due dosi D/2 a distanza di qualche ora è maggiore di quella ottenuta con un'unica esposizione ad una dose D. Questo fenomeno si può spiegare con la riparazione che interviene tra una frazione e la successiva. In questo modo la seconda dose è ricevuta da una popolazione più o meno omogenea di cellule non danneggiate, per cui ha per la maggior parte delle cellule solamente un effetto subletale. Il recupero della cellula è evidenziato dalla ricomparsa nella curva di sopravvivenza della spalla tra due esposizioni successive (vedi fig.2.15).

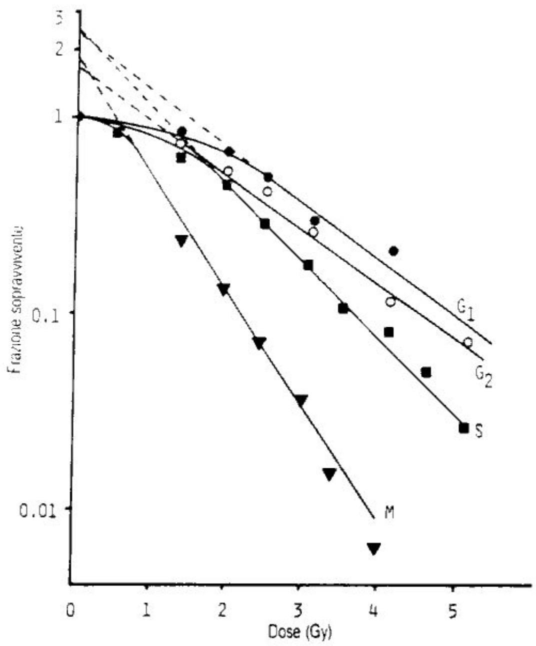

Figura 2.15: Cellule HeLa irradiate in diverse fasi del ciclo cellulare.

Come si vede in figura, per le radiazioni a basso LET l'intervallo di tempo tra la prima frazione e la successiva è di grande importanza nel determinare l'entità di recupero delle cellule. Dopo 20 ore di intervallo la curva di sopravvivenza presenta la ricomparsa di una spalla uguale a quella iniziale; questo vuol dire che dopo un tale intervallo di tempo le cellule hanno riacquistato l'iniziale capacità di riparazione del danno. In realtà sembra invece che ci sia una graduale diminuzione di questa capacità dopo un certo numero di frazionamenti.

Nel caso di curve di sopravvivenza con spalla ridotta o senza spalla, come nel caso di radiazioni ad alto LET, frazionando la dose, il recupero è quasi assente, poiché questo tipo di radiazione è particolarmente efficace nell'uccidere le cellule anche a basse dosi.

La sopravvivenza dopo un'irradiazione di N frazioni di dose d è data da $S = s^N$, dove s è la sopravvivenza per ciascuna frazione.

Il discorso sull'irradiazione frazionata diventa molto importante nel caso di radiosensibilità diverse nelle diverse fasi del ciclo cellulare per cui può essere rivelante la sincronizzazione del ciclo cellulare al fine di irradiare le cellule nelle fasi critiche.

2.3.3 Effetto ossigeno

Come già descritto all'inizio di questo capitolo, in presenza di ossigeno la radiosensibilità cellulare aumenta. Per ottenere un desiderato effetto biologico in tessuti altamente ossigenati la dose necessaria è dunque minore che nel caso di tessuti ipossici.

Per spiegare questo fenomeno sono state proposte varie ipotesi. La prima, come già visto in precedenza, afferma che la presenza di ossigeno causa un aumento della produzione di radicali liberi. Un'altra ipotesi si basa invece sull'alta affinità elettronica dell'ossigeno, che tende a reagire con gli elettroni liberati durante la radiolisi ritardandone la combinazione e aumentando la probabilità che questi possano causare danni. Inoltre, la carenza di ossigeno potrebbe provocare una diminuzione della capacità di recupero delle cellule danneggiate.

Il *rapporto di potenziamento dell'ossigeno* (OER: Oxygen Enhancement Ratio) è definito come il rapporto tra la dose necessaria per ottenere un dato effetto biologico in condizione di ipossia e in condizione di normale ossigenazione:

$$OER = \frac{D}{D_0} \tag{2.33}$$

dove D è la dose necessaria per produrre un effetto nel tessuto reale e D_0 è la dose che produrrebbe lo stesso effetto se il tessuto fosse completamente ossigenato.

In fig.2.16 sono rappresentate due curve di sopravvivenza ottenute per cellule di fegato umano in coltura irradiate in presenza e in assenza di ossigeno: le cellule ossigenate sono 2.2 volte più sensibili alla radiazione delle cellule ipossiche.

Denekamp e Dasu [9] hanno analizzato degli studi in cui hanno mostrato che in molte linee cellulari questo andamento può essere annullato se non addirittura invertito (vedi fig.2.17) e che esiste quindi una finestra di dose

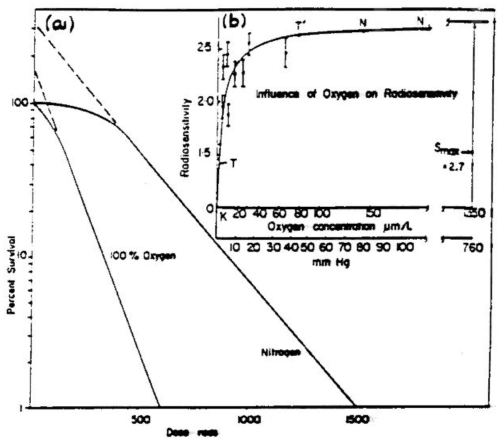

Figura 2.16: (a) curva di sopravvivenza per cellule di fegato umano in coltura irradiate in presenza e in assenza di ossigeno; (b) dipendenza della radiosensibilità dalla concentrazione di O_2.

($\sim 0.4 - 0.6$ Gy) entro la quale le cellule ipossiche sono più radiosensibili di quelle ossigenate.

Nella fig.2.18 è mostrato l'andamento dello OER in funzione del LET. La larga banda rappresenta i numerosi risultati sperimentali ottenuti su differenti linee cellulari. Come si vede, all'aumentare del LET la presenza dell'ossigeno diventa praticamente ininfluente (lo OER tende a 1). Questo è dovuto probabilmente al fatto che, per le radiazioni ad alto LET, gli effetti, più che essere mediati dai radicali liberi, sono dovuti alle elevate cessioni locali di energia con conseguenti frequenti rotture del DNA delle cellule colpite.

2.3.4 Dipendenza dal tipo di radiazione. Efficacia Biologica Relativa (RBE).

Tipi diversi di radiazione hanno effetti diversi per quanto riguarda la sopravvivenza cellulare. In genere radiazioni ad alto LET (ioni, neutroni, protoni di bassa energia) sono più efficaci di quelle a basso LET.

L'*Efficacia Biologica Relativa* (RBE = *Relative Biological Effectiveness*) è definita come il rapporto tra la dose assorbita di una radiazione di riferimento (in genere raggi γ prodotti da una sorgente di ^{60}Co radioattivo) e quello della radiazione in esame necessaria per produrre l'effetto biologico desiderato, cioè:

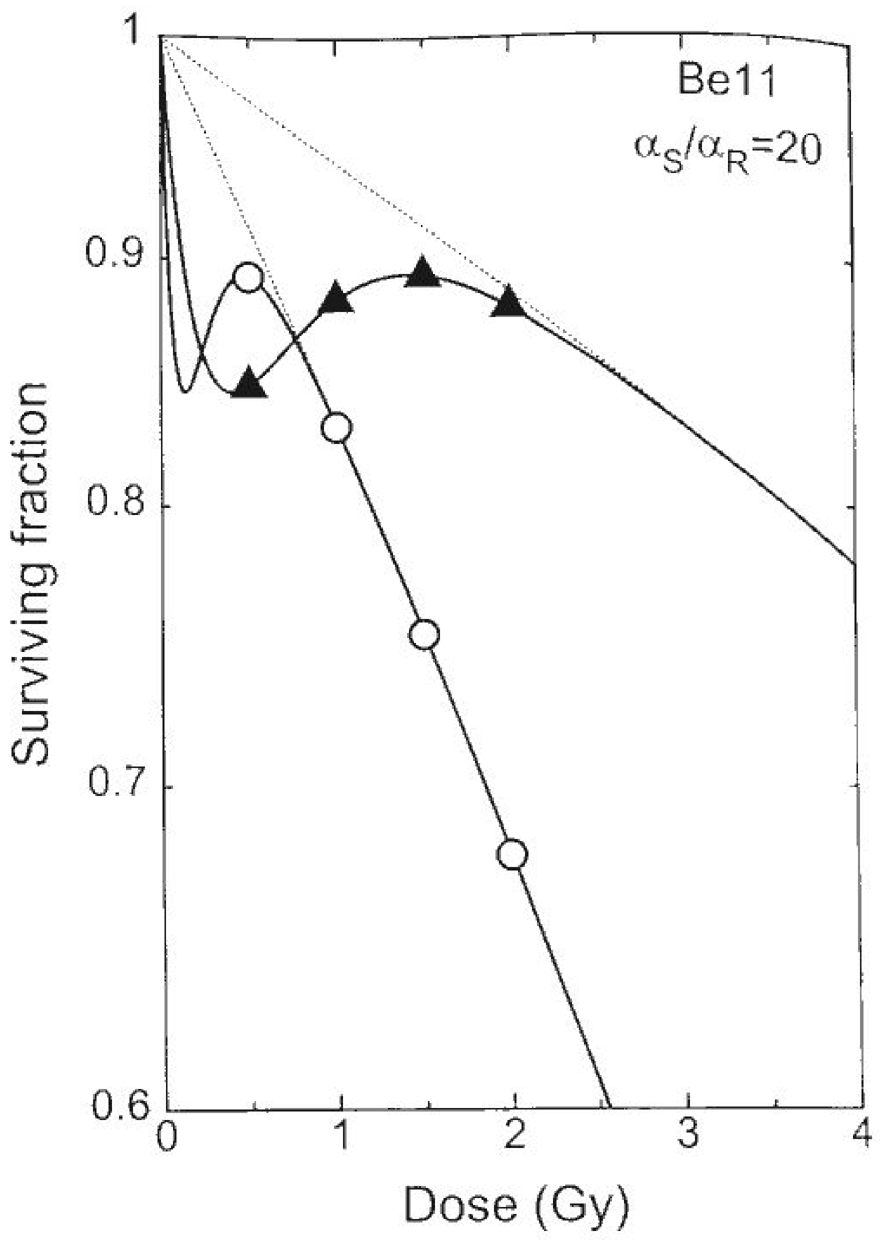

Figura 2.17: Sopravvivenza di cellule a cui è stato applicato il modello LQ/IR irradiate con raggi X in diverse condizioni di ossigenazione: assente (triangoli), presente (cerchi).

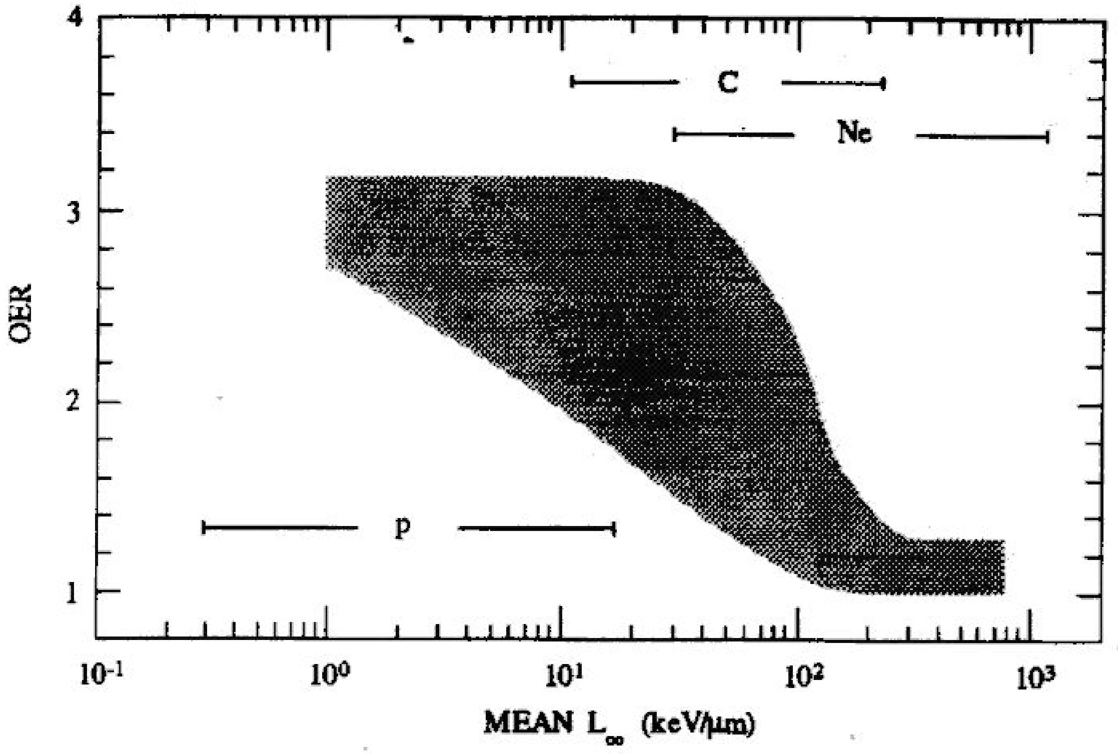

Figura 2.18: Rapporto di potenziamento dell'ossigeno in funzione del LET. La banda ricopre i valori di OER misurati per vari tipi di radiazione e linee cellulari.

$$RBE = \frac{D_\gamma}{D} \tag{2.34}$$

dove D è la dose assorbita necessaria per produrre l'effetto studiato nel sistema irraggiato e D_γ è la dose di fotoni che produce lo stesso effetto.

L'Effetto Biologico Relativo dipende generalmente dal fenomeno in esame (morte cellulare, induzione di rottura di catena doppia, aberrazione cromosomica) e dal livello considerato.

In tab.2.19 si riporta l'analisi fatta da Rydberg et alia [59] sulla percentuale di timidina glicole (una base danneggiata dal passaggio della radiazione) rimasta non riparata a due ore da un irraggiamento di 10 Gy in cui si vede chiaramente l'aumento del danno ottenibile con particelle ad alto LET rispetto ai raggi X.

radiazione ionizzante	LET (keV/μm)	% di timidina glicole
x	~0.2	17
N	97	27
Fe	150	32
He	70	36
He	120	43

Figura 2.19: Percentuale di timidina glicole danneggiata in seguito ad irradiazione.

Gli stessi autori hanno anche misurato (vedi tab.2.20) il numero di DSB non riparati e quelli riparati non correttamente (per frammenti di DNA fra le 0.1 e le 200 kbp) nell'irradiamento precedente mostrando che la riparazione diminuisce all'aumentare del LET.

radiazione ionizzante	LET (keV/μm)	DSB non riuniti	DSB non riuniti correttamente
x	~0.2	2	30
He	7	2	37
He	71	27	40
N	97	10	40
He	125	18	47
Fe	150	10	38

Figura 2.20: Numero di DSB non correttamente riuniti in seguito ad irradiazione.