

Esperimento ETIOPE

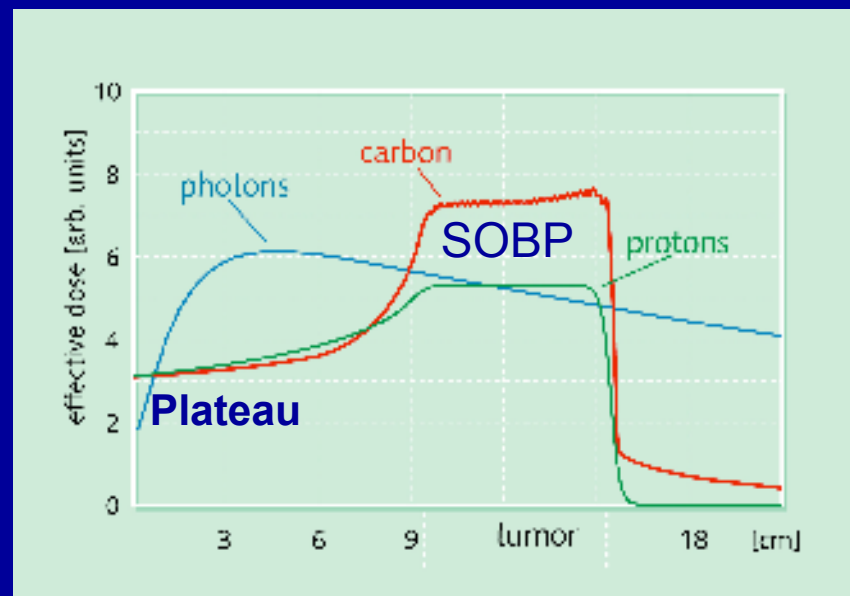
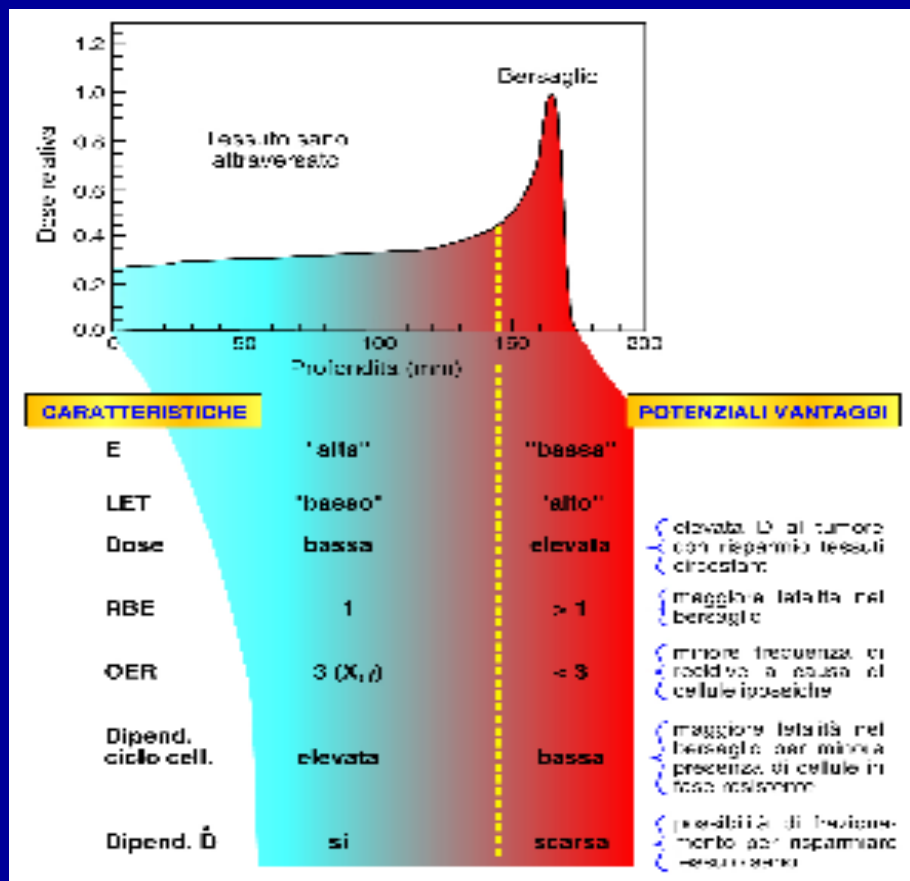
Effetti Tardivi di Ioni Pesanti Accelerati

Gianfranco Grossi

Dipartimento di Scienze Fisiche - Università Federico II, Napoli
INFN - Sezione di Napoli

Potenziati vantaggi dell'adroterapia

L'uso terapeutico di protoni e ioni pesanti (adroterapia) presenta vantaggi legati tanto alla distribuzione della dose fisica (curva di Bragg) che alle proprietà radiobiologiche delle particelle cariche.



Gli ioni carbonio presentano, rispetto ai protoni, una maggiore efficacia biologica relativa (RBE) a causa della minore riparabilità del danno radioindotto.

Utilizzo consigliato per tumori radioresistenti alla terapia convenzionale.

Possibile danno al tessuto sano attraversato, anche per gli effetti della frammentazione nucleare.

Finalità del progetto

Effetti tardivi radioindotti: i danni cellulari radioindotti possono provocare nei tessuti attraversati effetti a lungo termine tumorogenici (dovuti ad aberrazioni cromosomiche, instabilità genomica, ...) e non-tumorogenici (causati da morte cellulare, senescenza cellulare precoce, ...).

Radioterapia con protoni: dal 1954 ha curato in una trentina di centri più di 40.000 pazienti, per cui è stato possibile realizzarne il *follow up* e conoscere gli effetti tardivi sui tessuti sani.

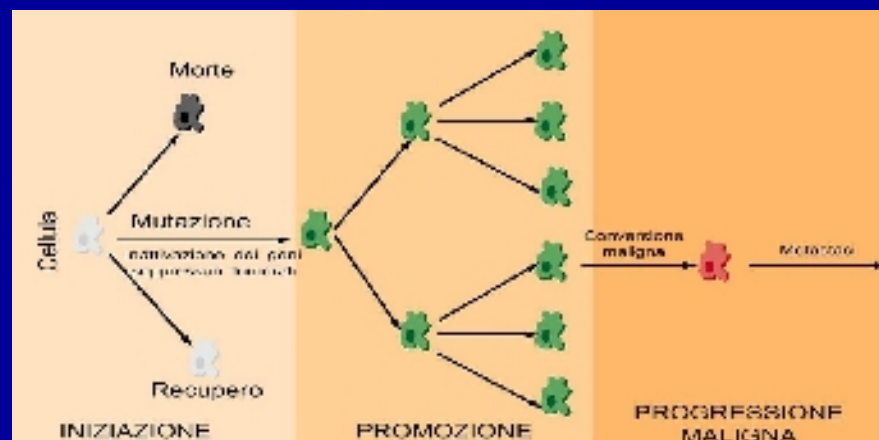
Radioterapia con ioni carbonio: dal 1994 è stata utilizzata in tre centri per curare circa 3400 pazienti, quindi non sono ancora ben caratterizzati gli effetti tardivi.

Scopo del progetto ETIOPE: studiare se e con che efficacia ioni carbonio accelerati inducono *in vitro* effetti tardivi. In particolare, si vuole misurare l'RBE, in linee cellulari umane esposte a fasci monoenergetici di varie energie (differenti LET) al SIS del GSI (Darmstadt) e a fotoni γ e X in sede, per l'induzione di trasformazione neoplastica, di senescenza cellulare prematura e confrontare gli effetti indotti in cellule cresciute ed irraggiate come sistemi 2D e 3D.

Gruppi partecipanti: Università e INFN – Milano, Università e INFN – Napoli, ISS e INFN - Roma

Trasformazione neoplastica (Milano)

Nella trasformazione neoplastica radioindotta la radiazione può agire sia nella fase iniziale, attivando o disattivando geni coinvolti nella regolazione cellulare, sia nelle fasi successive, indebolendo i meccanismi di controllo preposti al riconoscimento ed alla eliminazione di cellule potenzialmente cancerogene, anche non radioindotte.



La frequenza di trasformazione neoplastica misurata *in vitro* è un ottimo indicatore del rischio a lungo termine dell'esposizione ad agenti cancerogeni e, in particolare, alla radiazione ionizzante. (Miller et al. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**, 327, 2000)

Da alcuni anni il gruppo di Milano collabora con il Laboratorio di Biofisica del GSI nello studio del potere oncogeno di fasci di ioni carbonio usati in radioterapia, parametro di cruciale importanza nella valutazione dell'opportunità di impiego di questi fasci per tumori pediatrici, data l'elevata aspettativa di vita di questi pazienti, ed inoltre dato di estremo interesse anche nella valutazione del rischio di effetti tardivi dell'esposizione a radiazione nello spazio.

Trasformazione neoplastica: sistema cellulare, *end-point* e metodiche

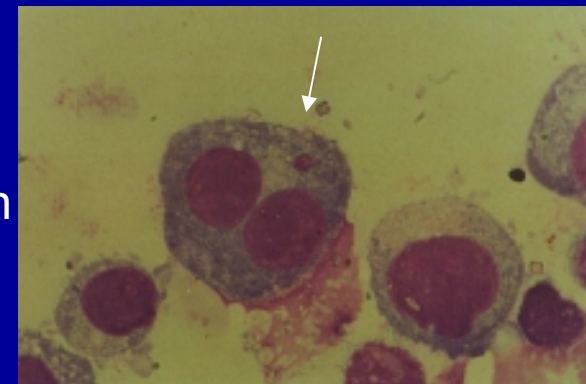
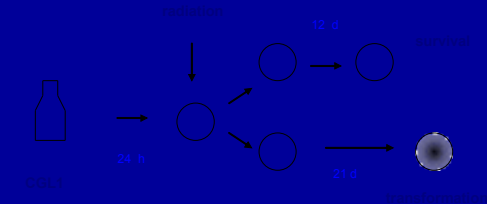
Linea cellulare: linea umana ibrida CGL1 (*Standbridge et al. Science, 215, 252, 1982*), attualmente unico sistema umano disponibile per studi quantitativi *in vitro* di trasformazione neoplastica (*Redpath et al. Radiat. Res. 110, 468, 1987*).

***End-point* e metodiche:**

- **Trasformazione:** le cellule trasformate esprimono una proteina di membrana (IAP) che può essere evidenziata trattandole con Western Blue (*Mendonca et al. Radiat. Res. 131, 345, 1992*) (*).

- **Morte clonogenica:** formazione di colonie ($n > 50$ cellule) da cellule sopravvissute a 12 giorni dall'irraggiamento.

- **Danno citogenetico (micronuclei):** formazione di micronuclei in cellule binucleate a 24 o 48 ore dall'irraggiamento con il metodo del blocco in citodieresi con citocalasina B. (*Fenech et al. Mutation Research 392, 11, 1997*).

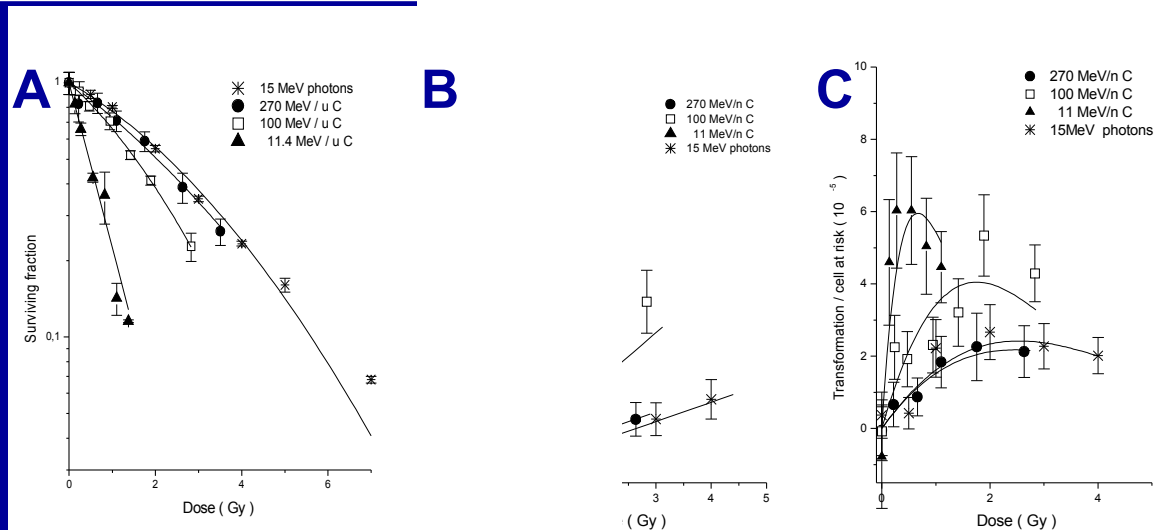


Trasformazione neoplastica: misure - 1

Utilizzando fasci di ioni carbonio monoenergetici di 11.4, 100 e 270 A MeV (LET = 172, 29.5 e 13.8 keV/ μ m) e, per confronto, fotoni di 15 MeV, sono state determinate le curve dose-effetto per l'induzione di mortalità (A), di frequenza di trasformazione neoplastica per cellula sopravvissuta (B) e per cellula inizialmente a rischio (C).

Risultati:

- Cellule CGL1 hanno la stessa probabilità di trasformazione neoplastica se esposte al fascio di ioni carbonio da 270 A MeV o a fotoni di 15 MeV.
- La probabilità di trasformazione è maggiore a basse dosi (~12 a 172 keV/ μ m).
- A parità di citotossicità gli ioni carbonio sono più oncogeni del fascio di fotoni (un fattore 3 a 172 keV/ μ m).
deve essere limitato il più possibile al volume tumorale.



ccni, W.K. Weyrather. Neoplastic
Submitted for publication)

umenta con il LET (RBE a

più oncogeni del fascio di
on radiazione di alto LET

Trasformazione neoplastica: misure - 2

Cellule CGL1 sono state inoltre irradiate:

- in sei diverse posizioni di un fascio con SOBP (4 cm di larghezza ad una profondità di 6 cm) con isodose fisica di 0.75 Gy e 1.5 Gy nel picco;
- con due fasci con SOBP contrapposti (0.75 Gy).

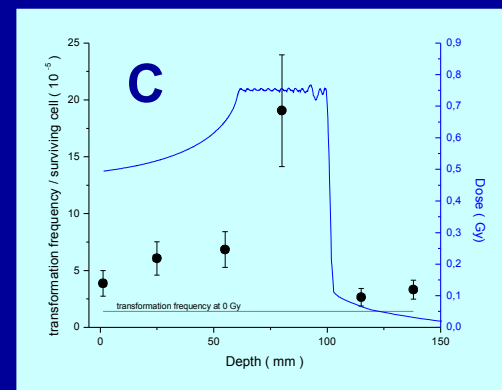
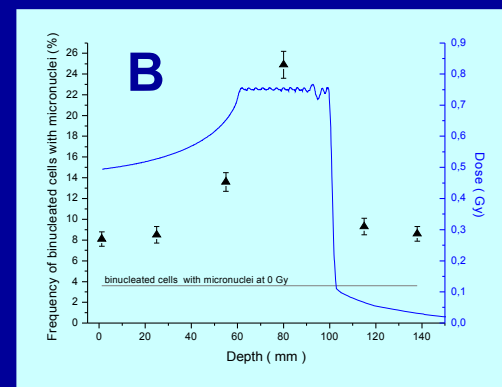
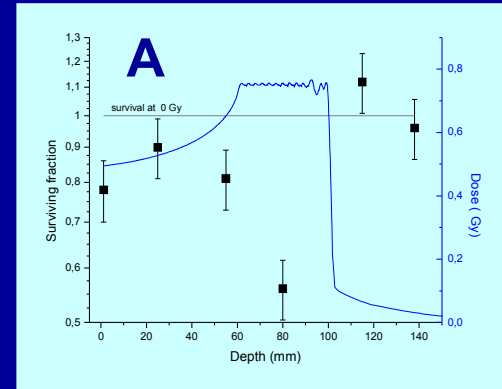
Sono state determinate la mortalità (A), la frequenza di trasformazione neoplastica (B) e, per la dose di 0.75 Gy, anche la frequenza di cellule con micronuclei (C).

Risultati:

- Nel caso della trasformazione neoplastica e dell'induzione di micronuclei, i frammenti presenti oltre il SOBP producono un effetto analogo a quello della dose all'ingresso del fascio. Ne consegue un elevato RBE dei frammenti per questi due effetti (fino a 10).

- Questo effetto non si osserva per la sopravvivenza: la mortalità cellulare indotta dai frammenti oltre il SOBP è trascurabile.

- Andamenti analoghi sono stati trovati per 1.5 Gy e sono indicati dai risultati preliminari ottenuti con i due fasci con SOBP contrapposti.



(D. Bettega, et al. Neoplastic Transformation induced by Carbon Ions. GSI Scientific Reports 2006 e

Trasformazione neoplastica: conclusioni e sviluppi dell'attività

Conclusioni:

- Il fascio di ioni carbonio nella zona di plateau (alta energia, basso LET, tessuto sano) induce trasformazione neoplastica con efficacia analoga a quella dei fasci di fotoni.
- L'efficacia aumenta nel SOBP (bassa energia, alto LET, tumore) e, a parità di mortalità cellulare indotta, è circa 3 volte quella dei fotoni per i valori di LET più elevati.
- Le basse dosi dei prodotti di frammentazione oltre il SOBP non hanno effetti significativi per la mortalità, mentre inducono trasformazione neoplastica pari a quella del fascio nel plateau.

Sviluppi futuri:

- Completare lo studio degli effetti di fasci multipli contrapposti, misurando, oltre alla trasformazione e la sopravvivenza, anche la frequenza di cellule con micronuclei alla prima divisione dopo l'irraggiamento.
- Estendere lo studio a distanze oltre il SOBP maggiori di quelle finora studiate (3.8 cm oltre il picco).
- Continuare lo studio, recentemente iniziato, di fasci terapeutici di fotoni a diverse energie del fascio e diverse tecniche di conformazione.

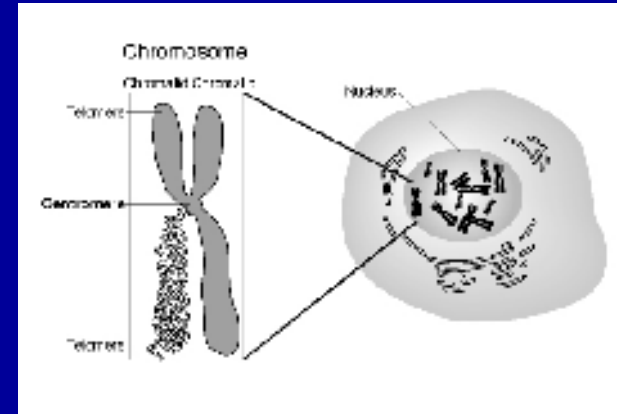
Sarebbe interessante studiare successivamente gli effetti dei più frequenti prodotti di frammentazione.

Effetti degenerativi: senescenza (Napoli)

In vitro la senescenza è definita operativamente come l'esaurimento del potenziale proliferativo di una cellula.

In vivo diversi tessuti mostrano accumulazione di cellule senescenti, ma se il loro numero aumenta rapidamente possono instaurarsi effetti degenerativi.

Sembra esserci una correlazione tra senescenza ed accorciamento dei telomeri, sequenza di basi poste alle estremità dei cromosomi, che avviene progressivamente come conseguenza intrinseca del meccanismo di duplicazione cellulare. Se la lunghezza scende al di sotto di un valore limite, si ha l'arresto del ciclo cellulare.



I dati più recenti sui sopravvissuti alle bombe atomiche mostrano che esiste una correlazione tra degenerazione tissutale legate alla senescenza e dose assorbita. Preoccupanti sono quelle a carico del tessuto cardiovascolare, poiché il rischio di infarto del miocardio aumenta con la dose assorbita.

I dati sulla cataratta in astronauti e sul sistema nervoso centrale in ratti suggeriscono che gli ioni pesanti sono molto efficaci nell'indurre senescenza.

Lo studio della senescenza indotta in vitro da un fascio terapeutico di ioni carbonio è quindi di interesse per predire i danni degenerativi nel tessuto sano attraversato.⁹

Senescenza: sistema cellulare e metodiche

Sistema cellulare: cellule umane endoteliali della linea HUVEC che entrano spontaneamente in senescenza e presentano un ben definito tasso di accorciamento dei telomeri (90 bp per *population doubling*).

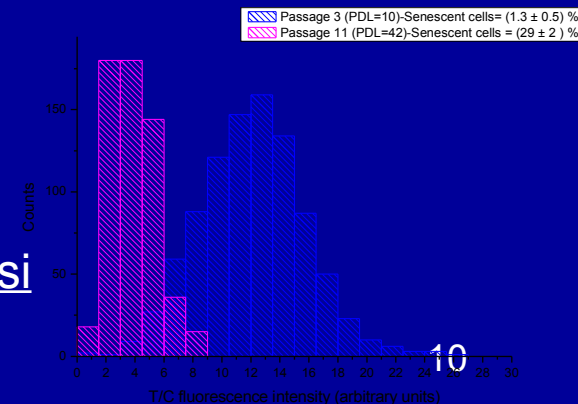
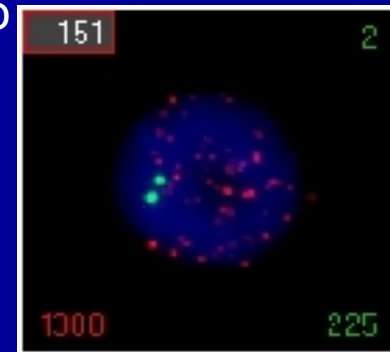
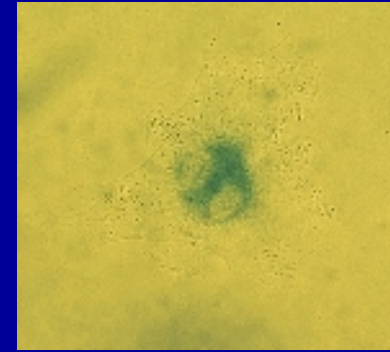
End-point e metodiche:

- **Morte clonogenica:** formazione di colonie ($n > 50$ cellule) da cellule sopravvissute a 12 giorni dall'irraggiamento.

- **Senescenza (test istochimico):** le cellule in senescenza esprimono l'enzima β -galattosidasi, il che, dopo trattamento specifico, fa loro assumere una spiccata colorazione verde.

- **Senescenza (IQ-FISH: *Interphase Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization*):** attraverso ibridizzazione con sonde fluorescenti (frammenti specifici di DNA cromosomico) sono visualizzati i telomeri (in rosso) di ogni cromosoma e un centromero (in verde). Considerando l'intensità di fluorescenza centromerica un invariante cellulare, il rapporto T/C fra le intensità dei due segnali (telomerico/centromerico) è proporzionale alla lunghezza dei telomeri.

I campioni sono analizzati con un sistema automatico di analisi d'immagini (RAIC) con software dedicato.



Senescenza (test istochimico): misure - 1

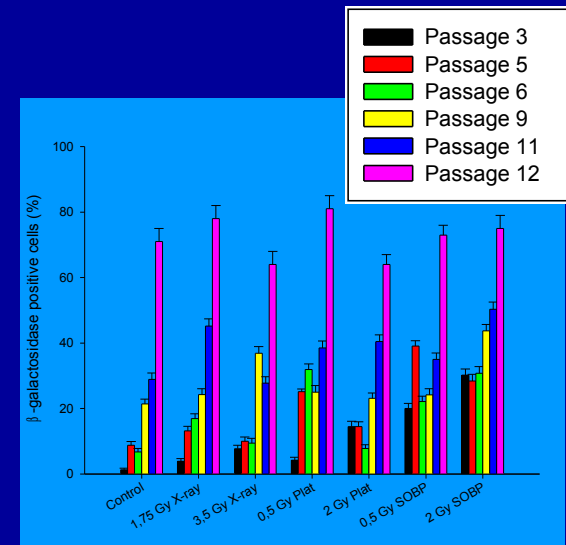
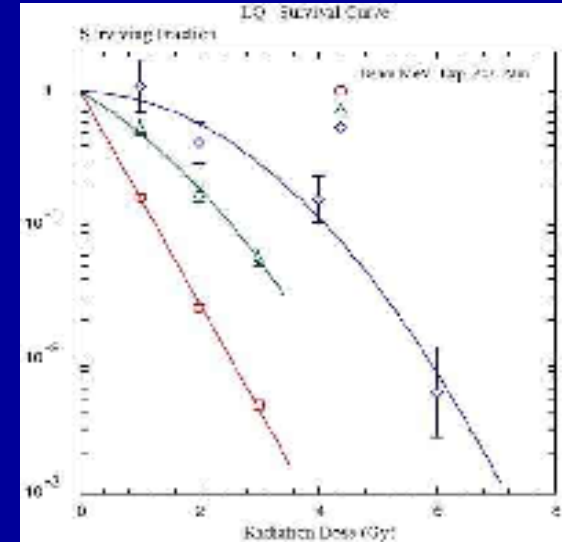
Utilizzando il fascio di ioni carbonio da 270 A MeV cellule HUVEC sono state irraggiate come mostrato in due posizioni (plateau: LET=13 keV/ μ m e SOBP: LET=100 keV/ μ m) con 0.5 e 2 Gy.

Dosi iso-effetto in termini di morte clonogenica di 1.75 e 3.5 Gy di raggi X da 250 keV sono state usate come riferimento.

Resultati:

- Le curve di sopravvivenza mostrano che gli ioni carbonio sono 2 (nel plateau) - 3 (nel SOBP) volte piú efficaci dei raggi X nell'indurre morte clonogenica in cellule HUVEC.

- L'istogramma mostra la senescenza, misurata tramite il test della β -galattosidasi, in colture cellulari derivate dalle cellule irraggiate propagate per successivi "passaggi". Cellule esposte a radiazione presentano una maggiore frequenza di cellule senescenti rispetto al controllo già al primo passaggio post-irraggiamento e ancor piú dal passaggio 5.



(L. Manti, et al. Premature senescence in human endothelial cells exposed to carbon ions. GSI Report 2007)

Senescenza (IQ-FISH): misure - 2

Se si esprime la senescenza in funzione del PDL (Population Doubling Level) ci si svincola dalle particolari condizioni di coltura.

A - Andamento della senescenza in funzione del PDL.

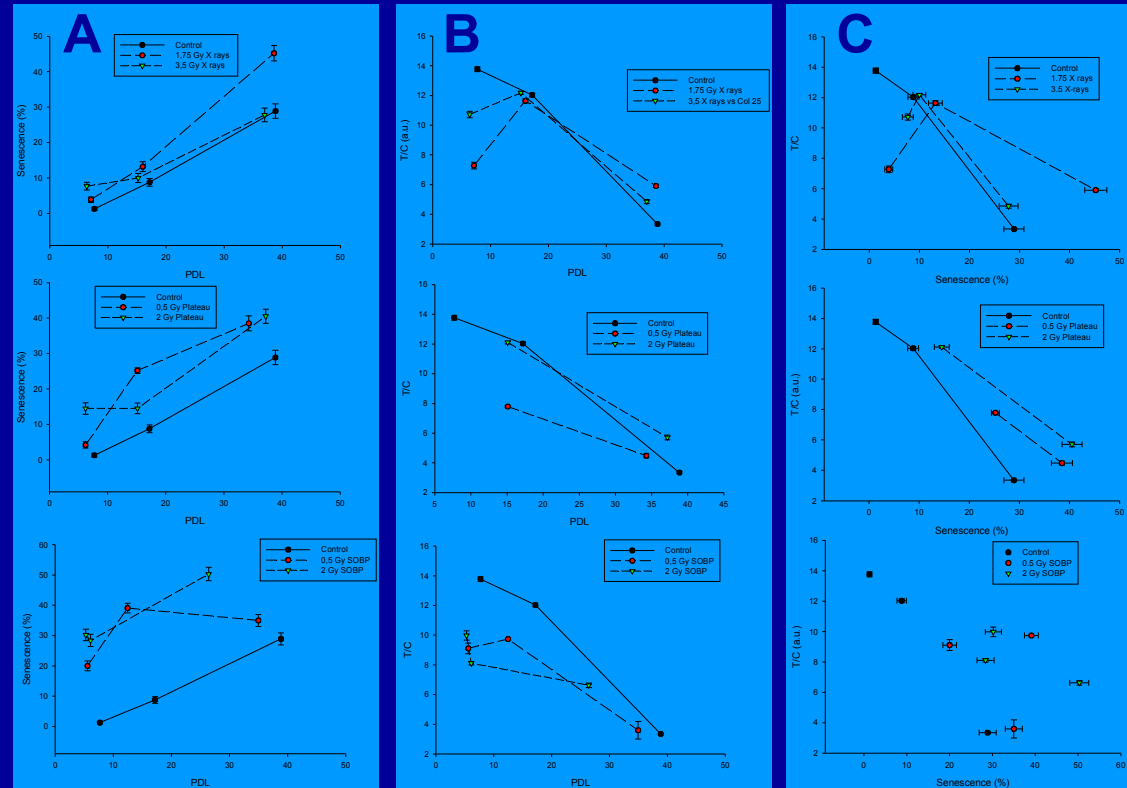
B - Andamento del rapporto T/C in funzione del PDL.

C - Andamento del rapporto T/C in funzione della senescenza a varie dosi e qualità di radiazione.

Risultati:

- Si distinguono due fasi: nella precoce gli ioni carbonio risultano più efficaci rispetto ai raggi X e tale effetto dipende dalla dose; nella ritardata dosi più basse di carbonio nella posizione del plateau tendono a provocare i maggiori effetti, mentre le differenze tra dosi di raggi X e controllo diminuiscono fortemente.

-Il rapporto T/C decresce all'aumentare del PDL e della senescenza.



(L. Manti, et al. Cultured endothelial human cells prematurely enter senescence as a non-cancer effect of high- and low-LET irradiation. ICRR 2007)

Senescenza: conclusioni e sviluppi dell'attività

Conclusioni:

- La radiazione induce senescenza prematura nel sistema HUVEC.
- La senescenza sembra occorrere in due fasi (*senescence waves*), una precoce ed una ritardata. Nella fase precoce gli ioni carbonio risultano più efficaci rispetto ai raggi X e, a parità di LET, più efficaci a basse dosi che ad alte dosi. Nella fase ritardata le differenze tra ioni carbonio, raggi X e controllo si attenuano.
- L'andamento del rapporto T/C sembrerebbe confermare che la riduzione della lunghezza telomerica nelle HUVEC è fortemente correlata con la senescenza cellulare fisiologica. I dati sembrano indicare nel caso di ioni carbonio una correlazione fra accorciamento telomerico e senescenza prematuramente radioindotta nel plateau (basso LET, tessuto sano), ma non nel SOBP (alto LET, tumore), quindi non si possono escludere effetti tardivi nel tessuto sano.

Sviluppi:

- Ripetere la misura della induzione della senescenza per chiarirne la dipendenza dall'accorciamento telomerico usando una dose (2 Gy) per il SOBP.
- Intensificare i punti dose nel plateau per confermare l'insorgenza dell'effetto alle dosi di interesse per il tessuto sano.

Effetti degenerativi: 2D vs 3D (Roma & Napoli)

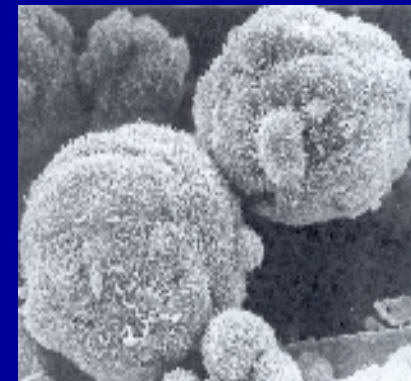
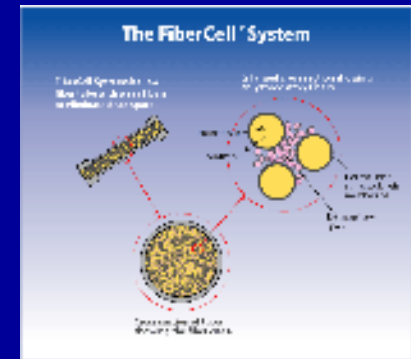
Il comportamento dei sistemi cellulari *in vitro* differisce ovviamente da quello *in vivo*, inoltre quasi tutti i dati presenti in letteratura riguardanti gli effetti indotti *in vitro* dalle radiazioni ionizzanti sono stati ottenuti su cellule coltivate ed irraggiate in monostrato.

Un confronto tra irraggiamenti *in vitro* di sistemi cellulari organizzati in 2D e 3D può essere utile per utilizzare tali risultati nei piani di trattamento radioterapeutici.

Strategie sperimentali:

- Uso di bioreattori (Fiber Cell System), in cui le cellule endoteliali siano sottoposte a condizioni quanto più simili a quelle reali simulando l'azione dello stress idrodinamico; le cellule crescono nel lumen di particolari fibre mentre il mezzo di coltura è pompato nel circuito. In queste condizioni si vogliono ripetere le misure di senescenza in cellule HUVEC per confrontarle con quelle in monostrato.

- Sistemi cellulari organizzati in 3D quali gli sferoidi che rappresentano *in vitro* la crescita e l'organizzazione di tessuti cellulari e, conseguentemente, simulano i differenti processi cellulari, inclusa la morte. Cellule MG-3 sono state esposte a radiazioni in configurazione 2D e 3D per misurare e confrontare le diverse tipologie di morte radiondotta (apoptosi e catastrofe mitotica).



Sferoidi di MG-63 al SEM (1100 X)

2D vs 3D (Fiber cell): work in progress

In condizioni di flusso idrodinamico, simili alle condizioni in vivo, la proliferazione cellulare è molto limitata. Nei test finora effettuati con cellule HUVEC, problemi sono stati incontrati per le condizioni ottimali di inoculazione e di recupero delle cellule dal bioreattore.

Il protocollo di crescita è stato ottimizzato (training c/o l'Institute For Environmental Medicine - University of Pennsylvania, Philadelphia).



Protocollo di irraggiamento:

Cellule verranno irraggiate in fiasche con ioni carbonio e raggi X e coltivate in fiasche (2D) e in bioreattore (3D). Dopo 4-5 giorni, le cellule saranno prelevate dal bioreattore e fatte crescere per 24-48h in 2D.

In condizioni normali le cellule, una volta pre-adattate al flusso (condizioni fisiologiche) e poi sottoposte alla sua cessazione, incrementano la proliferazione.

Se in condizioni fisiologiche le cellule irraggiate subiscono un'accelerazione nella insorgenza della senescenza, la loro proliferazione sarà inibita una volta che le condizioni di flusso saranno arrestate, cioè una volta fatte crescere in fiasche.



2D vs 3D (sferoidi): misure, conclusioni e sviluppi

End-point e metodiche:

Nella linea cellulare umana MG-63, cresciuta in monostrato e come sferoidi tridimensionali, è stata analizzata la morte indotta da radiazioni (apoptosi o catastrofe mitotica) dopo esposizione a 5 Gy di fotoni γ da ^{60}Co , usando il colorante Hoechst 33258.

L'espressione delle molecole di adesione, e in particolare il ruolo delle caspasi, è stato analizzato utilizzando l'inibitore zVAD-fmk.

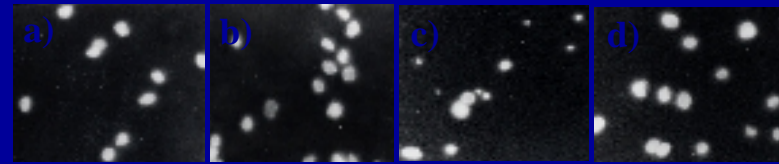
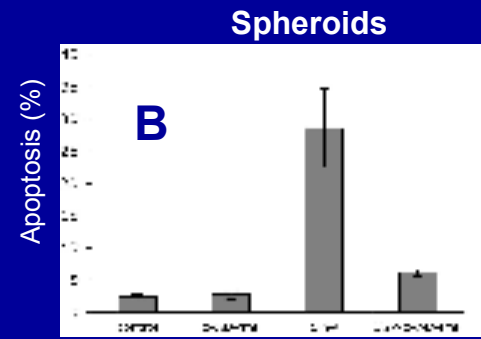
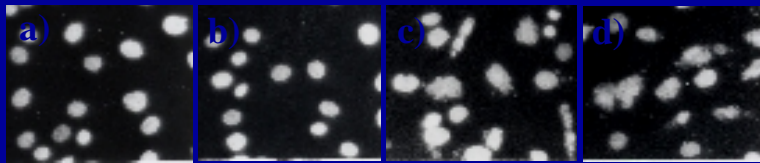
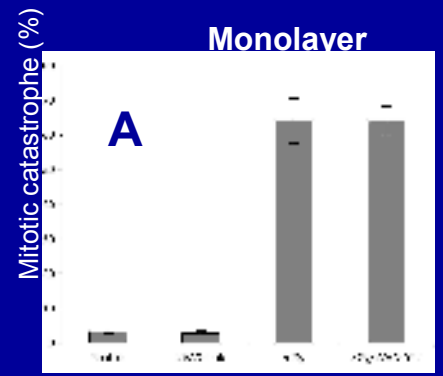
Risultati:

- La morte radioindotta dipende dall'organizzazione 2D/3D. Per cellule in monostrato (A) è dominante la catastrofe mitotica, per gli sferoidi (B) prevale l'apoptosi.

- L'analisi in parallelo di proteine correlate all'attività di elementi responsabili di ipossia sembrerebbe indicare il coinvolgimento di questo processo.

Sviluppi:

- Estendere questa analisi agli ioni carbonio, irraggiando gli sferoidi con isodosi (stessa SV dei gamma) nella zona di plateau e di SOBP.



(P. Indovina et al. Three-dimensional cell organization leads to a different type of ionizing radiation-induced cell death: MG-63 monolayer cells undergo mitotic catastrophe while spheroids die of apoptosis. Radiat. Res. In press)

Partecipanti al progetto (2006-2007)

Trasformazione cellulare:

Daniela Bettega - Università, Milano

Paola Calzolari - Università, Milano

Luisa Doneda - Università, Milano

Wilma Weyrather - GSI, Darmstadt

Petra Hessel - GSI, Darmstadt



Senescenza e 2D vs 3D (bioreattore):

Cecilia Arrichiello - Università Federico II, Napoli

Marco Durante - Università Federico II, Napoli

Giancarlo Gialanella - Università Federico II, Napoli

Gianfranco Grossi - Università Federico II, Napoli

Lorenzo Manti - Università Federico II, Napoli

Mariagabriella Pugliese - Università Federico II, Napoli

Paola Scampoli - Università Federico II, Napoli

Thilo Elsässer - GSI, Darmstadt

Silvia Ritter - GSI, Darmstadt



2D vs 3D (sferoidi):

Pietro Luigi Indovina - Università Federico II, Napoli

Antonella Ferrante - Istituto Superiore di Sanità, Roma

Gabriella Rainaldi - Istituto Superiore di Sanità, Roma

Maria Teresa Santini - Istituto Superiore di Sanità, Roma

