

RADIOBIOLOGIA (AA 2010-2011)

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI
Facoltà di Medicina e Chirurgia
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN FISICA MEDICA**

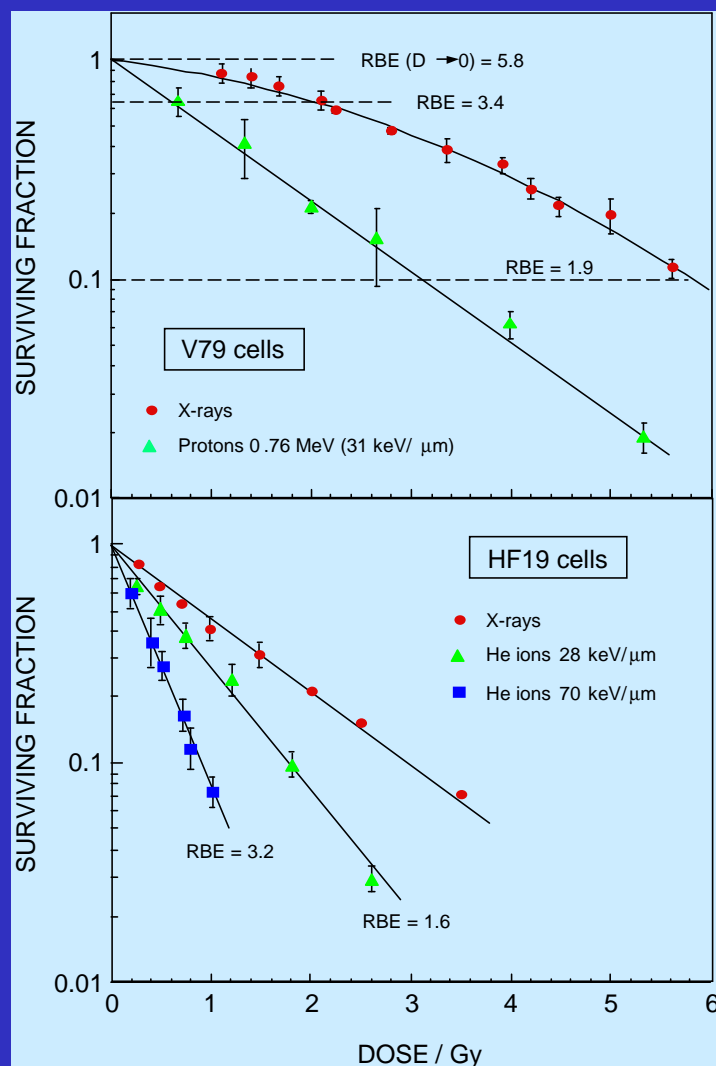
Prof. Mauro Belli
mauro.belli@iss.it mauro.belli@iss.infn.it
mau.belli1@gmail.com

**Parte 11.
Fattori fisici e biofisici
che modificano la risposta cellulare**

Fattori fisici e biofisici che modificano la risposta cellulare

- qualità della radiazione
- distribuzione temporale della dose
- organizzazione del bersaglio

Qualità della radiazione e curve di sopravvivenza



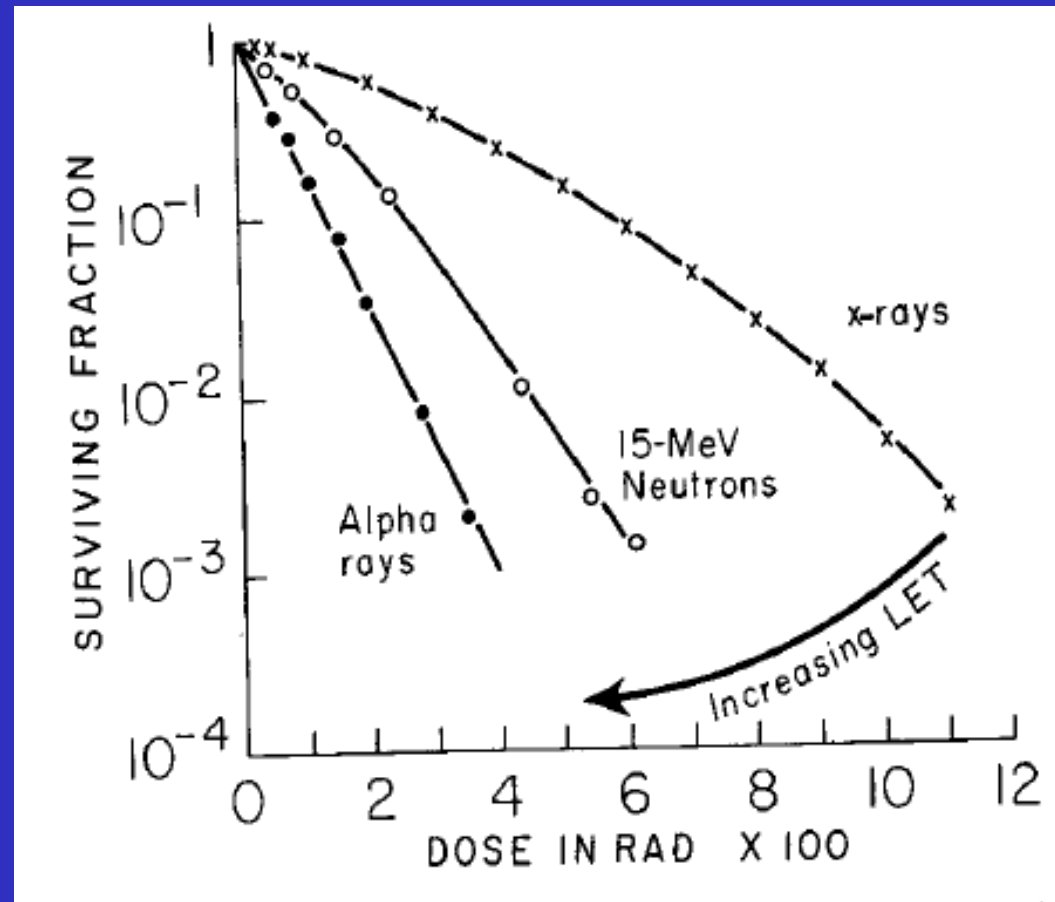
**Curve dose-risposta
per diverse radiazioni
e per diverse linee cellulari**

*(Belli et al Int. J. Radiat. Res., 1989
Cox et al, Int. J. Radiat. Res., 1979)*

**All'aumentare del LET (densità di
ionizzazione):**

- riduzione della spalla (per linee che ne possiedono)
- aumento della pendenza (per linee che hanno risposte lineari)

Qualità della radiazione e curve di sopravvivenza



Efficacia biologica relativa

Gli effetti biologici (cellulari)
dipendono dalle caratteristiche fisiche
della radiazione

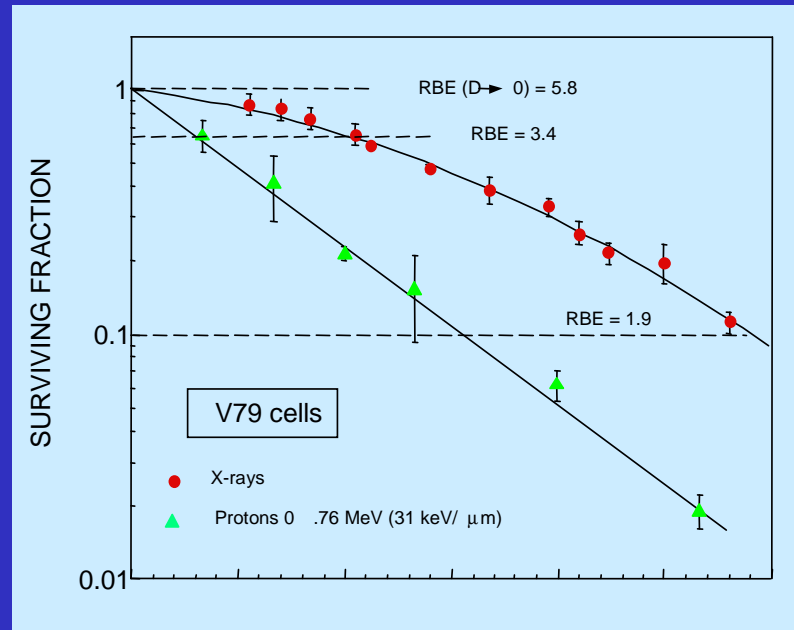
Efficacia biologica relativa

(RBE, Relative Biological Effectiveness)
di una radiazione

rispetto ad un'altra di riferimento (raggi X o gamma)

$$\text{RBE} = \frac{\text{dose radiazione di riferimento}}{\text{dose radiazione considerata}} \quad \text{a parità di effetto}$$

Qualità della radiazione e curve di sopravvivenza



$$\text{RBE} = \frac{\text{dose radiaz. di riferimento}}{\text{dose radiaz. considerata}} \quad \text{a parità di effetto}$$

Per risposte ai raggi X o gamma con spalla iniziale, l'efficacia biologica relativa (RBE) dipende dal livello di effetto (dose)

Qualità della radiazione

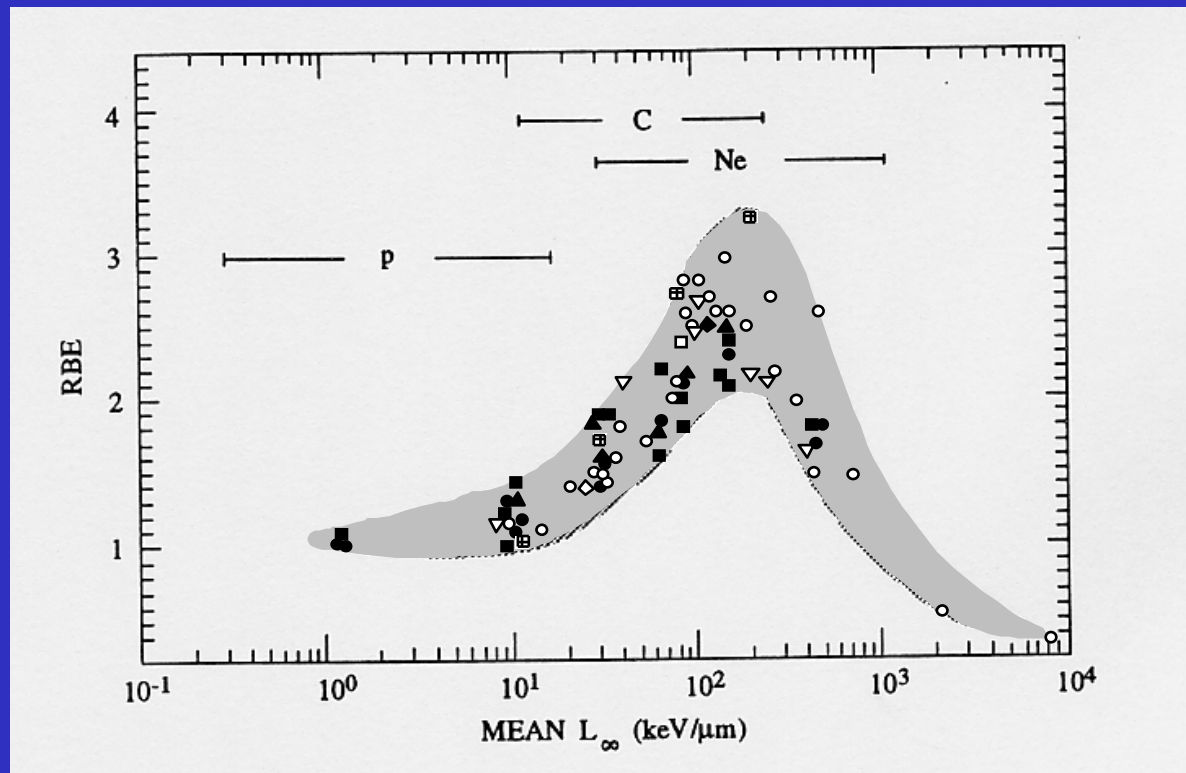
- Insieme delle caratteristiche della radiazione che, determinando la distribuzione spaziale dei depositi energetici, influiscono sulla sua efficacia biologica.
- Sono identificabili con la natura e l'energia delle particelle cariche responsabili della distribuzione spaziale della dose.
- L'efficacia biologica è in realtà legata alla particolare struttura di traccia della radiazione considerata.

Qualità della radiazione e LET

- Il trasferimento lineare d'energia (Linear Energy Transfer, LET) è correntemente usato come indicatore approssimato della qualità della radiazione.
- Il **LET** esprime l'energia trasferita alla materia dalle particelle cariche per unità di percorso lineare ed è proporzionale al numero di ioni prodotti per unità di percorso. Nelle applicazioni che qui interessano i fotoni e gli elettroni sono considerati radiazioni a basso LET.
- Pur essendo il LET definito solo per particelle cariche, ai fotoni viene attribuito un valore di LET pari al valor medio della distribuzione di LET degli elettroni secondari prodotti. Ai fotoni gamma emessi dal cesio-137 e dal cobalto-60 si attribuisce un LET pari a 1 e 0.2 keV/ μm , rispettivamente.

RBE - LET

RBE al 10% di sopravvivenza (*Blakely et al, Heavy ions radiobiology:cellular studies. Adv. Radiat. Biol. 1984*)



Dati da numerose linee cellulari

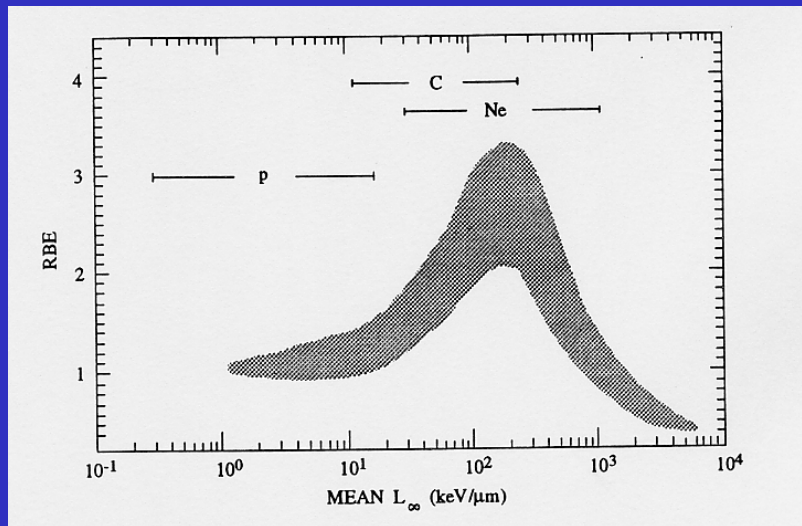
Relazione tra RBE e LET

L'RBE per gli effetti cellulari in generale dipende dal LET della radiazione ma la relazione precisa RBE-LET dipende dal tipo di particella.

Tuttavia si può individuare un andamento generale dell'RBE in funzione del LET, che è crescente fino a raggiungere un massimo a valori di LET di 100-200 keV/mm e poi discende fino a raggiungere valori anche inferiori a 1.

La discesa è connessa con l'eccesso di energia rilasciata dalle particelle molto densamente ionizzanti che, costituendo uno "spreco", abbassa l'efficienza per la produzione dell'effetto biologico.

In molte applicazioni, come la radioprotezione, il LET è correntemente utilizzato come **indicatore** della qualità della radiazione.

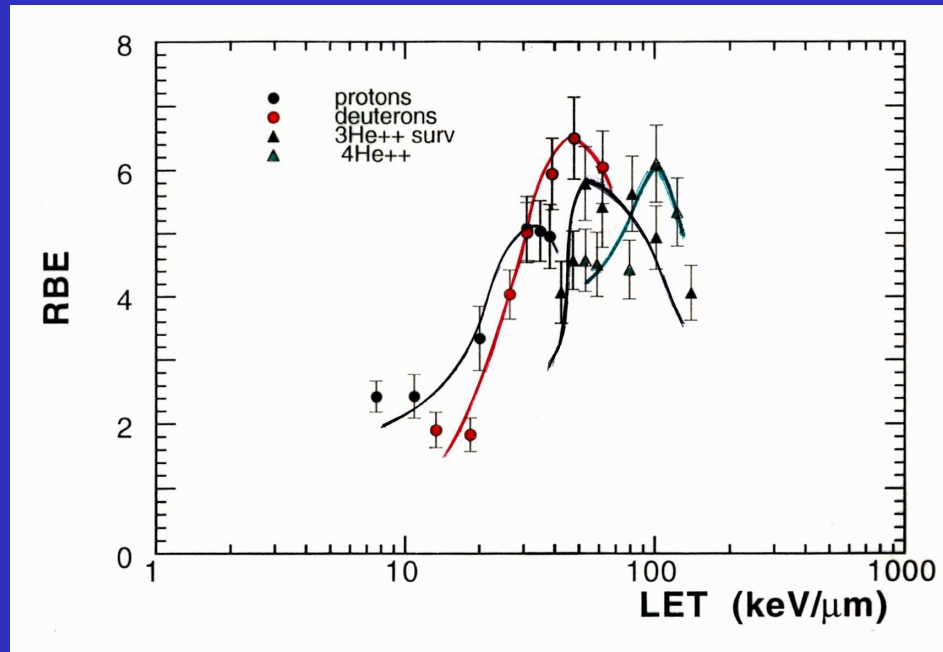


L'efficacia biologica è in realtà legata alla particolare **struttura di traccia** della radiazione considerata.

RBE al 10% di sopravvivenza. Dati da numerose linee cellulari

(figura adattata da: Blakely et al Adv. Radiat. Biol. 1984)

RBE-LET for inactivation of V79 cells by protons and other light ions



*Belli, Cherubini et al.
Int.J.Radiat.Biol.
1989, 1998*

*(co-operation INFN-LNL, ISS-
Rome, CNR-Bologna)*

- First experimental evidence that for cellular effects the RBE-LET relationships for light ions depends on the particle type.
- Up to $LET \approx 30 \text{ keV}/\mu\text{m}$ protons are more effective than other light ions of comparable LET.
- (In contrast, little or no significant dependence on LET or particle type has been found for DSB induction).

Descrittori della qualità della radiazione

LET = buon descrittore ?

Interazione delle particelle pesanti cariche

- Collisioni coulombiane
 - Collisioni anelastiche con gli elettroni del mezzo (il principale meccanismo di perdita d'energia nell'intervallo 1-500 Mev)
 - Collisioni con i nuclei (significative solo a bassa energia)
- Reazioni nucleari
- Perdite radiative (bremsstrahlung), emissioni Cherenkov, (relativamente poco frequenti)

Anche se relativamente poco frequente, la frammentazione dei nuclei del mezzo attraversato (target fragmentation) produce secondari densamente ionizzanti, importanti dal punto di vista radiobiologico. Nel caso di ioni pesanti l'interazione con i nuclei del mezzo può produrre la frammentazione di primi (projectile fragmentation). Questi processi sono importanti in adroterapia perché cambiano la qualità della radiazione de fascio terapeutico di ioni.

Il LET o potere frenante (particelle pesanti cariche): la formula di Bethe e Bloch

Potere frenante (massico) per collisione di un mezzo:

$$\frac{1}{\rho} S_{col} = \frac{1}{\rho} L_{\infty} = \frac{4\pi r_e^2 mc^2}{u} \frac{Z}{A} \frac{z^2}{\beta^2} \cdot \left[\ln \left(\frac{2mc^2 \beta^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2 \right]$$

dove:

S_{col} = potere frenante lineare per collisione,

L_{∞} = trasferimento lineare d'energia (non ristretto) della particella,

r_e = raggio classico dell'elettrone,

mc^2 = energia di riposo dell'elettrone,

u = unità di massa atomica (1/12 della massa dell'atomo del ^{12}C),

Z, A = numero atomico e massa atomica (relativa) del mezzo,

ρ = densità del mezzo,

z, β = carica elettrica (in unità di carica dell'elettrone) e velocità (relativamente alla velocità della luce) della particella,

I = energia d'eccitazione media del mezzo.

Per particelle non relativistiche ($v \ll c$) di energia T si ha:

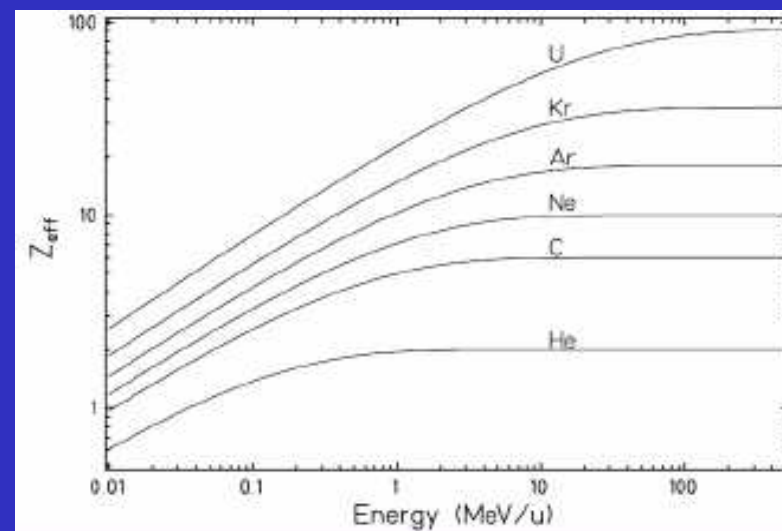
$$\beta = \frac{v}{c} = \frac{1}{c} \sqrt{\frac{2T}{m}} = 4.63 \cdot 10^{-2} \sqrt{\frac{T/\text{MeV}}{m/u}}$$

Il LET o potere frenante (particelle pesanti cariche): la correzione di Barkas

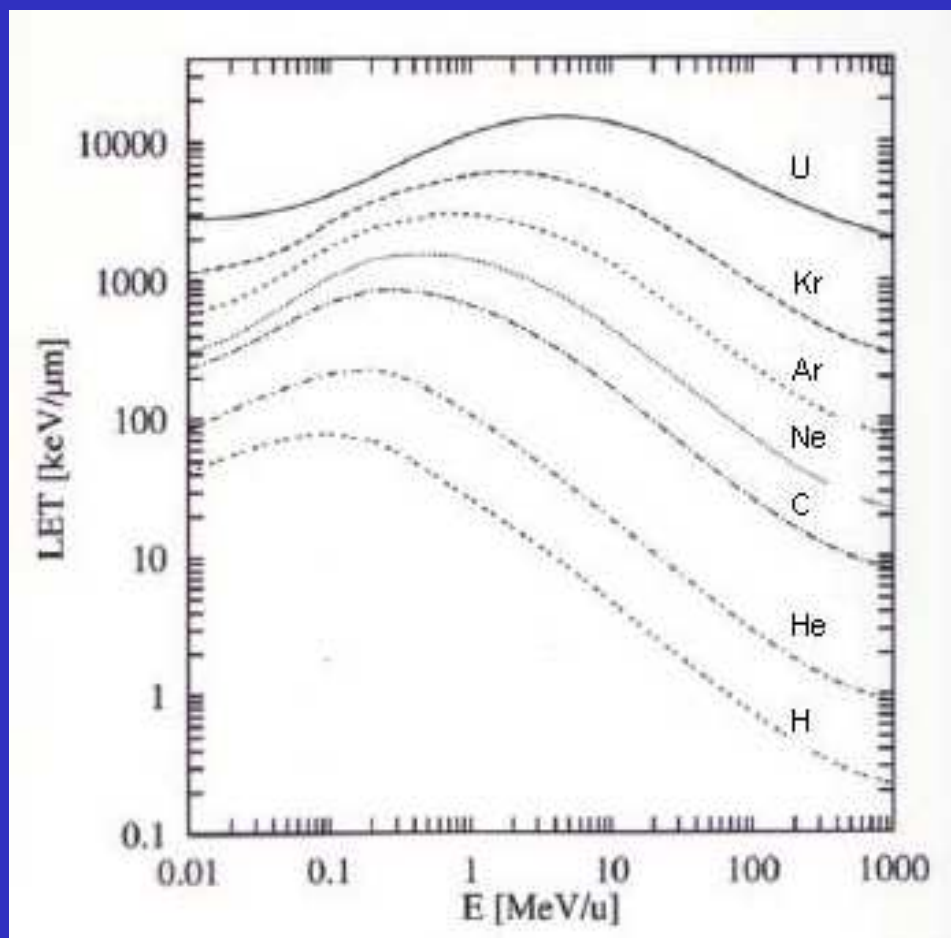
La formula di Bethe-Bloch perde di validità alle basse energie, quando la velocità della particella diventa confrontabile con quella degli elettroni atomici. La continua cattura e perdita di elettroni produce una fluttuazione di carica, il cui valore medio è inferiore alla carica iniziale della particella. Si tiene conto di questo fenomeno introducendo una "carica efficace" data dalla formula di Barkas (1964):

$$Z_{\text{eff}} = Z_p \left[1 - \exp \left(-125 \beta Z_p^{\frac{2}{3}} \right) \right]$$

Z_p = carica iniziale della particella
 β = velocità relativa della particella

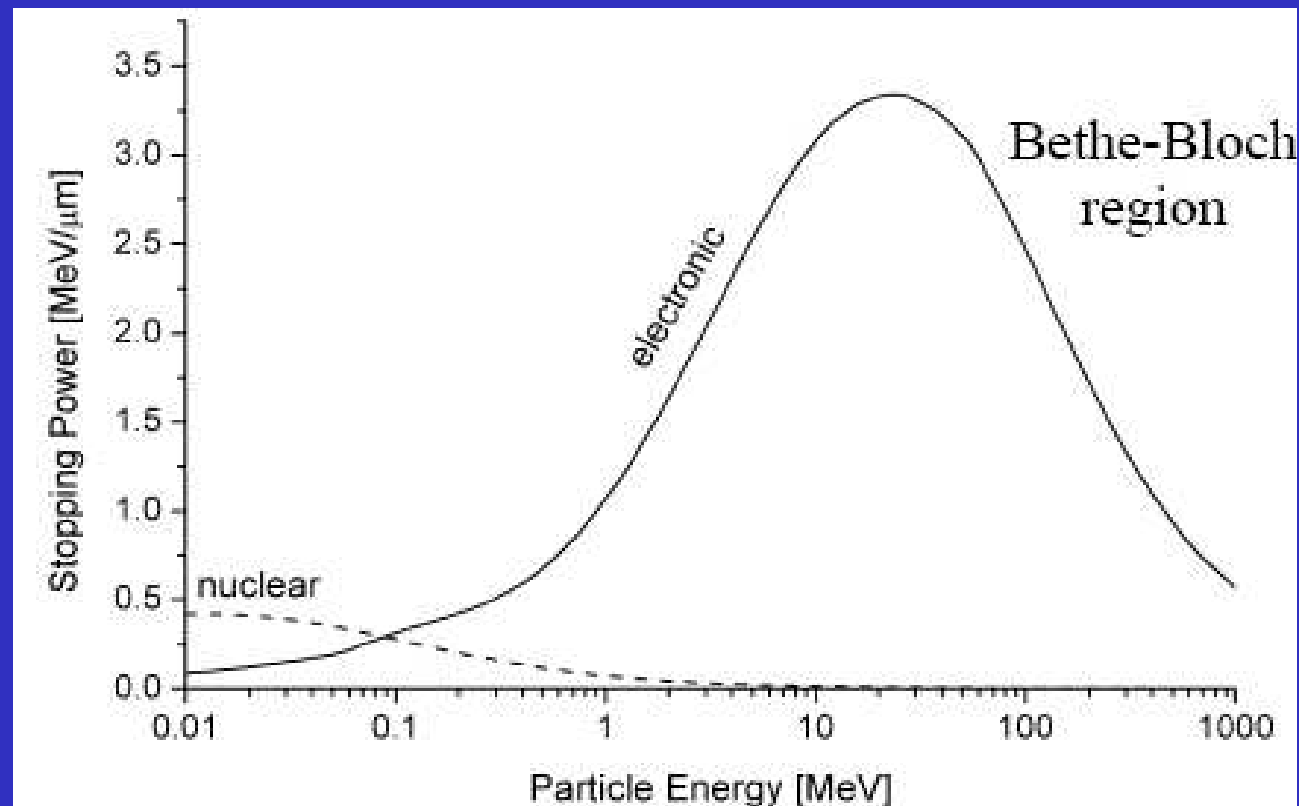


Il LET o potere frenante (particelle pesanti cariche) in funzione dell'energia



LET per varie particelle
cariche calcolato in acqua

Il LET o potere frenante (particelle pesanti cariche): applicabilità della formula di Bethe e Bloch



LET e struttura di traccia (particelle pesanti cariche): energia degli elettroni secondari

Massima energia cinetica ceduta ad un elettrone secondario (caso non relativistico):

$$E_{\max} = \frac{4mM}{(m+M)^2} E \approx \frac{4m}{M} E = 2mc^2 \beta^2$$

dove:

E, M = energia cinetica e massa della particella.

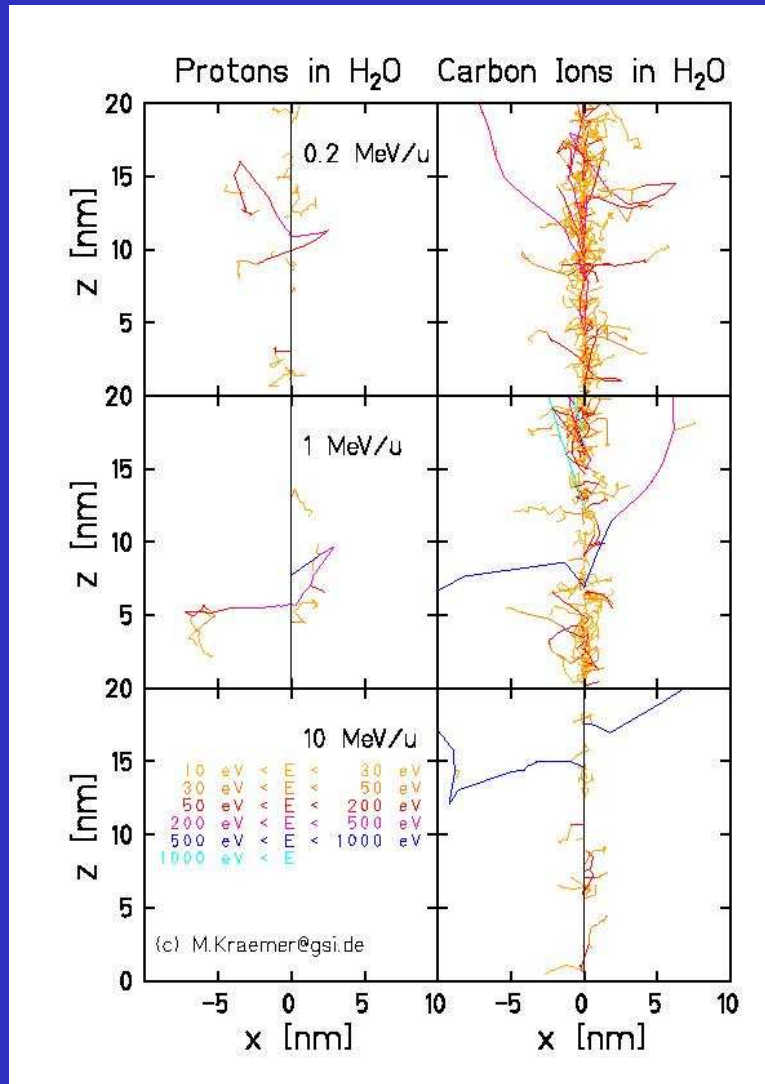
Spessore della traccia (massimo percorso degli elettroni secondari o raggi δ):

$$r_{\max} (\mu m) = 0.226 \cdot [E / M (MeV / u)]^{1.7}$$

Alcune conseguenze:

1. Due particelle diverse che hanno lo stesso rapporto z/β e che attraversano un dato mezzo hanno all'incirca lo stesso L_{∞} .
Se però hanno diversa carica, hanno anche diversa velocità e producono un diverso spettro di elettroni secondari; quindi la loro struttura di traccia è diversa.
La particella con maggior carica produce tracce di maggior spessore.
2. Due particelle diverse che hanno diversa massa ma stessa carica e stesso rapporto z/β e che attraversano un dato mezzo hanno lo stesso L_{∞} . Hanno lo stesso spettro di elettroni secondari e quindi la stessa struttura di traccia.

Struttura di traccia

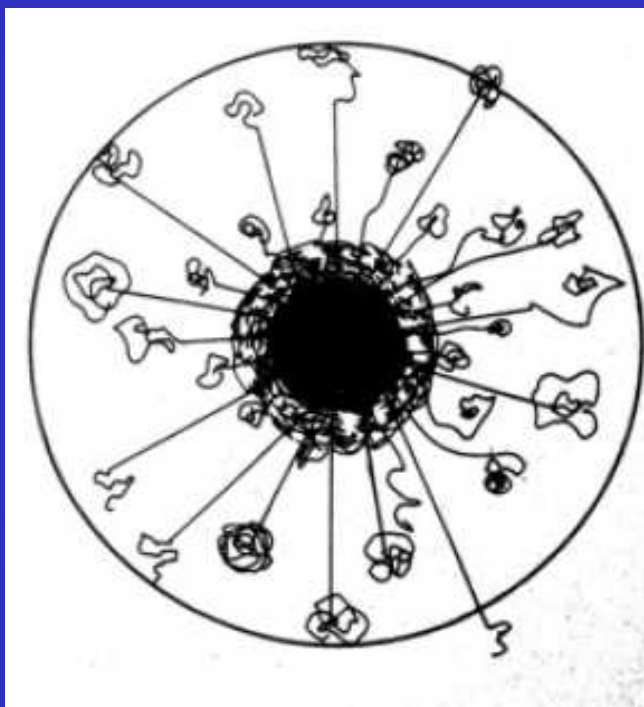


La struttura di traccia dipende da z , β , E della particella e dal mezzo attraversato

Simulazione di tracce di varie particelle con codice di Montecarlo (GSI)

Struttura di traccia: profilo radiale

Profilo radiale di dose



-Zona ad alta densità di ionizzazione prodotta dalle particelle primarie (core). Il raggio del core è dell'ordine di 1-10 nm, e dipende dal LET (in pratica da z^2/β^2) dalla particella. La dose è assunta uniforme.

- Zona di ionizzazioni prodotte dagli elettroni secondari (penombra). Si estende fino alla massima distanza data dalla massima energia degli elettroni delta, che dipende dal β della particella. La dose decresce come $1/r^2$.

Struttura di traccia: raggio della penombra

Approccio di Katz (Butts and Katz, Radiat.Res. 1967):

- trattazione semplificata della distribuzione energetica e spaziale degli elettroni secondari;
- relazione empirica tra il range e l'energia massima E_{\max} degli elettroni secondari

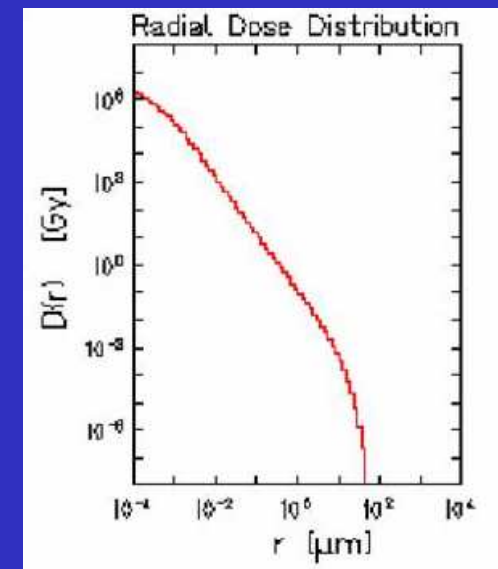
$$D(r, \beta, Z_{\text{eff}}) = \frac{CZ_{\text{eff}}^2}{2\pi\beta^2 r} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{r_{\max}} \right),$$

$$C = \frac{4\pi e^4}{mc^2}, \quad r_{\max} = kE_{\max}, \quad k = 10 \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2 \text{keV}}$$

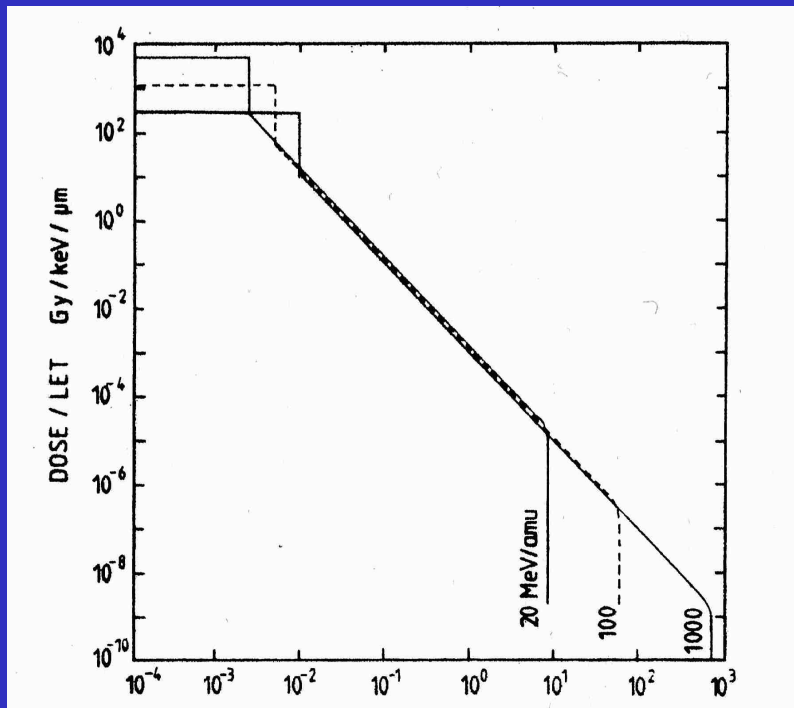
Successivamente modificata (Waligorski, Hamm and Katz, 1986) in:

$$r_{\max} = k E_{\max}^{\alpha}$$

con $k = 6 \times 10^{-6} \text{ g cm}^{-2} \text{ keV}^{-\alpha}$
 e α dipendente dalla velocità β dello ione:
 per $\beta < 0.03$, $\alpha = 1.079$ e
 per $\beta > 0.03$, $\alpha = 1.667$.



Struttura di traccia: particelle con lo stesso LET e diversa energia



Profilo radiale di dose calcolato per particelle cariche aventi lo stesso LET ma diverse energie specifiche (Kiefer et al, Adv. Space Res. 1983)

Assunzione di equipartizione della perdita di energia tra il core e la penombra.

Particelle con minore energia specifica hanno un core e una penombra più stretti e un core più denso.

Struttura di traccia: raggio della penombra per ioni leggeri con lo stesso LET e diversa energia specifica

	PROTONS (1 u)				ALPHA-PARTICLES (4 u)			
L_{∞} (keV/ μm)	E (MeV)	E_N (MeV/u)	β	r_{max} (μm)	E (MeV)	E_N (MeV/u)	β	r_{max} (μm)
20	1.38	1.38	0.054	0.39	35	8.7	0.137	9.0
23	1.16	1.16	0.050	0.29	30	7.5	0.128	6.9
38	0.56	0.56	0.035	0.08	16	4.0	0.093	2.4

da: Belli et al., *Physical and Radiobiological Properties of Hadron Beams. In: The TERA Project and the Centre for Oncological Hadrontherapy, Amaldi and Silari Eds., INFN-LNF 1995.*

Raggio della traccia = percorso massimo dei raggi delta calcolato con la formula:

$$r_{\text{max}} (\mu\text{m}) = 0.226 [E_N(\text{MeV/u})]^{1.7}$$

dove E_N è l'energia per nucleone, che corrisponde alla velocità relativa β riportata in tabella

La fluenza di particelle

Fluenza F = n. particelle che incide sulla sezione unitaria

Relazione tra F e D (all'equilibrio elettronico !):

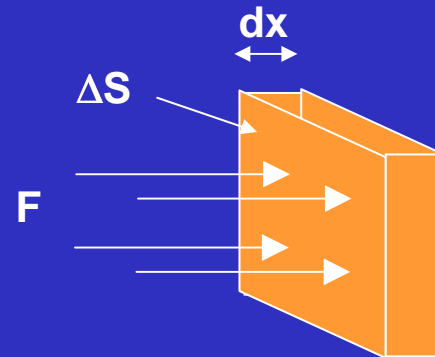
$$D = \Delta E / \Delta m = F \cdot \Delta S \cdot L \cdot \Delta x / (\rho \cdot \Delta V) = F \cdot L / \rho$$

ρ = densità del mezzo; $\Delta V = \Delta S \cdot \Delta x$ = volume elementare del mezzo

$$D \text{ (Gy)} = 1.6 \cdot 10^{-9} \cdot F \text{ (cm}^{-2}\text{)} \cdot L \text{ (keV/}\mu\text{m)} / \rho \text{ (g/cm}^3\text{)}$$

$$D \text{ (Gy)} \cong 1.6 \cdot 10^{-9} \cdot F \text{ (cm}^{-2}\text{)} \cdot L \text{ (keV/}\mu\text{m)}$$

avendo assunto per le cellule $\rho \cong 1 \text{ g/cm}^3$



Sezione d'urto

Sezione d'urto $\sigma = dE/dF$ ad un certo livello di effetto E

Dove E è un effetto cellulare qualsiasi (n_{let} , n_{DSB} , $M-M_0$, etc.)

$$\sigma = dE/dF = dE/dD \cdot dD/dF = k \cdot L \cdot dE/dD$$

alle basse dosi: $dE/dD \rightarrow \alpha$

$$\sigma (D \rightarrow 0) = k \cdot L \cdot \alpha$$

Se σ in cm^2 , L in $\text{keV}/\mu\text{m}$, α in Gy^{-1} : $k = 1.6 \cdot 10^{-9}$

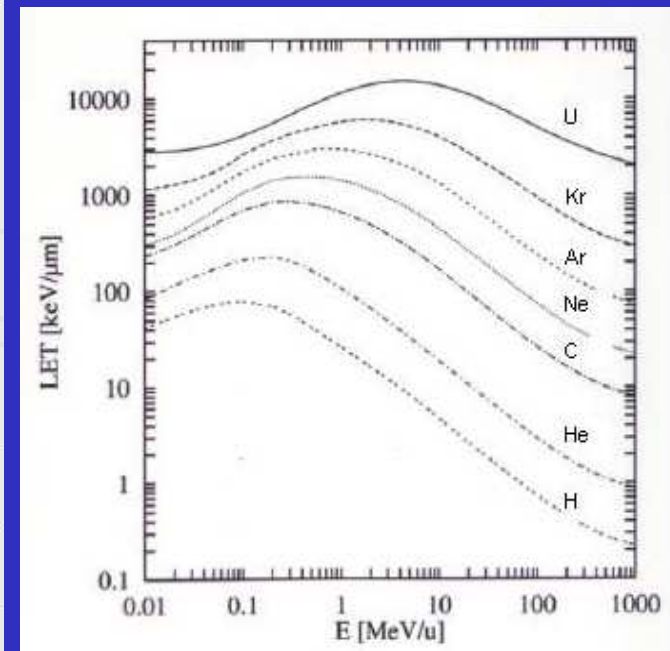
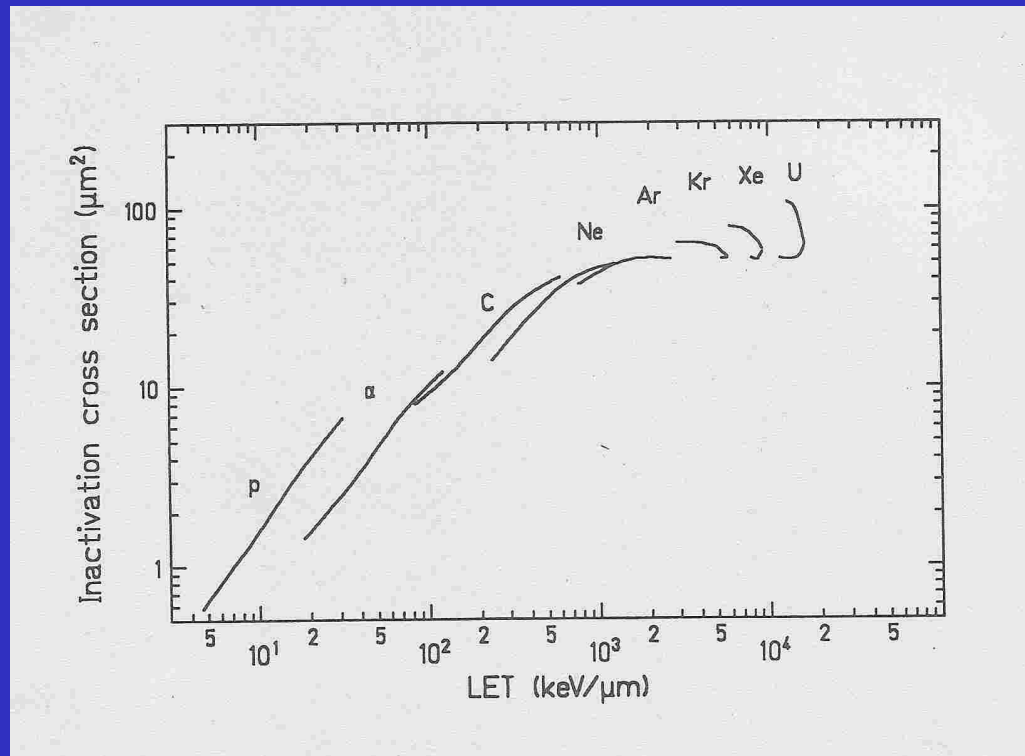
Se σ in μm^2 , L in $\text{keV}/\mu\text{m}$, α in Gy^{-1} : $k = 0.16$

Per l'inattivazione l'effetto da considerare è il n. di eventi letali $n_{\text{let}} = -\ln S$

$\sigma_{\text{in}} (D \rightarrow 0) = -k \cdot L \cdot d\ln S/dD$ e poiché $d\ln S/dD (D \rightarrow 0) = -\alpha_{\text{iv}}$:

$$\sigma_{\text{in}} (D \rightarrow 0) = k \cdot L \cdot \alpha_{\text{in}}$$

Sezione d'urto per inattivazione

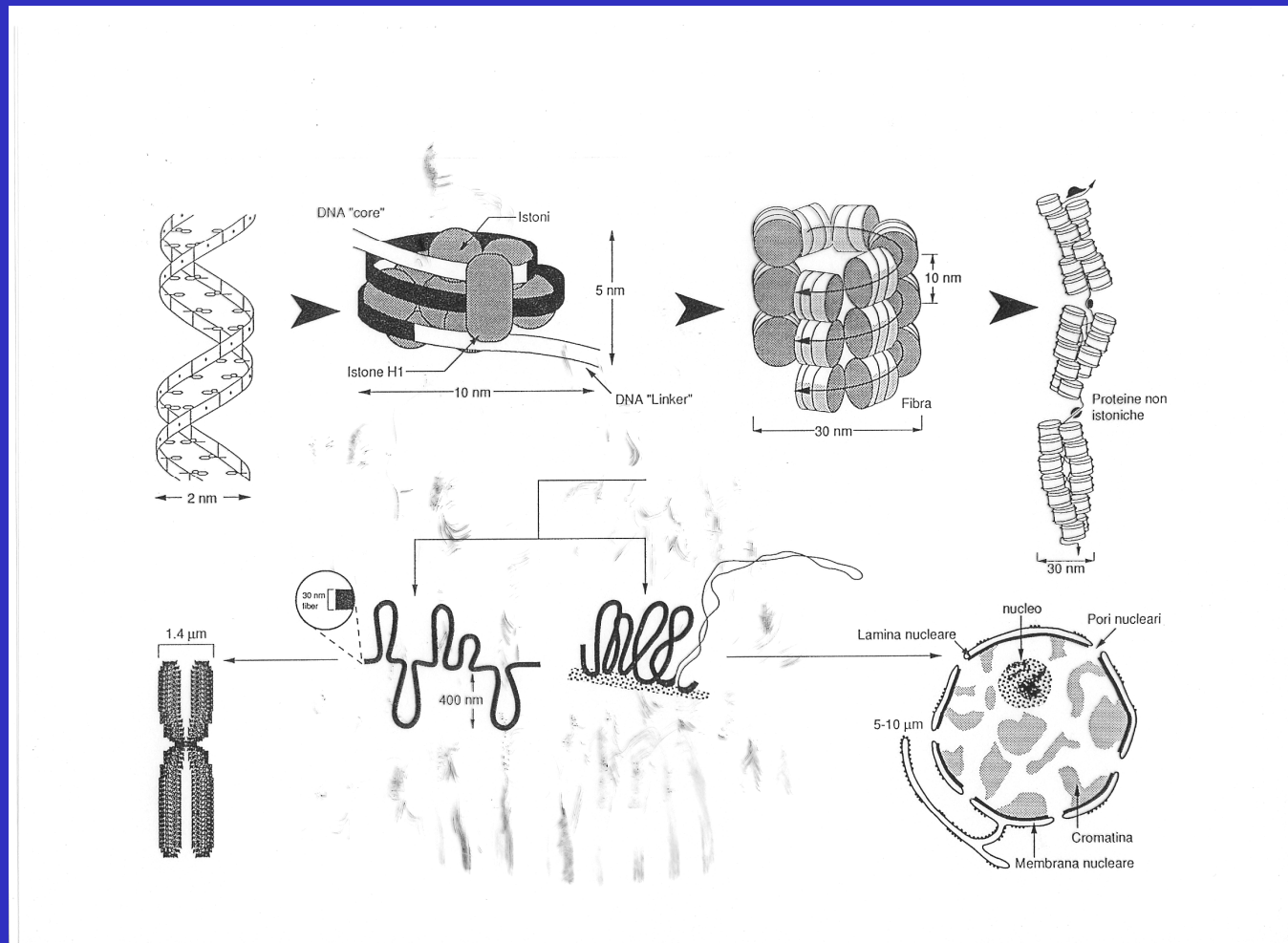


Le curve σ_{in} in funzione del LET sono specifiche per ciascun tipo di particella. Gli “hooks” che appaiono per gli ioni pesanti sono dovuti alla relazione tra LET ed energia.

Interazione tra struttura della cromatina e struttura di traccia

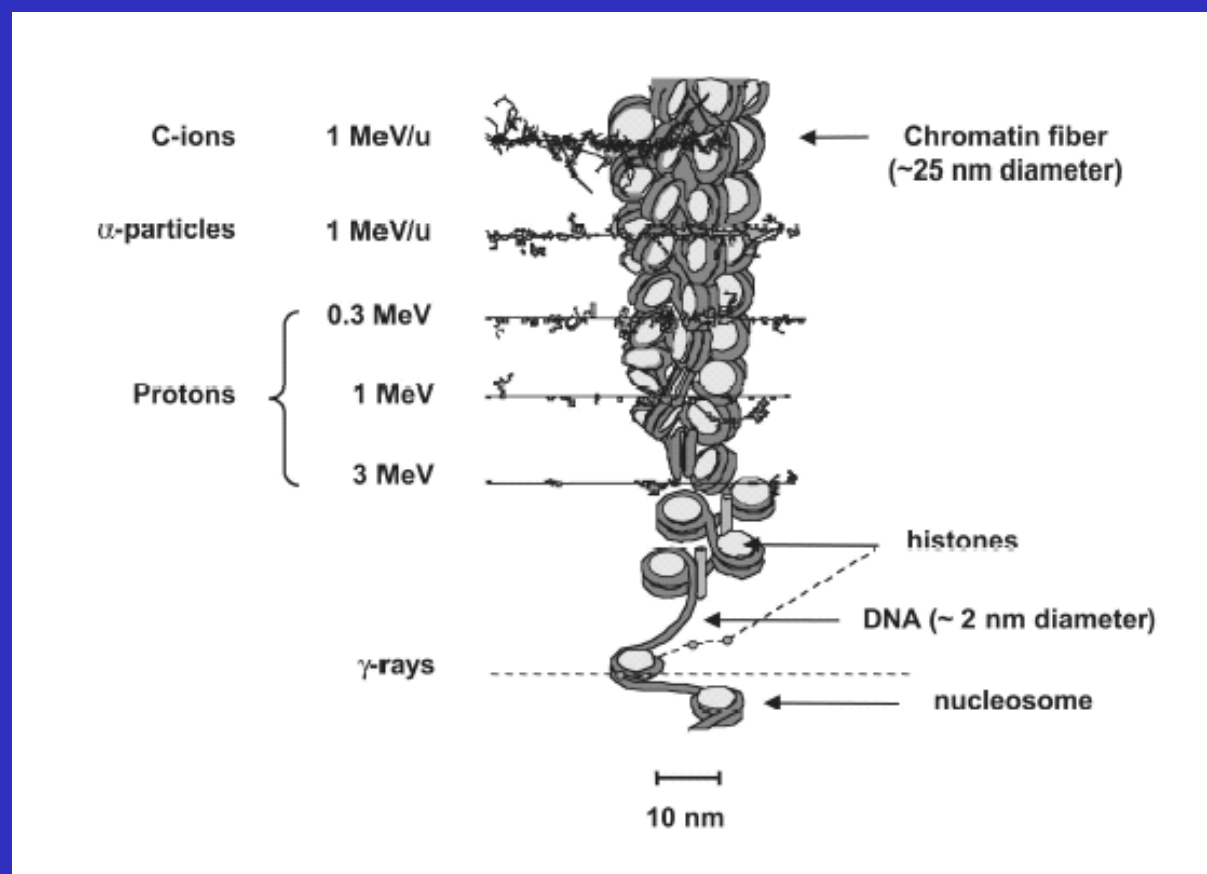
La probabilità di lesioni al DNA e la loro distribuzione spaziale è determinata dall'interazione tra la struttura di traccia delle r i e la struttura della cromatina

i diversi livelli dell'organizzazione della cromatina



Interazione tra la struttura di traccia e la struttura della cromatina

(a livello dei nucleosomi e della fibra cromatinica)

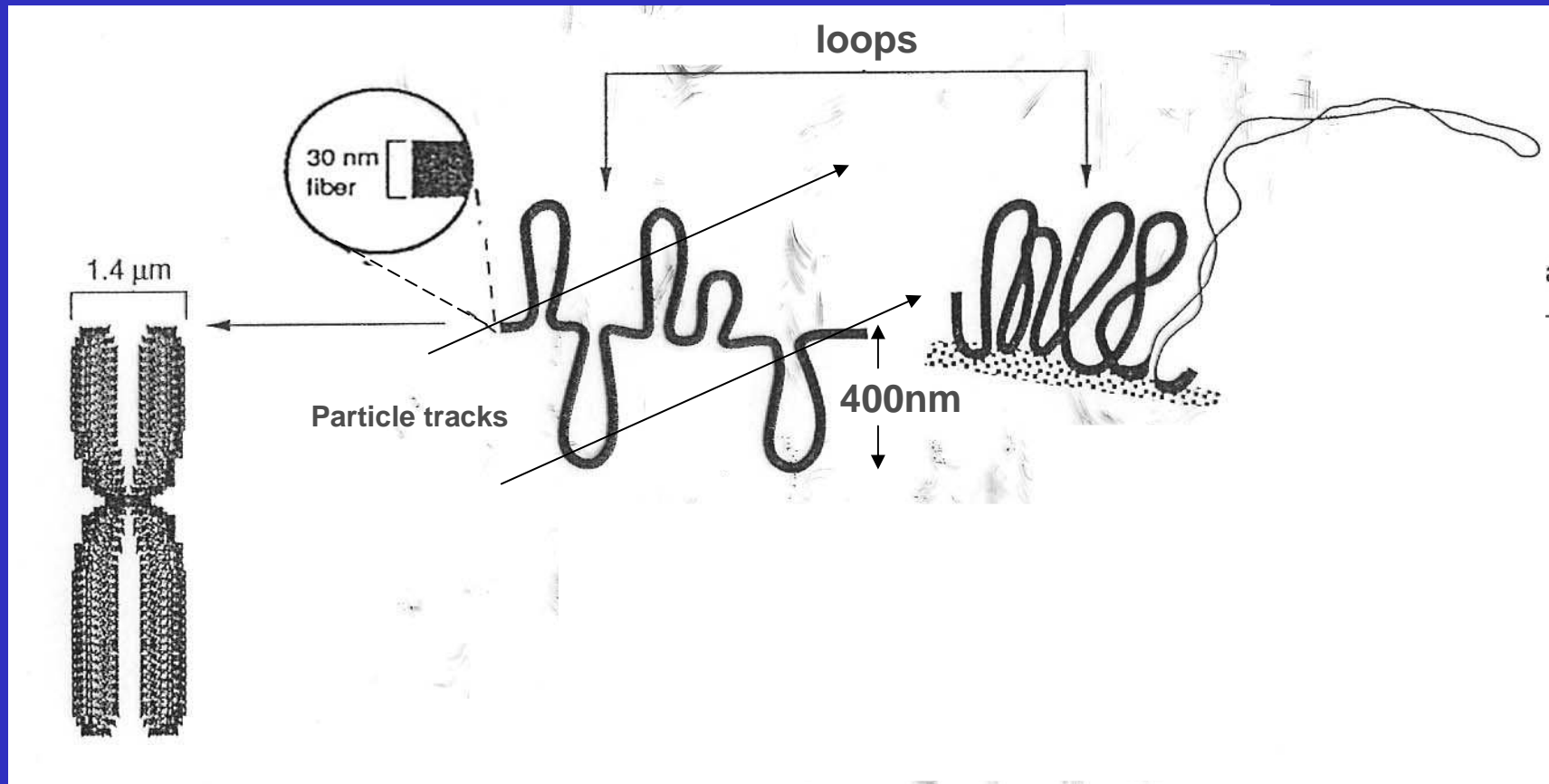


La probabilità di lesioni
al DNA e la loro
distribuzione spaziale è
determinata
dall'interazione tra la
struttura di traccia delle
RI e la struttura della
cromatina

Da: Belli et al. Journal Radiation Research, 2003

Interazione tra la struttura di traccia e la struttura della cromatina

(a livello dei loops)

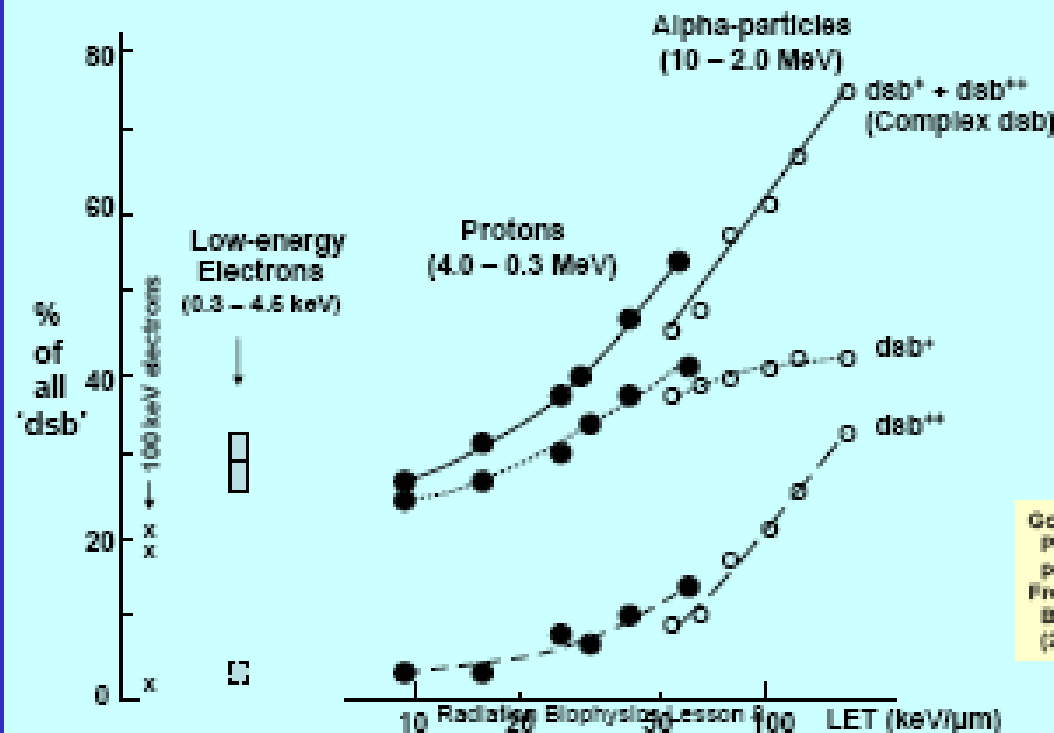


Complex lesions and radiation quality

Breakage Classification scheme

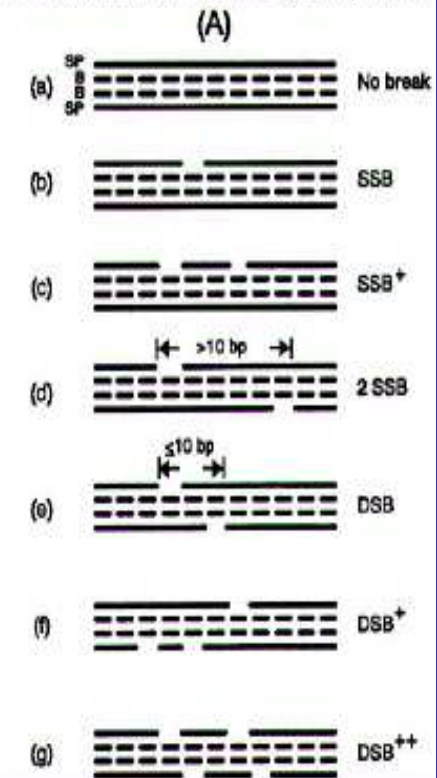
(Charlton & Humm, IJRB 53, 353 (1988),
Nikjoo et al, IJRB 71, 467 (1997))

The proportion of Complex DSB increases with LET.
The degree of complexity increases with LET.



Goodhead, Radiat
Prot Dosim, in
press (2006);
From Int J Radiat
Biol 155, 577-583
(2007)

Classification of breaks by complexity



Qualità della radiazione e qualità delle DSB

L'ipotesi attualmente largamente condivisa è la seguente:
le RI producono diverse classi di DSB caratterizzate da diversa riparabilità, la cui proporzione dipende dalla qualità della radiazione (Goodhead et al 1985, Ward 1988, Goodhead 1994).

Tale riparabilità è determinata dalla correlazione spaziale delle lesioni



le radiazioni densamente ionizzanti producono con maggior frequenza lesioni (in particolare DSB) spazialmente correlate nel DNA cellulare, le quali sono verosimilmente più difficilmente riparate o non riparate affatto.

Lesioni complesse e conseguenze biologiche

Sebbene vi siano molte indicazioni, in particolare attraverso simulazioni, che radiazioni di alto LET producono lesioni complesse con maggior frequenza, non esistono ad oggi metodi sperimentali per validare tali indicazioni..

L'ipotesi di lavoro corrente è che le lesioni correlate a breve distanza (lesioni complesse) siano responsabili della maggior parte degli effetti biologici e che esse siano quindi collegate alla maggiore efficacia delle radiazioni di alto LET, in particolare alle basse dosi.

Resta comunque aperto il problema di sviluppare metodi sperimentali adatti a riconoscere, a quantificare e a classificare le lesioni complesse e a correlarle con le conseguenze biologiche

Paradigma degli effetti delle radiazioni: il ruolo della qualità della radiazione (*take home message*)

- DNA = principale bersaglio delle r.i.:
- DSB = lesioni critiche (perdita continuità)
- le r.d.i. inducono con maggiore frequenza lesioni spazialmente correlate rispetto alle r.s.i.
- i processi di riparazione sono influenzati dalla correlazione spaziale delle lesioni
- gli effetti cellulari appaiono dominati da lesioni spazialmente correlate (verosimilmente lesioni complesse), in particolare alle basse dosi

Distribuzione temporale della dose

Effetto del rateo di dose

Effetto del frazionamento della dose

Effetto del rateo di dose

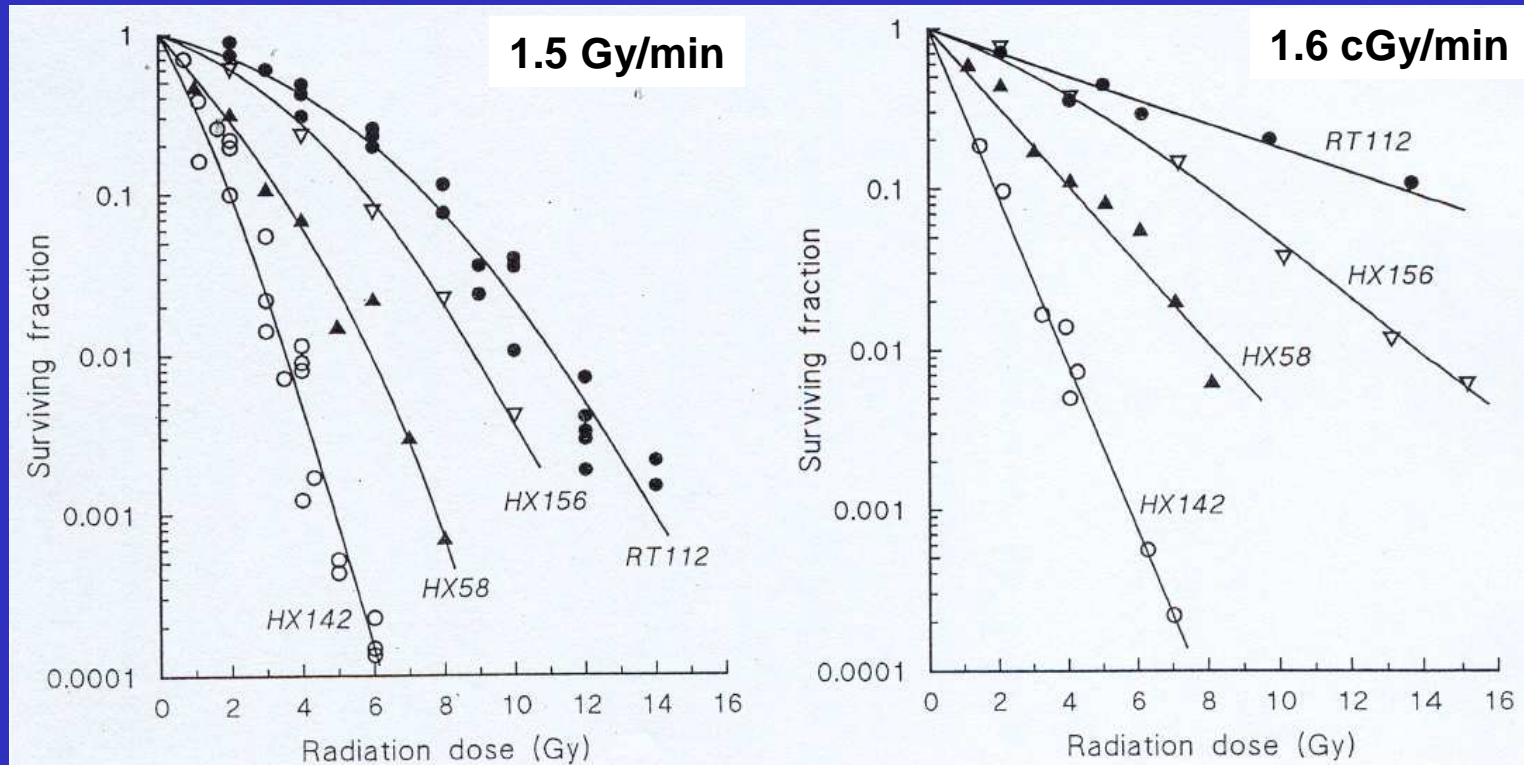
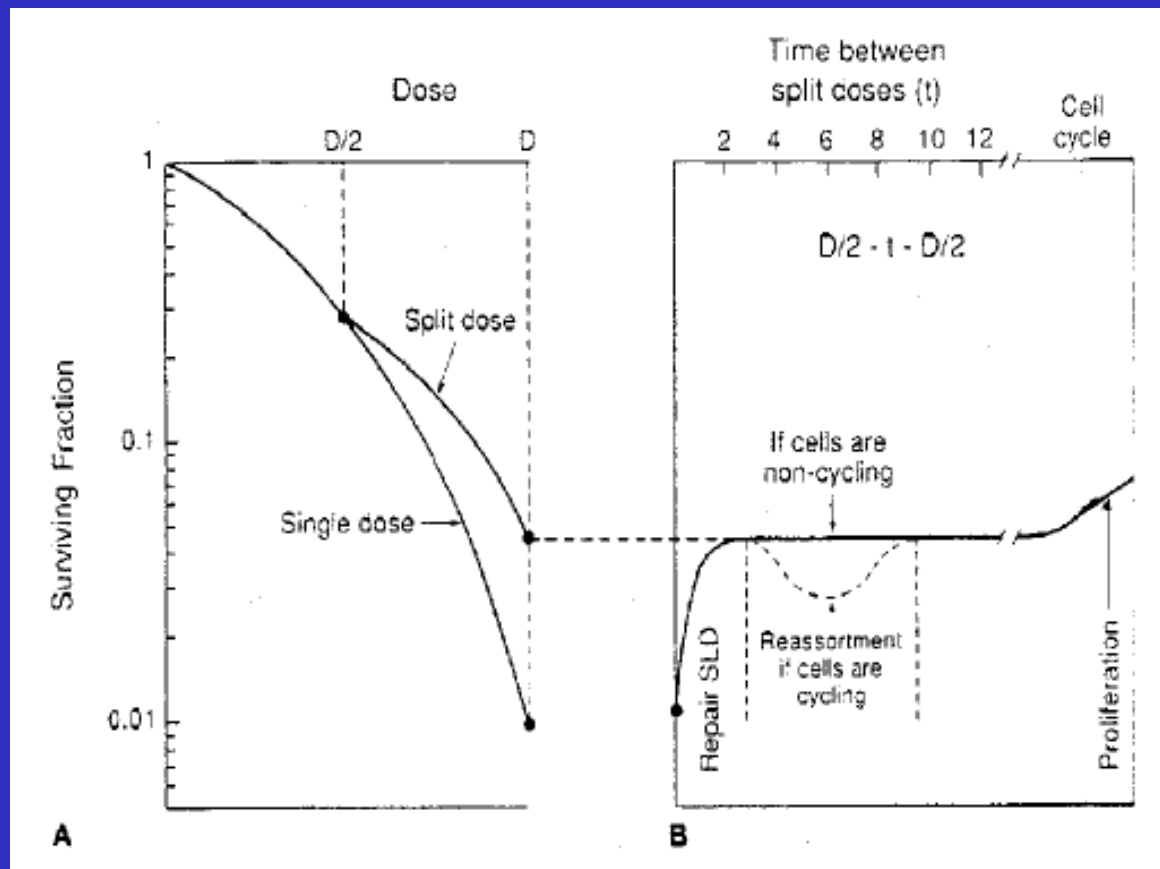


Figure 17.9 Cell survival curve for four representative human tumour cell lines irradiated (A) at high dose rate, 150 cGy/min; or (B) at low dose rate, 1.6 cGy/min. HX142, neuroblastoma; HX58, pancreas; HX156, cervix; RT112, bladder carcinoma. From Steel (1991), with permission.

Split dose



Interpretazione dell'effetto della split dose (1)

Il danno da radiazioni è classificato in:

1. **Danno letale, LD** (irreversibile, irreparabile; corrisponde alla componente alfa della curva di risposta)
2. **Danno potenzialmente letale , PLD** (componente del danno che può essere riparata modificando le condizioni post-irradiazione; in condizioni normali)
3. **Danno subletale, SLD** (danno che può essere riparato e che non si trasforma in LD o PLD se non interagisce con altro SLD; corrisponde alla componente beta della curva di risposta)

Interpretazione dell'effetto della split dose (2)

L'intervallo di tempo tra una frazione e la successiva consente alla cellula di riparare il danno subletale (SLD)

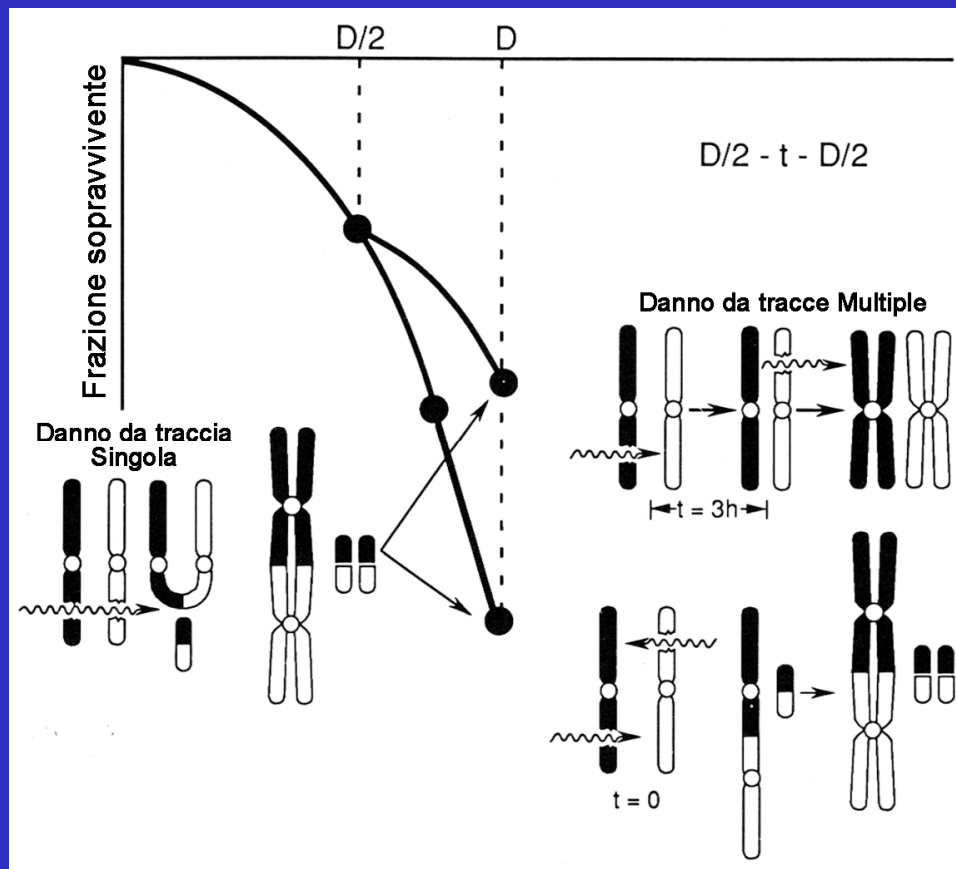
Riparo del danno subletale negli esperimenti di split-dose

Cellule di hamster cinese sono irradiate con due esposizioni successive, distanziate di un certo tempo t . In questo intervallo di tempo le cellule sono mantenute a temperatura ambiente per impedire la progressione del ciclo cellulare.

La massima sopravvivenza (riparo di tutto il danno subletale) si osserva quando le due esposizioni sono separate da almeno 2 ore.

Si può valutare che il tempo caratteristico di riparo è dell'ordine di 0.5 ore o inferiore.

Interpretazione dell'effetto della split dose (3)



Riparazione del danno subletale

Quando una dose D è data con due frazioni $D/2$ separate da alcune ore, la frazione di cellule che sopravvive è maggiore di quella che ha ricevuto una esposizione singola. La frazione di cellule inattivate dai danni da singola traccia è la stessa nei due casi. La frazione di cellule inattivate da danni dovuti a tracce multiple è invece diversa. Se due rotture cromosomiche che devono interagire per formare una lesione letale (ad es. un dicentrico) avvengono a distanza di ore, la prima rottura può essere riparata prima che avvenga la seconda. Se invece le due rotture avvengono contemporaneamente, esse possono interagire e formare così una lesione letale.

Il frazionamento della dose in radioterapia (1)

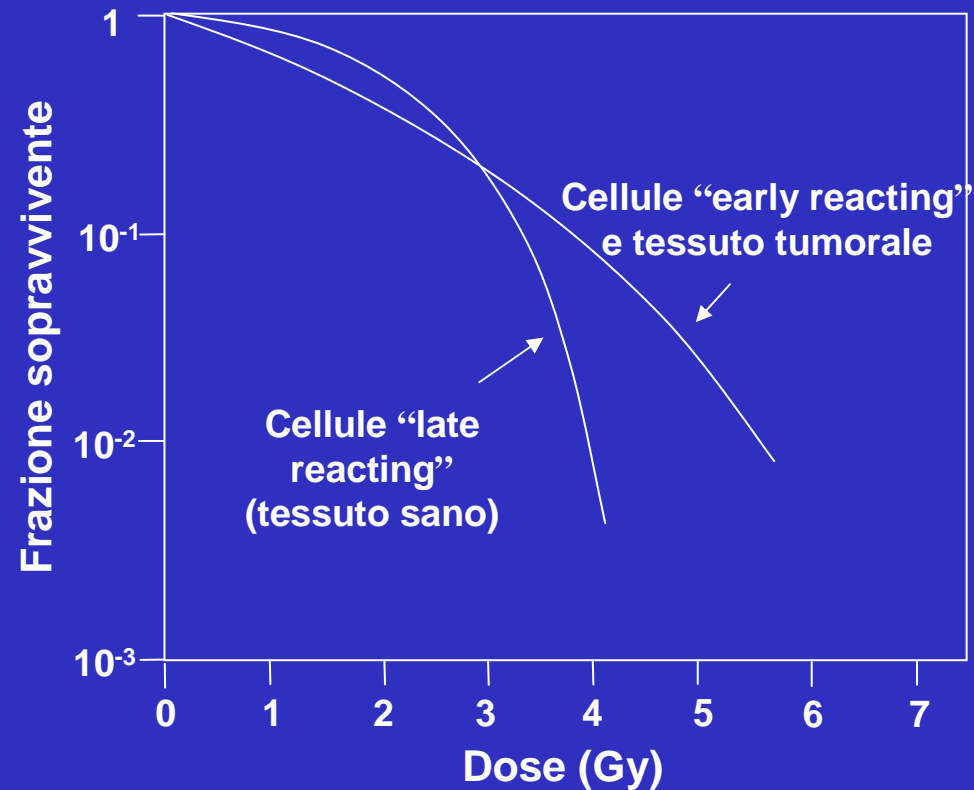
Nel grafico è mostrata la differente risposta (dovuta alla differente capacità riparativa) tra i tessuti early- e late- responding

Nella descrizione con l'equazione lineare quadratica

$$-\ln S = \alpha D + \beta D^2$$

α è maggiore per gli early effects rispetto ai late effects

β è maggiore per i late effects rispetto agli early effects.



Il rapporto α/β rappresenta la dose per cui la mortalità delle cellule dovuta al termine lineare (α) uguaglia quella del termine quadratico (β).

Il rapporto α/β è grande per early effects e piccolo per i late effects

Il frazionamento della dose in radioterapia (2)

Alcune conclusioni (per radiazioni sparsamente ionizzanti)

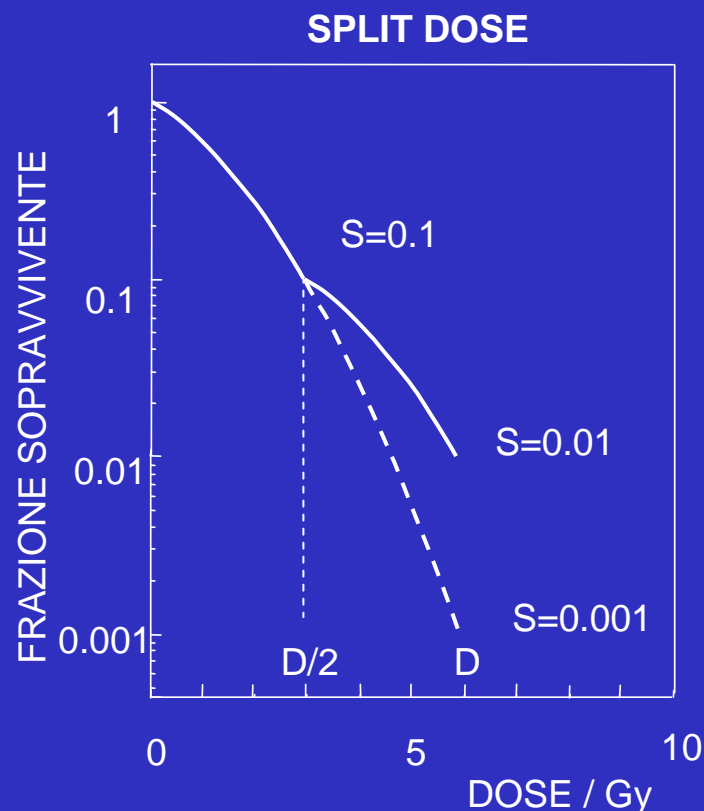
Cellule de tessuti normali, late-reacting, tendono ad avere curve di sopravvivenza più curve delle cellule tumorali e presentano maggiore capacità riparativa alle basse dosi (piccolo rapporto α/β).

Ciò rende importante il frazionamento della dose.

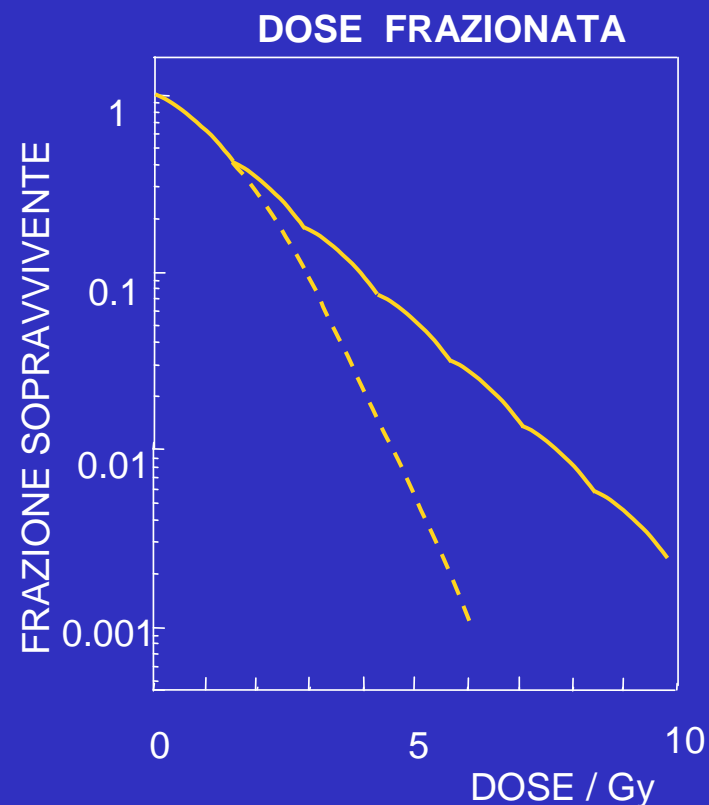
Le curve di sopravvivenza con dose frazionata sono quasi lineari, con pendenza media che diminuisce maggiormente (maggiore radioresistenza) nei tessuti sani “late responding” rispetto alle cellule tumorali “early responding”.

La probabilità di controllo locale può essere stimata dalla pendenza media di queste curve.

Effetto del frazionamento

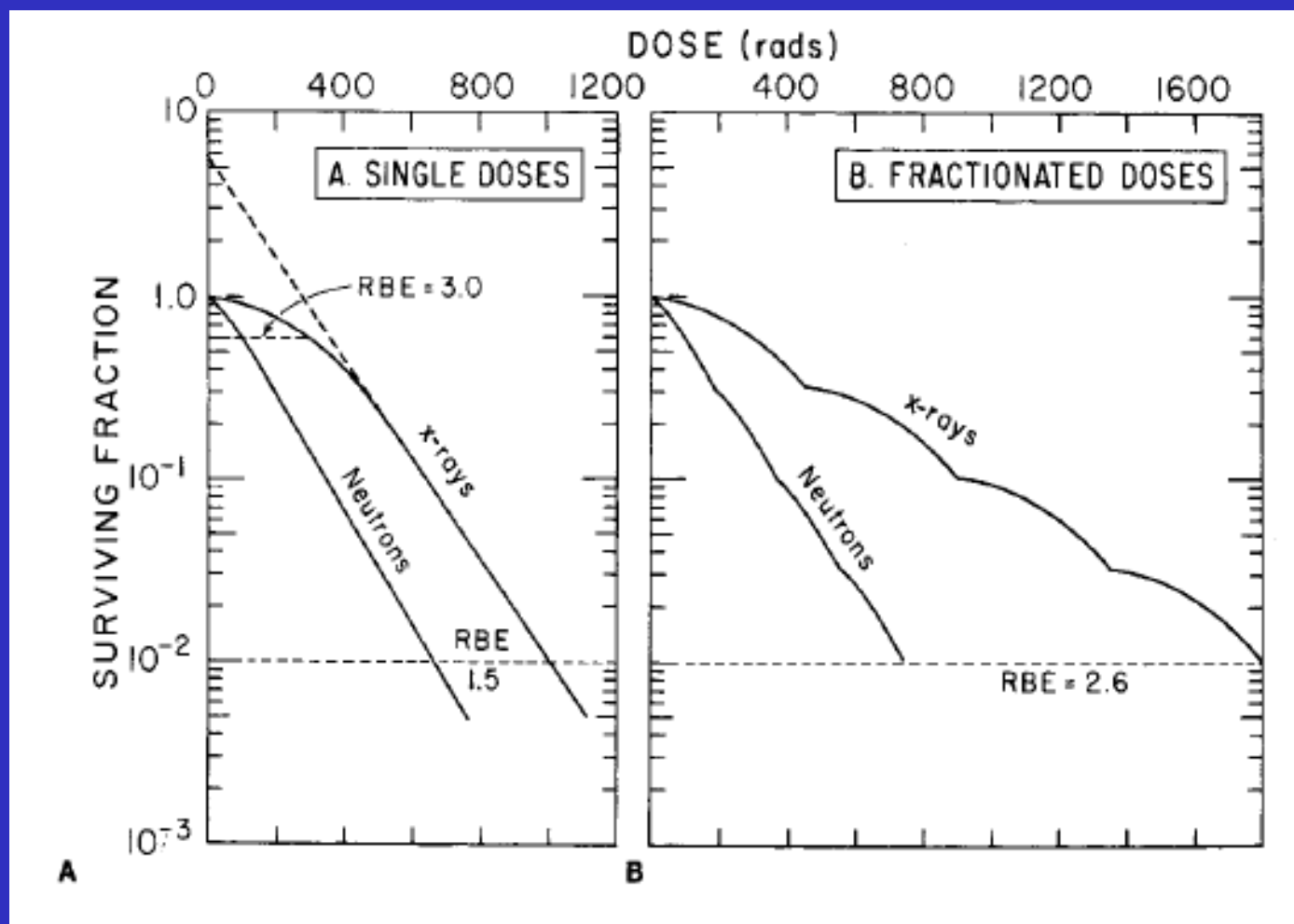


Le cellule sono irradiate in due esposizioni (con dose $D/2$ ciascuna) separate da un intervallo durante il quale esse sono mantenute a temperatura ambiente per impedirne la progressione nel ciclo ma consentire la riparazione. Il massimo della sopravvivenza si ottiene se la separazione è superiore ad un certo periodo, in genere di alcune ore.



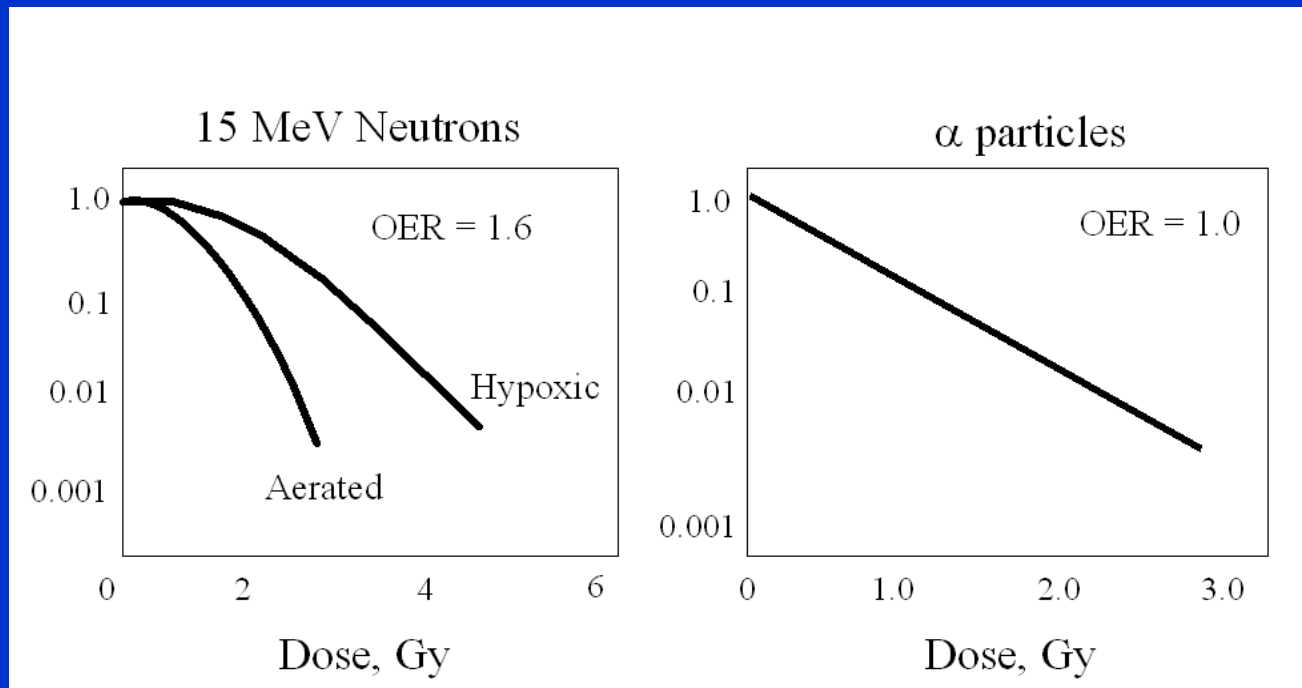
La curva in regime frazionato diventa quasi lineare con valori di sopravvivenza superiori a quelli in regime acuto.

Qualità della radiazione e frazionamento



Qualità della radiazione ed effetto Ossigeno

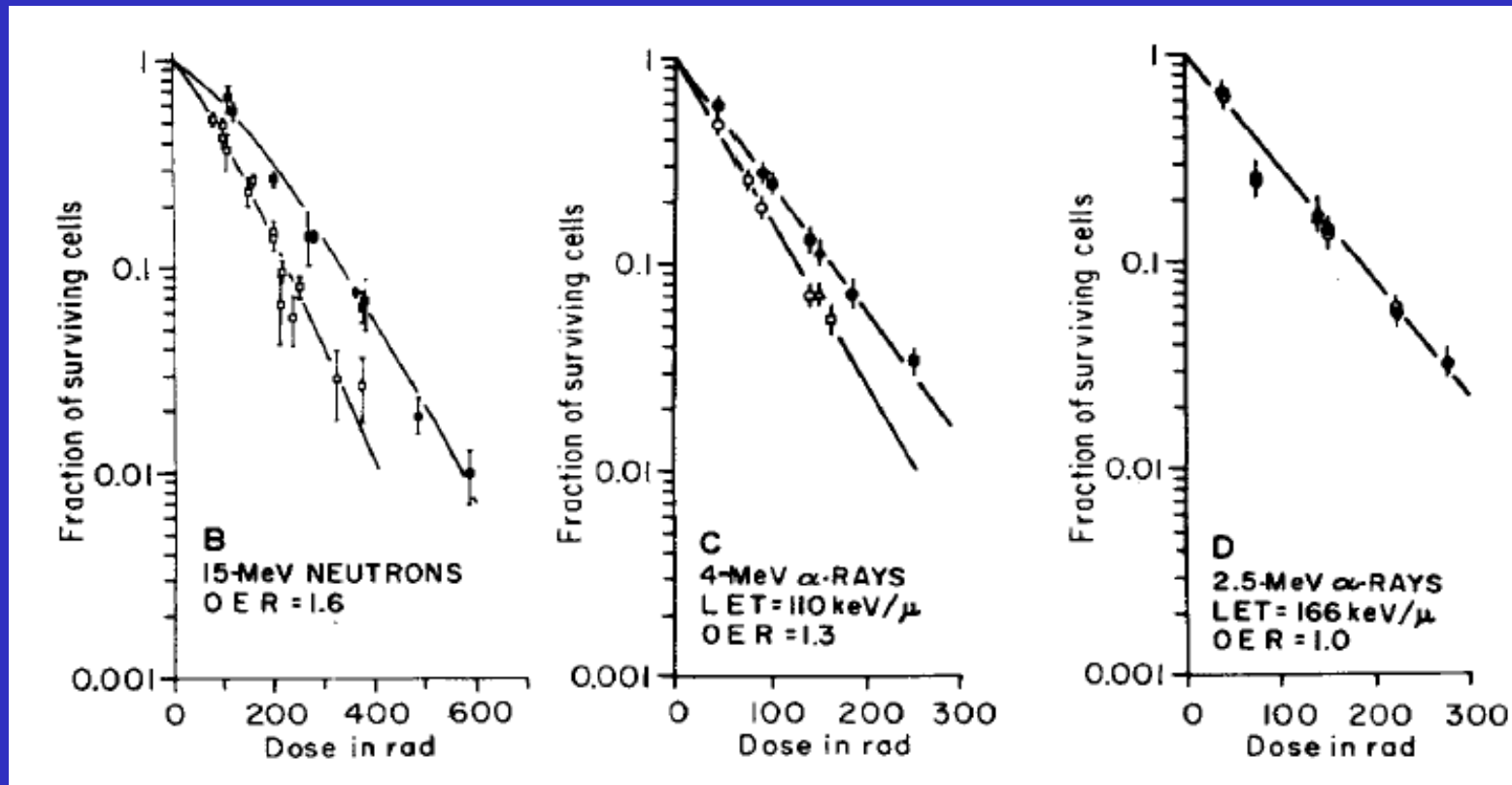
OER ha valori tipici compresi tra 1 e 2 per radiazioni densamente ionizzanti



Curve di sopravvivenza per cellule di mammifero (hamster) esposte a radiazioni adroniche in condizioni ipossiche e areate.

Per radiazioni ad alto LET, si nota una diminuzione dell'OER al crescere del LET. Ad esempio, la curva di sopravvivenza di cellule di hamster irradiate con particelle α non ha la spalla e non cambia passando da condizioni areate a quelle ipossiche (OER = 1).

Effetto del LET sulle curve di sopravvivenza e sull'OER



OER vs LET

