

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 10.
**Fattori biochimici e biologici che modificano
la risposta cellulare**

Fattori biochimici e biologici che modificano la risposta cellulare

- ploidia,
- fase nel ciclo cellulare,
- capacità riparativa,
- presenza di ossigeno,
- Presenza di radioprotettori endogeni ed
esogeni

La ploidia

Il numero di cromosomi è molto importante per la radiosensibilità. Le cellule diploidi (con una coppia di corredo cromosomico) sono meno radiosensibili per un fattore dell'ordine di 10 rispetto alle cellule aploidi (con un solo corredo cromosomico).

Ciò è dovuto principalmente al fatto che una cellula diploide contiene due copie dell'informazione genetica.

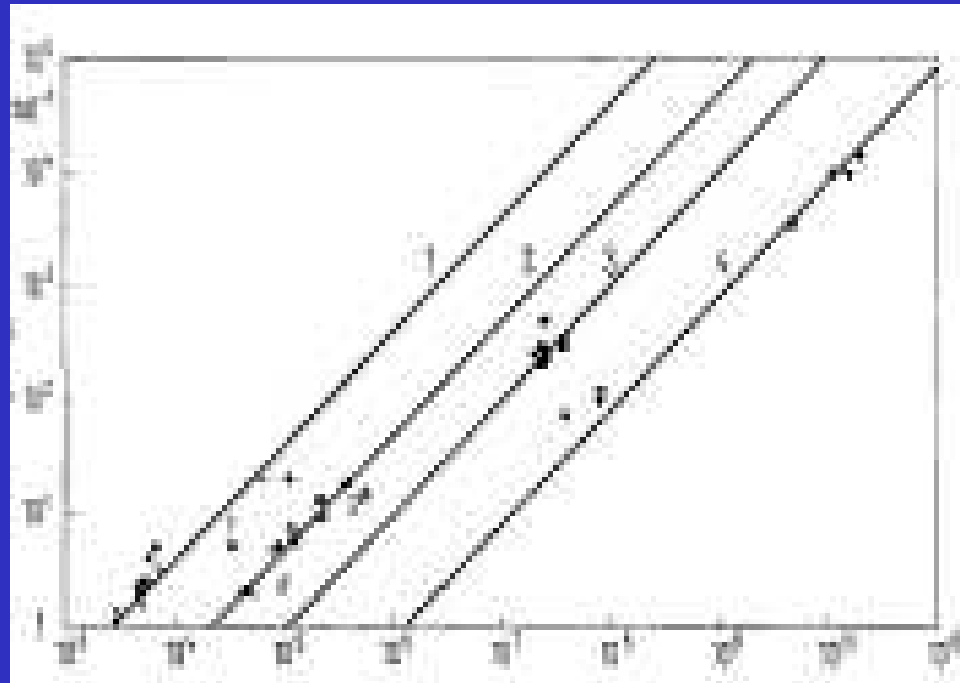
In sistemi vegetali si è trovato che la radiosensibilità diminuisce con il grado di ploidia (diploidi, tetraploidi, etc.)

La ploidia

Radiosensibilità ($1/D_{37}$)

1. Virus ssDNA, ssRNA
2. virus dsDNA
3. cellule aploidi
4. cellule diploidi

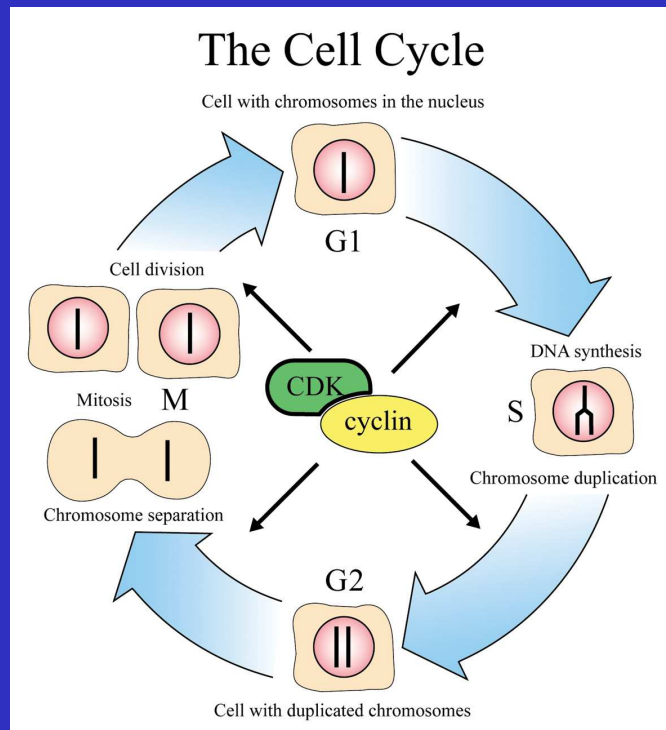
**All'interno di ciascuna classe
la radiosensibilità è
proporzionale al contenuto di
DNA**



Numero di nucleotidi

Kaplan and Moses, 1964

Durata delle fasi del ciclo cellulare



Il ciclo cellulare è diviso in 4 fasi: M, seguita da G1, seguita da S, e quindi G2

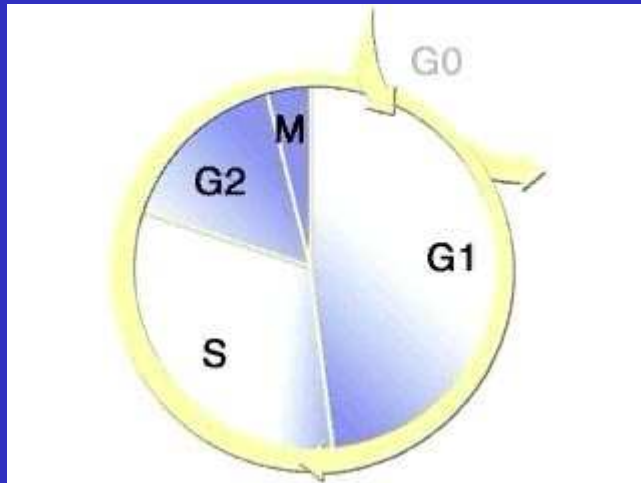
Le fasi del ciclo sono regolate dall'attivazione periodica delle chinasi ciclina-dipendenti.

I tempi del ciclo cellulare variano da circa 10 ore ad oltre 200 ore.

La maggiore differenza è dovuta a variazioni della durata di G1.

Durata approssimativa (h)		
	Cellule di hamster	Cellule HeLa (umane)
T_M	1	1
T_S	6	8
T_{G2}	3	4
T_{G1}	1	11
T_{ciclo}	11	24

Radiosensibilità nelle fasi del ciclo cellulare

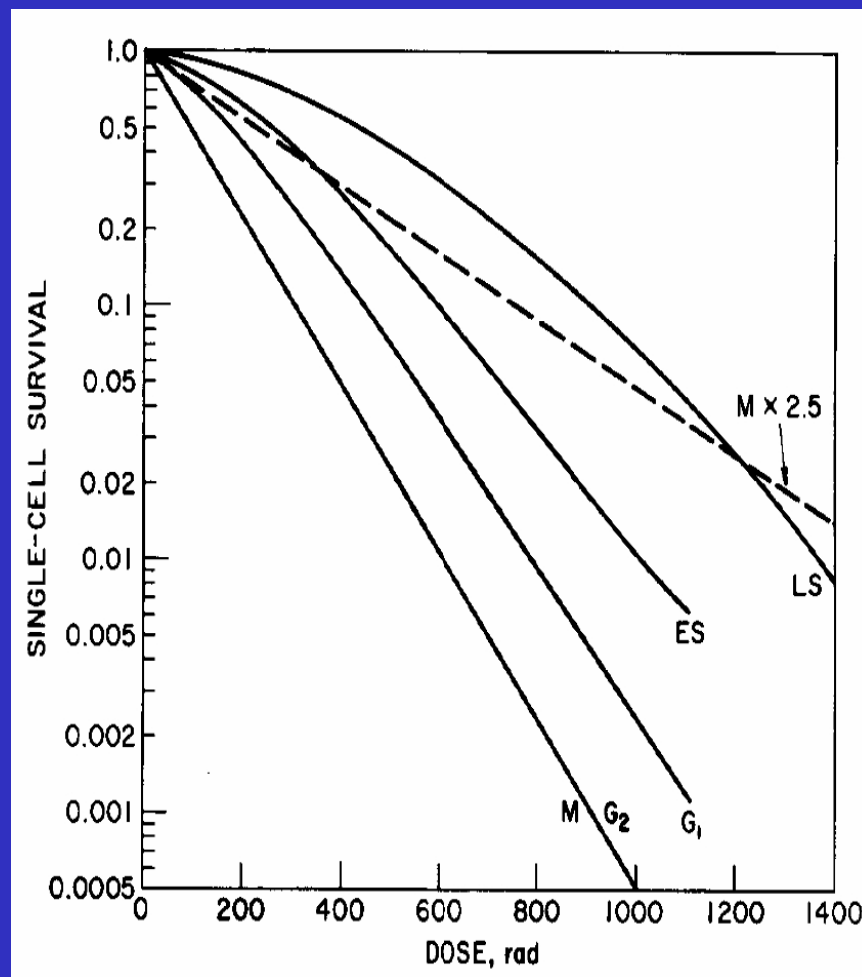


In generale, la maggior parte delle cellule sono più sensibili in tarda G2 e M (quindi intorno alla mitosi), e più resistenti in tarda S.

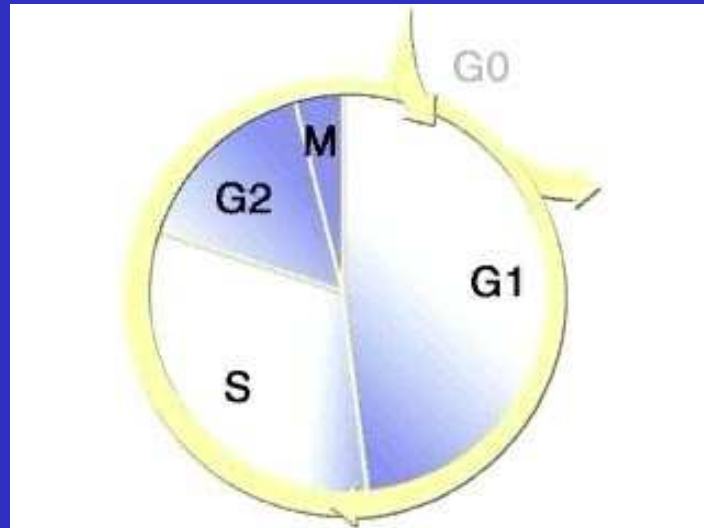
Ciò vale per le radiazioni sparsamente ionizzanti, mentre per le radiazioni densamente ionizzanti le variazioni di sensibilità sono meno pronunciate.

La manifestazione di resistenza o di sensibilità tende a correlare con la concentrazione di composti sulfidrilici (radioprotettori) presenti nella cellula nelle diverse fasi del ciclo.

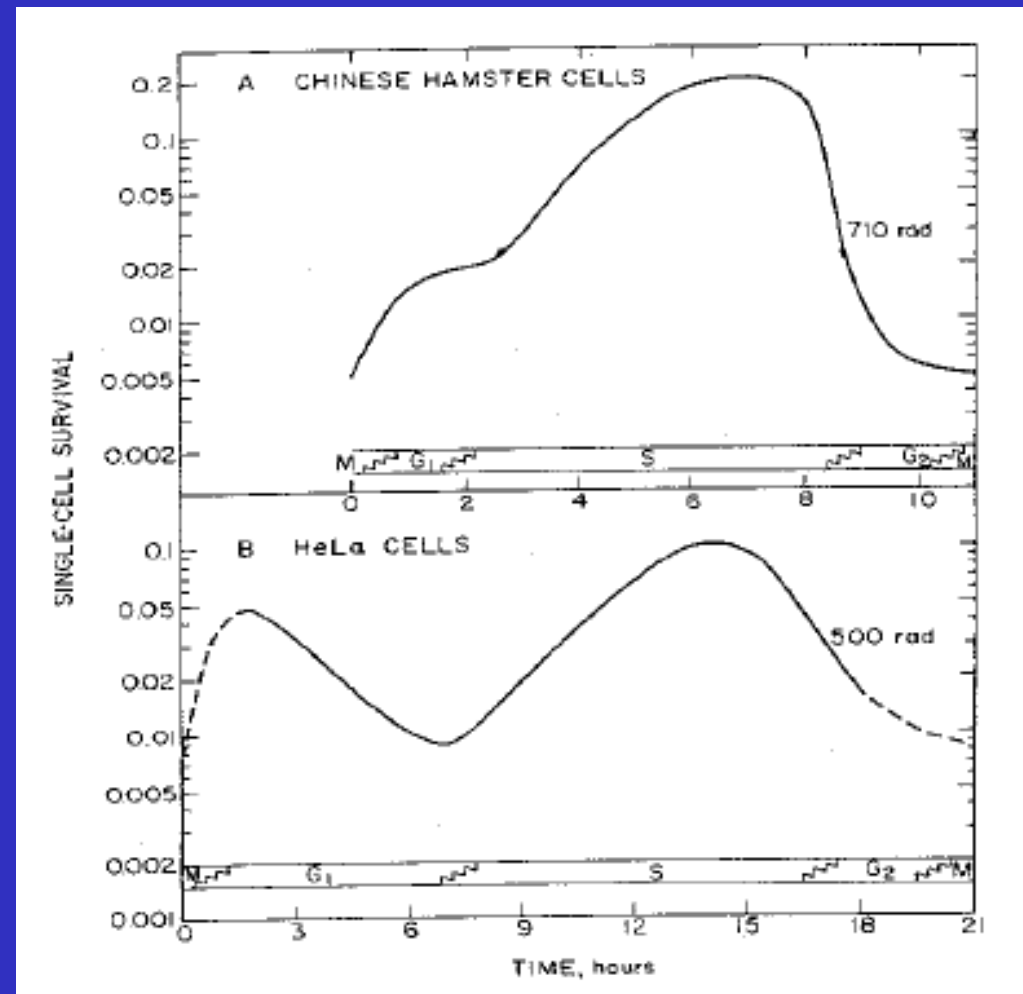
Radiosensibilità nelle fasi del ciclo cellulare



Radiosensibilità nelle fasi del ciclo cellulare



**Sopravvivenza di
cellule di hamster e
HeLa irradiate dopo la
prima mitosi**



Radiosensibilità nelle fasi del ciclo cellulare

Possibili meccanismi responsabili dell'effetto del ciclo cellulare:

- Durante la fase S il contenuto di DNA raddoppia (ridondanza, riparazione per HR)
- Durante la fase S anche la concentrazione dei composti sulfidrilici è massima, e tali composti sono radioprotettori

L'effetto ossigeno

L'ossigeno è un potente “sensibilizzante”.

In presenza di ossigeno molecolare (O_2) tutti i sistemi biologici sono molto più sensibili ai raggi X o γ di quanto non avvenga quando essi sono irradiati a livelli di ossigeno molto bassi (ipossia) o in assenza di ossigeno (anossia).

Effetto ossigeno: proprietà dell'ossigeno di aumentare l'efficacia (danno) di una dose di radiazione.

Oxygen Enhancement Ratio (1)

L'effetto ossigeno riduce la dose di radiazioni richiesta per produrre un determinato effetto radiobiologico:

Il grado di sensibilizzazione è espresso dal “rapporto di potenziamento dell'ossigeno”, meglio noto come Oxygen Enhancement Ratio, OER

$$OER = \frac{\text{dose in condizioni di ipossia}}{\text{dose in condizioni aerobiche}}$$

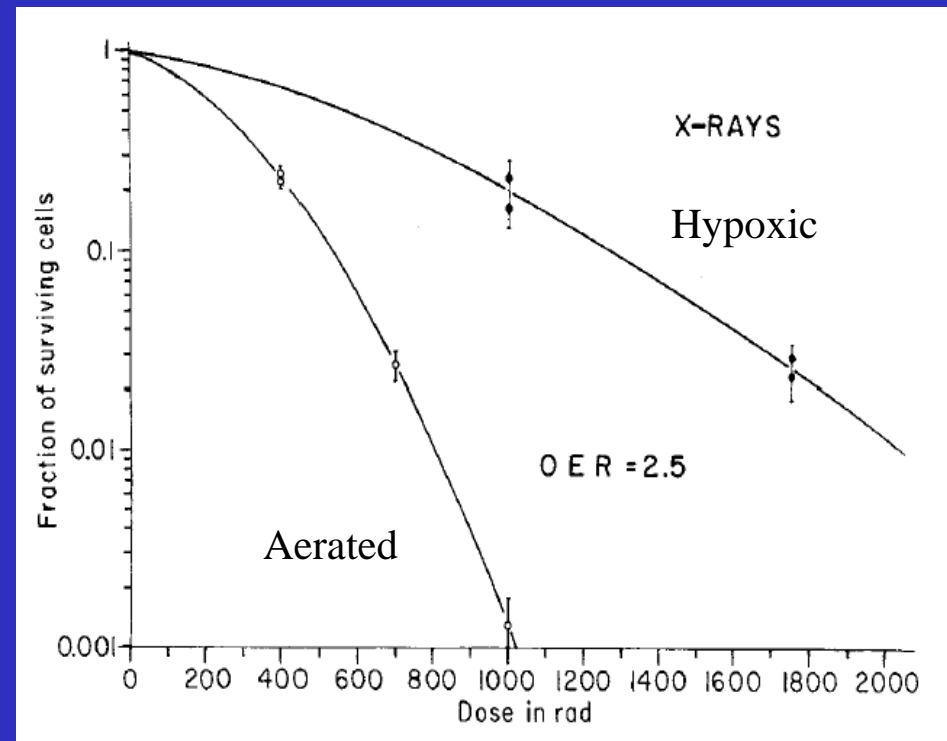
per produrre lo stesso effetto biologico.

Oxygen Enhancement Ratio (2)

L'OER ha valori tipici di 2,5 – 3 per raggi X e γ

La dose richiesta per produrre un certo livello di danno è 2,5 – 3 volte maggiore nelle condizioni ipossiche che nelle condizioni aerate.

O₂ è perciò un agente “dose-modifying”, in quanto la dose che da un particolare livello di sopravvivenza in condizioni ipossiche si riduce di un certo fattore (OER) in condizioni aerate, e tale fattore è lo stesso a tutti i livelli di sopravvivenza.



Curve di sopravvivenza per cellule di mammifero (hamster) esposte a raggi X in condizioni ipossiche e ossigenate.

Tempi di azione

Affinchè si osservi l'effetto ossigeno, è necessario che l'ossigeno sia presente:

- durante l'esposizione alla radiazione

Wright, Howard-Flanders, Acta Radiol 48, 1957

Howard-Flanders P., Moore D., Radiat Res 9, 1958

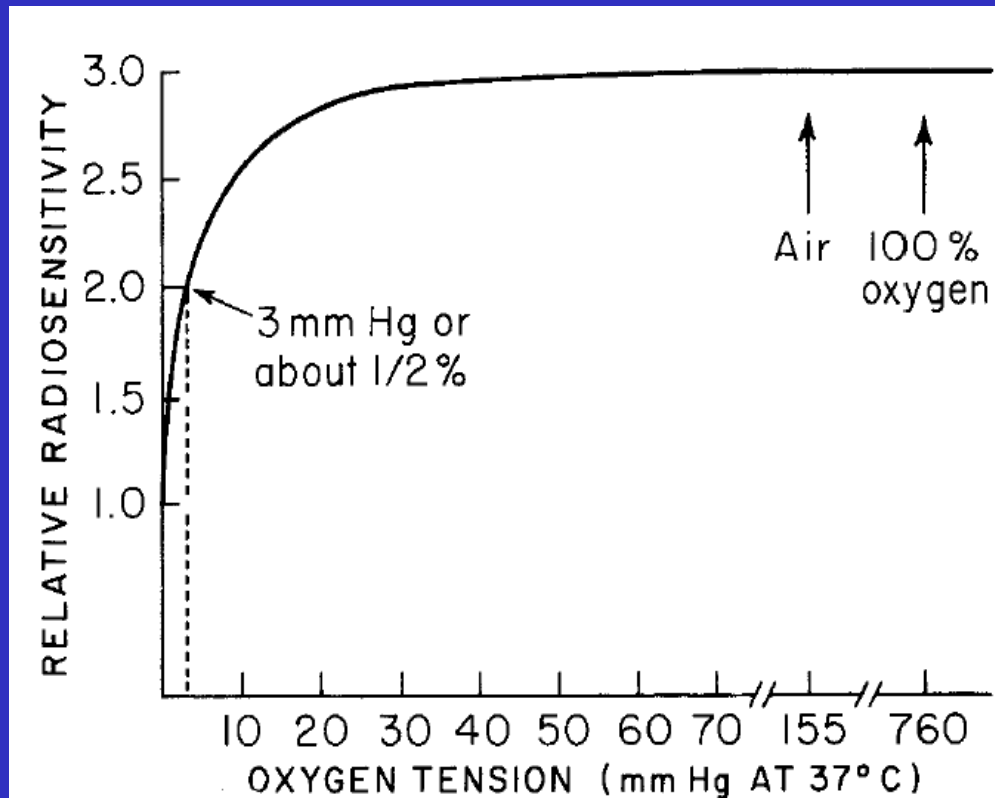
- oppure entro pochi millisecondi dopo l'irradiazione

-Michael BD et al., Radiat Res 54, 1973

L'idea di questo ultimo esperimento è che l'ossigeno, contenuto in una camera ad alta pressione, venga fatto esplodere su un monolayer di batteri in vari tempi, prima, durante e dopo l'irradiazione con un impulso di elettroni di 2 μ sec dato da un acceleratore lineare.

Il risultato è che l'ossigeno agisce come sensibilizzante se esso viene aggiunto non più tardi di 5 msec dopo l'irradiazione.

Concentrazione richiesta di ossigeno



Dipendenza della radiosensibilità dalla concentrazione di ossigeno.

La variazione di sensibilità si realizza soprattutto quando la concentrazione parziale di ossigeno passa da 0 a 30 mm Hg.

A pressioni maggiori la radiosensibilità tende ad un plateau.

Una sensibilità del 50 % rispetto alla massima (ossigenazione piena) avviene per una pressione parziale di ossigeno di circa 3 mm Hg, che corrisponde allo 0,5 %.

Concentrazione richiesta di ossigeno

Batteri e cellule di mammifero mostrano un effetto ossigeno simile

Conclusione:

Un apporto anche piccolo di O_2 produce drammatici e importanti effetti osservati con Raggi X.

La tensione di ossigeno in molti tessuti normali è simile a quella del sangue venoso, cioè 20-40 mm Hg.

Da un punto di vista radiobiologico i tessuti normali sono perciò considerati ben ossigenati.

Il meccanismo dell'effetto ossigeno (1)

L'evidenza sperimentale che l'ossigeno deve esser presente durante l'irradiazione oppure entro pochi millisecondi dopo di essa per poter agire come sensibilizzante implica che l'ossigeno agisce a livello dei radicali liberi

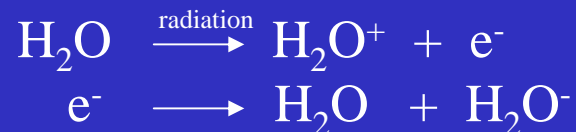
Quando l'ossigeno è presente, esso reagisce con una delle due estremità rotte (radicale libero) di una molecola di DNA, formando un perossido.

Ciò impedisce la ricombinazione delle due estremità rotte e quindi “fissa” la lesione (ipotesi della fissazione del danno).

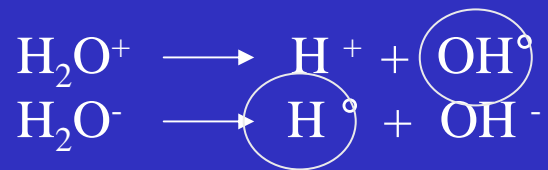
Il meccanismo dell'effetto ossigeno (2)

Radiochimica dell'acqua; ipotesi della fissazione del danno

Irradiazione di materiale vivente ~ energia assorbita da H₂O

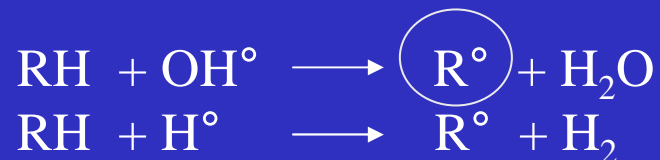


H₂O⁺, H₂O⁻ sono instabili:



H[°], OH[°] sono radicali liberi, cioè atomi o molecole elettricamente neutri aventi un elettrone spaiato rispetto allo spin nell'orbita esterna. Sono molto reattivi, con una grande tendenza ad accoppiare l'elettrone spaiato (ossidante) oppure a eliminare l'elettrone spaiato (riducente).

Ad es., possono estrarre idrogeno da molecole organiche RH:



R[°] sono radicali liberi secondari che possono interagire con molecole biologicamente importanti a provocare danni

—————> azione indiretta delle radiazioni ionizzanti

formazione del radicale organico perossido, che può attivare una reazione a catena che coinvolge più RH

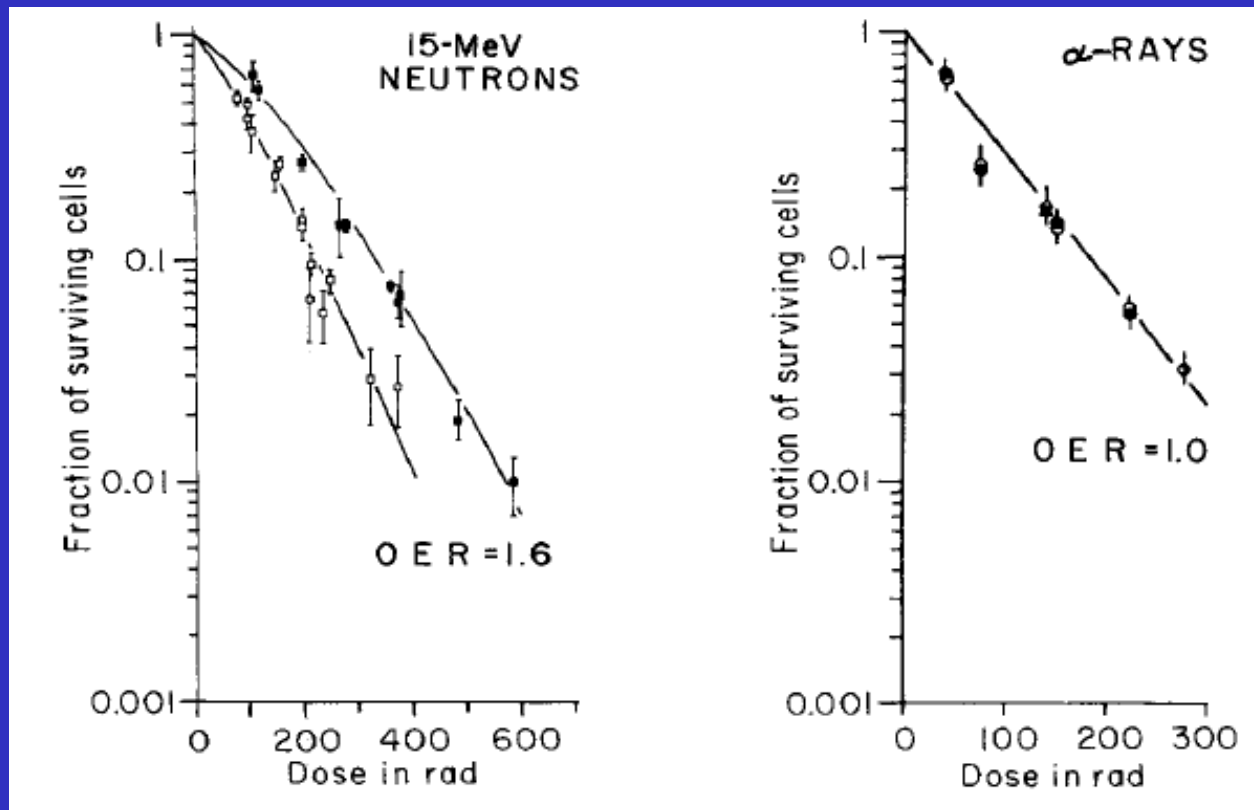
In presenza di O₂:



Fissazione del danno biologico, cioè cambiamento stabile della composizione chimica del target

⇒ potenziamento dell'efficacia delle radiazioni

L'effetto ossigeno e il LET (1)



OER decreases as LET increases

L'effetto ossigeno e il LET (2)

L'ossigeno ha un ruolo radiosensibilizzante quando è importante la produzione dei radicali liberi, cioè quando la radiazione agisce prevalentemente per azione indiretta (basso LET).

La presenza d'ossigeno viceversa ha un ruolo minore quando la radiazione agisce prevalentemente per azione diretta (alto LET).

Radioprotettori

- Endogeni (presenti naturalmente nella cellula)
- Esogeni (immessi dall'esterno)

I più importanti sono i composti tiolici, cioè i composti contenenti:

- il gruppo sulfidrilico RSH
- il ponte disolfuro RS-SR₁

I più semplici sono gli amminoacidi:



Un ruolo importantissimo nella cellula è svolto dal Glutatione: G-SH

Meccanismi di protezione dei composti tiolici nei confronti dei radicali radioindotti

I composti tiolici sono **radioprotettori** attraverso due diversi meccanismi: **competizione** o **restituzione**

1. Protezione competitiva o scavenging dei radicali liberi



2. Protezione restitutiva dell'idrogeno (riparazione chimica)



Meccanismi di protezione dei composti tiolici e qualità della radiazione

Ci si aspetta che la protezione esercitata dai composti tiolici attraverso i due diversi meccanismi di competizione o restituzione abbia un ruolo importante quando è importante la produzione dei radicali liberi, cioè quando la radiazione agisce prevalentemente per azione indiretta (basso LET), ed abbia viceversa un ruolo minore quando la radiazione agisce prevalentemente per azione diretta (alto LET).

Radioprotettori

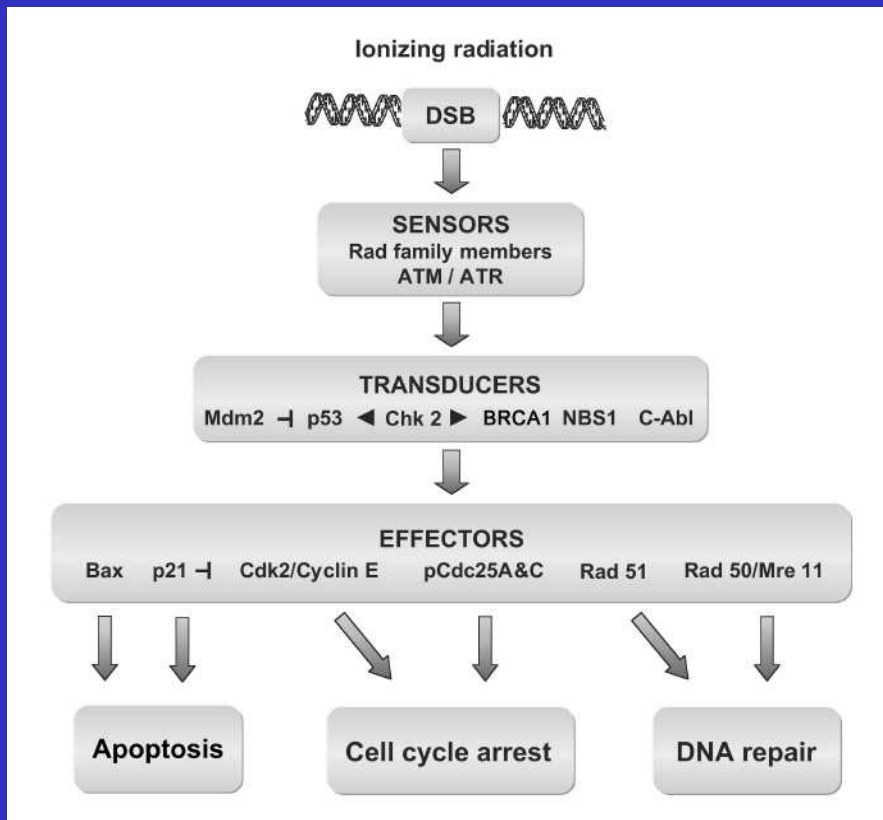
Aspetti pratici dei radioprotettori con gruppi SH

Cisteina e cisteamina sono composti tossici alle dosi necessarie per assicurare la protezione (nausea, vomito)

Più promettenti sembrano i composti dove il gruppo SH è coperto da un gruppo fosfato PO_3 (cystaphos, amifostina)

In particolare l'amifostina è stata sperimentata per applicazioni cliniche in quanto essa raggiunge rapidamente i tessuti normali ma penetra lentamente in quelli tumorali meno vascolarizzati.

Radiation induced signaling pattern



Da: Belli et al. Journal Radiation Research, 2003

Schematic representation of the signaling pattern activated by radiation-induced DNA DSB.

Human syndromes correlated with DNA repair and cell cycle checkpoints

Syndrome	Disorders	Gene/protein
Alaxia Telangectasia	breast carcinoma	ATM
Alaxia Telangectasia-like disorders	breast carcinoma, lymphoid tumors	Mre11
Njimegen breakage Syndrome	many types of cancer	Nbs1
Bloom Syndrome	many types of cancer	helicases
Werner Syndrome	many types of cancer	helicases
Familiar breast and ovary cancer	breast carcinoma, ovary cancer	BRCA
Li-Fraumeni Syndrome	breast carcinoma, lung, colon, urinary, bladder, testicular tumors	Chk2
Li- Fraumeni Syndrome	many types of cancer	p53
Familiar melanoma	many types of cancer	p16
Familiar retinoblastoma	many types of cancer	RB

Da: Belli et al. Journal Radiation Research, 2003

Human syndromes associated with cancer proneness and with lack or alteration of genes involved in DNA DSB repair and cell cycle checkpoints.

Il problema degli eterozigoti ATM

Poiché studi su topi hanno dimostrato che animali eterozigoti per mutazioni sui geni ATM, RAD 9 e BRCA 1 e loro combinazioni sono più radiosensibili per l'induzione di cataratta, è stato suggerito che queste mutazioni possano essere importanti anche nella risposta individuale dell'uomo alle radiazioni ionizzanti.

Ciò ha sollevato il problema di una possibile radiosensibilità, particolarmente nelle esposizioni per radioterapia, di persone che portano tali mutazioni.

È stato stimato che negli USA gli eterozigoti per ATM costituiscano l'1-3% dell'intera popolazione.