

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 2.
Le basi cellulari della Radiobiologia**

Le basi cellulari della radiobiologia

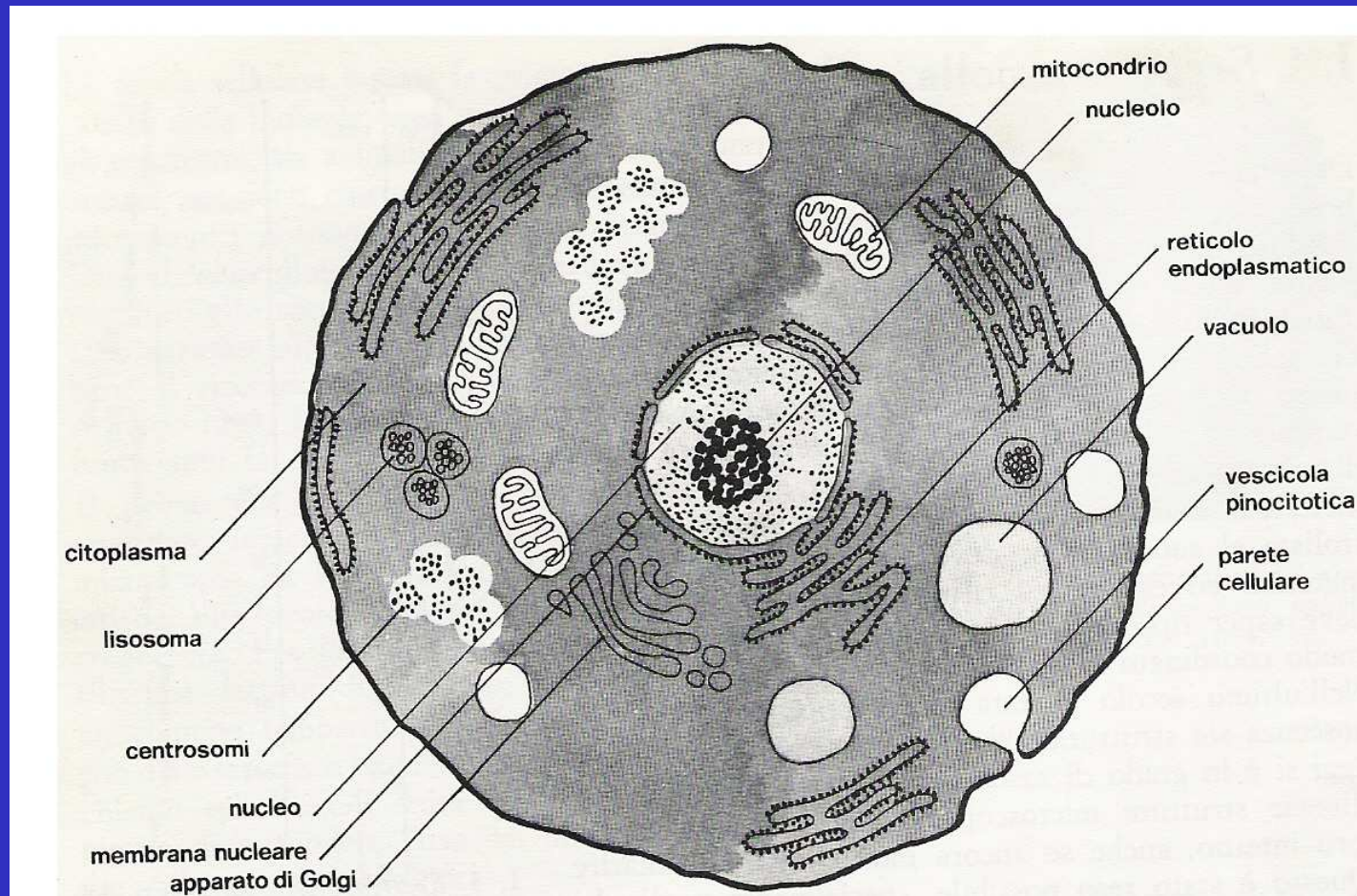
L'effetto delle RI sugli organismi è determinato in gran parte dagli effetti sulle cellule che li costituiscono

Infatti:

- Gli effetti **somatici** sono riconducibili agli effetti sulle cellule **somatiche** degli individui esposti
- Gli effetti **ereditari** sono riconducibili agli effetti sulle cellule **germinali** degli individui esposti
- La comprensione degli effetti biologici delle RI si basa principalmente sulle conoscenze ottenute a livello cellulare
- L' utilizzo di cellule coltivate in vitro permette lo studio di popolazioni di cellule approssimativamente “**autonome**”, dove le **interazioni cellula-cellula**, per le quali vi sono comunque evidenze indiscutibili, sono trascurabili oppure possono essere trattate come fenomeni aggiuntivi.

La cellula eucariotica

Nucleo vero e proprio separato dal citoplasma



Colture di cellule in vitro

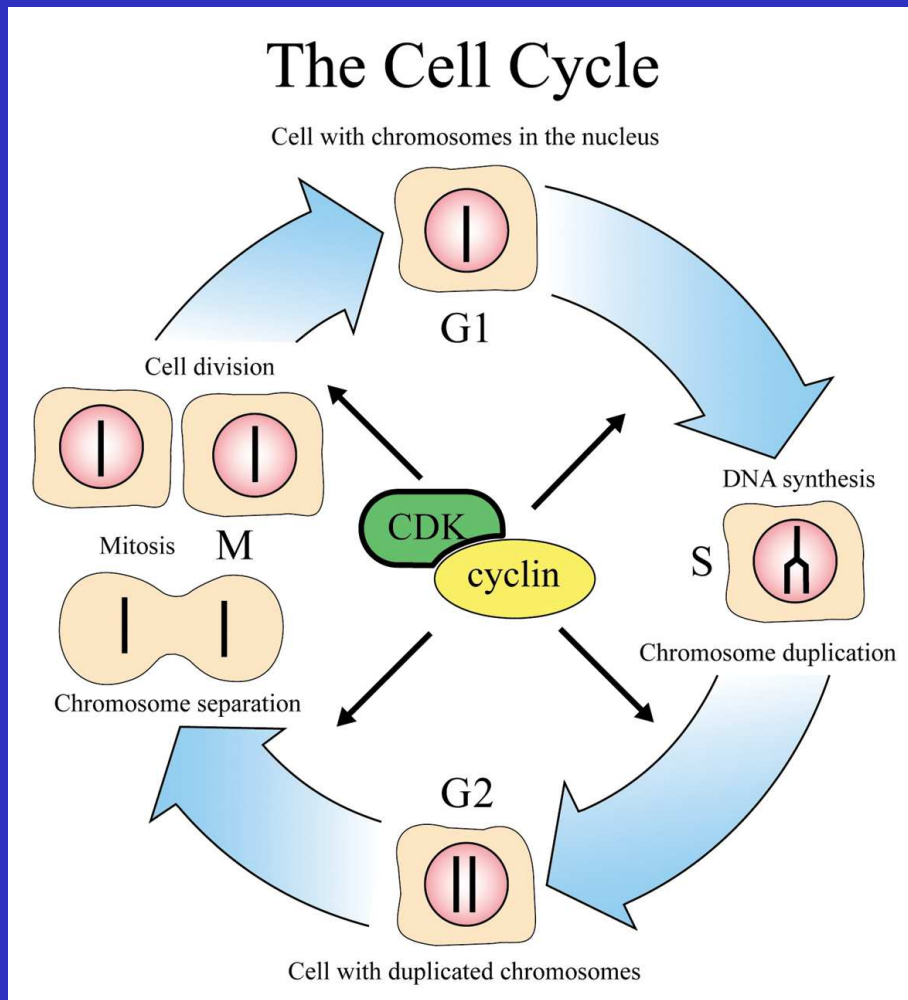
La radiobiologia cellulare fa uso estensivo di colture cellulari. Esse sono derivate da cellule disaggregate provenienti da:

- **Tessuto**
- **Coltura primaria**
- **Linea o ceppo cellulare**

Linee cellulari continue (dette anche “immortali”) possono essere ottenute da tumori umani (ad es. le cellule HeLa ottenute da un tumore della cervice dell’utero di una paziente di nome Henrietta Lacks nel 1951) oppure dalla trasformazione (spontanea o indotta) di colture primarie

La comprensione degli effetti delle RI sulle cellule richiede la conoscenza dei fenomeni che regolano la vita delle cellule stesse. Per le cellule eucariote è particolarmente importante tener presente il “ciclo cellulare”

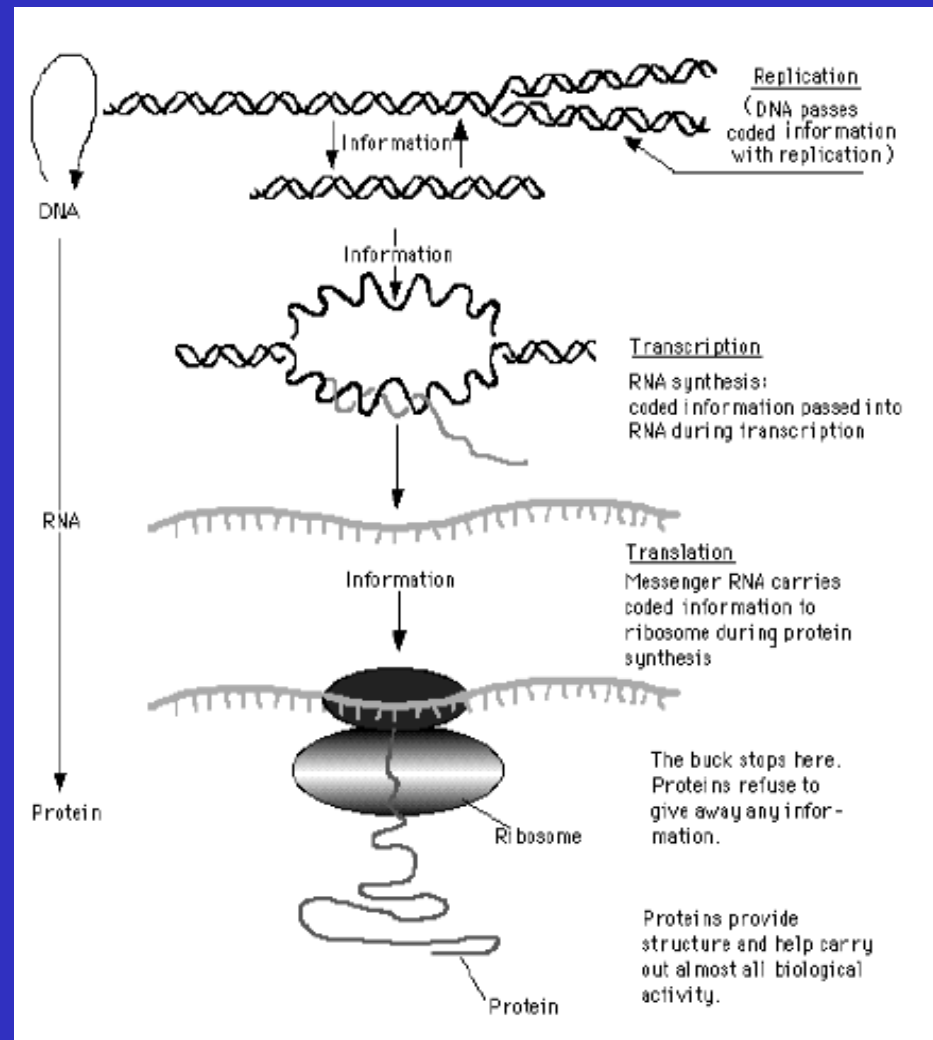
Il ciclo cellulare



Cicline

- ♦ Le cicline sono proteine essenziali per la progressione della cellula attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare
- ♦ La transizione da una fase all'altra avviene solo in presenza dell'attività enzimatica di una determinata proteina cdk (cyclin-dependent kinase) che attiva la ciclina specifica necessaria per la transizione

Il dogma centrale della biologia molecolare



Effetti sulle cellule

L'irradiazione di una cellula può dar luogo a:

- ritardo della divisione
- morte cellulare
- Induzione di mutazioni (la cellula sopravvive ma contiene una o più mutazioni)
- trasformazione neoplastica *in vitro* (la cellula sopravvive ma acquista potenzialità carcinogene)

La **morte** cellulare è considerata rappresentativa degli effetti **deterministici** sull'organismo umano.

L'induzione di **mutazioni** e la **trasformazione neoplastica *in vitro*** sono considerate rappresentative degli effetti **stocastici** sull'organismo umano.

Effetti sulle cellule

L'irradiazione di una cellula può comportare la modifica del suo patrimonio cromosomico (aberrazioni cromosomiche).

Le aberrazioni cromosomiche possono essere alla base sia della morte cellulare che di mutazioni o di trasformazione neoplastica *in vitro*. In particolare si trova una correlazione tra **aberrazioni cromosomiche** e **letalità** dell'esposizione.

Morte cellulare

La morte cellulare è definita operativamente in modi diversi a seconda del tipo di cellula.

Nel caso di **cellule proliferanti** (ad es. cellule staminali emopoietiche, cellule in coltura) la morte cellulare è definita come **perdita di capacità proliferativa** (perdita di clonogenicità).

Nel caso di **cellule differenziate**, non proliferanti (ad es. cellule nervose, muscolari, secretorie) la morte cellulare implica **perdita della funzione specifica**.

Morte cellulare

Cellule **coltivate in vitro** possono, a seguito dell'irradiazione, perdere la capacità di riprodursi (perdita di capacità proliferativa), bloccandosi in G1 o G2.

La cellula può poi scomparire per:

- Necrosi (rottura della membrana cellulare, di solito a seguito di una risposta infiammatoria)
- Apoptosi (morte programmata). E' la risposta ad un grave danno al DNA ed è caratterizzata da una definita sequenza di modificazioni morfologiche. Può verificarsi anche nei tessuti normali e tumorali.

Curve dose-risposta: il caso della curva di sopravvivenza

Le curve dose-risposta rappresentano l'andamento dei vari effetti in funzione della dose, avendo scelto opportune grandezze per la misura dell'effetto

Nel caso particolare della morte cellulare, viene correntemente presa come riferimento la capacità di una cellula a formare colonie sufficientemente grandi (clonogenicità).

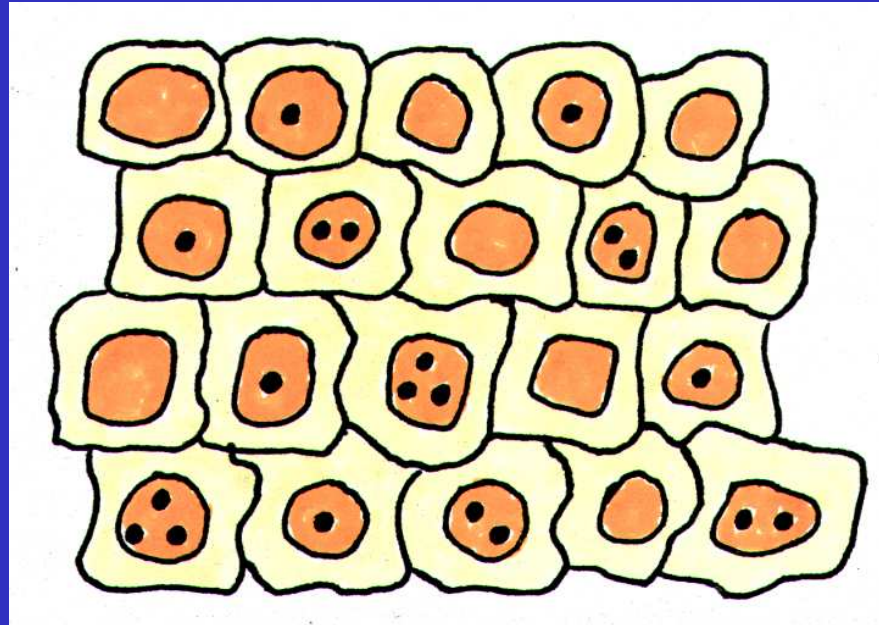
Una curva di sopravvivenza è l'andamento, in funzione della dose, della frazione di cellule sopravvivenenti, grandezza che è legata in modo inverso alla probabilità di morte.

- Probabilità di morte di una cellula ad una dose D :
numero medio $\langle n(D) \rangle$ di eventi letali per cellula
- Probabilità di sopravvivenza (praticamente uguale alla frazione di cellule sopravvivenenti) :

$$S(D) = \exp(- \langle n(D) \rangle)$$

dato che in generale si può applicare la distribuzione di Poisson.

Eventi letali e sopravvivenza



n = n. di eventi letali

$\langle n \rangle$ = n. medio di eventi letali per nucleo cellulare (identificato come bersaglio)

Se n è distribuito secondo Poisson: $P(n, \langle n \rangle) = e^{-\langle n \rangle} \cdot \langle n \rangle^n / n!$

Perché una cellula muoia basta che $n \geq 1 \Rightarrow$ morte cellulare

probabilità di sopravvivenza: $P(0, \langle n \rangle) = e^{-\langle n \rangle} = e^{-w \cdot D} = e^{-D/D_0}$

D_0 = dose letale media

La curva di sopravvivenza

La quantità che si misura è la frazione di cellule sopravvivenenti $S(D)$ ad una dose D .

L'andamento di $S(D)$ si definisce curva di sopravvivenza

Si inocula ciascun campione con N cellule e si misura il numero di colonie che si sviluppano nel controllo (N_{Cn}) e nell'irradiato alla dose D (N_D):

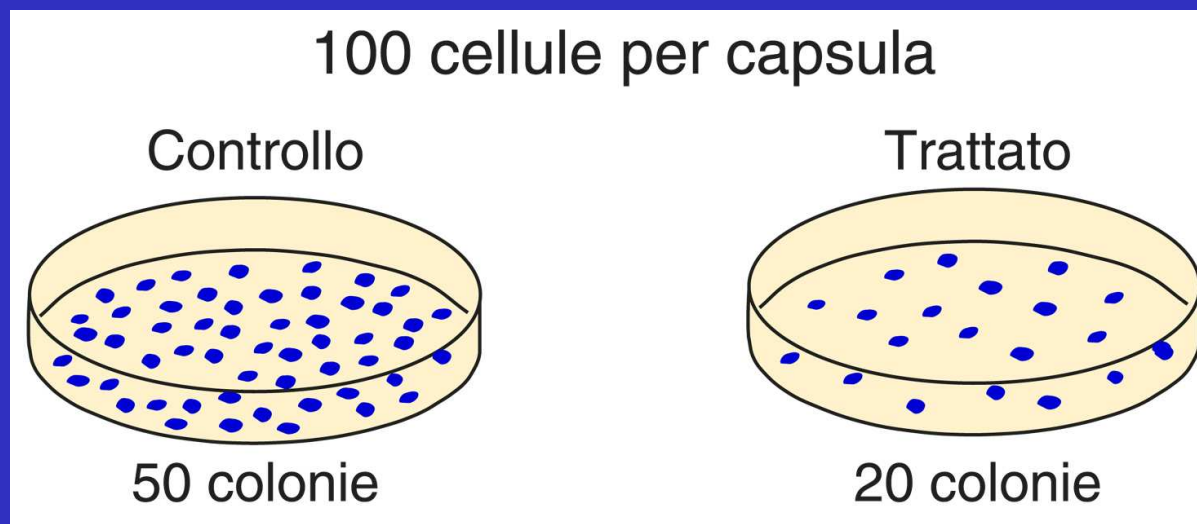
Efficienza di clonaggio

$$E.C. = N_{Cn}/N$$

Frazione di cellule sopravvivenenti

$$S(D) = N_D / N_{Cn} = N_D / (N \cdot E.C.)$$

Esempio:

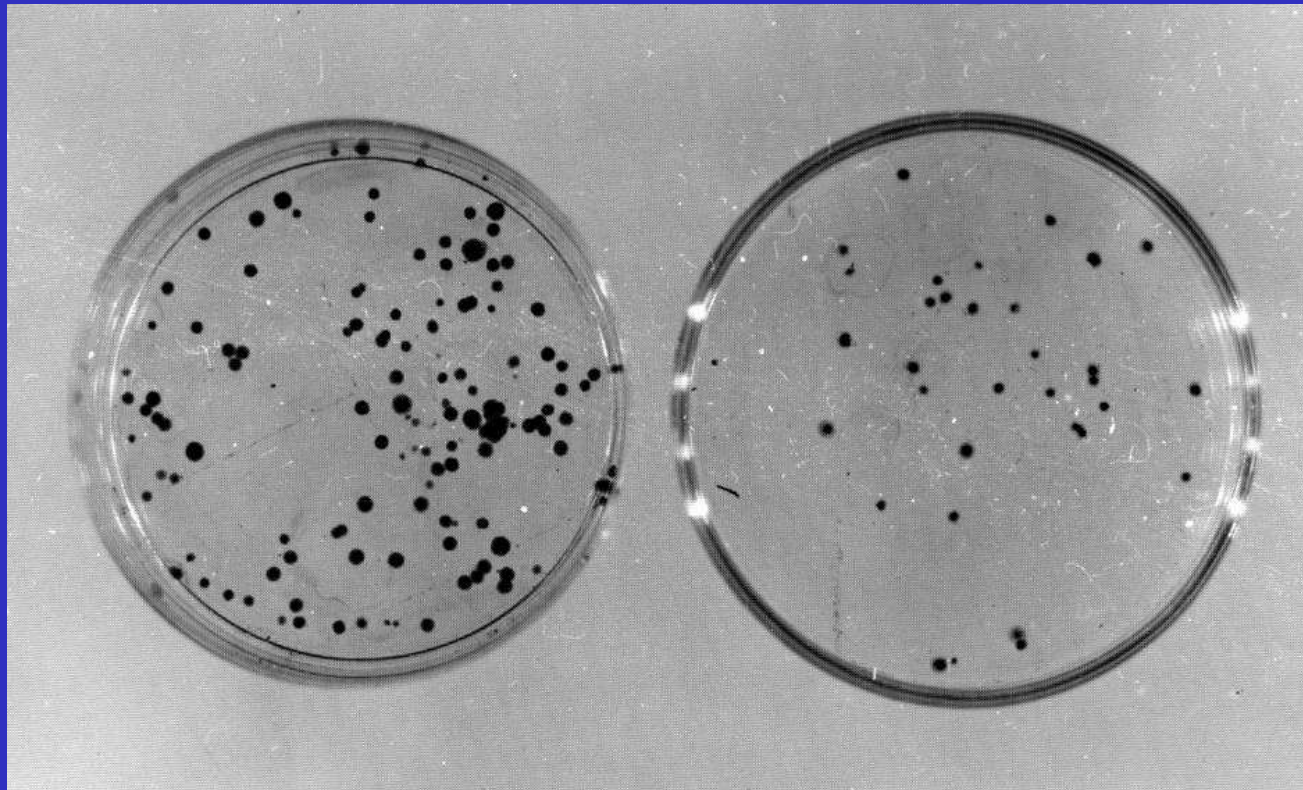


$$E.C. = 50/100 = 0.50 \text{ (50\%)}$$

$$S(D) = 20/(0.5 \cdot 100) = 0.40$$

Colonie cellulari

Colonie sviluppate da cellule di hamster cinese V79 seminate in capsule di Petri contenenti terreno nutritivo dopo 8 giorni d'incubazione a 37° in presenza di CO₂



Non irradiate

Irradiate con 5.5 Gy di raggi X

La curva di sopravvivenza

La frazione di cellule sopravvivenenti $S(D)$ ad una dose D è legata al numero medio $\langle n(D) \rangle$ di eventi letali per cellula dalla relazione (Poisson):

$$S(D) = \exp(- \langle n(D) \rangle)$$

La curva di sopravvivenza

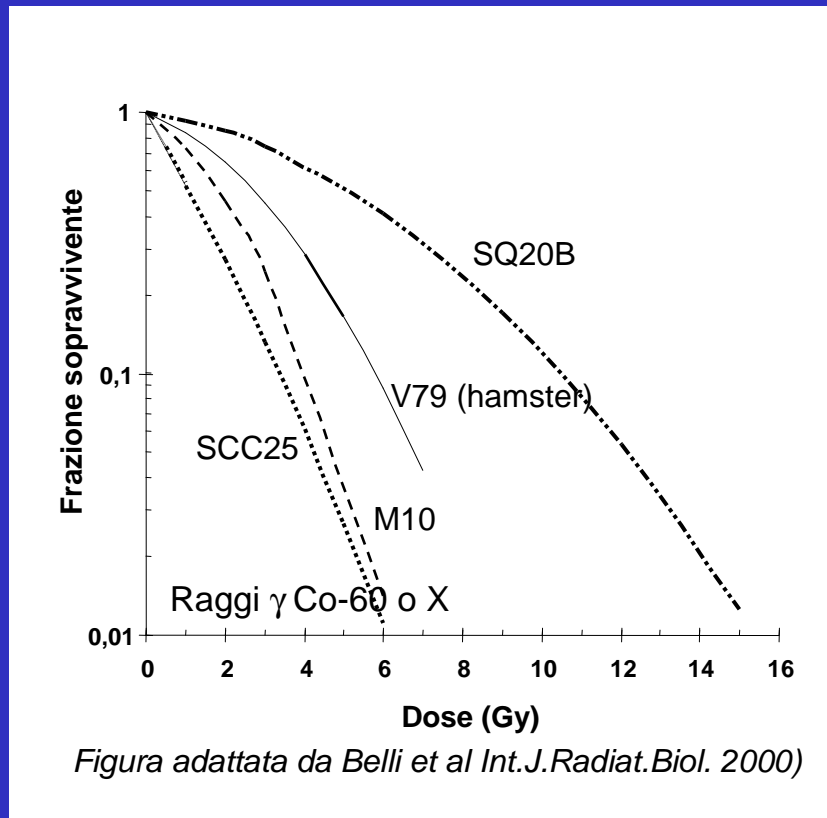
Sono state proposte varie funzioni matematiche per descrivere l'andamento sperimentale di $S(D)$ o, equivalentemente, di $\langle n(D) \rangle$, basate su altrettanti modelli, quali la teoria dell'urto e del bersaglio, la teoria della doppia azione, quella della riparazione saturabile, quella molecolare.

In passato si è molto discusso sulla scelta delle diverse funzioni. Poiché nessuno dei modelli è completamente soddisfacente, attualmente si tende ad usare in maniera fenomenologica la cosiddetta relazione lineare-quadratica:

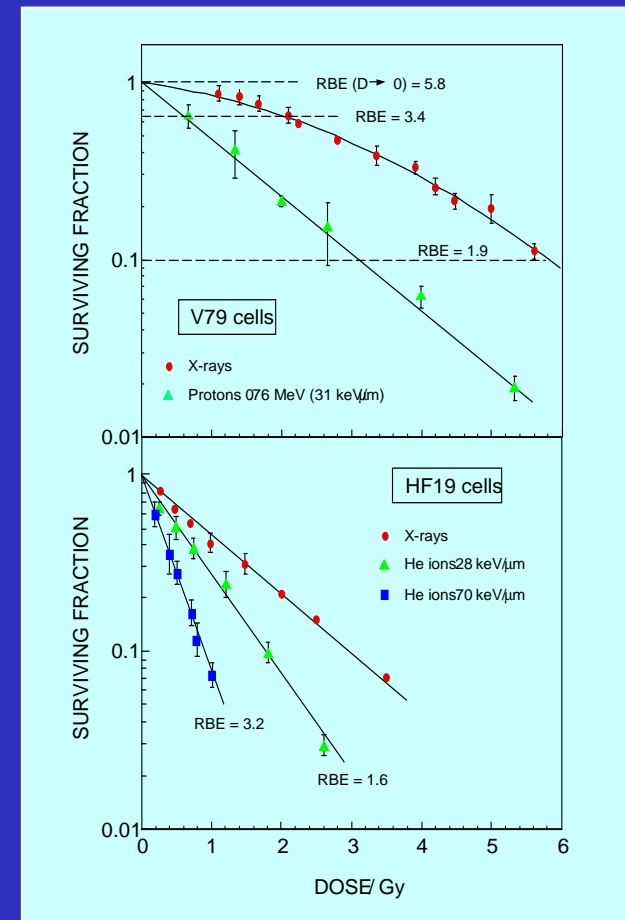
$$S(D) = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad \text{ovvero} \quad \langle n(D) \rangle = \alpha D + \beta D^2$$

(che esprime comunque i primi due termini di un'espansione in serie di una funzione crescente con la dose D).

Curve di sopravvivenza

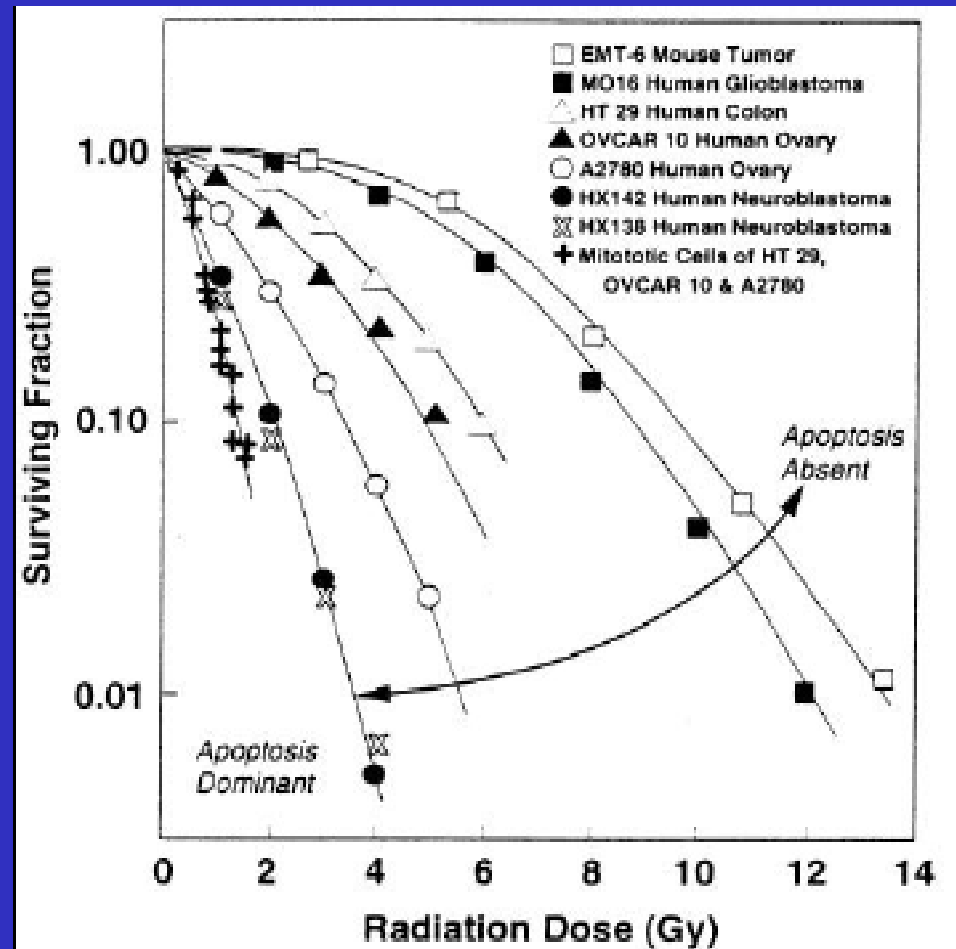


La forma delle curve di sopravvivenza può essere diversa a seconda del tipo di cellule, del tipo di radiazione e di altri fattori



Curve di sopravvivenza

Le cellule non hanno tutte la stessa radiosensibilità. Cellule diverse possono mostrare valori di radiosensibilità assai diversi. Vi è spesso una stretta relazione tra radiosensibilità cellulare e apoptosi (morte cellulare programmata)



Curve dose-risposta

Variazione dell'effetto in funzione della dose

Scelta di opportune grandezze per la misura dell'effetto

Curve di:

- **inattivazione / sopravvivenza**
- **mutazione**
- **aberrazioni cromosomiche / cromatidiche**
- **Trasformazione in vitro**

Fine