

**ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SECONDA FACOLTÀ DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

Titolo

**ACQUISIZIONE E ARCHIVIAZIONE
D'IMMAGINI MICROSCOPICHE DI
BRONCOSFERE IN RADIOBIOLOGIA**

Tesi in

Reti Logiche L-A

Relatore

Prof. Alessandro Bevilacqua

Presentata da

Alessandro Cedioli

Co-Relatore

Ing. Filippo Piccinini

Dott.ssa Anna Tesei

Dott. Rolando Polico

Sessione III

Anno Accademico 2010-2011

Indice

Capitolo 1 Introduzione	5
Capitolo 2 Materiali e metodi	8
2.1 Cellule tumorali utilizzate.....	8
2.2 Terreni di coltura	10
2.3 Contenitori	11
2.4 Broncofere <i>in-vitro</i>	14
Capitolo 3 Strumentazione di base del laboratorio di radiobiologia	18
3.1 Incubatore	19
3.2 Cappe a flusso laminare.....	21
3.3 Microscopio invertito.....	24
3.4 Bioreattore	31
3.5 Fantoccio.....	33
3.6 Acceleratore lineare	36
Capitolo 4 Protocolli di acquisizione e archiviazione dati	44
4.1 Protocollo di acquisizione.....	45
4.2 Protocollo di archiviazione dati	53
Capitolo 5 Descrizione dell'esperimento.....	56
5.1 Quantità caratteristiche di un fascio di fotoni.....	58
5.2 Frazionamento della dose	61
5.3 Definizione del protocollo di irradiazione	63
5.4 Irradiazione delle broncofere	67
Capitolo 6 Conclusioni e sviluppi futuri.....	72
Bibliografia	75
Ringraziamenti.....	78

Capitolo 1 Introduzione

La radioterapia è quella branca specialistica della medicina che prevede l'utilizzo di radiazioni ionizzanti per il trattamento di malattie, principalmente neoplasie. Fondamentalmente, lo scopo principale di un trattamento radioterapico radicale è l'uccisione di tutte le cellule tumorali presenti nel volume irradiato, al fine di distruggere tutti i tessuti maligni e contemporaneamente minimizzare i danni ai tessuti sani. Nonostante l'oggettiva constatazione dei risultati positivi riscontrati nei pazienti a seguito dei trattamenti, i processi biologici responsabili di tali effetti non sono al giorno d'oggi ancora perfettamente compresi. Inseguendo l'obiettivo di riuscire a definire tali processi è nata la branca delle scienze bio-mediche denominata radiobiologia, la quale appunto ha lo scopo di studiare gli effetti provocati dalle radiazioni quando esse interagiscono con un sistema biologico, quale ad esempio un aggregato multicellulare [1] [2]. In particolare, la volontà di comprendere sempre di più a riguardo dei processi biologici nati dalla interazione dai tessuti e delle radiazioni, è la motivazione fondamentale che ha spinto la realizzazione di un nuovo laboratorio operativo all'interno dell'Istituto scientifico Romagnolo per lo Studio e la cura dei Tumori (IRST), struttura da anni all'avanguardia nel campo della cura contro i tumori. E' così nato quest'anno il Laboratorio di Radiobiologia dell'IRST, diretto dalla Dott.ssa Anna Tesei e co-abitato da biologi, fisici sanitari e radiologi impegnati nel raggiungere importanti obiettivi di ricerca e progredire nelle conoscenze che si hanno oggi nel campo della radiologia applicata.

Il problema da affrontare risulta essere la reperibilità di materiale su cui fare esperimenti e testare veri metodi di terapia, variando parametri fondamentali di una seduta di radioterapia, quali ad esempio intensità e numero di frazioni delle radiazioni. A tal fine possono essere di aiuto gli aggregati multicellulari di cellule tumorali prodotti in laboratorio. Seguendo alcune metodiche innovative, è possibile ottenere *in-vitro* degli sferoidi di grandi dimensioni che risultano essere un ottimo modello di tumore allo stato solido [3] [4]. In particolare, molti studi radiobiologici sono stati effettuati utilizzando varie linee di cellule tumorali coltivate in laboratorio, ma le indagini che prevedessero l'utilizzo di una struttura cellulare tridimensionale quale ad esempio uno sferoide sono ancora molto poche [5] [6] [7].

Al giorno d'oggi, i tumori al polmone risultano essere la principale causa di morte dei paesi industrializzati. Purtroppo per via della scarsa reperibilità di materiale a causa dei problemi di diagnosi della patologia in tempi utili prima della completa degenerazione del tessuto e della difficoltà di estrazione di biopsie dal polmone, non è stato finora possibile studiare nel dettaglio gli effetti delle cure radioterapiche nel caso di questo specifico tumore. Tuttavia, il gruppo di ricerca del Dott. Wainer Zoli e della Dott.ssa Anna Tesei è recentemente riuscito ad isolare cellule staminali di tessuto dal polmone e ad identificare un protocollo in grado di supportare la proliferazione e l'induzione al formare sferoidi [8]. Le conoscenze acquisite hanno portato alla realizzazione in laboratorio di sferoidi di cellule tumorali e staminali di polmone, che risultano essere ottimi modelli tridimensionali di tessuto umano su cui è possibile eseguire esperimenti al fine di regolare i parametri dei trattamenti radioterapici per massimizzarne l'effetto di cura. In particolare, l'obiettivo di questi primi esperimenti effettuati nel Laboratorio di Radiobiologia è il riuscire a correlare i fenomeni biologici indotti dalla cura radioterapica all'esito di casi clinici riscontrati nel corso degli anni al fine di essere in grado di regolare i parametri della cura a seconda delle caratteristiche specifiche del tumore. Questo al fine di migliorare i trattamenti radiologici sui pazienti, cercando di definire ad esempio, le più efficaci modalità e intensità di irradiazione recando minori danni collaterali possibili.

Questo lavoro di Tesi si inserisce quindi nel contesto di un progetto di collaborazione nato tra il Laboratorio di Radiobiologia dell'IRST, di cui questo elaborato rappresenta la prima tesi scritta al suo interno, e il gruppo di ricerca *Computer Vision Group* (CVG) dell'Università di Bologna, coordinato dal Prof. Alessandro Bevilacqua. L'obiettivo principale del progetto di tesi, è la definizione del protocollo di acquisizione e archiviazione di immagini relative ad aggregati multicellulari trattati con diverse tecniche radioterapiche. Le immagini così acquisite e il *database* formato risultano essere fondamentali per studiare aspetti densitometrici degli sferoidi e riuscire a correlare le mutazioni della struttura a parametri clinico-biologici.

Questo elaborato di Tesi è composto dai seguenti capitoli:

- Capitolo 2: presenta una descrizione delle cellule CAEP (Carcinoma EPidermoidale) e del protocollo utilizzato per la creazione di sferoidi da queste linee cellulari. Vengono qui descritti materiale e metodologie operative seguite per la preparazione delle apposite piastre utilizzate nel trattamento radiologico.

- Capitolo 3: sono descritte le strumentazioni di base del laboratorio di radiobiologia partendo dalle strumentazioni indispensabili per la manipolazione del materiale biologico ai dispositivi per la creazione, il mantenimento e l'irradiazione degli sferoidi.
- Capitolo 4: si descrive il protocollo formulato per l'acquisizione di immagini microscopiche di agglomerati cellulari quali le broncosfere. Vengono trattate gli aspetti metodologici che stanno a monte dell'acquisizione, come alle particolari accortezze da tenere in considerazione durante il processo, e alla definizione del *modus operandi* da seguire durante la cattura delle immagini. Inoltre viene trattato la formulazione di un protocollo di archiviazione di tali immagini acquisite, in modo da avere una catalogazione del materiale che ne permetta il facile e intuitivo utilizzo.
- Capitolo 5: qui è descritto l'esperimento effettuato dagli operatori del Laboratorio di Radiobiologia. Ne vengono documentati i vari aspetti peculiari, le accortezze usate dagli operatori ed eventuali problematiche. La prima parte di essa prende in esame le motivazioni delle specifiche scelte di trattamento, la seconda descrive il protocollo di irradiazione.
- Capitolo 6: vengono trattate le conclusioni di tale esperimento, capacità apprese, risultati operativi raggiunti e potenziali sviluppi futuri tramite tali risultati.

Capitolo 2 Materiali e metodi

In questo capitolo vengono descritti i principali materiali utilizzati per l'esperimento radiobiologico e le metodologie necessarie per la loro preparazione. Vengono descritte le linee cellulari tumorali utilizzate, specificandone i terreni di coltura necessari per la loro proliferazione. Vengono esaminati i vari contenitori adoperati nelle diverse fasi di processo del materiale fino alla disposizione delle broncosfere in apposite piastre in cui rimarranno per tutta la durata dell'esperimento radiobiologico.

2.1 Cellule tumorali utilizzate

I tumori del polmone si possono dividere principalmente in 4 categorie e queste sono rappresentative del 95% della totalità:

1. adenocarcinoma
2. carcinoma delle cellule piccole (*small cell carcinoma*)
3. carcinoma delle celle grandi (*large cell carcinoma*)
4. carcinoma delle cellule squamose o epiteliali

In particolare, la 4° categoria da sola rappresenta circa il 25-40% della totalità dei tumori al polmone. Le cellule squamose sono la parte principale dell'epidermide della pelle, tuttavia sono presenti in densità elevate anche nel rivestimento del tubo digerente, nei polmoni e in altre zone del corpo. Cellule squamose di diverse zone sono caratterizzate da differenze rilevanti per quanto riguarda la presentazioni dei sintomi, la storia del tumore, la prognosi e la risposta al trattamento. Per effettuare l'esperimento radiobiologico che verrà trattato nei successivi capitoli sono state usate, per l'appunto, un particolare tipo di cellule squamose del polmone denominate CAEP (Carcinoma EPidermoidale). Questa linea cellulare non è commercialmente reperibile ma è stata isolata direttamente dai biologi dell'IRST. La linea cellulare è stata ottenuta da un recupero cutaneo, mediante biopsia, di un uomo di 68 anni di razza

caucasica, sottoposto a toracotomia per una moderata differenziazione di un carcinoma delle cellule squamose del polmone con coinvolgimento delle ossa.

I campioni tumorali sono stati liberati dagli elementi stromali dopo una notte di incubazione a 37°C con collagenasi (enzimi che tagliano i legami peptidici presenti nel collagene, componente fondamentale della matrice extracellulare) e ialuronoglucosaminidasi o ialuronidasi (enzimi che degradano l'acido ialuronico, uno dei componenti fondamentali dei tessuti connettivi). Gli ammassi di cellule tumorali sono stati raccolti mediante una filtrazione con dimensione del poro di 50µm equindipiastrate in recipienti di plastica contenenti una mistura di terreno DMEM e HAM's f12, più un 10% di siero fetale e 1% di L-glutammine e insulina [9]

2.2 Terreni di coltura

Per permettere la proliferazione delle cellule *in vitro* è necessario che le condizioni dell'ambiente *in vitro* siano il più vicino possibile a quello in cui le cellule si ritrovano *in vivo*. Risultano fondamentali, fattori quali la temperatura e la composizione del terreno di crescita. La composizione e la preparazione del terreno in cui vengono mantenute vitali e proliferative le cellule è piuttosto complessa e il numero di terreni commercialmente disponibili è molto elevato. Tuttavia, si può dire che generalmente i terreni sono tutti formati da una soluzione isotonica e tamponata che contiene sali inorganici, una fonte energetica come ad esempio il glucosio, gli aminoacidi essenziali e altre sostanze, tra cui la più importante è il siero o un suo analogo sintetico. I componenti principali utilizzati per produrre il terreno di coltura utilizzato per la proliferazione ed il mantenimento delle cellule CAEP sono:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): è un terreno di coltura al quale è stato aggiunto del siero fetale, un aggregato di composti essenziali per la crescita cellulare, in quantità del 10% in volume. Si tratta di un terreno di coltura adatto per cellule adese.
- HAM's f12, è un terreno di coltura che differisce dal DMEM per il maggior contenuto di aminoacidi, sali e glucosio. L'utilizzo combinato di questo terreno con DMEM (a rapporto 1:1) è stato sperimentalmente riconosciuto soddisfacente alla crescita cellulare delle cellule CAEP.
- L-glutammina (L-glu), è una delle fonti principali di carbonio per molte cellule in coltura e fornisce precursori per le biosintesi e per la sintesi proteica al glucosio e al piruvato. E' una fonte energetica prodotta attraverso il ciclo di Krebs. È assolutamente necessaria alla crescita cellulare.
- Insulina, è un ormone proteico prodotto dalle cellule beta delle isole di Langerhans all'interno del pancreas e ha la funzione di ridurre la glicemia mediante l'attivazione di diversi processi metabolici e cellulari.

Le colture cellulari di cellule CAEP, vengono mantenute in un incubatore a 37°C di temperatura e con una percentuale di CO₂ del 5%. Sono stati scelti questi valori per replicare esattamente i livelli di temperatura e CO₂ a cui queste cellule sarebbero sottoposte nell'organismo. Il periodo di duplicazione di tali cellule è intorno alle 50 ore. La stabilità di tale linea cellulare è stata verificata con l'effettuazione di più di 100 passaggi.

2.3 Contenitori

I contenitori tipicamente utilizzati per gli esperimenti radiobiologici sono contenitori di plastica (polistirene) monouso. Si tratta di plastiche particolari vendute in confezioni sigillate e sterilizzate. In particolare, per l'esperimento trattato in questo lavoro di Tesi sono stati impiegati fondamentalmente 3 tipi di contenitori:

- 1) Le fiasche. Sono una sorta di bottiglie con tappo a vite, che hanno il "corpo" a forma di parallelepipedo con una base stretta a 2 facce laterali ampie. La fiasca tipicamente viene mantenuta sdraiata su una delle facce maggiori, sulla cui superficie crescono e aderiscono cellule. Queste fiasche dispongono di tappi dotati di un filtro, che permette gli scambi gassosi pur mantenendo chiuso il tappo, diminuendo così il pericolo di inquinamenti accidentali (Fig. 2.1).



Fig. 2. Immagine di una fiasca – Tratta da Wikipedia

- 2) I contenitori del bioreattore: un particolare contenitore di plastica creato appositamente per questo dispositivo. Tali contenitori permettono di essere fissati al rotore, che fa sì che ruotino intorno al proprio asse, e sono caratterizzati da una particolare membrana posta sul fondo che impedisce l'adesione delle cellule. Sono stati utilizzati contenitori da 50ml (Fig. 2.2).

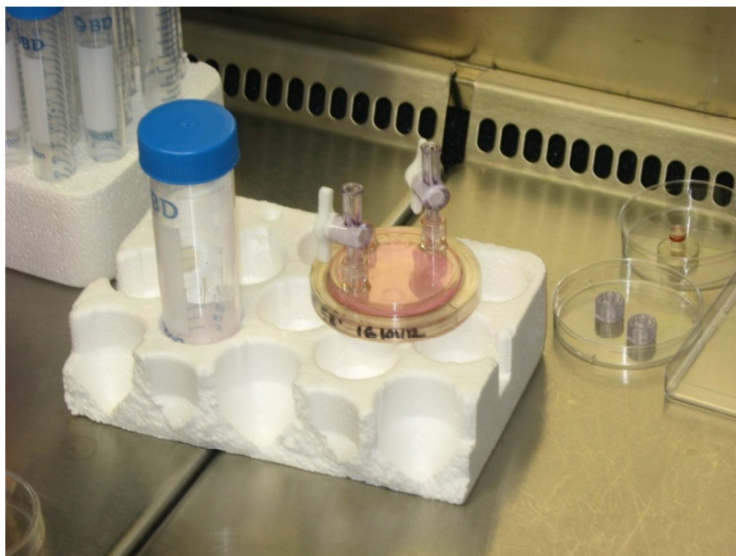


Fig. 2.2 Immagine del contenitore del bioreattore

- 3) Le piastre, una sorta di scatola con una base suddivisa in più sezioni isolatee un coperchio per chiudere il tutto. Le piastre Petri sono di solito rotonde, le piastre multipozzetto (meglio conosciute come *multiwell*) sono piastre quadrate suddivise in diversi pozzetti (da 6 a 96) a volume variabile a seconda del numero di pozzetti. Queste piastre riportano sul bordo superiore e laterale dei riferimenti alfanumerici per riuscire ad identificare mediante coordinate ogni singolo pozzetto. Durante l'esperimento radiobiologico sono state utilizzate piastre da 96 *well low attachment* cioè piastre non coattate per diminuire la probabilità che gli sferoidi aderiscano nel fondo del pozzetto (Fig. 2.3). In ciascun pozzetto vengono di solito inoculati circa 200 μL di sospensione cellulare. Dato che le piastre hanno un coperchio che non è a tenuta, il rischio di contaminazioni è alto, e richiedono una maggiore attenzione nel trattamento.

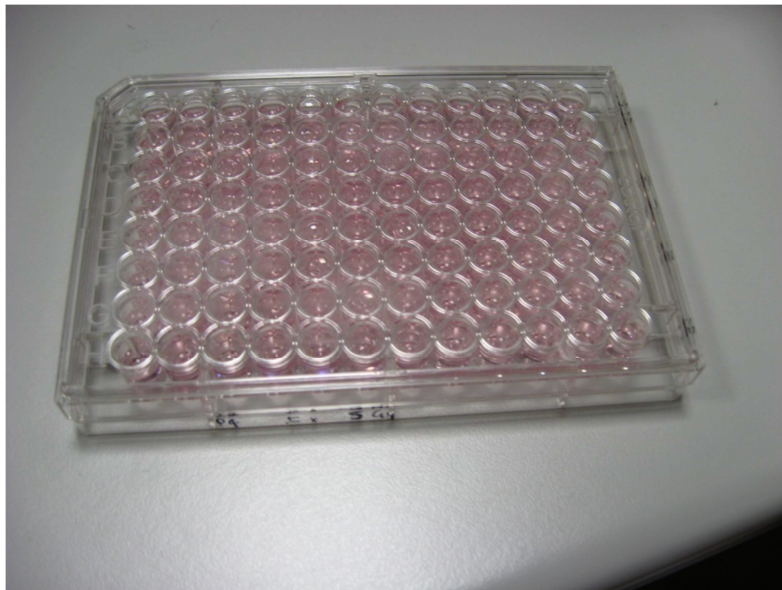


Fig. 2.3 Immagine di una piastra 96 *well low attachment*

2.4 Broncofere *in-vitro*

Mediante l'utilizzo di un particolare dispositivo denominato bioreattore, è possibile permettere alle cellule madri, di aderire alle cellule figlie nate durante il processo di mitosi. Questo determina la creazione di uno sferoide cellulare anziché un film sul fondo del contenitore. Risulta di particolare interesse ottenere degli sferoidi cellulari *in vitro* perché permette di disporre in grande quantità di tumori allo stato solido.

Le cellule che sono state utilizzate per la creazione degli sferoidi impiegati per l'esperimento radiobiologico sono delle cellule CAEP. Questa linea cellulare ha mostrato buona propensione alla formazione di sferoidi di dimensioni considerevoli (fino a più di 2mm di diametro) e risulta, essendo una linea cancerogena del polmone, una tipologia tumorale di primo interesse per l'elevato numero di casi clinici similari trattati.

2.4.1. Creazione di broncofere

Per poter creare sferoidi dalla linea cellulare CAEP, tali colture cellulari vengono fatte proliferare fino a che siano presenti nella fiasca approssimativamente 50 milioni di cellule così da avere una densità di un milione di cellule per millilitro quando verranno poste nel contenitore del bioreattore. Per poter stimare il numero di cellule presente nella fiasca viene tipicamente utilizzato un emocitometro: un piccolo contenitore per cellule formato da uno speciale vetrino portaoggetti con opportuno copri oggetto, con impressa (o stampata) nella superficie una griglia graduata. Viene utilizzato abbinato al microscopio ottico, per riuscire a contare le cellule in un volume noto indicato dalla griglia graduata. Quando si osserva che il numero di cellule all'interno della fiasca è approssimativamente quello desiderato si procede con le operazioni che permettono di introdurre le cellule in un contenitore del bioreattore:

1. Si prende un contenitore del bioreattore con capacità di 50ml. Tale scelta determina una densità cellulare di un milione per millilitro. Tale densità è stata stimata dagli operatori biologici dell'IRST affinché si possano ottenere un numero significativo di sferoidi.
2. Si procede ad "attivare" la membrana del contenitore, rendendola così non aderente per le cellule, mediante un'aggiunta di 25-30ml di PBS (*PhosphateBuffered Saline*). Tale volume di PBS risulta necessario per poter bagnare completamente la membrana del contenitore in rotazione. Il PBS è una soluzione tampone comunemente usata per la sua caratteristica di

isotonicità rispetto alle cellule umane. Viene utilizzato per diversi impieghi fra cui come soluzione di lavaggio per le cellule.

3. Trascorsi circa 30 minuti, l'azienda produttrice dei contenitori per il bioreattore assicura che la membrana posta sul fondo degli stessi si può considerare "attivata". Il PBS viene quindi prelevato mediante l' utilizzo di una pipetta con puntale sterile.
4. Viene effettuata una centrifugazione della coltura cellulare precedentemente posta in una provetta. Questa operazione causa la stratificazione dei diversi elementi in base alla loro densità. Le cellule avendo densità maggiore dei componenti del terreno di coltura andranno quindi a depositarsi sul fondo.
5. Vengono prelevate dal fondo della provetta le cellule mediante l' utilizzo di una pipetta automatica con puntale sterile e successivamente vengono introdotte nel contenitore del bioreattore.
6. Viene aggiunto all'interno del contenitore del terreno di coltura (lo stesso descritto precedentemente, in Terreni di coltura), attraverso un rubinetto per iniezione con siringa.
7. Utilizzando due siringhe, una vuota posta nel rubinetto per l' aspirazione e una contenente del terreno di coltura posta nel rubinetto di iniezione, si procede alla fase di eliminazione di bolle d' aria all'interno del contenitore. Tale procedimento consiste nell' introdurre, utilizzando la siringa posta nel rubinetto di iniezione, del terreno di coltura all'interno del contenitore fino a che l' aria residua nello stesso non fuoriesca completamente entrando nella siringa vuota posta nel rubinetto per l' aspirazione.
8. Vengono serrati i rubinetti del contenitore per evitare fuoriuscita di materiale.
9. Si introduce il contenitore all'interno di uno degli appositi alloggiamenti nel bioreattore.
10. Viene impostata la velocità a 12,4 giri al minuto. È stata impostata questa velocità perché viene consigliata dall' azienda produttrice del bioreattore come valore iniziale di rotazione dei contenitori per tipologie cellulari affini a quella in esame. La velocità non resta costante durante l' intero processo di creazione degli sferoidi. Questo perché all' aumentare delle dimensioni degli agglomerati, questi non "risultano più in equilibrio" alla velocità settata inizialmente. Per "risultano in equilibrio" si intende che durante la rotazione del contenitore posto nel rotore gli sferoidi rimangano sempre in continuo movimento senza mai collidere contro il bordo del contenitore. La velocità viene quindi nei giorni lievemente incrementata per mantenere tale equilibrio.

11. Vengono controllati i livelli di CO² e di temperatura dell'incubatore assicurandosi siano settati ai valori precedentemente definiti per il mantenimento di tali colture cellulari.

Circa 2 volte a settimana il terreno viene sostituito così da permettere alle cellule di avere il nutrimento necessario per lo sviluppo cellulare. Questo procedimento implica l'utilizzo di specifiche accortezze, dovute alle particolari caratteristiche del contenitore quali

1. Dopo aver estratto il contenitore dal rotore, prelevato e posto in una provetta l'intero contenuto, per evitare che possa seccarsi la membrana, perdendo così le sue caratteristiche di inibizione all'adesione cellulare su di essa, nel contenitore vengono introdotti 10ml, volume sufficiente a ricoprire superficialmente l'intera membrana, di terreno nuovo.
2. Si sostituisce il terreno di coltura alle broncosfere utilizzando le procedure analoghe all'introduzione delle cellule CAEP nel contenitore del bioreattore sopra descritto.
3. Si reintroduce il contenitore nel rotore.
4. Viene invertito il verso di rotazione del rotore.
5. Si regola la velocità di rotazione in modo che durante la rotazione del contenitore gli sferoidi rimangano sempre in continuo movimento all'interno del contenitore senza mai collidere contro il bordo dello stesso.

Da osservazioni sperimentali, la creazione degli sferoidi di cellule CAEP si può ritenere matura, cioè con formazione di sferoidi di dimensioni superiori a circa 0,5mm, intorno al quindicesimo giorno dall'introduzione delle cellule nel contenitore del bioreattore, e rimangono vitali circa fino al trentesimo giorno.

2.4.2. Mantenimento e proliferazione degli sferoidi

Quando gli sferoidi si considerano pronti, si procede alla loro "messa in piastra". Per effettuare questa operazione si preleva mediante una pipetta automatica con puntale sterile un singolo sferoide dal contenitore e viene posto in uno dei 96 pozzetti di una piastra. Si ripete questa operazione fino a quando viene posto uno sferoide per ogni pozzetto della piastra. In ciascun pozzetto vengono introdotti 200µl di terreno di coltura. Caratteristica fondamentale per il mantenimento degli sferoidi posti nelle piastre è che durante i procedimenti di sostituzione del terreno dei singoli pozzetti,

questo non venga sostituito in toto ma ne vengano prelevati 100µsostituiti con altrettanta quantità di terreno nuovo. Questo per evitare di aspirare con la pipetta automatica anche del materiale cellulare. Globalmente vengono posti 96 sferoidi per piastra per un totale di 16 piastre. Nell'esperimento trattato in questo lavoro di Tesi sono state utilizzate 16 piastre perché sono stati effettuati 5 tipologie di trattamento ipofrazionato con 3 intensità di radiazione per ciascuna tipologia, più una piastra che non è stata trattata ma è utilizzata come piastra di riferimento.

Tipicamente, ciascuna piastra viene marcata con il numero e l'intensità di trattamenti di irradiazione al quale sarà sottoposta (Fig. 2.4).

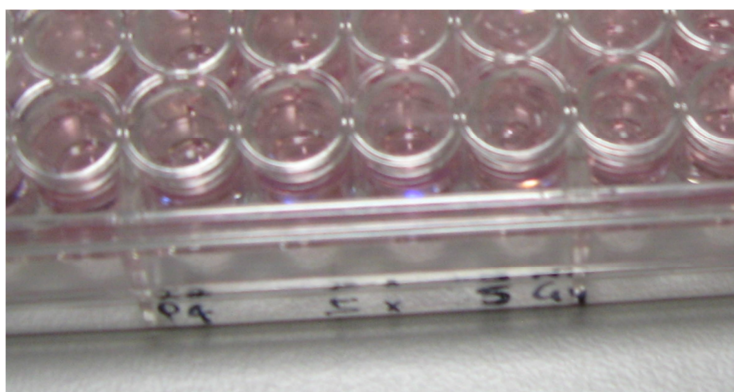


Fig. 2.4 Immagine della piastra marcata con numero e intensità di trattamenti di irradiazione

Nell'esecuzione del procedimento di collocamento degli sferoidi nella piastra vi è come problema la difficoltà di garantire l'introduzione di un singolo sferoide per pozzetto. Ciò è motivato dal fatto che l'operazione viene effettuata mediante osservazioni visive e operazioni manuali e quindi non si ha la certezza di non avere risucchiato all'interno del puntale mediante pipetta oltre allo sferoide voluto anche qualche sferoide non facilmente visibile a occhio umano. Inoltre la ripetitività di queste operazioni rende davvero impegnativo mantenere un grado di accuratezza elevato, da parte dell'operatore incaricato, per tutti i circa 1500 sferoidi introdotti nei pozzetti.

Capitolo 3 Strumentazione di base del laboratorio di radiobiologia

Con il termine “strumentazione di base del laboratorio di radiobiologia”indichiamo quei dispositivi fondamentali necessari per il corretto svolgimento di esperimenti a carattere radiobiologico, dove si ha quindi il connubio tra materiale biologico, quali cellule e tessuti, e tecniche di radiazione. In questo capitolo verranno presentati quindi strumenti atti alla produzione, trattamento e osservazione delle broncosfere e i dispositivi utilizzati per il loro trattamento radiologico. Sebbene sia un arduo compito entrare nei dettagli dei vari strumenti, specialmente di quelli utilizzati per trattare le radiazioni, questo capitolo ha lo scopo di fornire le informazioni fondamentali per comprendere il funzionamento macroscopico di tali strumenti, fondamentali per l’esperimento radiobiologico trattato nei capitoli successivi.

3.1 Incubatore

Molti tipi di cellule umane richiedono per una crescita ottimale una temperatura di circa 37°C e un terreno ad un pH compreso tra 7.0 e 7.2. La natura dei prodotti secondari del metabolismo cellulare è tale da rendere il medium (sinonimo di terreno o brodo o mezzo di coltura) piuttosto acido. Data la scarsa tolleranza delle cellule a cambiamenti eccessivi del pH, è necessario un sistema tampone. Un sistema molto usato è il tampone bicarbonato\CO₂ che richiede un apporto di CO₂ nell'incubatore e bicarbonato nel medium. Inoltre, la presenza di un'atmosfera ad elevato grado di umidità previene l'evaporazione del medium. Per questo tipo di colture sono quindi necessari incubatori in grado di controllare sia la temperatura che la miscela di gas: di solito si opera a 37°C con il 95% di aria e il 5% di CO₂, mentre l'umidità viene mantenuta da una vaschetta d'acqua posta sul fondo dell'incubatore. Il 5% di CO₂ deve essere accuratamente controllato, perché governa la stabilità del sistema tampone: infatti di gioca sull'equilibrio:



Se il medium si acidifica si forma acido carbonico che dà origine alla CO₂ che si libera; se la concentrazione di bicarbonato nel mezzo di coltura diminuisce, immediatamente l'anidride carbonica si discioglie nuovamente riportandolo alla concentrazione giusta e permettendo così di mantenere il pH nel *range* ottimale. Ovviamente i gas in entrata (aria e CO₂) vengono filtrati con filtri da 0.2µm. La vaschetta piena d'acqua posta sul fondo dell'incubatore, deve essere addizionata di antimuffa. Oggi tra l'altro esistono alcuni modelli di incubatori come ad esempio un tipo della Hereaus-Thermo Fisher ScientificInc. (Waltham, MA, USA), che essendo costruito con la camera interna di rame, impedisce la crescita di muffe e microorganismi al suo interno. Altri, come la FORMA-Thermo Fisher ScientificInc. (Waltham, MA, USA) hanno ad esempio un sistema di umidificazione che non prevede più la vaschetta sul fondo, ma l'immissione dell'aria umidificata prefiltrata così da eliminare anche questa fonte di inquinamento. Infine, oggi sono disponibili sul mercato incubatori che possono produrre vapore a 140°C per effettuare una sterilizzazione della camera interna quando necessario. Comunque sia, è buona norma pulire e controllare frequentemente gli incubatori. Nel caso di inquinamento delle colture, è necessario eliminare velocemente le fiasche contaminate e decontaminare l'incubatore.

Per l'esperimento radiobiologico è stato usato un incubatore che mantiene al suo interno una temperatura di 37°C e una percentuale di CO₂ del 5%.



Fig. 3.1 Incubatore

3.2 Cappe a flusso laminare

Le cappe a flusso laminare hanno principalmente un duplice scopo:

1. proteggere il campione dall'operatore e dall'ambiente circostante
2. proteggere l'operatore dal campione (cioè minimizzare i rischi di infezione)

Vi sono diversi tipi di cappa sterile; i principali sono:

1. le cappe a flusso laminare orizzontale
2. le cappe a flusso verticale di Classe I
3. le cappe a flusso verticale di Classe II
4. le cappe a flusso verticale di Classe III

In particolare, la cappa a flusso orizzontale non offre nessuna protezione all'operatore. In questo tipo di cappa un flusso di aria filtrata fluisce orizzontalmente dalla parte posteriore della cappa uscendo dalla parte anteriore. Il flusso in questo modo investe in pieno l'operatore e rilasciando tutto quello che può portare con sé nell'ambiente circostante. È ovvio che in questo tipo di cappa non si devono inserire cellule che possano essere fonti potenziali di rischio, e sono raccomandate solo per la parte di preparazione dei terreni, e sono molto utilizzate nelle colture di cellule vegetali.

Le cappe a flusso verticale di classe I danno una buona protezione all'operatore, ma una protezione minore alle colture. L'aria viene risucchiata dall'apertura frontale della cappa, passa sopra le colture ed esce dalla parte superiore della cappa. Queste cappe vengono di solito utilizzate in ambienti sterili particolari, dove gli operatori indossano speciali vestiti protettivi.

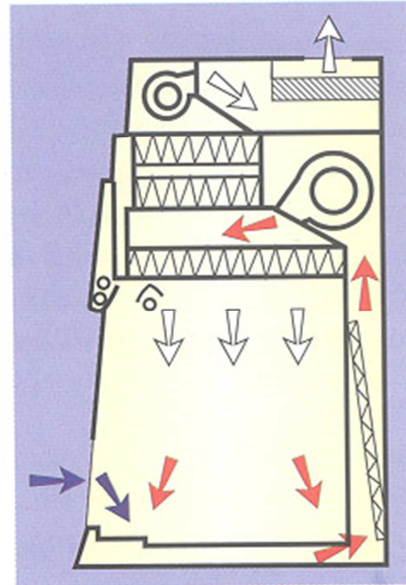
Le cappe di classe II offrono una buona protezione sia all'operatore che alle colture. Dato che è stata usata questa tipologia di cappe durante l'esperimento radiobiologico, verranno prese in esame dettagliatamente (Fig. 3.3).

Un flusso d'aria, filtrato attraverso un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) che rimuove virtualmente tutte le particelle più grandi di $0.3 \mu\text{m}$ di diametro (e quindi sterilizza l'aria in entrata) entra nella cappa attraverso il "soffitto" e viene spinta come un pistone attraverso la superficie di lavoro e quindi esce dal piano perforato sul "pavimento" della cappa. Il 70% dell'aria viene ricircolato, mentre il 30% viene eliminato attraverso dei filtri HEPA posti superiormente. Se si lavora con materiale pericoloso è possibile montare dei filtri aggiuntivi, ad es. per i virus.

Una quantità di aria pari a quella eliminata viene fatta entrare prelevandola dall'ambiente circostante attraverso la porta frontale della cappa. L'aria passa attraverso una griglia larga circa 20 cm posta in basso all'imboccatura della cappa e da lì passa sotto il piano e viene filtrata e fatta circolare. Oltre la griglia il flusso d'aria forma una vera e propria barriera d'aria che dovrebbe impedire l'ingresso a potenziali contaminanti. La parte frontale della cappa è chiusa da un vetro che separa la testa dell'operatore dalla cappa stessa. L'uso della cappa a flusso laminare dovrebbe rendere difficile ai batteri il passaggio nelle colture, tuttavia i movimenti e il materiale all'interno della cappa possono creare turbolenze tali da diminuire l'efficienza del sistema.



Fig. 3.2 Fotografia di una cappa presente nel laboratorio di farmacologia preclinica dell'IRST



Class II

Fig. 3.3 Schema sintetico cappe classe II – Tratto da Wikipedia

Le cappe di classe III sono utilizzate per lavorare con organismi altamente patogeni. In queste cappe, l'operatore è riparato dall'area di lavoro da una barriera fisica costituita di solito da una lastra di vetro o perspex che chiude l'intera apertura frontale. L'area di lavoro viene resa accessibile attraverso un paio di guanti ad alta protezione. L'uso di cappe di classe III richiede la conoscenza di speciali regole di sicurezza, che devono venire dalle autorità sanitarie locali.

3.3 Microscopio invertito

Per poter trattare ed osservare correttamente cellule o tessuti risulta fondamentale l'utilizzo di un microscopio ottico. In particolare quando si osservano cellule o aggregati di esse si consiglia l'utilizzo di microscopi invertiti (chiamati anche microscopi rovesciati), caratterizzati dal fatto di presentare la fonte luminosa sopra il portaoggetti e gli obiettivi sotto. La configurazione risulta quindi essere precisamente invertita rispetto ai tradizionali microscopi. Tale configurazione ottimizza la capacità del microscopio di mettere a fuoco il fondo della piastra, rendendo possibile l'osservazione delle colture cellulari senza doverle mettere in un vetrino. Il poter osservare le cellule direttamente dalla piastra è indispensabile per i vari processi di routine di un laboratorio biologico (determinazione confluenza, stato delle cellule, etc.) senza rendere inutilizzabili successivamente i campioni esaminati. Per effettuare l'esperimento trattato nei capitoli successivi è stato utilizzato un microscopio invertito Zeiss Axiovert200 (Fig. 3.4).



Fig. 3.4 Viste del lato sinistro e destro del Microscopio Zeiss Axiovert200

Tale microscopio può essere usato sia in *brightfield* sia in contrasto di fase.

Gli obiettivi disponibili sono:

- ACHROPLAN 5x/0,12 (abbinato all'anello di fase ph0)
- ACHROPLAN 10x/0,25 (abbinato all'anello di fase ph0)
- LD APLAN 20x/0,30 (abbinato all'anello di fase ph1)
- ACHROPLAN 40x/0,17 (abbinato all'anello di fase ph2)

I filtri disponibili sono:

- B (invia al campione la luce nella lunghezza d'onda di eccitazione nel *range* del blu (488nm) e lascia arrivare al rivelatore la luce emessa a lunghezza d'onda nel *range* del verde (530nm).
- G (invia al campione la luce nella lunghezza d'onda di eccitazione nel *range* del verde (530nm) e lascia arrivare al rivelatore la luce emessa a lunghezza d'onda nel *range* del rosso (620nm).
- UV (invia al campione la luce nella lunghezza d'onda di eccitazione nel *range* dell'ultravioletto (400nm) e lascia arrivare al rivelatore la luce emessa a lunghezza d'onda nel *range* del blu (488nm).

Il condensatore ha una *numerical aperture*(NA) da 0.55 con 6 posizioni e gli anelli disponibili sono:

- Ph0
- ph1
- ph2
- H
- DIC
- DIC

Questo microscopio permette l'osservazione delle cellule anche in contrasto di fase, sia positivo che negativo:

- Nel contrasto di fase positivo se l'indice di rifrazione del campione è maggiore dell'indice di rifrazione del bianco, nell'immagine finale il soggetto si vede scuro.
- Nel contrasto di fase negativo se l'indice di rifrazione del campione è maggiore dell'indice di rifrazione del bianco, nell'immagine finale il soggetto si vede chiaro.

Come “bianco” in analisi cellulare tipicamente viene considerato un pozzetto contenente solo terreno di coltura (senza quindi cellule seminate). Nel laboratorio di colture cellulari dell’IRST questo microscopio è abbinato ad una fotocamera commerciale Zeiss MRc (Fig. 3.5). La sigla MR indica i modelli *top* delle camere Zeiss, mentre il pedice “c” indica che la fotocamera è a colori (se fosse stata in bianco e nero, indicata nel caso venisse utilizzata unicamente per fotografie in fluorescenza, avrebbe avuto il pedice “m”). La fotocamera ha una capacità risolutiva di 1,4 *Megapixel* e non permette l’acquisizione video.



Fig. 3.5 Fotografia della fotocamera Zeiss MRc

Le caratteristiche tecniche fornite direttamente dalla casa costruttrice sono riportate di seguito (

Technical Data AxioCam MRc

Sensor	Sony ICX 285, progressive readout, with RGB filter mask				
CCD basic resolution	1388 x 1040 = 1,4 megapixels				
Pixel size	6.45 µm (h) x 6.45 µm (v)				
Sensor size	Chip area 8.9 mm x 6.7 mm, equivalent 2/3"				
Spectral range	Approx. 400 nm-700 nm, BG 40 IR protection glass				
Dynamic range	Typical > 1 : 2200 (> 66.8 dB)				
Full Well	Typical 17 Ke				
Readout noise	Typical < 7.7 e				
Dark current	Typical 0.7 e/pixels/s, dark current compensation for maximum low light performance				
Readout speed	24.57 MHz pixel clock				
Live image frame rates	H	x	V	Mode / Binning	Max. frame rate*
	1388	x	1040	slow / 1	13 images/s
	460	x	344	middle / 3	26 images/s
	276	x	208	fast / 5	38 images/s
Resolution and frame rates for time lapse images in AxioVision module Fast Acquisition (High Speed Color Mode**)	H	x	V	Binning	Max. frame rate*
	1388	x	1040	1 x 1, RGB / SW	14 images/s
	692	x	520	2 x 2, SW	26 images/s
	460	x	344	3 x 3, RGB	35 images/s
	344	x	260	4 x 4, SW	42 images/s
	276	x	208	5 x 5, RGB	48 images/s
Max. file size per image	Approx. 8.6 MB at 1388 x 1040 at 3 x 12 bit (36 bit color depth)				
High-speed operation modes for AxioVision module Fast Acquisition	<ul style="list-style-type: none"> • Five preloadable exposure time parameters in camera head for high-speed multichannel acquisition*** • Continuous mode for fast triggered acquisition • Overlapping exposure and readout of the sensor in fast time lapse images**** 				
Color interpolation	High Speed Color Mode or High Quality Color Mode selectable				
Hard disk recording	Inline recording of image data directly to hard disk at all speeds with AxioVision module Fast Acquisition				
Readout of subframes (ROI)	Freely selectable				

Signal amplification	Analog: 2x, digital 32x
Digitization	12 bit
CCD cooling	One stage Peltier cooling
Interface	FireWire 1394a (400 megabits/s)
Range of integration time	1 ms up to 60 s
Signal output connectors	2 x TTL-Out: exposure time and readout time (i.e. for driving external electric shutters), 1 x Trigger-In to start an acquisition
Optical interface	C-Mount
Housing	Blue anodized aluminum, with cooling fins, 1/4" connection for tripod mount, 11 cm x 8 cm x 4.5 cm / 370 g
Operating system	Microsoft® Windows 2000 Professional Microsoft® Windows XP Professional
Registration	CE, cUL
Power supply	10-33 V, DC, 4 W power supply provided by FireWire bus from PC (external power supply only for notebook operation required)
Ambient condition (operation)	+5° ... +35° Celsius, max. 80% relative humidity, no condensation, free air circulation required
Order number	426508-9901-000

Above frame rates are supported by the camera electronics. Computer hardware, operating system and application software may decrease the frame rates. Selecting a part of the sensor area can increase the frame rate. All specifications are subject to change without notice.

* Frame rates depend on exposure time and readout mode.

** Image rates when recording onto hard drive in High Speed Color Mode.

*** In Continuous Mode the maximal exposure time is 819 ms per channel.

**** In basic resolution mode the sensor readout time is 69 ms. Below this value, the frame rate is only determined by readout time. Above this value, the frame rate is determined by exposure time, only. With activated binning mode, the readout time is shorter, respectively.

Fig. 3.6 e Fig. 3.7).

Technical Data AxioCam MRc

Sensor	Sony ICX 285, progressive readout, with RGB filter mask				
CCD basic resolution	1388 x 1040 = 1,4 megapixels				
Pixel size	6.45 µm (h) x 6.45 µm (v)				
Sensor size	Chip area 8.9 mm x 6.7 mm, equivalent 2/3"				
Spectral range	Approx. 400 nm-700 nm, BG 40 IR protection glass				
Dynamic range	Typical > 1 : 2200 (> 66.8 dB)				
Full Well	Typical 17 Ke				
Readout noise	Typical < 7.7 e				
Dark current	Typical 0.7 e/pixels/s, dark current compensation for maximum low light performance				
Readout speed	24.57 MHz pixel clock				
Live image frame rates	H	x	V	Mode / Binning	Max. frame rate*
	1388	x	1040	slow / 1	13 images/s
	460	x	344	middle / 3	26 images/s
	276	x	208	fast / 5	38 images/s
Resolution and frame rates for time lapse images in AxioVision module Fast Acquisition	H	x	V	Binning	Max. frame rate*
	1388	x	1040	1 x 1, RGB / SW	14 images/s
	692	x	520	2 x 2, SW	26 images/s
Acquisition (High Speed Color Mode**)	460	x	344	3 x 3, RGB	35 images/s
	344	x	260	4 x 4, SW	42 images/s
	276	x	208	5 x 5, RGB	48 images/s
Max. file size per image	Approx. 8.6 MB at 1388 x 1040 at 3 x 12 bit (36 bit color depth)				
High-speed operation modes for AxioVision module Fast Acquisition	<ul style="list-style-type: none"> • Five preloadable exposure time parameters in camera head for high-speed multichannel acquisition*** • Continuous mode for fast triggered acquisition • Overlapping exposure and readout of the sensor in fast time lapse images**** 				
Color interpolation	High Speed Color Mode or High Quality Color Mode selectable				
Hard disk recording	Inline recording of image data directly to hard disk at all speeds with AxioVision module Fast Acquisition				
Readout of subframes (ROI)	Freely selectable				

Signal amplification	Analog: 2x, digital 32x
Digitization	12 bit
CCD cooling	One stage Peltier cooling
Interface	FireWire 1394a (400 megabits/s)
Range of integration time	1 ms up to 60 s
Signal output connectors	2 x TTL-Out: exposure time and readout time (i.e. for driving external electric shutters), 1 x Trigger-In to start an acquisition
Optical interface	C-Mount
Housing	Blue anodized aluminum, with cooling fins, 1/4" connection for tripod mount, 11 cm x 8 cm x 4.5 cm / 370 g
Operating system	Microsoft® Windows 2000 Professional Microsoft® Windows XP Professional
Registration	CE, cUL
Power supply	10-33 V, DC, 4 W power supply provided by FireWire bus from PC (external power supply only for notebook operation required)
Ambient condition (operation)	+5° ... +35° Celsius, max. 80% relative humidity, no condensation, free air circulation required
Order number	426508-9901-000

Above frame rates are supported by the camera electronics. Computer hardware, operating system and application software may decrease the frame rates. Selecting a part of the sensor area can increase the frame rate. All specifications are subject to change without notice.

* Frame rates depend on exposure time and readout mode.

** Image rates when recording onto hard drive in High Speed Color Mode.

*** In Continuous Mode the maximal exposure time is 819 ms per channel.

**** In basic resolution mode the sensor readout time is 69 ms. Below this value, the frame rate is only determined by readout time. Above this value, the frame rate is determined by exposure time, only. With activated binning mode, the readout time is shorter, respectively.

Fig. 3.6 Caratteristiche tecniche fotocamera Zeiss MRc - Tratto da www.zeiss.com

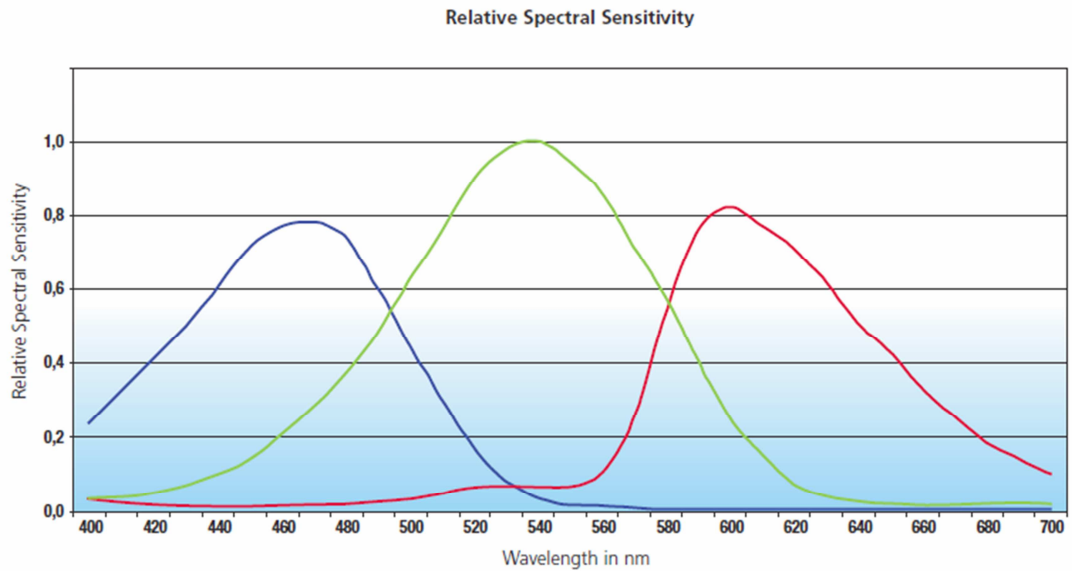


Fig. 3.7 Immagine della sensibilità dello spettro RGB – Tratto da www.zeiss.com

Il *software* adibito all'acquisizione delle immagini utilizzato per l'esperimento citato nei prossimi capitoli è un AxioVision AC e viene fornito direttamente dalla casa costruttrice della camera all'acquisto della stessa.

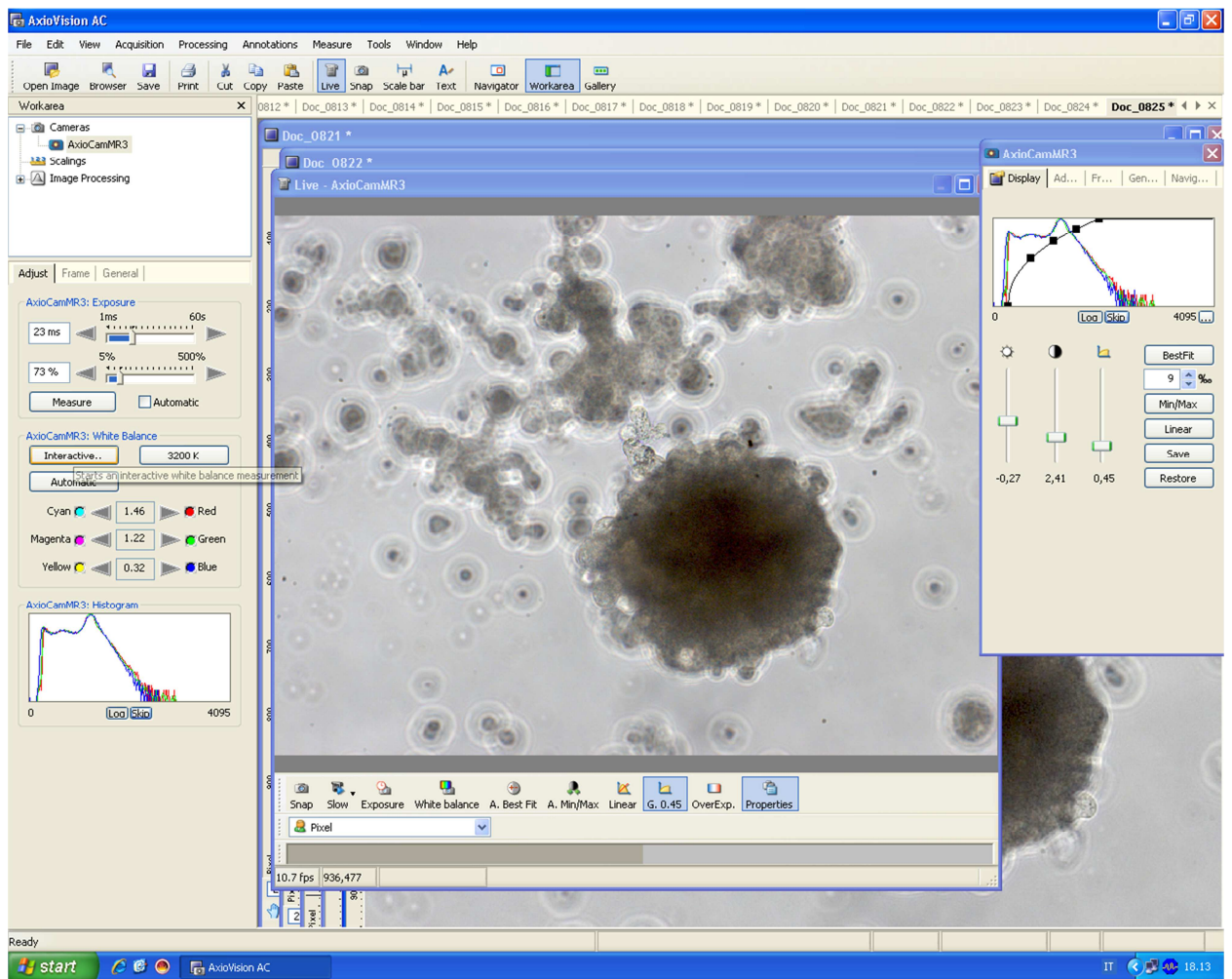


Fig. 3.8 Interfaccia programma AxioVision AC

Tramite il microscopio usato si riescono a fotografare aree di dimensioni varie a seconda dell'ingrandimento utilizzato, in particolare con i seguenti ingrandimenti queste sono le aree che si riescono a fotografare in un singolo frame di acquisizione:

- obiettivo 5x, area fotografata in un singolo frame: $2,2016 \text{ mm}^2$
- obiettivo 10x, area fotografata in un singolo frame: $0,5545 \text{ mm}^2$
- obiettivo 20x, area fotografata in un singolo frame: $0,1377 \text{ mm}^2$
- obiettivo 40x, area fotografata in un singolo frame: $0,0367 \text{ mm}^2$

3.4 Bioreattore

Il bioreattore è un dispositivo che permette la creazione e propagazione tridimensionale di tessuti nati partendo dalla coltivazione cellulare. Il principio di funzionamento teorico del bioreattore è quello di simulare l'assenza di gravità in modo da favorire una progressiva adesione cellulare attorno ad un nucleo in modo da promuovere la formazione di uno sferoide impedendo la normale adesione cellulare su fiasca che tenderebbe a formare un film e non un corpo tridimensionale. Per ottenere questo fenomeno, le colture cellulari poste negli appositi contenitori vengono fatte ruotare intorno al loro asse generando una forte accelerazione centripeta che favorisce l'adesione alle cellule madri delle cellule figlie nate durante il normale processo di mitosi. In particolare, il dispositivo in utilizzo all'IRST nasce da un brevetto NASA sviluppato per effettuare esperimenti atti a osservare la crescita di cellule nello spazio, cercando di simularne le stesse condizioni nell'atmosfera terrestre [10] [11] [12].

Il bioreattore sostanzialmente è una camera incubatore regolata in temperatura e concentrazione gassosa ed è composto essenzialmente da tre parti:

1. contenitore della coltura: unità circolari pre-sterilizzate con allocati due rubinetti per iniezione e aspirazione con siringa e un'apertura per riempire e svuotare il contenitore in maniera *user'sfriendly*. Le camere sono caratterizzata da una particolare membrana per evitare l'adesione delle cellule sul fondo e una capacità volumetrica da 10 e 50ml.
2. rotatore base: elemento meccanico utilizzato per garantire la funzione di supporto e rotazione dei contenitori. Sono disponibili fino a 8 stazioni di rotazioni che devono essere impegnate in maniera simmetrica rispetto al fulcro di rotazione per favorire situazioni di equilibrio e minimizzare le vibrazioni. Le stazioni possono essere controllate con controlli indipendenti per ciascun contenitore
3. alimentazione: *consolle* con monitor del controllo della velocità. Mediante questa *consolle* si può regolare la velocità e il verso di rotazione dei contenitori. La consolle è collocata fuori dall'incubatore.



Fig. 3.9 Immagine di un bioreattore – Tratta da www.Synthecon.com

In particolare, il bioreattore utilizzato per la creazione di broncofere per l'esperimento trattato nei capitoli successivi include un rotore SyntheconRCCS-4SC con 8 stazioni di rotazioni non indipendenti per alloggiare contenitori da 50ml.

3.5 Fantoccio

Definiamo con il termine “fantoccio” l’apposito dispositivo creato per contenere una piastra per colture cellulari al suo interno ed essere alloggiato ed utilizzato per simulare un trattamento di irradiazione. Il materiale di composizione del fantoccio è il polimetilmetacrilato, PMMA, comunemente chiamato plexiglass, caratterizzato da una densità di $1,11 \text{ g/cm}^3$. In radiologia questa densità si può considerare sufficientemente simile a quella dell’acqua, definendo quindi i comportamenti del PMMA sono considerati “acqua equivalenti”. Il fantoccio è composto da una base e un coperchio di uguali dimensioni, 40cm di larghezza e lunghezza e 4cm di spessore, con al loro interno una cavità di dimensioni sufficienti a contenere una piastra per colture cellulari. La cavità è posta in modo tale da collocare la piastra contenente le colture cellulari precisamente al centro del fantoccio (Fig. 3.10).

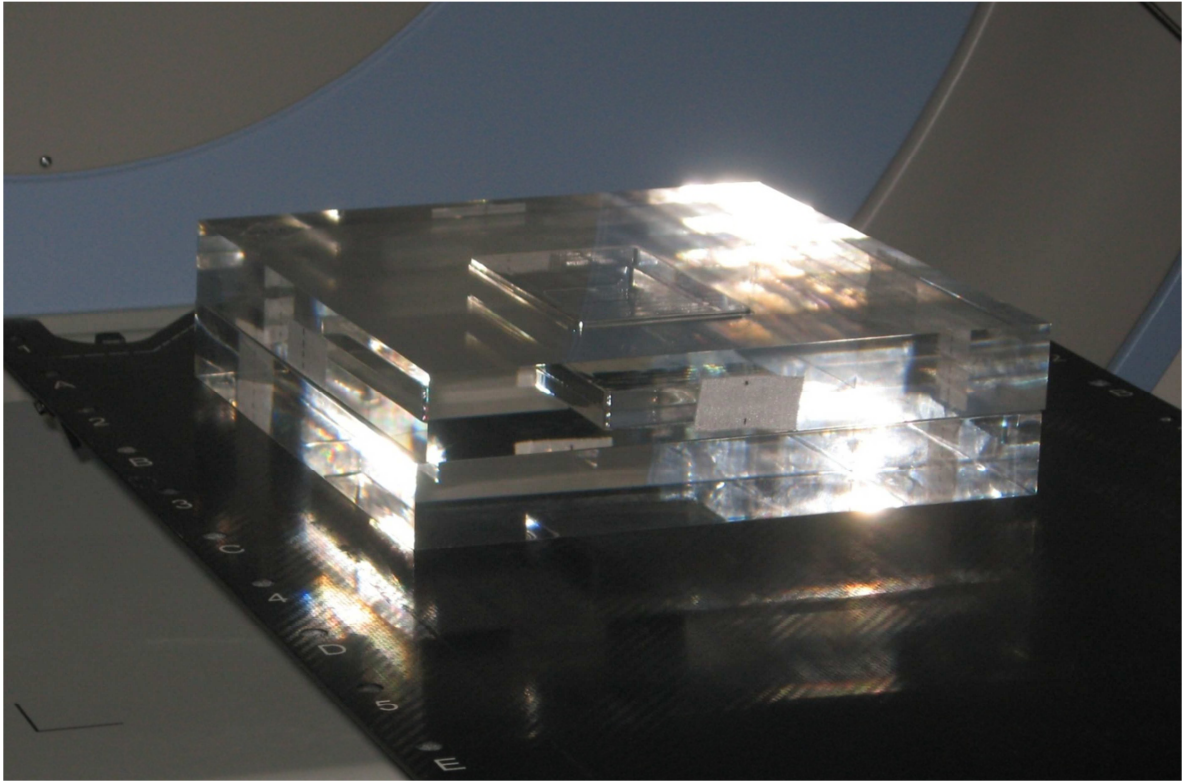


Fig. 3.10 Immagine del fantoccio creato per poter collocare la piastra nel macchinario utilizzato per il trattamento radiologico

Sul bordo del fantoccio vengono applicati dei riferimenti ottici che permettono sia l'allineamento della base con il coperchio che di centrare precisamente la piastra contenuta nel fantoccio sotto il fascio di fotoni emessi dall'acceleratore lineare (Fig. 3.11).

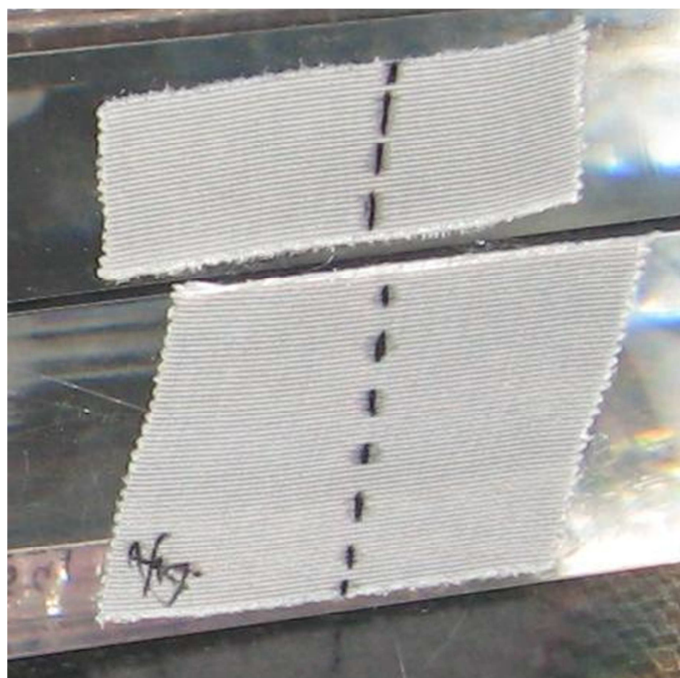


Fig. 3.1 Immagine dei riferimenti posti nel fantoccio

Il fantoccio sopracitato non è commercialmente reperibile, ma è stato progettato dal Dott. Rolando Polico, direttore del Laboratorio di Radiologia dell'IRST di Meldola, per effettuare esperimenti radiobiologici.

3.6 Acceleratore lineare

Lo strumento tipicamente utilizzato per la produzione dei fasci di fotoni usati nelle tecniche di trattamento radioterapico è l'acceleratore lineare, denominato LINAC (*LINear ACcellerator*). Il LINAC utilizza onde elettromagnetiche di alta frequenza (3000 MHz) per accelerare elettroni in un tubo lineare. Il fascio stesso di elettroni ad alta energia può essere utilizzato per il trattamento di tumori superficiali o può essere diretto contro un bersaglio per la produzione di fasci di fotoni ad alta energia ($\geq 1\text{MeV}$) in grado di raggiungere tumori posti anche in posizioni profonde [13].

3.6.1. La struttura accelerante

La struttura accelerante consiste di un tubo acceleratore, o guida d'onda, mantenuto ad una pressione molto bassa (vuoto spinto) così da evitare collisioni atomiche al suo interno. Il tubo è costruito in rame ed è caratterizzato internamente da dischi di rame di varie dimensioni e spaziatura che hanno la funzione di accelerare gli elettroni all'energia voluta (in campo clinico tipicamente da 4 MeV a 18-25 MeV) e di mantenere il fascio su una traiettoria ben definita nella forma di un fascio "a pennello" di diametro pari a 3 mm. Il fascio di elettroni di alta energia è convogliato, generalmente mediante un magnete curvante, alla testata di trattamento dove può colpire un *target*, per produrre un fascio di raggi γ (*photon beam mode*,

3) o attraversare un foglio di diffusione, tipicamente un sottile foglio di alluminio, che allarga il fascio di elettroni e ne varia l'energia (*electron beam mode*,

3). I raggi γ sono prodotti per *bremsstrahlung* o "radiazione di frenamento", cioè radiazione emessa da particelle cariche quando subiscono un'accelerazione, quando gli elettroni attraversano il *target*, con uno spettro caratteristico di energia che dipende sia dallo spessore che dal tipo di materiale. Il *target* è raffreddato ad acqua ed è abbastanza spesso da assorbire la maggior parte degli elettroni incidenti. L'energia degli elettroni viene così convertita in un ampio spettro di energie di fotoni il cui valore massimo corrisponde all'energia degli elettroni incidenti. Viene inserito un filtro di "appiattimento" (*flattening filter*), tipicamente di piombo, per rendere uniforme il fascio radiante di fotoni attraverso il campo dato che l'elevate energie

degli elettroni incidenti generano un fascio non uniforme. La posizione di tale filtro risulta particolarmente critica; qualsiasi minimo spostamento produrrà un'alterazione della simmetria ed omogeneità del fascio al di fuori dei limiti di accettazione. La testata di trattamento è costituita da un guscio molto spesso di materiale schermante ad alta densità come piombo, tungsteno o leghe tungsteno-piombo. La testata contiene il target per i raggi γ e il foglio di diffusione per i fasci di elettroni; segue un sistema di collimatori fissi che dirige il fascio di raggi γ al filtro di *flattening* (rimosso automaticamente nel caso di trattamenti con fasci di elettroni). Il fascio di fotoni o di elettroni attraversa successivamente un sistema di camere a ionizzazione per il monitoraggio della dose erogata. Queste camere sono piatte, costituite da piani paralleli e divise in diversi settori, riempite di gas, sigillate in modo che la loro risposta non sia influenzata dalla pressione e dalla temperatura. Dopo le camere a ionizzazione sono posizionati i collimatori mobili per raggi γ . Questo sistema è costituito da due coppie di blocchi (*jaws*) mobili, di piombo, che permettono di definire campi di trattamento rettangolari di apertura fino ad un massimo, tipicamente, di $40 \times 40 \text{ cm}^2$ alla distanza di trattamento pari a 100 cm dalla sorgente. Per la terapia con fotoni, dopo le camere di monitoraggio, possono essere introdotti a mano o meccanicamente anche dei filtri a cuneo (*wedge*) al fine di produrre una distribuzione di dose volutamente asimmetrica. Questi filtri hanno forme diverse a seconda della ditta costruttrice e a seconda dell'effetto desiderato. L'utilizzo di questi particolari filtri è atto a proteggere dalle radiazioni una zona limitrofa a quella da trattare. La definizione del campo è ottenuta attraverso un sistema di localizzazione luminoso, costituito da uno specchio e una fonte luminosa posti tra le camere e i collimatori. Per i fasci di elettroni il sistema di collimazione varia molto da ditta a ditta, tipicamente è costituito da supporti esterni in alluminio di diverse aperture, che permettono di definire il campo di trattamento alla distanza fissa di trattamento e generalmente sono appoggiati alla cute per evitare dispersioni (Fig. 3.13) [14] [15].

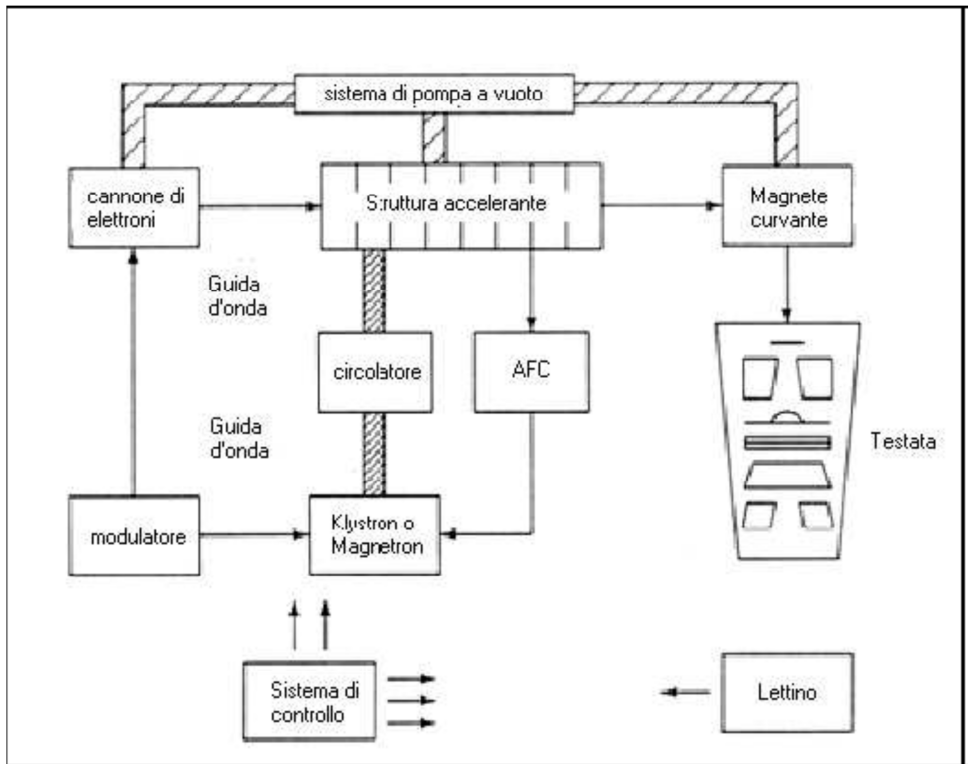
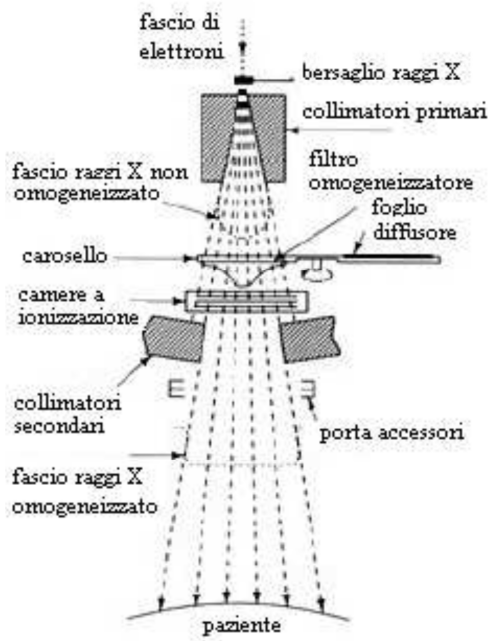


Fig. 3.12 Diagramma a blocchi della struttura accelerante di un acceleratore lineare di elettroni [13]

X-ray mode



e mode

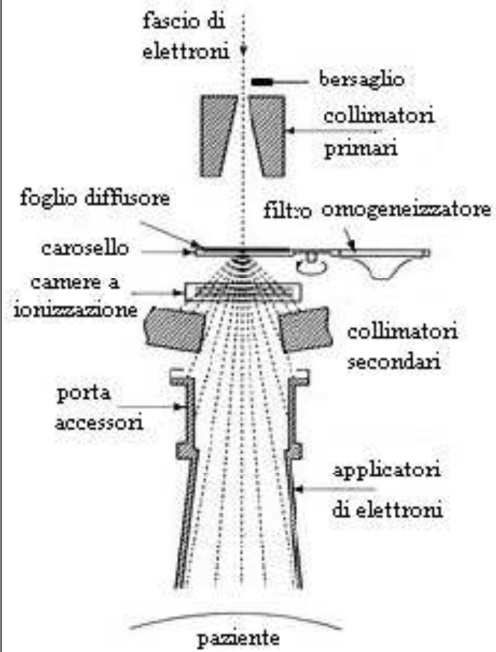


Fig. 3.13 Schema della testata di un acceleratore lineare di elettroni nel caso di un fascio di fotoni e in quello di un fascio di elettroni [13]

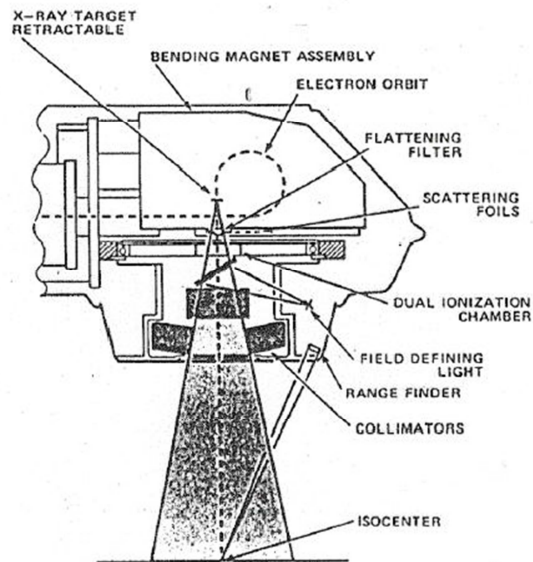


Fig. 3.14 Schema della testata dell'acceleratore lineare [16]

3.6.2. Supporto del *gantry* e del paziente

I più importanti sistemi meccanici di un acceleratore lineare sono il supporto del *gantry* (la testata dell'acceleratore), i sistemi di guida, che servono a posizionare la sorgente di radiazione rispetto al paziente, e il supporto del paziente, ossia il lettino mobile, che deve permetterdi posizionare il paziente secondo quanto previsto dal trattamento. Il lettino deve essere in grado di eseguire tutti i movimenti verticali, longitudinali, laterali e rotazionali, in modo da allineare correttamente il paziente. Tutti i movimenti devono essere guidati e controllati con un alto grado di precisione (tipicamente 1-2 mm e 1°), e la struttura deve essere stabile rispetto alle sollecitazioni da carico (Fig. 3.15 Fig. 3.15) [17].

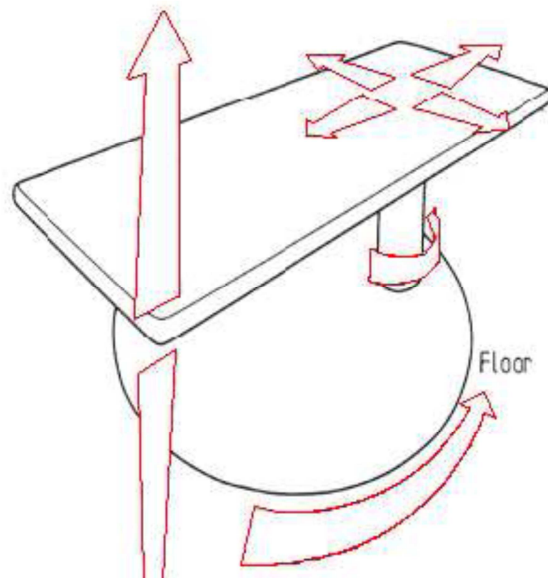


Fig. 3.15 Patient support [13]

Gantry, lettino e collimatori devono ruotare attorno al comune centro, detto isocentro (Fig. 3.16 e Fig. 3.17), che viene indicato da una serie di laser che si incrociano nell'isocentro stesso (questo sistema di laser viene utilizzato anche per il posizionamento del paziente).

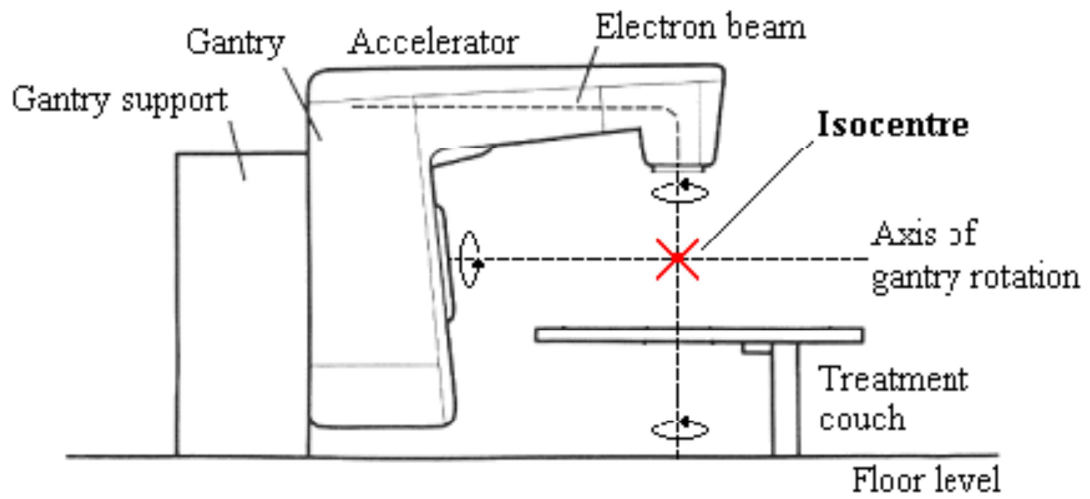


Fig. 3.16 Definizione dell'isocentro [13]

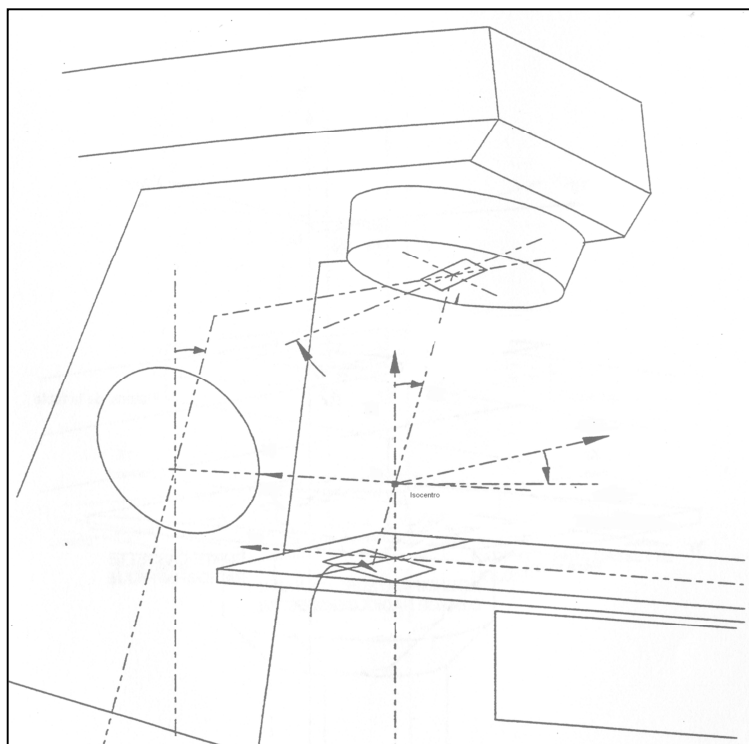


Fig. 3.17 Definizione dell'isocentro [13]

Per effettuare il trattamento di radiazione è stato utilizzato un acceleratore lineare ElektaSynergy caratterizzato da una valvola termoionica ad alta potenza magnetron, un *target* per la generazione di fotoni in lega composta da rame e tungsteno e un lettino per il paziente HexaPod evo (Fig. 3.18).

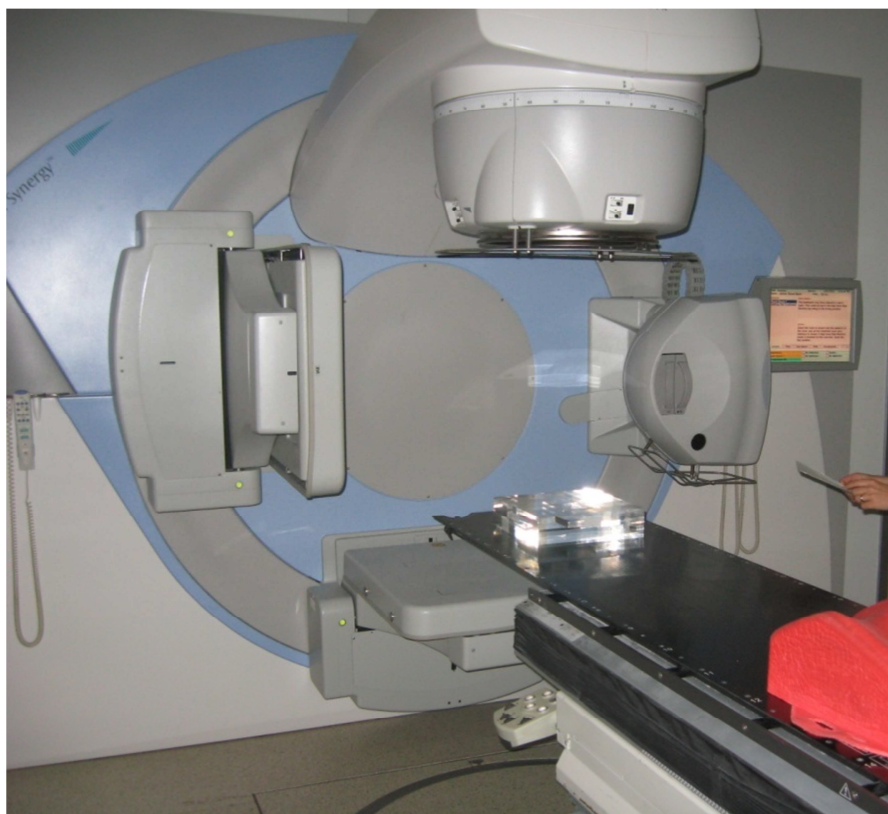


Fig. 3.18 Acceleratore lineare ElektaSynergy

Capitolo 4 Protocolli di acquisizione e archiviazione dati

La definizione di un protocollo risulta di fondamentale importanza per la delineazione di uno *standard* operativo ripetibile ed effettuabile da più operatori. In questo capitolo vengono definiti il protocollo di acquisizione e archiviazione di immagini microscopiche di agglomerati cellulari. Il primo prende in esame le metodiche seguite per l'acquisizione dell'immagini, con particolare attenzione agli aspetti critici di tale operazione, mentre il secondo concerne la metodica seguita nella archiviazione di tali immagini, seguendo una logica di classificazione del materiale e la creazione di una mappa di navigazione dello stesso. In particolare, la formulazione di tali protocolli risulta importante perché permetterà di espandere con futuri esperimenti il *database* contenente le immagini di agglomerati cellulari trattati con procedure radioterapiche, in modo da avere informazioni relative ai cambiamenti morfologici degli sferoidi durante i diversi frazionamenti programmati.

4.1 Protocollo di acquisizione

Al fine di analizzare e studiare gli aggregati multicellulari è importante stabilire un ferreo protocollo di acquisizione dati, tipicamente immagini, in modo da tener traccia e seguire lo sviluppo delle cellule che compongono lo sferoide. In questo lavoro si è scelto di analizzare in dettaglio la morfologia degli sferoidi, per cui sono state acquisite al microscopio immagini ad intervalli di tempo prestabiliti. Tipicamente gli sferoidi sono coltivati in piastre multi-pozzetto, in modo da poter separare i singoli sferoidi, e sono mantenuti in incubatore per non alterare lo sviluppo cellulare. Onde evitarne la contaminazione, risulta importante maneggiare le piastre seguendo qualche accortezza, quali l'utilizzo di guanti, e un trasporto attento da una zona di lavoro all'altra. Le piastre hanno un coperchio che non consente una chiusura completa tramite sistemi di ancoraggio, ma è solo appoggiato e quindi il rischio di contaminazioni è maggiore rispetto all'utilizzo delle fiasche (dove però non sarebbe possibile tener separati i vari sferoidi) in cui è presente una chiusura ermetica. Si dovrà quindi prestare particolare attenzione a non far oscillare troppo il terreno di coltura all'interno dei pozzetti durante il trasporto, in modo da evitare la sua fuoriuscita dagli stessi.

In pratica, la piastra contenente gli sferoidi viene prelevata manualmente dall'incubatore e viene posizionata direttamente sul tavolino del microscopio o sul portaoggetti dello stesso nel caso si dispongadi un portaoggetti adatto per l'utilizzo delle piastre (Fig. 4.1). Purtroppo, in assenza di un adatto portaoggetti vari modelli di microscopio (tra i quali quello da me utilizzato) non permettono una regolazione laterale e longitudinale della posizione della piastra, ma solo di quella verticale. Ciò rende complicato riuscire a centrare lo sferoide all'interno del *field of view* mediante regolazione manuale da parte dell'operatore direttamente sulla piastra.

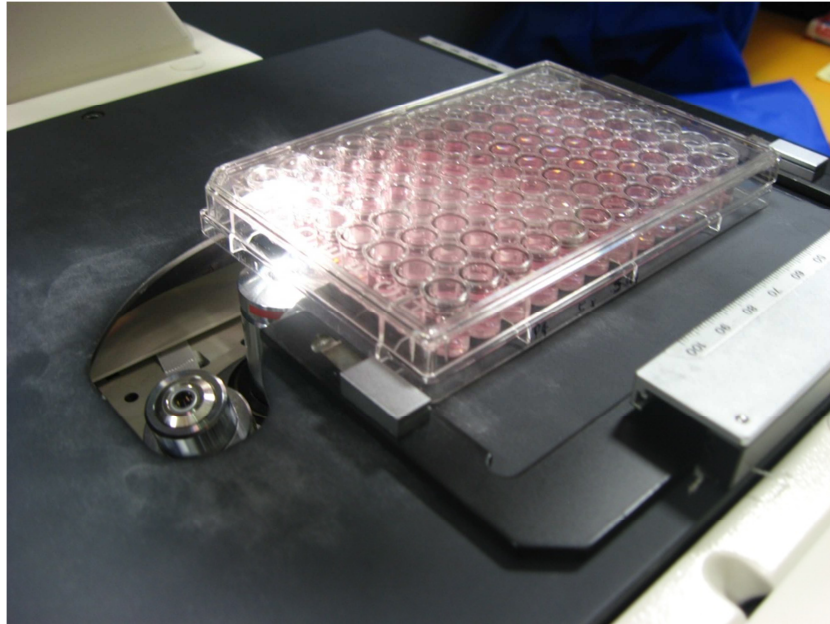


Fig. 4.1 Fotografia di una piastra 96well posta sul tavolino del microscopio

Per l'acquisizioni delle immagini è stato stabilito un ferreo protocollo in modo da standardizzare le operazioni eseguite, così da rendere riproducibili le stesse condizioni e impostazioni di cattura delle immagini anche nelle acquisizioni successive. Per prima cosa partiamo dal chiarire che per tutte le immagini acquisite è stato utilizzato un microscopio invertito Zeiss Axiovert200, con obiettivo 5x/0,13, in modalità campo chiaro (anello condensatore ph0) e non abbiamo posto nessun filtro. Si procede quindi ad osservare mediante oculare se nel pozzetto in esame lo sferoide contenuto è collocato sul bordo o al centro del pozzetto. Se collocato al centro dell'immagine lo sfondo del campo di vista risulterà avere caratteristiche omogenee (Fig. 4.4). Nel caso contrario avremo delle variazioni di luminosità dello sfondo, chiamate appunto effetti di bordo (Fig. 4.3 e Fig. 4.2).

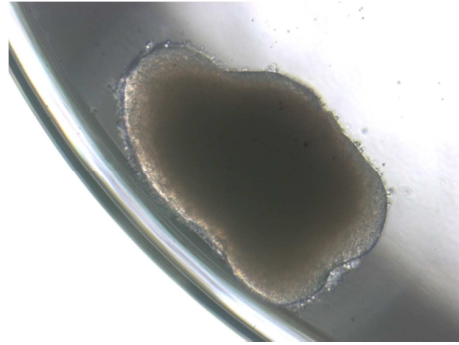


Fig. 4.2 Fotografia di uno sferoide giacente sul bordo

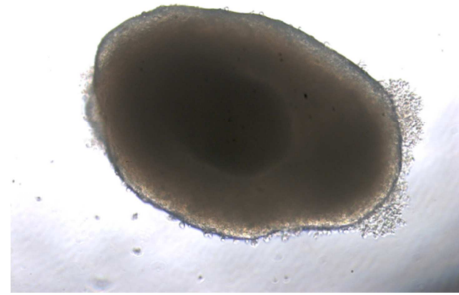


Fig. 4.3 Fotografia di uno sferoide giacente in prossimità del bordo

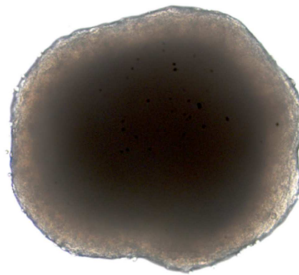


Fig. 4.4 Fotografia di uno sferoide giacente lontano dal bordo

Per ovviare a questo problema, qual'ora lo sferoide fosse a contatto con il margine del pozzetto o ne fosse troppo vicino da causare uno sfondo dalle caratteristiche non omogenee, si procede a sollevare manualmente la piastra e inclinarla leggermente nella direzione in cui vogliamo portare lo sferoide. Dato che lo sferoide non è aderente alla plastica ma semplicemente adagiato sul fondo in un punto di equilibrio per via della legge della gravità, esso si sposterà velocemente nella direzione desiderata. Una volta terminata questa operazione è necessario far completamente assestare lo sferoide non toccando la piastra, ponendola ad esempio sopra il tavolino del microscopio per almeno un minuto. Sperimentalmente abbiamo verificato che questo è un tempo sufficiente per evitare che lo sferoide sia ancora in leggero movimento. Bisogna mostrare accortezza nell'evitare di inclinare eccessivamente la piastra provocando una fuoriuscita di terreno di cultura o di materiale biologico durante questa fase. Dopo aver posizionato la piastra in modo da avere lo sferoide completamente all'interno del *field of view*, e per quanto possibile al centro di esso, vengono impostati i parametri relativi alla telecamera in modo che tutte le immagini siano acquisite nelle stesse condizioni e siano confrontabili. Per fare ciò è stato stabilito un *modus operandi* composto da 4 fasi fondamentali di lavoro. Si imposta una gamma costante a 0.45 nel software di acquisizione immagini per rendere il valore di tale parametro lineare. Si regola l'intensità della sorgente luminosa del microscopio mediante controllo manuale posto sullo stesso (Fig. 4.5).



Fig. 4.5 Fotografia del comando manuale per la regolazione dell'intensità luminosa nel microscopio Zeiss Axiovert200

Si setta il *best fit* mediante il *software* adibito all'acquisizione delle immagini e si osservano i valori di luminosità e contrasto rilevati. Confrontando tali dati con i parametri *standard* che si è deciso di usare per l'acquisizione di tutti gli sferoidi (Fig. 4.6), si effettuano le opportune modifiche di correzione sull'intensità luminosa del microscopio. Si ripetono quindi il secondo e il terzo punto fino a che si visualizzano i valori di luminosità e contrasto coincidenti con quelli scelti come parametri standard.

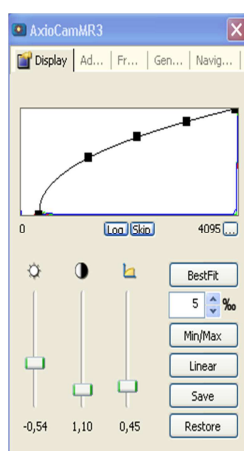


Fig. 4.6 Immagine relativa alla visualizzazione dei parametri *standard*.

Si diseleziona il *best fit* onde evitare variazione dei valori settati, durante l'acquisizione. Dopo aver impostato i parametri *software* e *hardware* si procede nel regolare la distanza focale spostando in *z* l'*holder* in modo da ottenere una singola immagine dello sferoide con il minor numero di regioni fuori fuoco. Se le dimensioni dello sferoide non permettono di riuscire ad acquisire una singola immagine completamente a fuoco, si individua la posizione *z* dell'*holder* e si inizia ad acquisire manualmente immagini ad un passo di campionamento costante fino a che l'intero sferoide risulterà di nuovo interamente fuori fuoco. Questo permetterà di riuscire ad ottenere *offline* una singola immagine composta finale completamente a fuoco, sfruttando i vari algoritmi di ricostruzione da *depth of focus* proposti in letteratura. In particolare nel mio caso le immagini di inizio e fine acquisizione mi sono state sempre confermate da biologi esperti microscopisti, in modo da avere una sicurezza sul riuscire a capire quando una regione si ritiene o meno a fuoco, soprattutto nelle

regioni di incertezza in cui l'immagine non essendo nitida e ben definita, come nel caso della calotta dello sferoide, è di difficile determinazione. In particolare per acquisire le immagini degli sferoidi a diversi piani focali sono state utilizzate delle accortezze di fondamentale importanza:

- si aspettano almeno un paio di minuti da quando si posiziona la piastra a quando si catturano le immagini, questo perché rimangono dei flussi all'interno del liquido del terreno di coltura che può fare spostare lo sferoide o farlo andare addirittura fuori dal campo di vista.
- si evitano contatti con il banco su cui è posizionato il microscopio per evitare lievi ma rilevanti variazioni dell'immagine visualizzata.
- si lasciano trascorre qualche paio di secondi fra una cattura dell'immagine e l'altra onde evitare che il *software* si blocchi.

Il tempo stimato per il prelevamento della piastra dall'incubatore, il suo posizionamento sul microscopio, la regolazione dei parametri del microscopio e del *software* e l'acquisizione di circa 70 immagini a diversi piani focali è di circa 10 minuti.

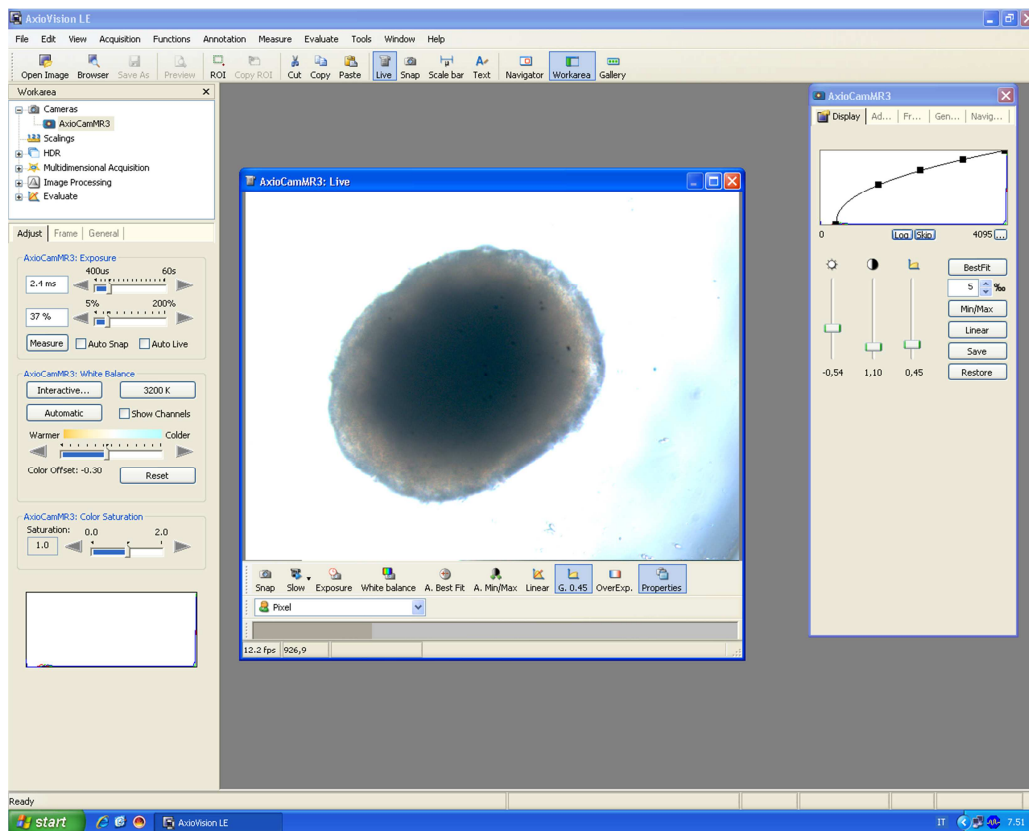


Fig. 4.7 Immagine relativa al *software* AxioVision utilizzato per l'acquisizione delle immagini

Nello svolgere il processo di acquisizione sono emerse alcune problematiche:

- Impossibilità di acquisire sferoidi di dimensioni maggiori al *field of view*.
- Difficoltà nel maneggiare simultaneamente microscopio e programma *software* per le acquisizioni dovuto alla distanza di circa 2 metri che interpone il computer collegato alla camera del microscopio dal microscopio stesso.
- Il *software* non permette l'acquisizione di video, utili ad esempio per acquisire velocemente diversi piani focali dello sferoide stesso. Si è ovviato a questo problema acquisendo mediante singole immagini per piani focali, l'intero sferoide, implicando però un dispendio di tempo notevole.
- Scarse prestazioni del *computer* associato alla camera, che rende i procedimenti di acquisizione, salvataggio e trasferimento immagini molto lenti.
- Impossibilità di utilizzare il microscopio presente nel laboratorio solo per l'esperimento di radiobiologia citato. Ciò fa sì che le caratteristiche di acquisizioni in date differenti anche se potranno essere simili non potranno essere mai completamente uguali.
- L'orario in cui l'esecuzione dell'esperimento può essere effettuato, tipicamente dalle 17:30 alle 22:00.

4.2 Protocollo di archiviazione dati

Un'archiviazione meticolosa e ordinata dei dati acquisiti risulta di fondamentale importanza per la loro conservazione e fruibilità. Nello svolgere questa operazione si tiene presente che un'archiviazione ottimale è facilmente comprensibile e usufruibile qualunque sia l'utilizzatore di tali dati. Risulta perciò necessaria una classificazione in funzione delle caratteristiche peculiari di tali dati. Nel caso in esame i fattori che caratterizzano i dati sono: l'identificativo del pozzetto, l'intensità di irraggiamento, il numero di trattamenti di irraggiamento e la data di acquisizione. L'intensità di radiazione assorbita viene misurata tipicamente in *gray* (simbolo Gy). Un'esposizione di un *gray* corrisponde ad una radiazione che deposita un joule per chilogrammo di materia. Seguendo i fattori di caratterizzazione sopra citati sono state effettuate delle cartelle di raccolta dati organizzate nell'ordine dal numero di trattamenti di irraggiamento (che variano da 0 a 5), dall'intensità di irraggiamento misurata in decigray, simbolo dGy, (0dGy, 50dGy, 65dGy e 75dGy), dalla data di acquisizione e dall'identificativo del pozzetto. Effettuando questa catalogazione delle cartelle, mantengo una raccolta delle immagini ordinata e di facile comprensione.

Le cartelle contenenti le immagini degli sferoidi a diversi piani focali hanno una nomenclatura che permette di riportare tutte le informazioni fondamentali di tali acquisizioni. Il primo simbolo rappresenta con una lettera la coordinata sull'asse verticale del pozzetto rispetto alla piastra. Il secondo rappresenta con un numero la coordinata sull'asse orizzontale del pozzetto rispetto alla piastra. I successivi due simboli, separati dai primi due da un *underscore*, rappresentano l'intensità di radiazione, espresso in dGy, a cui lo sferoide acquisito è stato sottoposto. Separato da *underscore* dai simboli precedentemente citati, è presente un valore rappresentativo del numero di trattamenti subiti dallo sferoide. Infine, separati da un ulteriore *underscore* dai simboli precedenti, vi sono gli ultimi otto valori rappresentativi della data di acquisizione dello sferoide. Di questi otto valori i primi quattro numeri sono un identificativo dell'anno, i successivi due sono l'identificativo del mese e gli ultimi due sono l'identificativo del giorno. A titolo rappresentativo si riporta di seguito un esempio di nomenclatura di una cartella: C1_75_5_20120216. Le acquisizioni presenti in questa cartella sono relative quindi allo sferoide situato nel pozzetto della terza riga e prima colonna della piastra che ha subito cinque trattamenti di radiazione a un'intensità di 75dGy. Queste immagini sono state acquisite il 16 febbraio 2012.

In ogni cartella è stato posto un documento di note atto a raccogliere tutte le informazioni aggiuntive sull'acquisizione di tale sferoide (Fig. 4.8). Il documento

riporta informazioni sui parametri di luminosità, contrasto, gamma, *exposure*, obiettivo, filtro, condensatore utilizzato e passo di campionamento.

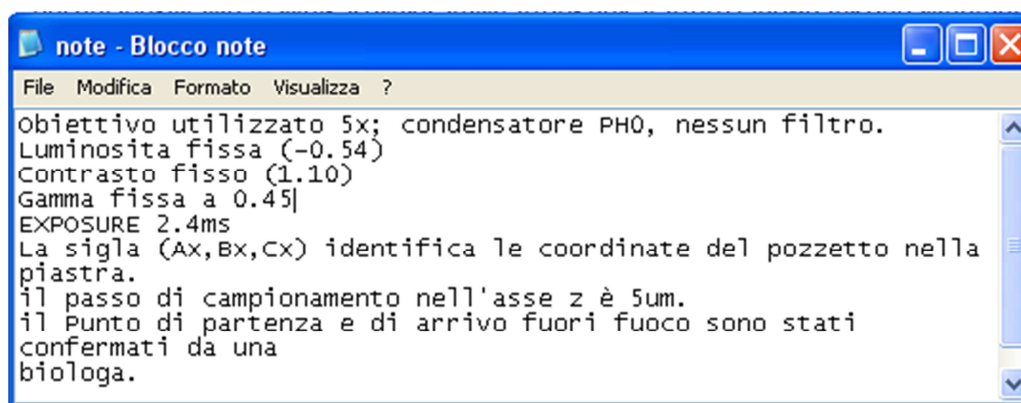


Fig. 4.8 Immagine del documento di note

Per la navigazione immediata dell'intero materiale risulta fondamentale creare un foglio di lavoro che visualizzi globalmente tutte le cartelle in modo ben definito. In questo foglio di lavoro sono impostati sulle righe il numero di trattamenti e l'intensità delle radiazioni mentre sulle colonne sono riportate le date delle acquisizioni. Le coordinate dei pozzetti sono state poste nelle caselle opportune che ne identificano così tutti i parametri (Fig. 4.9).

N°di trattamenti	Intensità radiazione							
		23/01/2012	24/01/2012	25/01/2012	26/01/2012	27/01/2012	02/02/2012	16/02/2012
0	0	B1					B1	B1
0	0	C1					C1	C1
4	5		B1				B1	B1
4	5		C1				C1	
3	5			A9			A9	A9
3	5			B9			B9	B9
3	5			C9				
2	5				B1		B1	B1
2	5				C1		C1	C1
1	5					B8	B8	
1	5					C8	C8	
5	6,5	A1					A1	
5	6,5	C1					C1	
4	6,5		A1				A1	A1
4	6,5		B1				B1	B1
4	6,5		C1				C1	C1
3	6,5			B8			B8	B8
3	6,5			C8			C8	C8
2	6,5				B1			B1
1	6,5					B8	B8	
1	6,5					C8	C8	
5	7,5	A1					A1	
5	7,5	C1					C1	
4	7,5		A1				A1	A1
4	7,5		B1				B1	B1
4	7,5		C1				C1	C1
3	7,5			A8			A8	A8
3	7,5			B8			B8	B8
3	7,5			C8			C8	C8
2	7,5				B1		B1	B1
2	7,5				C1		C1	C1
1	7,5					A8		
1	7,5					B8		
1	7,5					C8	C8	

Fig. 4.9 Immagine relativa allo schema di navigazione delle cartelle

Avendo inserito dei collegamenti ipertestuali, cliccando sulle coordinate del pozzetto desiderato si aprirà immediatamente la cartella corrispettiva.

Capitolo 5 Descrizione dell'esperimento

Dall'incontro di due distinti settori di ricerca, quali la radiologia e la biologia, è nato un progetto che unisce le conoscenze degli specialisti operanti in entrambi i settori per ottenere risultati di ricerca di interesse comune. Tale sinergia ha permesso la realizzazione di un nuovo ambiente operativo all'interno dell'IRST, il Laboratorio di Radiobiologi. Il primo esperimento ufficiale di quest'ultimo viene appunto trattato in parte in questo elaborato, che rappresenta la prima tesi del laboratorio. Le motivazioni che spingono l'attuazione di tale esperimento sono quelle di associare informazioni densitomorfofometriche a determinati esiti dei trattamenti su pazienti refertati con dati clinico-biologici. In particolare, si dispone di una raccolta dati con gli storici dei pazienti trattati, con informazioni riguardanti la modalità di trattamento (numero e intensità di irradiazioni), la risposta dell'organismo a quest'ultimo, il decorso della malattia, indicazioni della qualità della vita del paziente e data e causa di un eventuale decesso. Vengono quindi effettuati dei trattamenti del tutto simili a quelli eseguiti sui pazienti, su sferoidi di cellule CAEP denominate broncosfere, scelte per la loro caratteristica di essere riproducibili *in-vitro* e di riuscire ad assumere una struttura tridimensionale assimilabile alla struttura dei tessuti reali. In questo esperimento sono stati eseguiti dei trattamenti di ipofrazionamento, caratterizzati da pochi trattamenti di irradiazione ad alta intensità. Sono state irradiate 15 piastre con differenti intensità di dose (5Gy, 6,5Gy, 7,5Gy) e numero di trattamenti (da 1 a 5). Per osservare cosa può determinare o meno varie risposte a livello cellulare vengono effettuati differenti test di post trattamento quali:

- Test sulla fosfatasi acida, o APH (*Acid Phosphatase Assay*) che è un test enzimatico che permette di valutare la vitalità delle cellule [18].
- Test clonogenico, che permette di osservare eventuali variazioni sulle caratteristiche di ripopolamento cellulare. Un'adeguata diminuzione o cessazione della capacità di ripopolamento indica la perdita da parte delle cellule tumorali di riprodursi, in caso contrario indica la possibile ricaduta della malattia nel paziente sottoposto al radiotrattamento.

- Studio morfologico delle cellule.

Il fine ultimo è quello di capire quindi i meccanismi biologici che stanno alla base di determinati risultati clinici e formulare un protocollo operativo ottimale possibile da applicare successivamente ai pazienti in cura.

5.1 Quantità caratteristiche di un fascio di fotoni

Risultano di fondamentale importanza la definizione delle quantità caratteristiche più importanti di un fascio di fotoni prodotto da un acceleratore lineare per comprendere le successive scelte operative effettuate nello svolgimento dell'esperimento [2]:

- La dose assorbita D è una grandezza fisica definita come la quantità di energia E per unità di massa m assorbita da un mezzo a seguito di esposizione a radiazioni:

$$D = \frac{E}{m}$$

La dose assorbita, misurata in *gray* [Gy], è una grandezza estensiva che non è direttamente legata al danno biologico causato ad un organismo o ad un tessuto organico. Infatti, una stessa quantità di energia assorbita da un organismo produce danni biologici differenti a seconda del tipo di radiazione a cui è stato esposto.

- L'intensità di dose assorbita è una grandezza definita come la dose ricevuta nell'unità di tempo ed è misurata in Gy/s.
- La Dose Percentuale in Profondità, PDD, è il rapporto tra la dose assorbita alla profondità d e la dose massima assorbita relativa alla profondità d_0 :

$$PDD = 100 \times \frac{Dd}{Dd_0}$$

La trasmissione della dose, oltre il punto della dose massima, aumenta con l'energia del fascio: più alta è l'energia del fascio, maggiore è il potere di penetrazione e maggiore è la dose rilasciata in profondità. La curva di dose presenta una crescita iniziale fino al raggiungimento di un massimo la cui posizione varia con l'energia del fascio. La regione tra la superficie e il punto della dose massima è detta regione di *build-up* della dose. Oltre tale regione si raggiunge l'equilibrio elettronico e la curva assume un andamento esponenziale decrescente (Fig. 5.1).

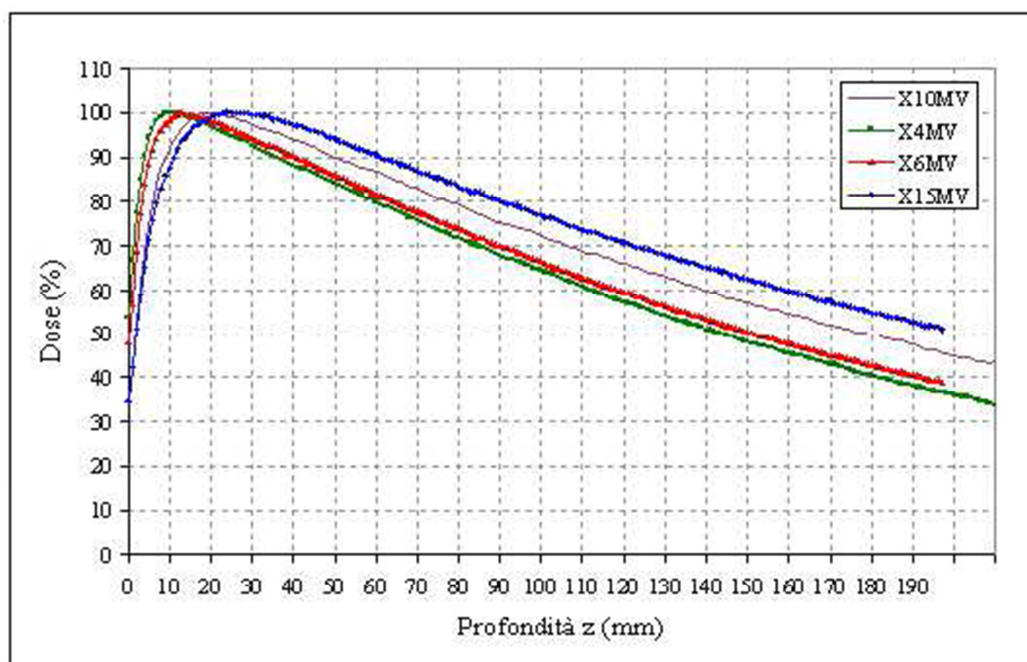


Fig. 5.1 Esempi di dosi percentuali in profondità per fotoni di diverse energie: all'aumentare dell'energia il punto di massima dose, il *build up*, si sposta a profondità maggiori, inoltre, maggiore è l'energia, minore è la dose in superficie (risparmio della cute per le alte energie) [2]

Al fine di rappresentare la variazione della dose in un volume o in un piano, vengono utilizzate le curve di isodose che sono definite come quelle linee che uniscono punti di pari dose. In generale le curve sono rappresentate a intervalli di dose regolari come percentuali di dose rispetto ad un valore di riferimento. Per effettuare il protocollo operativo radiobiologico dell'esperimento che verrà trattato nei capitoli successivi è stato effettuato una simulazione *software* che permettesse di stimare le curve di isodose relative (Fig. 5.2).

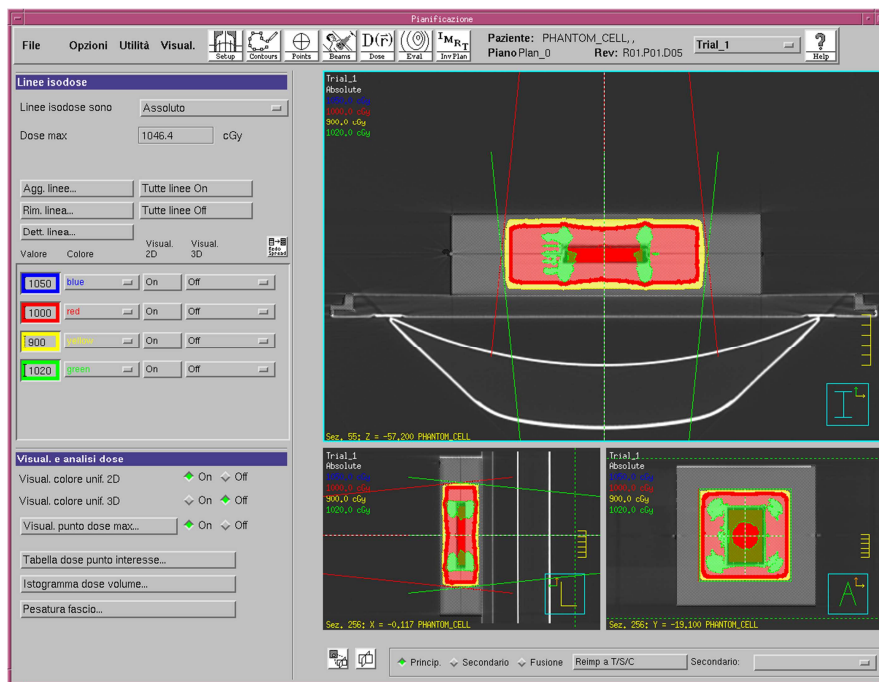


Fig. 5.2 Curve di isodosi relative all'irraggiamento del fantoccio

- L'Unità Monitor, UM, è l'unità con cui si specifica la dose rilasciata. La calibrazione delle Unità Monitor si effettua in modo tale che sia erogato 1 Gy per cento Unità Monitor alla profondità di 10 cm in acqua, con un campo di dimensioni $10 \times 10 \text{ cm}^2$, a distanza dalla sorgente pari a 100 cm.

5.2 Frazionamento della dose

L'esperienza clinica dimostra che il frazionamento della dose totale di radiazione è complessivamente vantaggioso al fine di indurre un effetto differenziale tra tessuti sani e tumorali e quindi un guadagno terapeutico. Il frazionamento aumenta la tolleranza da parte dei tessuti normali (per fenomeni di riparazione e di ripopolamento) e nello stesso tempo consente di eliminare gli effetti radioprotettivi dell'ipossia del tumore. Il frazionamento può essere:

- standard: comprendente 5 frazioni alla settimana di circa 2Gy ciascuna intervallata da 24 ore, per 5-6 settimane.
- a ciclo spezzato: due emicicli di circa 3 settimane ciascuno separati da un intervallo di 2 settimane, dosi singole e frazioni settimanali come nel frazionamento standard. Questo schema mira ad aumentare la tolleranza acuta permettendo alle mucose sensibili di riparare per ripopolamento cellulare le aree disepitelizzate.
- Ipofrazionamento moderato: 2-5 frazioni alla settimana di 2,5-4,3Gy, tempo totale di trattamento ridotto [19].
- Ipofrazionamento superiore al moderato: 2-5 frazioni alla settimana di 4,3-7,5Gy, tempo totale di trattamento ridotto.
- Frazionamento multiplo quotidiano, 2-3 frazioni al giorno intervallate di 4-6 ore l'una dall'altra, per 5 giorni alla settimana, dosi singole e totali diversificate a seconda dello scopo perseguito e può essere:
 - Iperfrazionamento, frazioni singole di 1,15-1,2Gy, dose totale più alta di quella del frazionamento standard, stesso tempo totale. Con questo schema si mira a somministrare una dose fisica maggiore al tumore aumentando conseguentemente l'inattivazione cellulare, senza aumentare il danno tardivo poiché i tessuti responsabili di questo sono sensibili soprattutto all'entità della singola dose.
 - Frazionamento accelerato, frazioni singole di 1,5-1,6Gy, dose totale non diversa da quella del frazionamento standard, tempo totale significativamente più breve. Mira a ridurre il numero di raddoppi cellulari tumorali durante il trattamento, in pratica ad avere meno cellule da inattivare, sì che a pari dose totale sarà più probabile ottenere la cura della lesione. Poiché i tessuti responsabili del danno tardivo non hanno significativi fenomeni proliferativi cellulari in tempi

brevi, e la tolleranza dipende quindi non dal tempo ma dalla dose singola e totale, non si avrà aumento del danno tardivo.

Si cerca quindi di sviluppare delle tecniche avanzate che permettano un'irradiazione più specificatamente indirizzata alla lesione tumorale risparmiando i tessuti sani circostanti [20].

5.3 Definizione del protocollo di irradiazione

I processi di irradiazione sono stati preceduti da una fase di calibrazione della dose che verrà assorbita dai singoli sferoidi. Dopo aver effettuato una TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) al fantoccio con una piastra all'interno, Fig. 5.3, viene calibrato il sistema di radiazione mediante un programma *software* che permette di stimare la dose di radiazione assorbita nelle varie regioni del fantoccio utilizzato per l'alloggiamento della piastra contenente gli sferoidi, in base all'intensità di radiazione emessa.

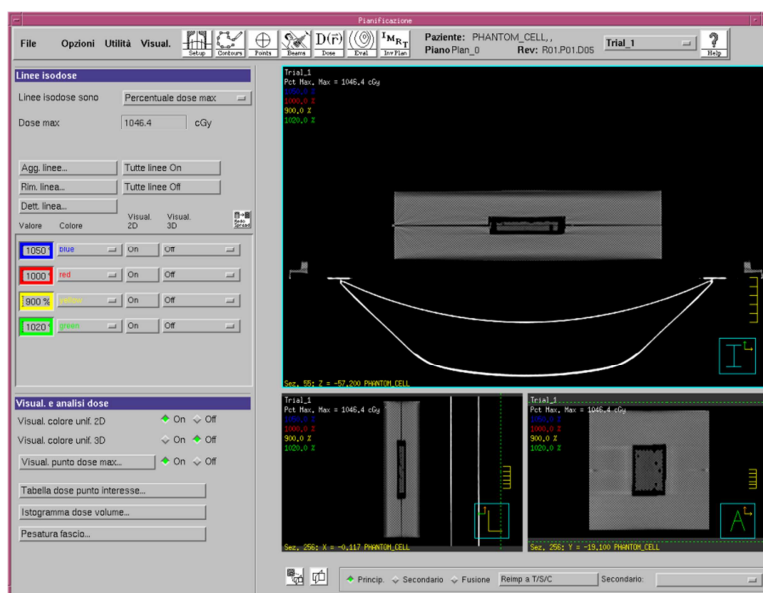


Fig. 5.3 Immagine della TAC effettuata al fantoccio

L'obiettivo è far assorbire a tutti gli sferoidi di ciascuna piastra la dose stabilita di radiazioni. Utilizzando un solo fascio d'irradiazione, ad esempio, non si avrebbe una curva d'irradiazione tale da garantire una buona omogeneità della dose di assorbimento su tutta la piastra (Fig. 5.4 e Fig. 5.5).

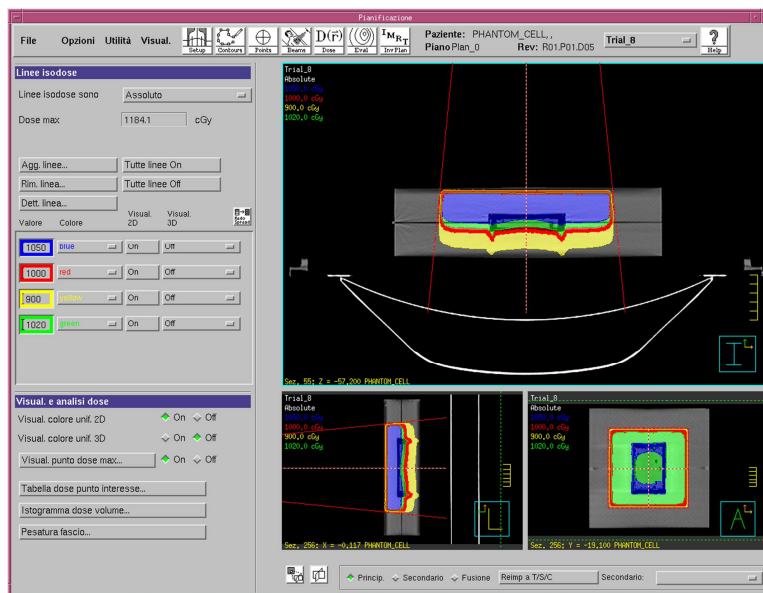


Fig. 5.4 Immagine della simulazione di irradiazione con fascio che colpisce ortogonalmente il coperchio del fantoccio

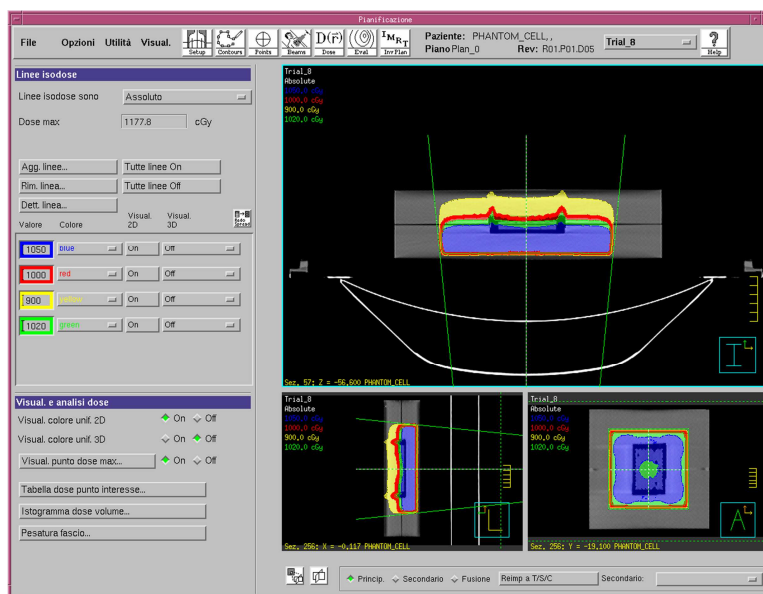


Fig. 5.5 Immagine della simulazione di irradiazione con fascio che colpisce ortogonalmente la base del fantoccio

Il protocollo di irradiazione scelto per l'esperimento prevede una radiazione a 0° e un'altra a pari intensità a 180° (Fig. 5.6).

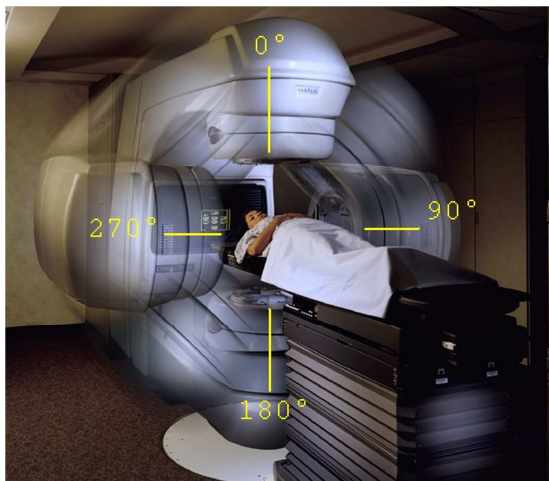


Fig. 5.6 Immagine raffigurante i alcuni gradi di rotazione del *gantry* dell'acceleratore lineare – Tratta da www.varian.com

Ciò permette di avere una dose di assorbimento nella regione occupata dalla piastra con gli sferoidi uniforme all'intensità voluta (Fig. 5.7).

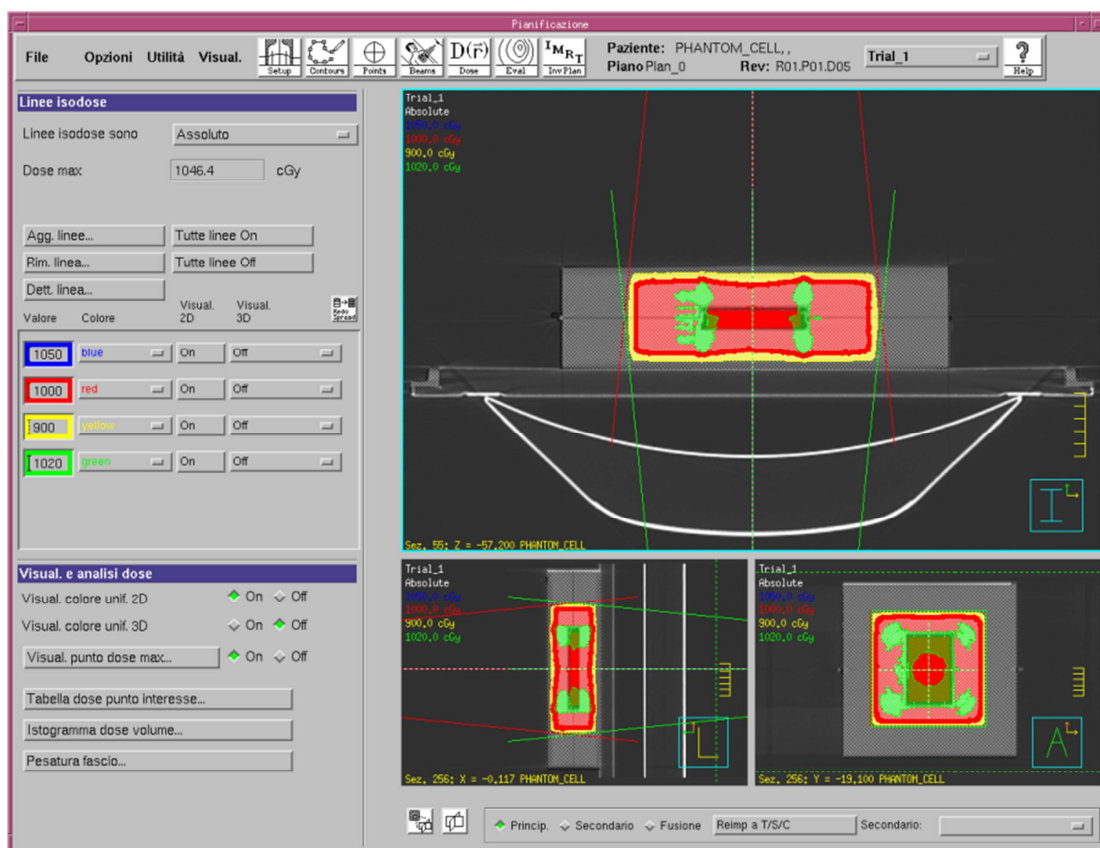


Fig. 5.7 Immagine della simulazione di irradiazione usata per l'esperimento

5.4 Irradiamento delle broncosfere

Note le motivazioni alla base delle scelte per le procedure di irradiazione si descrive di seguito tale processo:

1. Posizionamento del fantoccio nel lettino (Fig. 5.8). Il fantoccio viene posizionato in modo tale da avere l'isocentro dell'acceleratore collocato esattamente al centro di esso. Per fare ciò si dispone il fantoccio cosicché le tracce del laser coincidano con i riferimenti presenti nello stesso e che la distanza fra il coperchio e la sorgente dell'acceleratore lineare sia di 96cm, questo perché l'isocentro è posto sull'asse verticale a 100cm dalla sorgente del LINAC. In questo modo l'isocentro è posto esattamente nella cavità del fantoccio, occupato dalla piastra. Questo procedimento viene effettuato da un esperto operatore radiologico e richiede un paio di minuti.

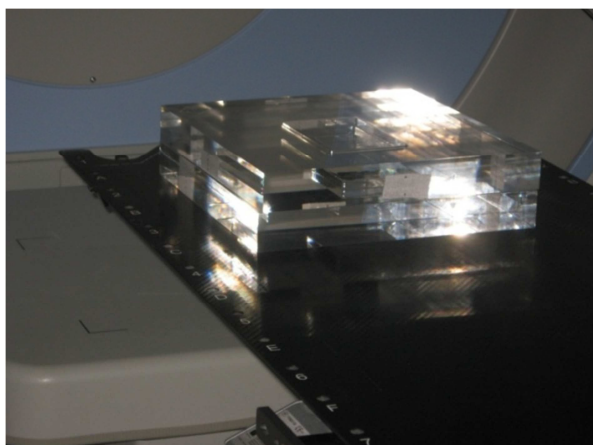


Fig. 5.8 Immagine del fantoccio posizionato sul lettino

2. Un biologo solleva il coperchio del fantoccio (Fig. 5.9).

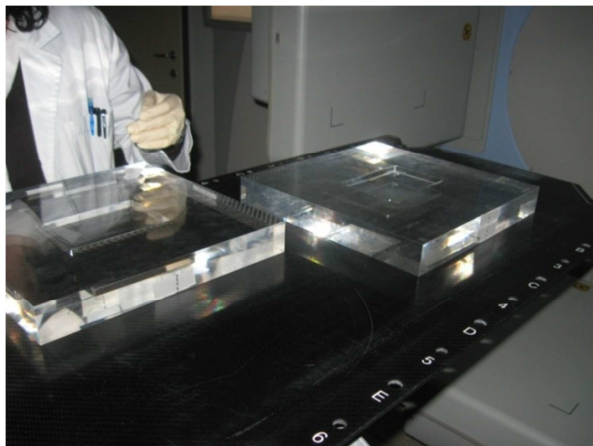


Fig. 5.9 Immagine del processo di introduzione della piastra nel fantoccio

3. Introduce la piastra da irradiare al suo interno (Fig. 5.10).



Fig. 5.10 Immagine del processo di introduzione della piastra nel fantoccio

4. Si riposiziona il coperchio (Fig. 5.11). Se in queste fasi il fantoccio risulta non essere più perfettamente centrato, viene riposizionato da parte del radiologo o un esperto in tale ambito il fantoccio.

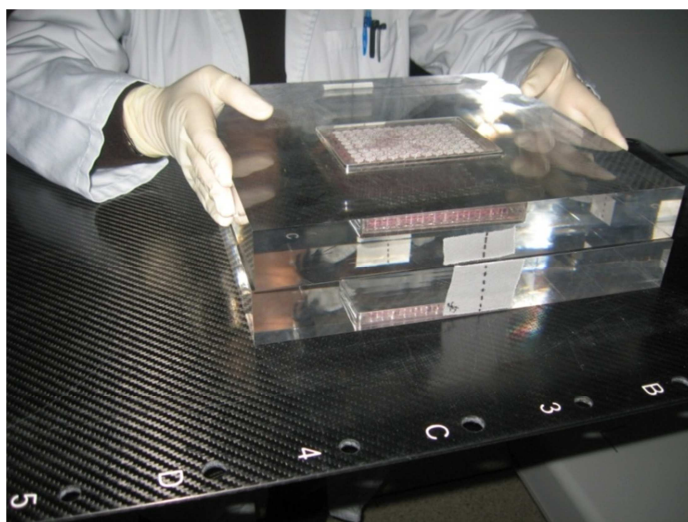


Fig. 5.11 Immagine del processo di introduzione della piastra nel fantoccio

5. Si esce dal *bunker*, camera che ospita il LINAC, si chiude ermeticamente la porta piombata e ci si reca in sala di controllo, una stanza che contiene i comandi operativi dell'acceleratore lineare (Fig. 5.12).



Fig. 5.12 Immagine della porta automatica del *bunker* (a sinistra) e della sala di controllo (a destra)

6. Si settano i parametri stabiliti mediante calibrazione nella definizione del protocollo e si effettua il primo irradiazione a 0 gradi
7. A operazione terminata si sposta la testata a 180 gradi e si effettua la seconda irradiazione.
8. Terminato questo processo l'operatore biologico entra nel camera del LINAC e estrae la piastra irradiata dal fantoccio.

L'operazione si ripete nei punti da 2 a 6 fino a che tutte le piastre stabilite sono state irradiate.

Quando tutte le piastre sono state irradiate vengono reintrodotti nell'incubatore.

Il primo giorno dell'esperimento vengono trattate le 3 piastre che subiranno complessivamente 5 trattamenti. Il secondo giorno vengono trattate sia quelle che subiranno complessivamente sia 5 che 4 trattamenti. Si procede con questo metodo operativo fino al quinto giorno di esperimento nel quale verranno irradiate tutte le piastre. Vedi Fig. 5.13, in cui sono riportate nelle ascisse il giorno in cui sono stati effettuati i trattamenti, e sulle ordinate il numero di trattamenti subiti dalle piastre, fino a portare al giorno conclusivo dell'esperimento, il numero di irradiazioni delle piastre voluto.

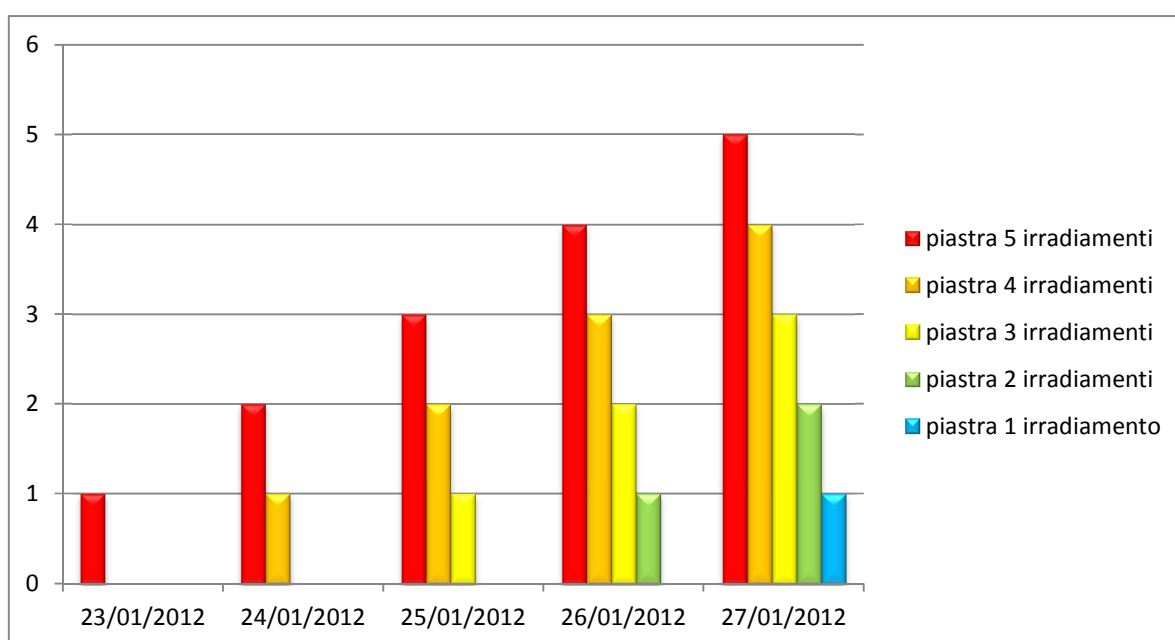


Fig. 5.13 Piano di trattamento

Capitolo 6 Conclusioni e sviluppi futuri

Il lavoro svolto in questa Tesi si inserisce in una consolidata collaborazione tra il Computer Vision Group (CVG), coordinato dal Prof. Bevilacqua ed il Laboratorio di Radiobiologia dell'Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST), coordinato dalla Dott.ssa Anna Tesei e dal Dott. Rolando Polico.

In particolare, sono stato inserito all'interno del gruppo di ricerca che ha condotto il primo esperimento del Laboratorio di Radiobiologia, disegnato per studiare come parametri fondamentali delle cure radioterapiche influenzano lo stato delle cellule trattate. Negli esperimenti che sono stati inclusi in questo lavoro di Tesi sono stato seguito principalmente dalla Dott.ssa Anna Tesei per la parte biologica, dal Dott. Rolando Polico e dalla Dott.ssa Anna Sarnelli per la parte radiologica e dal Prof. Alessandro Bevilacqua e dall'Ing. Filippo Piccini per la parte di analisi di immagini.

L'essere seguito da questi specialisti mi ha permesso di:

- Acquisire conoscenze sui processi di sviluppo e proliferazione cellulare.
- Acquisire conoscenze sulla creazione e gestione delle broncosfere.
- Acquisire nozioni sui principi della radioterapia e sulle principali tipologie di trattamenti radioterapici.
- Utilizzare microscopi e sistemi di acquisizione di immagini.
- Apprendere tecniche avanzate di elaborazione di immagini volte principalmente allo studio morfo-densitometrico di aggregati multicellulari.
- Studiare come le odierne cure radioterapiche agiscono nel contrastare i tumori.

In particolare, grazie alle conoscenze acquisite sono stato in grado di analizzare e descrivere in dettaglio le procedure e il protocollo di esecuzione del primo esperimento del Laboratorio di Radiobiologia dell'IRST. Con questo lavoro di Tesi è stato creato il protocollo di acquisizione e archiviazioni di immagini microscopiche di broncosfere, che potrà essere utilizzato in futuro per standardizzare le procedure

eseguite per studiare il comportamento dei tumori al polmone a seguito di differenti trattamenti radioterapici.

Nella parte sperimentale del lavoro di Tesi, ho personalmente acquisito in tre differenti momenti temporali (prima che gli sferoidi fossero irradiati, pretrattamento, 7 giorni dopo la fase di trattamento radioterapico e 20 giorni post-trattamento) sequenze di immagini a diverse profondità di fuoco, relative a ben 21 sferoidi trattati variando principalmente due parametri: l'intensità di radiazione e il numero di frazioni. Inoltre come controllo sono state acquisite immagini aggiuntive relative a sferoidi non trattati radioterapicamente o trattati in differenti modalità controllate. Complessivamente ho manualmente acquisito circa 6500 immagini di broncosfere a diversi piani focali, riguardanti un totale di 85 sferoidi. Tali immagini sono state poi catalogate utilizzando differenti alberi di ricerca e il *database* creato e rilasciato ai ricercatori dell'IRST è disponibile su richiesta per eventuali future analisi.

Molti sono i lavori prossimi venturi che saranno affrontati grazie al protocollo creato e al *database* realizzato in questo lavoro di Tesi:

- Per prima cosa il *database* verrà espanso con un futuro esperimento, eseguito seguendo il protocollo stabilito, in modo da avere informazioni relative ai cambiamenti morfologici degli sferoidi anche durante i diversi frazionamenti programmati.
- Grazie alle tecniche di elaborazione di immagini che stiamo sviluppando sarà possibile disporre di una ricostruzione tridimensionale della superficie degli sferoidi in tempo reale durante le acquisizioni.
- Dalla correlazione dei dati biologici con i dati morfologici ottenuti sarà possibile studiare come parametri quali intensità di radiazione e numero di frazioni influenzano la cura radioterapica.
- Verranno studiate le varie singole cellule che compongono gli sferoidi per capire se con un determinato data set di parametri le radiazioni sono in grado di necrotizzare il cuore del tumore senza danneggiare le cellule epiteliali esterne.
- Sarà possibile testare una nuova cura sperimentale osservando direttamente su modelli di tumore allo stato solido gli effetti indotti.

In conclusione questo lavoro di Tesi fornisce un importante contributo allo studio e innovazione dei trattamenti radioterapici attualmente utilizzati come cura per contrastare e combattere i tumori al polmone, considerati essere la prima causa di morte nei paesi industrializzati. L'esperienza vissuta durante le attività sperimentali

di laboratorio seguite è stata estremamente formativa e spero di aver la fortuna di essere coinvolto nei futuri studi che verranno svolti partendo dai dati acquisiti in questo lavoro di Tesi.

Bibliografia

[1] Chadwick KH, Leenhouts HP, editors. A Molecular Theory of Radiation Biology. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1981.

[2] Basic Clinical Radiobiology fourth edition. Edited by Micheal Joiner and Albert van der Kogel.

[3] Weibezahn K F, Knedlitschek G, Bier W, Schaller T: Mechanically processed microstructures used to establish an in vitro tissue model. *Micro System Technologies '94, 4th International Conference on Micro Electro, Opto, Mechanical Systems and Components, Berlin.*

[4] Leoni A. Kunz-Schughart, James P. Freyer, Ferdinand Hofstaedter and Reinhard Ebner. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model. *J Biomol Screen* 2004 9: 273.

[5] Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, Guillemain F: Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36:179-192.

[6] Durand RE, Olive PL: Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids. *Methods Cell Biol* 2001;64:211-233.

[7] Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL: Multicellular tumour spheroids in radiation biology. *Int J Radiat Biol* 1999;75:787-799.

[8] Tesei A, Zoli W, Arienti C, Storci G, Granato AM, Pasquinelli G, Valente S, Orrico C, Rosetti M, Vannini I, Dubini A, Dell'Amore D, Amadori D, Bonafè M. Isolation of stem/progenitor cells from normal lung tissue of adult humans. *Cell Prolif.* 2009 Jun;42(3):298-308. Epub 2009 Mar 31.

- [9] A.Gaspari, L.Roncuzzi, L. Ricotti, L. Lenzi, R.Grupponi, A.Sensi, N.Zini, W.Zoli and D.Amadori: Molecular and Biological Features of two New Human Squamous and Adenocarcinoma of the Lung Cell Lines.
Cancer Genet Cytogenet 107:11-20 (1998)
- [10] Hammond TG, and Hammond JM: Optimized Suspension Culture: The Rotating-Wall Vessel.
Am J Physiol Renal Physiol 281: F12-F25, 2001.
- [11] Lappa, M: Fluids, Materials, and Microgravity: Numerical Techniques and Insights into the Physics.
Naples, Italy: Elsevier Science Oxford, 2004.
- [12] Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Johnston ED, Leurencin CT: Quantitative Analysis of Three-Dimensional Fluid Flow in Rotating Bioreactors for Tissue Engineering.
J Biomed Mater Res 69: 205-215, 2004.
- [13] F. M. Khan. The physics of radiation therapy. LIPPINCOTT Williams and Wilkins, Third Edition, 2003.
- [14] Prof. F. Schillirò seconda università degli studi di Napoli: Lezione di Radioterapia
- [15] Prof. Enza Barbieri Alma Mater Studiorum università di Bologna: Radioterapia: campo di applicazione: Lezione di Diagnostica per immagini e radioterapia.
- [16] Dott.ssa Marcella Palombarini. L'Acceleratore Lineare in Medicina: aspetti fisici e tecnologici. Servizio di Fisica Sanitaria, Ospedale Bellaria, Bologna
- [17] R.Bellia, G.ghigi, M.Giannini, S.micheletti, R.polico, A.Romeo, A.D.Angelo, A Ferri, E. Menghi, S.Naccarato, R.Ruggieri, A.Sarnelli. Caratterizzazione fisica e controllo di qualita del sistema Elekta per IGRT.
Corso di aggiornamento ospedali riuniti gruppo interregionale AIFM-AIRO 6 aprile 2009
- [18] Kunz-Schughart, Juergen Friedrich, Wolfgang Eder, Juana Castaneda, Markus Doss, Elisabeth Huber, Reinhard Ebner and Leoni A: A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-D Culture: The Acid Phosphatase Assay.
J Biomol Screen 2007 12: 925

[19] Thomas ZILLI. Moderate Hypofractionation for Localized Prostate Cancer: Toxicity and Outcome.

12th varian oncology summit Berlin 2011.

[20] Cittadini Giorgio. Diagnostica per immagini e radioterapia. V edizione Ecig.

Ringraziamenti

Durante il mio periodo di tesi in azienda oltre a svolgere attività innovative, stimolanti e interessanti sono stato a contatto con diverse persone con le quali si è instaurato un rapporto professionale e umano davvero piacevole. Grazie a loro le mie numerose e curiose domande e richieste hanno avuto risposta, e hanno così contribuito in maniera piena al mio arricchimento scientifico/lavorativo.

In particolare voglio spendere parole di ringraziamento per:

- Il Prof. Alessandro Bevilacqua: persona splendida. Mi ha fatto sempre sentire utile e importante all'interno del suo gruppo. Persona acuta e in grado di riuscire a sorprendermi con ciò che insieme a suoi collaboratori riesce a ideare e realizzare.
- L'ing. Filippo Piccini: doveroso citarlo. Sin dall'inizio si è dimostrato non solo un punto di riferimento nello svolgere le mie attività, ma anche un amico. La sua completa disponibilità nel migliorare il mio operato è stata davvero notevole. Le sue doti intellettuali e la sua enorme passione per la ricerca mi permettono di dire con certezza che la sua carriera lavorativa sarà caratterizzata da numerose soddisfazioni e sarò contento di poter vantare l'aver collaborato con lui.
- La Dott.ssa Anna Tesei: una vera e propria macchina da ricerca. Forte determinazione, grandi conoscenze e ambiziosi progetti la caratterizzano. E' stato davvero un piacere lavorare con lei.
- Il Dott. Rolando Polico e la Dott.ssa Anna Sarnelli: la loro completa disponibilità a rispondere in maniera accurata alle mie numerose domande sugli aspetti radiologici dell'esperimento è stata davvero di importanza fondamentale alla stesura di questo elaborato
- Federica, la mia famiglia e i miei amici che mi hanno supportato e sopportato in questo periodo d'intense attività.