

RADIAZIONI IN BIOMEDICINA

LA RICERCA RADIOBIOLOGICA MEDIANTE STUDI *IN VITRO* E *IN VIVO*: PROBLEMATICHE E IMPLICAZIONI PER IL RADIOTERAPISTA

Renzo Corvò

Oncologia Radioterapica - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova

Negli ultimi decenni il rapido sviluppo di nuove tecnologie in radioterapia ha imposto al clinico l'acquisizione di nuovi processi operativi per la cura dei pazienti affetti da tumori maligni. La ricerca è stata prevalentemente tecnologica e si è affiancata alla ricerca clinica condotta mediante l'esecuzione di studi clinici controllati mirati ad esplorare nuovi frazionamenti della dose o nuove associazioni chemio-radioterapiche. Questo duplice impegno nella tecnologia e nella clinica ha, per molteplici ragioni, limitato lo sviluppo della ricerca radiobiologica applicata e di base. Quando condotta, la ricerca radiobiologica è stata prevalentemente di tipo "traslazionale indiretta" ossia intesa come interpretazione dell'osservazione clinica di risultati o effetti collaterali che sono espressione di complessi fenomeni cellulari e molecolari. In casi selezionati, la ricerca clinica ha però promosso la ricerca radiobiologica che si è espressa mediante studi *in vivo* e *in vitro*; tra i primi ricordiamo: 1) la costruzione in laboratorio di curve di sopravvivenza cellulare "dose-effetto" mediante l'irradiazione di colture cellulari di tessuti sani o tumorali (SF2) o mediante l'irradiazione di sistemi sferoidali multicellulari (modelli 3-D); 2) l'analisi su preparati istologici freschi o paraffinati di parametri di cinetica cellulare (S-phase labeling index, Ki-67, PCNA, Ciclina B1 e D, e altri), di ossigenazione cellulare (pironidazolo index), di radiosensibilità (apoptosi index); tra i secondi (*studi in vivo*) rientrano gli studi di radiosensibilità intrinseca su animale (xenograft umani), di cinetica cellulare (LI, Ts e Tpot mediante infusione *in vivo* di pirimidine alogenate) e di ossigenazione tissutale (pO₂ mediante elettrodi intratumorali). La recente espansione in clinica della PET favorisce lo sviluppo di una ricerca radiobiologica *in vivo* per lo studio della biologia tumorale (metabolismo glucidico e proteico, studio delle aree ad elevata proliferazione o ipossiche) su base individuale. Questo nuovo imaging funzionale integrato con lo studio istologico o molecolare di parametri radiobiologici classici sembra aprire prospettive che superino quei problemi legati alla eterogeneità di valori inter e intratumorali e alle tecniche di standardizzazione dei vari laboratori sperimentali. Studi avanzati di radiobiologia pre-clinica sembrano oggi necessari per il migliore disegno di innovativi protocolli chemio-radioterapici che prevedono, in associazione alla radioterapia, l'impiego di nuove bioterapie come gli inibitori dell'Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R), delle tirosino-chinasi, delle ciclo ossigenasi 2 (Cox-2), delle farnesyl-transferasi. Le stesse industrie farmaceutiche sembrano avere oggi la necessità dell'apporto in laboratorio del "clinical investigator" per meglio capire l'impatto di nuovi farmaci sui tessuti tumorali e sani in presenza di radiazioni ionizzanti. Per il raggiungimento di questi obiettivi (ricerca radiobiologica pre-clinica in oncologia) una potenzialità operativa sembra essere rappresentata dalla costituzione di "Gruppi di Lavoro per la Ricerca in Radiobiologia GRR" a valenza monoistituzionale interdipartimentale o interistituzionale (Università – IRCCSS – Ospedali, INFN, ISS, industrie) che vedano coinvolte professionalità diverse (radioterapisti dedicati alla radiobiologia, anatomo-patologi, biologi, fisici, chirurghi, ematologi, radiodiagnosti, medici nucleari, chimici et al.) uniti per la realizzazione di progetti comuni nel campo della Radiobiologia.

MECCANISMI DI FOTOTOSSICITA' DEI FLUOROCHINOLONI: DANNO SUL DNA CELLULARE E SUA RIPARAZIONE

La Sala G., Maggi A., Di Carlo B., Proietti Pannunzi C. e Sapora O.

Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La fotosensibilizzazione, prodotta dall'interazione tra luce e farmaci di uso comune, è un fenomeno ben noto (1). Infatti molte classi di farmaci, reagendo con i fotoni della luce nel campo dell'UVA e UVB, danno origine a fotoprodotto stabili o più frequentemente a radicali a vita breve, che reagendo con le strutture cellulari ne possono alterare struttura e funzioni. Una classe di farmaci, di particolare importanza per la sua applicazione, è quella dei fluorochinoloni, agenti anti-microbici con uno spettro di azione particolarmente ampio, che possiedono un nucleo cromoforo comune, con uno o due fluori, ma catene laterali differenti, che ne modulano le caratteristiche chimico-fisiche e l'effetto.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati ottenuti studiando i meccanismi di azione di due fluorochinoloni (FQ), la Ofloxacin (OFLX) e la Lomefloxacin (LFLX), su due linee cellulari umane, le HL60 e le K562. Sono stati valutati la fototossicità e due tipi di danno, le singole (ssb) e le doppie (dsb) rotture sul DNA cellulare mediante la tecnica del *Comet Assay*.

Materiali e metodi

Le condizioni di crescita per le HL60 e le K562 ed il loro mantenimento sono stati già descritti (2). La concentrazione di FQ impiegata per tutti gli esperimenti è di 0,050 mM. Le cellule sono state trattate con due protocolli sperimentali per simulare le condizioni durante e dopo il trattamento terapeutico: 1) esposizione acuta (EA), FQ aggiunto immediatamente prima del trattamento con UVA, e 2) esposizione protratta (EP), incubazione per due ore in presenza di FQ, rimozione del farmaco e trattamento radiante. Per l'esposizione agli UVR, 330 ± 5 nm, è stato impiegato un sistema della Photo Physics Ltd dotato di lampada da 2000 W e monocromatore a reticolo. Subito dopo il trattamento le cellule sono centrifugate, lavate e risospese per la misura dei danni indotti sul DNA, che sono stati valutati impiegando la tecnica del *comet assay* in ambiente alcalino (ssb) e in ambiente neutro (dsb) (3). Come parametro è stato impiegato il momento della coda della cometa (TM= tail moment) (4).

Risultati e discussione

Le due linee cellulari posseggono due differenti sensibilità al danno ossidativo prodotto sia da radiazioni ionizzanti che da UVR con lunghezze d'onda maggiori di 300 nm, mentre a lunghezze d'onda minori mostrano sensibilità simili. Le concentrazioni di FQ impiegate sono comparabili a quelle che normalmente si riscontrano nel circolo sanguigno di un paziente sottoposto a terapia. I parametri delle curve di sopravvivenza nelle diverse condizioni sono riportati in tabella I. Ambedue i farmaci mostrano un effetto fototossico pari a circa 2 (D0 solo UVA/ D0 con FQ). Le due sostanze si comportano invece diversamente nel caso di EP. La OFLX anche dopo rimozione ritiene la sua azione fototossica al contrario di quella della LFLX che diminuisce drasticamente. Questi dati indicano che se le due sostanze hanno meccanismi di azione simili esse debbono agire su target cellulari differenti (5).

Tabella I: D₀, espressa in kJoule/m², per cellule HL60 e K562 trattate secondo i protocolli sperimentali riportati in materiali e metodi.

Trattamento	Lomefloxacin	Ofloxacin
HL60 solo UVA	7,10±0,31	7,10±0,31
HL60 in presenza di FQ	4,22±0,24	3,89±0,21
HL60 preincubate con FQ	5,94±0,31	4,41±0,27
K562 solo UVA	11,08±0,77	11,08±0,77
K562 in presenza di FQ	5,42±0,36	6,85±0,29
K562 preincubate con FQ	8,60±0,72	6,53±0,36

Per chiarire questo punto è stato studiato il danno sul DNA e la sua riparazione. E' necessario premettere che ambedue le sostanze interagendo con la luce producono radicali OH, in grado di reagire con tutte le macromolecole cellulari e con tutte le molecole che costituiscono il DNA. In figura 1 sono riportati i risultati relativi alla induzione di ssb. Il trattamento con solo UVA non produce danni al contrario di quanto avviene in presenza di FQ's. La LFLX produce un maggior numero di ssb della OFLX, poichè produce, a parità di dose, una maggiore quantità di radicali OH (5). La rimozione del farmaco nel protocollo EP ha come conseguenza la scomparsa dell'effetto sul DNA, sebbene almeno parte dell'effetto fototossico permanga (tabella I). Questo risultato sembra confermare che almeno parte dell'effetto esercitato da questi farmaci non è dovuto al danno sul DNA ma, come già proposto (5, 6), a quello prodotto sulle membrane cellulari. Le ssb prodotte vengono riparate efficacemente e velocemente dai sistemi di riparazione cellulari, infatti dopo 30 minuti il valore di TM è simile a quello del controllo. Ambedue le cellule reagiscono in maniera simile contro le ssb sul DNA e quindi rimane ancora senza apparente giustificazione la differenza di comportamento tra OFLX e LFLX.

In figura 2 sono riportati i valori di TM relativi al *Comet Assay* in ambiente neutro. Nel caso della OFLX non vi è alcun aumento del valore di TM rispetto ai controlli dopo tre differenti dosi di UVA, mentre in presenza di LFLX vi sono valori più alti anche se non proporzionali alla dose somministrata. E' stata studiata la riparazione di questo tipo di danno dopo esposizione in presenza di LFLX. Si ha un progressivo aumento delle dsb in funzione del tempo di riparazione, dopo 60 minuti circa 6 volte il valore di TM iniziale. Questo risultato indica che vengono prodotti più tipi di danno, come danni alle basi e siti abasici che non risultano inizialmente come ssb, e che la cellula nel tentativo di rimuovere tali danni, introduce enzimaticamente dsb sulla catena del DNA. La LFLX quindi non produce direttamente dsb e si può ipotizzare invece che produca danni complessi e clusterizzati. Infatti per avere una dsb occorre che venga prodotto un danno singolo rispettivamente sulle due catene opposte ed entro una distanza di circa 10 nucleotidi. Se si assume che i danni siano distribuiti in maniera casuale, il loro numero, alle dosi impiegate negli esperimenti riportati, non è statisticamente sufficiente da produrre due danni opposti e vicini. Ciò implica che gli eventi prodotti dagli OH devono essere clusterizzati cioè non uniformemente distribuiti lungo la catena del

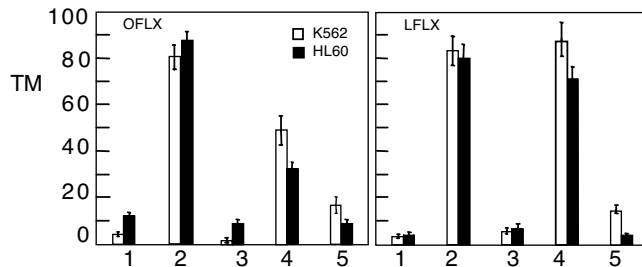


Figura 1: Comet Assay alcalino (ssb): 1- cellule di controllo; 2- cellule irradiate con 4 Gy; 3- cellule trattate al buio con solo FQ; 4- cellule trattate con FQ e UVA, protocollo EA; 5- cellule trattate con FQ e UVA, protocollo EP. Dose UVA 2 kJoule/m² a 330 nm.

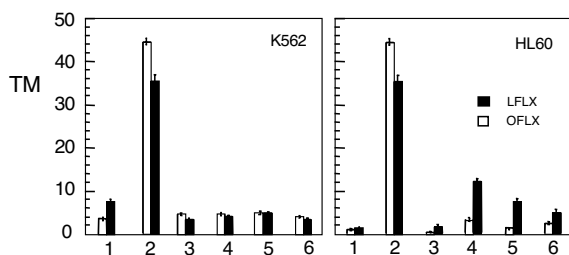


Figura 2: Comet Assay neutro (dsb): 1- cellule di controllo; 2- cellule irradiate con 30 Gy; 3- cellule trattate al buio con solo FQ; 4- cellule esposte in presenza di FQ a 5 kJoule/m² di UVA; 5- cellule esposte in presenza di FQ a 10 kJoule/m² di UVA; 6- cellule esposte in presenza di FQ a 15 kJoule/m² di UVA.

DNA. E' possibile inoltre come proposto (7) che il radicale FQ possa produrre addotti sulla molecola del DNA. Vi sono evidenze sperimentali che i siti più accessibili al danno prodotto sia da agenti fisici che chimici siano le zone più aperte del DNA, come quelle in trascrizione (8).

In conclusione i risultati ottenuti mostrano che: (i) la fotosensibilizzazione si ottiene a dosi terapeutiche, ed è presente anche in cellule trattate con esposizione protratta, (ii) i FQ in combinazione con gli UVA producono radicali OH, (iii) come danno iniziale sul DNA sono prodotte ssb, danni alle basi e siti abasici ma solo quando il FQ è presente al momento del trattamento radiante e le ssb vengono rapidamente riparate, (iv) la LFLX produce due volte più ssb dell'OFLX, (v) il danno prodotto non è distribuito in maniera casuale ma clusterizzato, (vi) le dsb non vengono prodotte come danno iniziale ma sono formate nel tentativo di rimuovere i danni e (vii) l'effetto fotosensibilizzante dipende dalla distribuzione e dalla compartimentalizzazione del farmaco dovuta alle sue caratteristiche chimico-fisiche.

Bibliografia

- 1) Spielmann H., et al. ATLA 22, 314, 1994
- 2) Sapora O., et al. Rapporti ISTISAN 00/18, 65, 2000.
- 3) Sapora O., et al. ISTISAN 02/42, 56, 2002.
- 4) Olive PL.. Methods Mol. Biol. 203, 179, 2002
- 5) Trisciuglio D., et al. Toxicol. In Vitro, 16, 449, 2002.
- 6) Ouedraogo G., et al. Photochem. Photobiol. 70, 123, 1999.
- 7) Sortino s., et al. Photochem. Photobiol., 68, 652, 1998
- 8) Sapora O.. Physica Medica X (1), 43, 1994.

STUDIO DEL COMPLESSO DNA-PK IN LINEE CELLULARI TUMORALI DOPO ESPOSIZIONE ALLE RADIAZIONI IONIZZANTI

Barattini P., Stronati L., Grollino M.G., Gumiero D. e Tirindelli Danesi D.

Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA CR Casaccia, Roma,

e-mail: paola.barattini@casaccia.enea.it

Le rotture della doppia elica del DNA costituiscono le lesioni citotossiche più importanti generate dalle radiazioni ionizzanti e possono portare a morte cellulare o a perdita di materiale genetico se non riparate o portare a sviluppo di neoplasie se riparate non correttamente. Negli Eucarioti superiori le rotture della doppia elica del DNA sono riparate essenzialmente attraverso il meccanismo della ricombinazione non omologa (NHEJ), in cui un ruolo chiave è svolto dal complesso DNA-PK (proteina-chinasi DNA dipendente). La DNA-PK è costituita da una subunità catalitica di 470 kDa (DNA-PKcs) e da un eterodimero di 70 e 80 kDa (Ku70 e Ku80). La proteina Ku è capace di riconoscere le estremità rotte del DNA e di legarsi ad esse senza specificità di sequenza. Inoltre, essa ha la funzione di

richiamare la subunità catalitica sul sito del DNA danneggiato e innescare in tal modo la cascata enzimatica che conduce alla riparazione completa della doppia rottura (Smith e Jackson 1999; Chu 1997). E' stato suggerito che il complesso DNA-PK è candidato importante nel determinare la radiosensibilità intrinseca delle cellule, a causa del suo coinvolgimento nel processo di riparazione del DNA e quindi, questo complesso proteico potrebbe essere usato come marker prognostico e/o predittivo di risposta delle cellule tumorali al trattamento radioterapico (Sakata *et al.* 2001). Predire la sensibilità alle radiazioni delle cellule tumorali sarebbe molto importante per l'ottimizzazione del trattamento radioterapico.

Allo scopo di valutare un potenziale ruolo delle proteine del complesso DNA-PK come fattori prognostici e/o predittivi della risposta di cellule tumorali alla radioterapia, è stato condotto uno studio sulla modulazione dell'espressione ed attività di legame al DNA di Ku e della DNA-PKcs dopo esposizione alle radiazioni ionizzanti.

A tal fine, tre linee cellulari umane stabilizzate sono state esposte ai raggi X nel range di dose da 0 a 14 Gy. In particolare, sono state utilizzate: una linea tumorale di vescica radioresistente (RT112), una linea normale di tessuto uroepiteliale anch'essa caratterizzata come radioresistente (PNT2) e una linea tumorale di colon radiosensibile (SW48). Le analisi dell'espressione proteica e dell'attività di legame al DNA sono state effettuate mediante western blot (WB) ed electrophoretic mobility shift assay (EMSA) su estratti proteici nucleari e citoplasmatici delle linee cellulari dopo 1 e 3 ore di incubazione dall'esposizione.

Dai risultati ottenuti risulta evidente che negli estratti nucleari delle due linee radioresistenti, PNT2 e RT112, 1 ora dopo l'esposizione l'attività di legame al DNA di Ku70/80 aumenta, rispetto ai controlli non irraggiati, in maniera dipendente dalla dose dopo trattamento con i raggi X. Questo indica una maggiore capacità di Ku di legarsi al DNA probabilmente in conseguenza di un numero maggiore di estremità rotte di DNA. Al contrario, gli estratti nucleari della linea SW48 non hanno mostrato differenze nell'attività di legame al DNA dell'eterodimero Ku prima e dopo raggi X (Fig. 1).

Nelle cellule di PNT2 l'aumento dell'attività di legame dell'eterodimero Ku sembra correlare con un più alto livello di espressione di Ku80 nucleare ma non con l'espressione di Ku70 e della DNA-PKcs mentre nelle cellule di RT112 non è stata osservata alcuna correlazione. Questi risultati suggeriscono che nella linea PNT2 l'attività di legame di Ku potrebbe essere regolata dall'espressione di Ku80 e che ci potrebbe essere un maggior richiamo di questa proteina dal citoplasma al nucleo al crescere delle dosi come evidenziato dal fatto che l'espressione di Ku80 diminuisce nel citoplasma alle dosi corrispondenti.

Al contrario in RT112 l'espressione nel nucleo di Ku70 e Ku80 non cambia con i raggi X mentre l'eterodimero Ku è capace di legarsi al DNA anche nel compartimento citoplasmatico di RT112 (Fig. 2).

Possiamo ipotizzare che in questa linea cellulare il citoplasma funzioni come deposito dove l'eterodimero Ku è attivato, pronto per essere richiamato dal nucleo quando venga prodotto un maggior numero di lesioni al genoma. Invece, in PNT2 la proteina sembra essere attivata direttamente nel nucleo. Ciò potrebbe indicare una diversa regolazione del complesso nelle due linee radioresistenti normale e neoplastica. Inoltre, la proteina Ku potrebbe essere attivata attraverso un meccanismo di fosforilazione/defosforilazione nel compartimento citoplasmatico e da qui le molecole fosforilate potrebbero essere trasferite nel nucleo (Frasca *et al.* 1999). Nella linea SW48 invece il livello

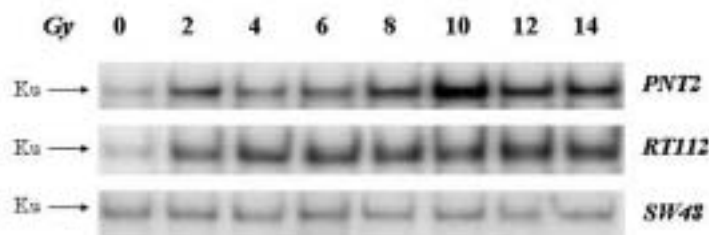


Fig.1 Attività di legame al DNA della proteina Ku70/80 in estratti nucleari delle linee PNT2, RT112 e SW48 dopo 1 ora dal trattamento con raggi X

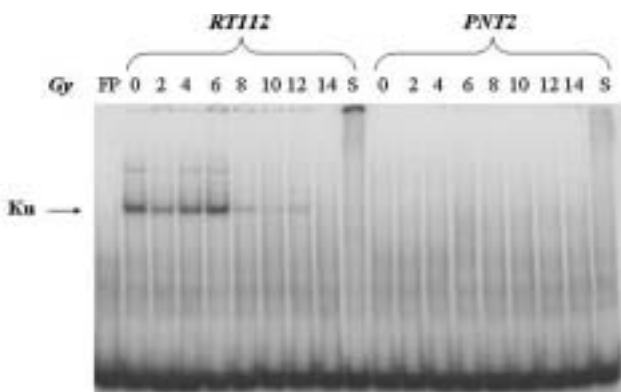


Fig.2 Attività di legame dell'eterodimero Ku70/80 negli estratti citoplasmatici in PNT2 e RT112 dopo 1 ora dall'esposizione ai raggi X. FP=free probe, S=supershift con anticorpo policlonale anti-Ku80.

di espressione di Ku70, Ku80 e DNA-PKcs non cambia dopo trattamento radiante rispetto ai controlli non irraggiati, sia nel nucleo che nel citoplasma.

I risultati ottenuti dagli estratti nucleari di PNT2 e RT112 dopo 3 ore dall'irraggiamento hanno dimostrato che l'attività di legame dell'eterodimero Ku70/80 aumenta in maniera dipendente dalla dose e diminuisce alle dosi più elevate. Questi dati suggeriscono che in queste due linee cellulari potrebbe esistere un meccanismo inibitorio, che si innesca ad un certo tempo dopo l'esposizione ad alte dosi di raggi X. Questo meccanismo regolerebbe l'attività di Ku in cellule altamente danneggiate interferendo con la sua capacità di attivare tutta la cascata di enzimi che intervengono nel processo di riparo del DNA e indirizzando le cellule verso la morte cellulare. Recentemente sono stati identificati degli specifici RNA e delle proteine in grado di interagire con una subunità di Ku70/80 (KUBs) e capaci di ridurre l'attività di legame al DNA della proteina per ingombro sterico, costituendo un segnale apoptotico (Yang *et al.* 2000). Quindi, è ragionevole supporre che queste cellule vadano incontro ad apoptosi e che la più bassa attività di legame della proteina osservata a 3 ore dall'irradiazione potrebbe essere dovuta ad una riduzione delle cellule vitali.

Nella linea SW48 anche a 3 ore dal trattamento con i raggi X non sono state osservate differenze, rispetto ai controlli non irraggiati, né nell'attività di legame al DNA di Ku né nell'espressione dei componenti del complesso. E' dunque presumibile che in SW48, poiché l'attività di Ku non incrementa dopo l'esposizione, il danno al DNA non venga efficientemente riparato.

In conclusione, i dati presentati dimostrano che l'attività di legame di Ku correla con la sensibilità alle radiazioni, che esiste una regolazione negativa della capacità di riparo dell'eterodimero Ku che si instaura ad una certa distanza di tempo dall'esposizione ad alte dosi di raggi X e che l'attività di Ku potrebbe essere regolata dall'espressione di Ku80. Queste osservazioni aprono la possibilità di poter sfruttare il ruolo di Ku come marker prognostico e/o predittivo di risposta delle cellule tumorali alla radioterapia.

Bibliografia

- 1) Chu G (1997). Double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 272: 24097-24100.
- 2) Frasca D et al. (1999). Effect of age on DNA binding of ku protein in irradiated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Exp. Gerontol.* 34: 645-658.
- 3) Sakata K et al. (2001). Expression of genes involved in repair of double-strand breaks in normal and tumor tissues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 49: 161-167.
- 4) Smith GC & Jackson SP (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13: 916-934.
- 5) Yang CR et al. (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 5907-5912.

GENI DI SUSCETTIBILITÀ AI TUMORI CUTANEI E RADIAZIONI: TUMORIGENESI IN TOPI ETEROZIGOTI PER *Ptch1* SU DIVERSI BACKGROUND GENETICI

S. Pazzaglia, M. Mancuso, M. Tanori, P. Merola, S. Rebessi, V. Di Majo, V. Covelli, A. Saran

ENEA CR-Casaccia, Roma

Il carcinoma a cellule basali (BCC) è la forma più comune di cancro nell'uomo, con incidenza in rapido aumento. La rara malattia ereditaria conosciuta come sindrome del carcinoma nevoide a cellule basali (BCNS), o sindrome di Gorlin, è caratterizzata da una serie di problemi clinici, tra cui anomalie di sviluppo ed una predisposizione allo sviluppo di BCC (da decine a centinaia) e di tumori extracutanei, come medulloblastomi (MB) e rhabdomyosarcomi. Mutazioni ereditarie nei pazienti affetti da BCNS e mutazioni somatiche nei BCC sporadici sono state identificate nell'omologo umano del gene *Patched* (*Ptch1*) di *Drosophila*. Topi eterozigoti knockout per il gene *Ptch1*, che rappresentano una copia fenotipica della BCNS, sono caratterizzati da una forte predisposizione alla tumorigenesi spontanea e radioindotta. Recentemente abbiamo descritto l'induzione di BCC (M. Mancuso *et al.*, *Cancer Res.*, in corso di stampa) e di MB (S. Pazzaglia *et al.*, *Oncogene* 21, 7580-84, 2002) in topi eterozigoti per *Ptch1* su background CD1 dopo esposizione alle radiazioni ionizzanti (RI).

Nella popolazione umana, in diverse famiglie portatrici di BCNS, è stato osservato che per una identica mutazione del gene *Ptch1* il fenotipo clinico può essere molto variabile, sia per quanto riguarda le anomalie di sviluppo che per i tratti neoplastici, suggerendo che l'espressione fenotipica è probabilmente modulata da geni addizionali.

Per valutare l'effetto di geni specifici (*tumor modifiers*) appartenenti ad un diverso background genetico, topi eterozigoti per *Ptch1* su un background CD1 (*CD1Ptch1*^{+/-}) sono stati accoppiati con topi altamente suscettibili (Car-

S) o resistenti (Car-R) alla tumorigenesi cutanea, ottenendo ibridi di prima generazione F1S e F1R (Car-S/R x CD1*Ptch1*^{+/-}) che sono stati esposti a raggi X da 250 kV (HVL = 1,5 mm Cu).

Tabella 1. *Schema sperimentale*

Dose	Età	Linea	Genotipo	Numero di topi
0 Gy	-	F1S	<i>wt</i>	59
			<i>Ptch1</i> ^{+/-}	39
		F1R	<i>wt</i>	24
			<i>Ptch1</i> ^{+/-}	25
4 Gy Localizzata	60 giorni	F1S	<i>wt</i>	72
			<i>Ptch1</i> ^{+/-}	65
		F1R	<i>wt</i>	28
			<i>Ptch1</i> ^{+/-}	28
3 Gy Whole-body	4-8 giorni	F1S	<i>wt</i>	46
			<i>Ptch1</i> ^{+/-}	32
		N2	<i>wt</i>	25
			<i>Ptch1</i> ^{+/-}	16

In un primo esperimento topi F1S e F1R di due mesi sono stati trattati irradiando una porzione di cute dorsale di circa 3 cm² con 4 Gy. In un secondo esperimento topi F1S e N2*Ptch1*^{+/-} (Car-S F1S*Ptch1*^{+/-}) sono stati trattati con 3 Gy a corpo intero in età neonatale (Tabella 1). Gli animali sono stati osservati per tutta la vita e sacrificati se con evidenti segni di malattia.

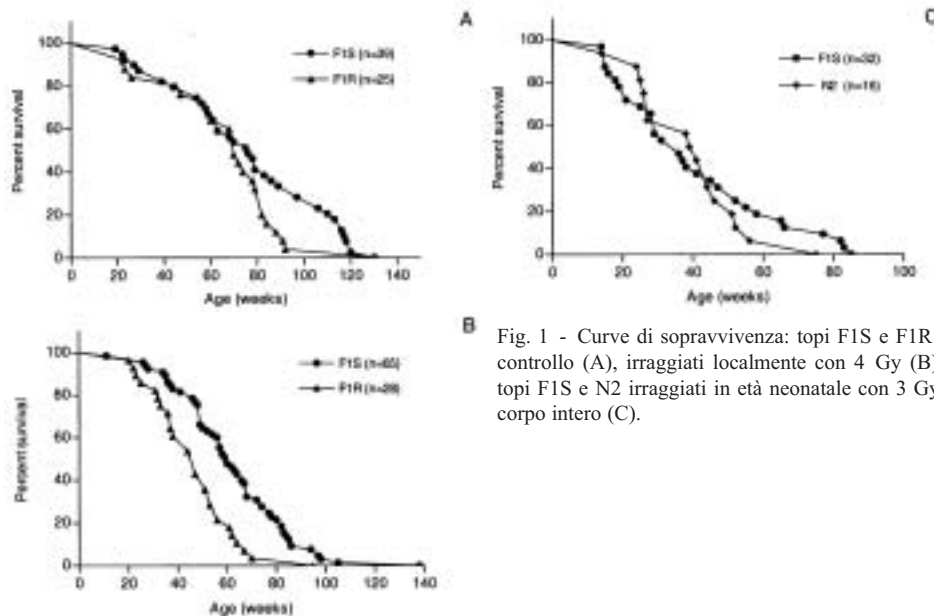


Fig. 1 - Curve di sopravvivenza: topi F1S e F1R di controllo (A), irradiati localmente con 4 Gy (B) e topi F1S e N2 irradiati in età neonatale con 3 Gy a corpo intero (C).

I risultati di questo studio hanno mostrato che, sebbene il background genetico ha un impatto modesto sulla sopravvivenza di topi *Ptch1*^{+/-} (Fig. 1), ha invece effetti evidenti sulla carcinogenesi cutanea. Nella pelle degli animali F1S ed N2 sono stati osservati BCC visibili a occhio nudo (Fig. 2 A, B ed E) e aree di iperproliferazione di cellule basali (Fig. 2 C) e BCC nodulari (Fig. 2 D), osservabili solo dopo esame microscopico.

Le linee murine derivanti dal background Car-S (F1S ed N2) hanno mostrato un'elevata incidenza di BCC nodulari ed infiltrativi (Tabelle 2 e 3, Fig. 2 F), confermando che i geni di suscettibilità alla tumorigenesi cutanea di questa linea esaltano l'effetto dell'aploinsufficienza di *Ptch1* ai fini dell'induzione di BCC da parte delle RI. Al contrario, nei topi F1R non è stata osservata induzione di BCC (Tabella 2), indicando che i geni di resistenza alla tumorigenesi cutanea segregati nella linea murina Car-R modulano negativamente la suscettibilità allo sviluppo di BCC conferita dall'aploinsufficienza di *Ptch1*.

L'effetto degli alleli di suscettibilità derivati dalla linea Car-S è tessuto-specifico; infatti, nonostante la più elevata suscettibilità all'induzione di BCC, le linee eterozigoti per *Ptch1* derivate dagli animali Car-S hanno mostrato una più bassa incidenza di MB paragonati agli animali CD1(dati non mostrati).

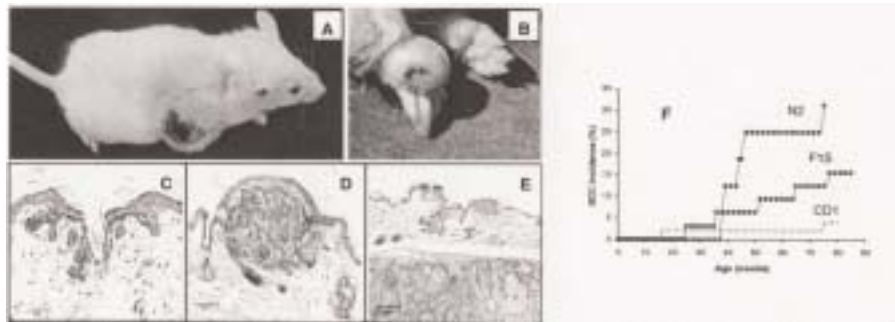


Fig. 2 - Aspetti macroscopici e microscopici di BCC in varie fasi di sviluppo (A-E) e cinetica di sviluppo dei BCC macroscopici in topi CD1, F1S e N2 irraggiati in età neonatale (F).

Tabella 2. Incidenze di lesioni basaloidee e di BCC nodulari e macroscopici in topi F1S e F1R irraggiati localmente a 2 mesi.

Trattamento	Linea	Lesioni basaloidee			BCC macroscopici	
		N. di topi autopsiati	Topi con aree di iperproliferazione (%)	Topi con noduli (%)	N. di topi	Topi con BCC (%)
Controlli	F1S	31	7 (22.6)	3 (9.6)	39	1 (2.6)
	F1R	22	2 (9.1)	-	25	-
4 Gy	F1S	56	20 (35.7)	16 (28.6)	65	11 (16.9)
	F1R	25	2 (8.0)	-	28	-

Tabella 3. Incidenze di lesioni basaloidee e di BCC nodulari e macroscopici in topi CD1, F1S e N2 irraggiati in età neonatale con 3 Gy su tutto il corpo.

Linea	Lesioni basaloidee			BCC macroscopici	
	N. di topi autopsiati	Topi con aree di iperproliferazione (%)	Topi con noduli (%)	N. di topi	Topi con BCC (%)
CD1	46	29 (63.0)	11 (23.9)	52	2 (3.8)
F1S	30	11 (36.7)	13 (43.3)	32	5 (15.6)
N2	15	5 (33.3)	10 (66.7)	16	5 (31.3)

Come osservato nei topi CD1 dove il 100% dei BCC mostra la perdita dell'allele wild type di *Ptch1*, 14 di 15 BCC dei topi F1S mostrano un pattern allelico alterato al locus *Ptch1* (Fig. 3).



Fig. 3 - Stato allelico del locus *Ptch1* nei BCC macroscopici.

Nel complesso i risultati indicano un significativo effetto del background genetico sullo sviluppo del BCC. Una predisposizione genetica allo sviluppo di BCC è stata dimostrata anche nell'uomo, ma i loci genetici associati al fenotipo suscettibile non sono stati individuati. In questo studio descriviamo lo sviluppo di un nuovo modello in cui la combinazione della deficienza di *Ptch1* e di un background genetico suscettibile alla cancerogenesi cutanea facilita la formazione di BCC nodulari ed infiltrativi. Questo sistema modello può essere usato per studiare i geni che influenzano lo sviluppo del BCC, che rappresenta la forma di tumore più comune nell'uomo. (Parzialmente finanziato dal contratto ENEA-UE FIGH-CT99-00006, e dal Progetto Strategico 1998, Legge 449/97-MURST).

IMPORTANZA DEL FATTORE TEMPO NELLA RADIOTERAPIA POST-OPERATORIA. EVIDENZE SPERIMENTALI

Marcello Benassi¹, Anna Cividalli², Giovanni Creton³, Lidia Strigari¹,
Donatella Tirindelli Danesi²

¹Div. Fisica Medica, Istituto Tumori Regina Elena, Roma;

²Sez. di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA C.R. Casaccia, Roma;

³Dip. Radioterapia, Clinica Villa Flaminia, Roma

e-mail: benassi@ifo.it

Introduzione

L'obiettivo di questo studio era di dimostrare sperimentalmente che il fattore tempo/volume è una variante fondamentale nella programmazione di un trattamento associato di chirurgia e radioterapia. A tale scopo abbiamo effettuato due tipi di esperimenti in topi C3D2F1 inoculando cellule di carcinoma mammario murino nel piede o nella coscia.

Gli esperimenti sono stati programmati sulla base di modelli statistici che indicano come per piccoli volumi la crescita tumorale può essere considerata di tipo esponenziale e che la possibilità di cura può essere espressa con una funzione esponenziale del numero medio di cellule clonogeniche rimaste nel tumore dopo la terapia.

La sopravvivenza di una popolazione cellulare è ben rappresentata dal modello Lineare Quadratico [1]

$$S = \text{EXP}[-(\alpha + \beta \frac{D}{N}) \cdot D]$$

dove: α e β sono parametri del modello correlati alla radiosensibilità della popolazione cellulare; D, N sono rispettivamente dose totale e numero delle frazioni.

L'irradiazione di una popolazione cellulare in dose singola ha un'efficacia maggiore di un'irradiazione frazionata (figura 1).

Sperimentalmente il Volume tumorale cresce secondo il noto andamento descritto dalla funzione di Gompertz [2,3]. In figura 2 è rappresentato l'andamento della crescita del volume tumorale dopo 2, 7 e 12 giorni dall'inoculo. Nelle formule V0 indica il volume tumorale iniziale, a e b sono parametri che determinano l'andamento della crescita tumorale.

La probabilità di controllo tumorale [4] è legata al numero di cellule presenti a fine trattamento dalla relazione:

$$TCP = \text{EXP}(-K_0 \cdot S)$$

dove K_0 è il numero di cellule iniziali e S è la sopravvivenza.

Materiali e metodi

1° esperimento: Tumore in piede (206 topi). Radiazioni in dose singola (RT) sono state somministrate in tempi diversi dopo l'inoculo delle cellule tumorali (giorno 1). I topi sono stati randomizzati nei seguenti gruppi: 1° controllo, 2° RT giorno 2 (volume tumorale VT < 50 mmc, 3-40 Gy), 3° RT giorno 7 (VT > 50 mmc, 15-55 Gy), 4° RT giorno 12 (VT > 150 mmc, 40-65 Gy).

2° esperimento: Tumore in coscia (60 topi). I topi sono stati randomizzati in tre gruppi: A controllo, B escissione chirurgica del tumore macroscopico tra 7 e 9 giorni dall'inoculo, C come il precedente + RT 30 Gy a 24 ore dall'escissione. La dose di radiazioni è stata scelta sulla base della TCD50 osservata nel primo esperimento in topi con malattia subclinica.

Risultati

1° Esperimento: La TCD50 è stata (29.7±2.2) Gy nel 2° gruppo, (59.7±2.7) Gy nel 3° e (61.7± 3.1) Gy nel 4° gruppo. Le TCD50 rispettivamente per il gruppo 2 e 3 e per i gruppi 3 e 4 risultano essere significativamente differenti ($p \leq 0.001$).

2° Esperimento: Nel gruppo A (controllo) abbiamo osservato la crescita tumorale in tutti i topi. Nel gruppo B (solo escissione chirurgica) la ricrescita tumorale si è osservata nell'84.6% dei topi, mentre nel gruppo C (sottoposto a chirurgia ed irradiazione) solo nel 33.3% dei casi.

La percentuale di ricrescita osservata nel gruppo C è significativamente differente ($p \leq 0.011$) rispetto al gruppo A e ($p \leq 0.012$) rispetto al gruppo B.

I risultati del presente studio confermano che il numero delle cellule tumorali presenti al momento dell'irradiazione influenza fortemente la probabilità di controllo tumorale.

Il fattore tempo è determinante per il successo della radioterapia postoperatoria e supporta il rationale della IORT come terapia adiuvante dopo chirurgia in presenza di rischio di residuo subclinico, terapia che attualmente è in corso di sperimentazione clinica.

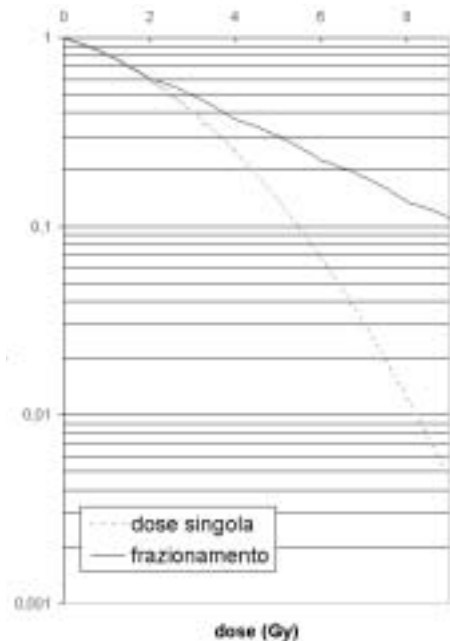


Figura 1: rappresentazione degli andamenti della sopravvivenza cellulare in funzione della dose somministrata in dose singola (linea in grigio) e dose frazionata (linea in nero). Come si può constatare la sopravvivenza a parità di dose è nel caso di somministrazione di dose singola è sempre minore.

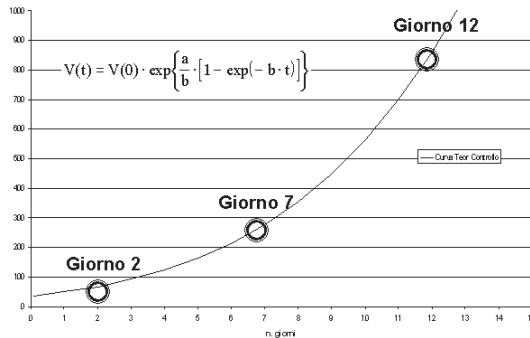


Figura 2: Crescita del volume tumorale.

Bibliografia

- 1) Keller A.M.; Rossi H.H.: The theory of dual radiation action. Curr. Topics Radiation Research 1972, 8:85-158.
- 2) Eisen M: Mathematical models in Cell Biology and Cancer Chemotherapy (Lectures Notes in Biomathematics). Springer 1999.
- 3) Benassi M, Bianciardi L, di Nallo AM, Gentile FP, Panichelli V, Begnozzi L, Radiation Dose and Effect Probability Distributions in Radiotherapy; Physica Medica Vol VIII N.2 93-103, 1992.
- 4) Trefil JS, Scaffner JG and Looney WB. Method of Extrating Information on Tumor Response to Single and Combined Modality Treatment from Growth Curves; Methods in Cancer Research XIV:325-365. Academic press, 1967.

APPLICAZIONE DI MODELLI RADIOBIOLOGICI ALLA RADIOTERAPIA CON FASCI IN INTENSITÀ MODULATA (IMRT)

Paolo Francescon⁽¹⁾, Stefania Cora⁽¹⁾, Michele Avanzo^(1,2), Priyadarshini Rajaguru⁽³⁾
Rosabianca Guglielmi⁽⁴⁾, Gino Panizzoni⁽⁴⁾

- ^{1)U.O. Fisica Sanitaria, Azienda Ospedaliera n.6 "Vicenza", Vicenza,}
- ^{2)Scuola di Specializzazione in Fisica Sanitaria – Milano,}
- ^{3)Cancer Institute (W.I.A), Adyar, Madras, India,}
- ^{4)U.O. di Radioterapia, Azienda Ospedaliera n.6 "Vicenza", Vicenza}

Introduzione

L'introduzione di nuove tecniche radioterapiche rappresenta per il Radioterapista un'intrinseca difficoltà dovuta alla mancanza di dati clinici con cui confrontarsi per poter accertare sia la bontà della tecnica in termini di miglior outcome e sia per poter scegliere in modo adeguato le dosi e il frazionamento della dose totale. In particolare, la tecnica ad intensità modulata (Intensity Modulated Radiation Therapy, IMRT) fornisce una distribuzione di dose altamente conformata alla lesione, permettendo di risparmiare notevolmente i tessuti sani e gli organi a rischio e quindi consentendo una possibile dose-escalation al tumore. Lo scopo del presente lavoro è fornire un modello radiobiologico per la determinazione della probabilità di controllo locale del tumore (Tumor Control Probability, TCP) che, oltre a prevedere l'esito clinico del trattamento radioterapico, permetta di confrontare piani rivali e di scegliere tra diversi schemi di frazionamento.

L'implementazione del modello richiede la scelta di parametri radiobiologici adeguati in base alla letteratura esistente e ai dati clinici finora disponibili.

Una volta implementato il modello, prima di poter utilizzare il TCP come uno strumento decisionale nella scelta della tecnica di trattamento nella pratica clinica, è necessario valutarne la corrispondenza con i risultati clinici.

Materiali e metodi

Lo studio comprende otto pazienti con tumori nella regione del capo-collo (stadiazione T2 – T4), di cui sette carcinomi squamosi ed un osteosarcoma. Un solo paziente aveva effettuato chemioterapia prima del trattamento radioterapico. I pazienti sono stati trattati con radioterapia IMRT con intento radicale, in 24-27 frazioni da 2.5 Gy. L'irradiazione avviene con fasci di fotoni di tensione nominale pari a 6 MV. I fasci, in numero da 5 a 7, sono coplanari ed equispaziati attorno al paziente. La distribuzione di dose con la tecnica IMRT è ottenuta tramite un software per piani di trattamento basato su un inverse planning: ossia partendo dagli obiettivi di dose che il clinico vuole ottenere sulla lesione e sugli organi critici, il software sviluppa il piano. Gli obiettivi sono generalmente una dose uniforme nel target e una dose minima agli organi critici. Si possono inoltre dare più obiettivi sulla stessa regione, come una dose minima e/o una dose massima in una fissata percentuale del volume dell'organo. Durante la fase di ottimizzazione, il software suddivide ciascun fascio in una serie di fascetti e varia il peso di ciascuno di essi in modo da raggiungere l'obiettivo stabilito. La modulazione di intensità è realizzata all'acceleratore mediante un collimatore multilamellare (MLC): tramite un software di conversione (sequencer), la modulazione del fascio viene convertita in una sequenza di segmenti di forma irregolare, ciascuno dei quali ha un peso diverso.

La tecnica IMRT è particolarmente efficace nel caso di lesioni complesse e concave, come nel caso delle lesioni del capo-collo, dove la vicinanza di diversi organi critici, quali midollo, parotidi, mucose ecc., rende particolarmente difficile ottenere una distribuzione di dose uniforme all'interno del target. Nelle figg. 1 e 2 è riportato un esempio di distribuzione di dose per una lesione del capo-collo su un piano coronale e trasversale, rispettivamente.

Dopo la fine del trattamento radioterapico, i pazienti sono stati seguiti con visite periodiche e sottoposti a TC e/o palpazione per accertare la risposta alla terapia e la presenza o meno di lesioni recidivali.

La risposta di sei pazienti su otto, a 2-7 mesi dalla fine della terapia, è stata completa. Un solo paziente non ha risposto alla radioterapia, mentre un paziente ha avuto recidiva dopo 2 mesi, la percentuale di pazienti in risposta completa perciò è 75%.

Implementazione del modello per il calcolo del TCP

Per il calcolo del TCP, definito come la probabilità che tutte le cellule tumorali siano uccise in seguito al trattamento radioterapico, è impiegato il modello proposto da Webb e Nahum (1993), con la correzione per la disomogeneità della dose al bersaglio, e con la correzione inter-paziente della radiosensibilità (Nahum, Tait 1992). E' possibile inserire altre correzioni, come l'effetto combinato di radioterapia e chemioterapia (Steel 1988), il ripopolamento delle cellule (Fowler 1986), l'effetto ossigeno (Nahum 2003), di cui non faremo uso in questa prima fase di implementazione del modello. Per il calcolo del TCP sono stati scelti i parametri provenienti dai dati sull'irradiazione di cellule dei tumori SCC ed osteosarcoma *in vitro* (Malaise 1987, Steel 1991).

Tipo lesione	α	β	Riferimento
SCC	0.36	0.042	1
Osteosarcoma	0.38	0.063	2

Il parametro della variazione della radiosensibilità, $h= 0.13$ è stato scelto per avere un miglior accordo con i risultati clinici.

La densità delle cellule clonogeniche è stata scelta di 10^7 cm^{-3} , ritenuta una stima ragionevole in letteratura per molti tipi di tumore inclusi quelli del capo collo (Webb 94). Per il calcolo del TCP è stato scritto un software specifico che lavora in ambiente MATLAB.

Risultati

Il TCP medio dei pazienti considerati è 75.13%.

L'accordo tra il TCP ed i risultati clinici è stato verificato con test t-student ad un campione in cui l'ipotesi nulla è che il valor medio del TCP dei pazienti sia uguale alla percentuale di pazienti con risposta completa. L'ipotesi nulla è vera con $80\% < p < 90\%$.

Discussione e Conclusioni

L'accordo tra TCP dei pazienti e frazione di pazienti con risposta completa è buono, pertanto si ritiene che il modello sia in grado di riprodurre i risultati clinici finora ottenuti e può essere ritenuto uno strumento utile per valutare la distribuzione di dose al bersaglio nei piani IMRT.

Tuttavia il numero di pazienti studiato è ancora troppo limitato per poter confermare il valore predittivo del TCP. Il

modello può comunque essere usato come ausilio per studiare l'impatto clinico di diversi schemi di frazionamento, fermo restando che ogni decisione dovrà essere presa in base all'esperienza clinica.

In futuro, disponendo di una casistica più ampia, si dovrà inoltre studiare l'introduzione di correzioni per la frazione di cellule ipossiche e per il ripopolamento, ritenuti importanti fattori prognostici per l'esito della terapia dei tumori del capo collo (Begg 1992, Brizel 1997).



Fig. 1: distribuzione di dose con tecnica IMRT a 5 campi nella regione del capo-collo su un piano coronale.



Fig. 2: distribuzione di dose con tecnica IMRT a 5 campi nella regione del capo-collo su un piano trasversale.

Bibliografia

- 1) Begg et al. (1992), Predictive value of potential doubling time for radiotherapy of head and neck tumor patients: results from the EORTC cooperative trial. *Semin. Radiat Oncol.* 2:22-25
- 2) Brizel DM, Sibley GS et al. (1997), Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology Biol. Phys.* Vol.38, N.2 pp 285-289, 1997.
- 3) Fowler JF (1986), Potential for increasing the differential response between tumors and normal tissues: Can proliferation rate be used? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12: 641-645
- 4) Malaise et al, Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumors cells and fibroblasts. *Radiat. Res.*11:617-624
- 5) Nahum AE, Tait DM. (1992), Maximizing local control by customized dose prescription for pelvic tumors. In Breit A, Advanced radiation therapy: tumor response modelling and treatment planning. Breit A Ed. Heidelberg. Springer 1992; 425-431
- 6) Nahum AE et al (2003), Incorporating clinical measurements of hypoxia into local-control modeling of prostate cancer: implications for the α/β ratio. In corso di pubblicazione su *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*
- 7) Steel GG (1988), The search for therapeutic gain in the combination of radiotherapy and chemotherapy. *Radiother. Oncol.* 11: 31-53
- 8) Steel GG, Wheldon TE (1991), Clinical Practice and Controversies. in *Paediatric Oncology*, Chapman and Hall Medical.
- 9) Webb S (1994), Optimum parameters in a model for tumor control probability including interpatient heterogeneity. *Phys.Med.Biol.* 39,1895-1914.
- 10) Webb S, Nahum AE (1993), A model for calculating tumor control probability in radiotherapy including the effects of inhomogeneous distributions of dose and clonogenic cell density. *Phys. Med. Biol.* 1993; 38: 653-666.

RELAZIONE TRA DOSE DI RADIOTERAPIA ED OUTCOME BIOCHIMICO NEL TRATTAMENTO INTEGRATO ORMONO-RADIOTERAPICO DEL CA PROSTATICO

Morganti A.G. [6], Pompei L. [2], Fortuna G. [3], Ammaturo M.V. [4], De Paula U. [5], Mattiucci G.C. [1], Luzi S. [1], Mantini [1], Digesù C. [1], Rossetto M.E. [2], Palloni T. [3], Petrongari M.G. [4], Gentile P. [5], Deodato F. [6], Macchia G. [6], Frascino V. [1], Valentini V. [1], Cellini N. [1].

Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del S.C., Roma, Cattedra di Radioterapia (1); Ospedale Civile, Viterbo, Unità Operativa di Radioterapia (2); Ospedale S. Filippo, Roma, Unità Operativa di Radioterapia (3); Ospedale S. Camillo, Roma, Unità Operativa di Radioterapia (4); Ospedale S. Pietro Fatebenefratelli, Roma, Unità Operativa di Radioterapia (5); Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del S.C., Campobasso, Unità Operativa di Radioterapia (6).

Introduzione

La prognosi dei pazienti sottoposti a radioterapia per carcinoma prostatico è migliorata grazie all'uso sia di escalation della dose che di integrazione ormonoradioterapica. Tuttavia, nei trials di integrazione ormono-radioterapica sono state impiegate dosi moderate di radioterapia, mentre nelle sperimentazioni sulle dosi elevate di radioterapia il trattamento ormonale è stato escluso. Scopo di questo studio è quello di valutare l'impatto prognostico relativo di differenti livelli di dose (<70 Gy versus \geq 70 Gy) e di differenti modalità di trattamento ormonale associato alla radioterapia (neoadiuvante versus adiuvante).

Materiale e metodo

426 pazienti (età mediana: 71 anni; range: 51-87 anni) sono stati sottoposti a radioterapia sulla prostata (dose mediana: 70 Gy) +/- irradiazione profilattica delle stazioni linfonodali pelviche (45 Gy) e a ormonoterapia neoadiuvante-concomitante (bicalutamide per 30 giorni; goserelin: 1 fiala da 3.6 mg ogni 28 giorni, a partire da 2 mesi prima del trattamento radiante e per tutta la durata di questo). La dose somministrata alla prostata è stata < 70 Gy nel 44.8% dei pazienti e \geq 70 Gy nel 55.2%. A 244 pazienti è stato prescritto un trattamento ormonale adiuvante (goserelin per almeno 2 anni). La distribuzione dei pazienti in base allo stadio clinico è stata: T2: 48.1%, T3: 51.9 %. La distribuzione in base al Gleason score è stata: grado 2-4: 14.3 %; grado 5-7: 66.7 %; grado 8-10: 19.0%. La distribuzione in base al PSA pretrattamento è stata (in ng/ml): 0-4: 7.0 % ; 4-10: 29.3 %; 10-20: 30.3 %; \geq 20: 33.3 %.

Risultati

Con un follow-up mediano di 35 mesi (range: 6-151), 81 pazienti (19.0%) hanno presentato recidiva biochimica, 17 pazienti (4.0%) hanno presentato progressione locale di malattia e 12 pazienti (2.8%) hanno presentato metastasi a distanza. Complessivamente, 23 pazienti (5.4%) hanno presentato ripresa di malattia. 4 pazienti (0.9%) sono deceduti. Nessun paziente è deceduto per carcinoma prostatico. Alla analisi univariata sia la dose di radiazioni somministrata al T, sia la somministrazione di ormonoterapia adiuvante sono risultate significativamente correlate alla sopravvivenza libera da recidiva biochimica. Alla analisi multivariata, l'unico parametro significativamente correlato alla sopravvivenza libera da recidiva biochimica è stata la dose di radiazioni somministrata al T. All'analisi dei sottogruppi è risultata una significativa correlazione, nel sottogruppo di pazienti non sottoposto a ormonoterapia adiuvante, tra dose di radioterapia e sopravvivenza libera da recidiva biochimica. Analoga correlazione è stata osservata nel sottogruppo di pazienti con stadio clinico T3, tra somministrazione di ormonoterapia adiuvante e sopravvivenza libera da recidiva biochimica. Nei pazienti sottoposti a ormonoterapia adiuvante non è stata osservata una correlazione tra dose di radioterapia e outcome biochimico.

Conclusioni. I risultati di questo studio confermano l'impatto positivo di dosi di radioterapia > 70 Gy e l'impatto positivo dell'ormonoterapia adiuvante nei pazienti con neoplasia localmente avanzata. Tuttavia, nei pazienti sottoposti a trattamento ormonale prolungato non è stata osservata una correlazione tra dose di radioterapia e outcome biochimico. Questo risultato rende tuttora incerto il ruolo di una ulteriore escalation della dose nei pazienti sottoposti alla integrazione ormonoradioterapica.

TOSSICITÀ TARDIVA RETTALE NELLA RADIOTERAPIA DEL CARCINOMA PROSTATICO: IMPATTO DI DOSE, FRAZIONAMENTO E VOLUME IRRADIATO

Morganti A.G. [6], Pompei L. [2], Fortuna G. [3], Ammaturo M.V. [4], De Paola U. [5], Mattiucci G.C. [1], Luzi S. [1], Mantini [1], Digesù C. [1], Rossetto M.E. [2], Palloni T. [3], Petrongari M.G. [4], Gentile P. [5], Deodato F. [6], Macchia G. [6], Cellini F. [1], Valentini V. [1], Cellini N. [1].

Policlinico A. Gemelli, Università Cattolica del S.C., Roma, Cattedra di Radioterapia (1); Ospedale Civile, Viterbo, Unità Operativa di Radioterapia (2); Ospedale S. Filippo, Roma, Unità Operativa di Radioterapia (3); Ospedale S. Camillo, Roma, Unità Operativa di Radioterapia (4); Ospedale S. Pietro Fatebenefratelli, Roma, Unità Operativa di Radioterapia (5); Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia nelle Scienze Biomediche, Università Cattolica del S.C., Campobasso, Unità Operativa di Radioterapia (6).

Introduzione

Sia la dose di radiazioni che l'utilizzo di volumi di trattamento estesi a comprendere le vescichette seminali o le stazioni linfonodali pelviche sono stati considerati fattori predisponenti per l'incidenza di tossicità tardiva rettale. Scopo di questa analisi è quello di valutare, nell'ambito di uno studio osservazionale multicentrico, l'impatto sulla tossicità rettale tardiva della dose di radioterapia, del volume irradiato, del frazionamento impiegato e dell'eventuale riscontro di tossicità rettale acuta.

Materiale e metodo

703 pazienti affetti da carcinoma prostatico sono stati sottoposti a radioterapia radicale in 6 centri di radioterapia. L'età mediana è stata di 70 anni (range: 47-89 anni). Nel 53.4% dei pazienti è stata eseguita una irradiazione profilattica delle stazioni linfonodali pelviche. Nel 86.9% dei pazienti sono state incluse, nel volume del sovradosag-

gio, le vescichette seminali. Nel 72.7% dei pazienti è stato impiegato un frazionamento giornaliero di 180 cGy, mentre nel restante 27.3% è stato impiegato un frazionamento di 200 cGy/die. Il 33.0% dei pazienti è stato irradiato con tecnica conformazionale e nel 48.1% dei pazienti è stato prescritto un trattamento ormonale adiuvante. La dose di radioterapia è stata di 65-69 Gy nel 42.2% dei pazienti, e di 70-74 Gy nel restante 57.8%. Il range del follow-up è stato di 6-134 mesi. La tossicità acuta è stata classificata secondo la scala RTOG, e la tossicità tardiva secondo la scala RTOG-EORTC. L'incidenza della tossicità tardiva è stata calcolata in termini di incidenza cumulativa attuariale con il metodo di Kaplan-Meier. Il confronto tra curve di incidenza cumulativa è stato eseguito mediante Log-rank test (analisi univariata) e Cox proportional hazard model (analisi multivariata).

Risultati

L'incidenza di proctite acuta è stata: grado 1: 32.7%; grado 2: 14.5%; grado 3: 2.0%. L'incidenza di tossicità tardiva rettale è stata: grado 1: 14.8%; grado 2: 2.0%; grado 3: 0.1%. L'incidenza di tossicità tardiva rettale è stata significativamente maggiore nei pazienti sottoposti a radioterapia profilattica della pelvi (22.6% vs 10.3%; $p=0.004$) ed alla irradiazione delle vescichette seminali (18.8% vs 5.2%; $p=0.006$). Inoltre è stata registrata una significativa correlazione tra proctite acuta e tardiva; l'incidenza di tossicità tardiva rettale, in relazione al grado di proctite acuta, è stata infatti la seguente: grado 0: 14.1%, grado 1: 20.5%, grado 2: 18.2%, grado 3: 33.7% ($p=0.027$). Non è stata invece osservata una correlazione significativa tra tossicità tardiva rettale e dose ($p=0.702$), uso di ormonoterapia adiuvante ($p=0.951$), frazionamento ($p=0.666$), e tecnica di trattamento (convenzionale vs conformazionale; $p=0.365$). Alla analisi multivariata è stato confermato il significativo impatto sia della irradiazione pelvica ($p=0.040$) che della irradiazione delle vescichette seminali ($p=0.026$).

Conclusioni

In una analisi su 703 pazienti sottoposti a radioterapia per carcinoma prostatico, l'incidenza di tossicità tardiva rettale è risultata accettabile. L'entità del volume irradiato, sia a dosi "profilattiche" che "curative" ha avuto un impatto significativo su questo parametro. La significativa relazione tra tossicità tardiva acuta e rettale definita come "consequential late effect" ci permette di prevedere la probabilità che ha un paziente di sviluppare tossicità tardiva sulla base della severità dell'evento acuto, che risulta, sia nell'analisi uni- che multivariata, indipendente dalla dose totale, dal frazionamento e dai volumi di trattamento.

ANEMIA E POTENZIALE METASTATIZZANTE NEL CA PANCREATICO: RUOLO DELLA NEOANGIOGENESI?

Macchia G., Mattiucci GC., Deodato F., Di Gesù C., Forni F., Morganti AG., Picardi V.,
Valentini V., Cellini N.

Policlinico Gemelli - Università Sacro Cuore - Roma

Introduzione

L'impatto dell'anemia sulla prognosi dei pazienti oncologici sottoposti a radioterapia è ben noto. L'ipossia tissutale riduce gli effetti sul DNA dei radicali liberi prodotti dalle radiazioni ionizzanti. Sperimentalmente è stato dimostrato un alto grado di ipossia nei tumori pancreatici; inoltre, in considerazione della nota correlazione fra anemia e grado di ipossia tumorale, si può ipotizzare che anche nei tumori del pancreas l'anemizzazione del paziente possa peggiorare il grado di ipossia tumorale.

Tuttavia, mancano in letteratura analisi sulla correlazione tra stato anemico e prognosi nei pazienti con tumore del pancreas esocrino. Scopo di questo studio è quello di valutare, in una popolazione di pazienti affetti da carcinoma del pancreas localmente avanzato, sottoposti a radiochemioterapia concomitante, l'eventuale impatto della concentrazione di emoglobina pretrattamento sull'outcome, in termini di risposta clinica, controllo locale, sopravvivenza libera da metastasi, sopravvivenza libera da malattia e sopravvivenza globale.

Pazienti e metodo

30 pazienti sottoposti allo stesso tipo di radiochemioterapia concomitante (5-FU, 1000 mg/sm/day, infusione continua e.v., gg 1°-4° di radioterapia) e a radioterapia con fasci esterni (39.6-59.4 Gy) sono stati suddivisi in due gruppi, in base al valore mediano di emoglobinemia pretrattamento (cut off 11.5 g/dl). In questi due gruppi sono state confrontate le percentuali di risposte cliniche, il controllo locale, la sopravvivenza libera da metastasi, la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale, mediante analisi univariata (logrank) e multivariata (Cox).

Risultati

Non sono state osservate differenze significative né in termini di risposta clinica né nella sopravvivenza libera da progressione locale tra pazienti con Hgb ≤ 11.5 e pazienti con Hgb > 11.5 . La sopravvivenza libera da metastasi è stata di 5.1 mesi nei pazienti con Hgb ≤ 11.5 , e di 10.7 mesi nei pazienti con Hgb > 11.5 ($p= 0.011$). Considerando sia le progressioni locali che le metastasi a distanza, 19 pazienti (63.3%) hanno presentato progressione di malattia. La sopravvivenza mediana libera da malattia è stata rispettivamente di 5.1 mesi e 10.2 mesi in pazienti con Hgb ≤ 11.5 e > 11.5 , ($p= 0.026$).

La sopravvivenza mediana globale è stata rispettivamente di 7.5 mesi e 10.3 mesi in pazienti con Hgb ≤ 11.5 e >11.5 , ($p= 0.039$). All'analisi multivariata, la concentrazione di emoglobinemia alla diagnosi è stato l'unico fattore prognosticamente correlato alla sopravvivenza libera da metastasi ($p = 0.026$), alla sopravvivenza libera da malattia ($p = 0.048$) ed alla sopravvivenza globale ($p = 0.048$)

Conclusioni

A nostra conoscenza, questa rappresenta la prima valutazione riguardante l'impatto dell'emoglobinemia in pazienti sottoposti a radioterapia per carcinoma pancreatico. La maggior incidenza di metastasi nei pazienti con emoglobina pretrattamento ≤ 11.5 supporta l'ipotesi secondo cui la condizione di anemia stimola il processo dell'angiogenesi tumorale e lo stato di instabilità genetica, entrambi favorenti il potenziale metastatizzante del tumore.