

# Radiazioni

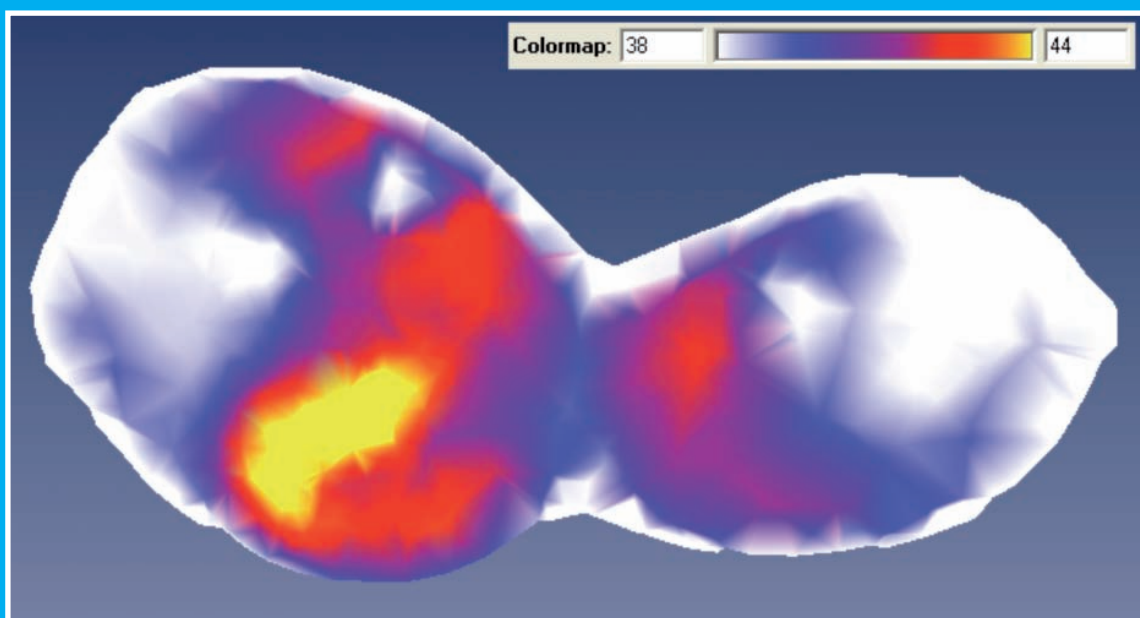
## Ricerca e Applicazioni

Periodico della Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni

***IPERTEMIA REGIONALE PROFONDA:  
PRINCIPI FISICI E PIANIFICAZIONE  
TRAMITE HYPERPLAN***

***IPERTEMIA ONCOLOGICA:  
METODI, INDICAZIONI CLINICHE E LIVELLI  
DI EVIDENZA***

***RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI  
DI XRCC1 E XRCC3 NELLA RADIOSENSIBILITÀ  
INDIVIDUALE: ANALISI DEL DANNO AL DNA  
INDOTTO DALLE RADIAZIONI IONIZZANTI***



# SOMMARIO

**Radiazioni Ricerca e Applicazioni**  
Periodico della Società Italiana  
per le Ricerche sulle Radiazioni  
Pubblicazione Periodica  
Quadrimestrale  
Dicembre 2008 - Vol. XI n. 3

**Direttore Responsabile**

**Francesca Ballarini**

Dipartimento di Fisica Nucleare e Teorica  
Università di Pavia  
e-mail: francesca.ballarini@pv.infn.it

**Direttore Editoriale**

**Raffaele De Vita**

Sezione Tossicologia e Scienze Biomediche  
ENEA Centro Ricerche Casaccia, Roma  
e-mail: devita@enea.it

**Capo Redattore**

**Lorenzo Manti**

Dipartimento di Fisica  
Università Federico II, Napoli  
e-mail: lorenzo.manti@na.infn.it

**Comitato di Redazione**

**Francesca Antonelli**

Dipartimento Tecnologia e Salute  
Istituto Superiore di Sanità, Roma  
e-mail: francesca.antonelli@iss.it

**Mauro Bonardi**

Università degli Studi di Milano  
e-mail: mauro.bonardi@mi.infn.it

**Martino Grandolfo**

Dipartimento Tecnologie e Salute  
Istituto Superiore di Sanità, Roma  
e-mail: martino.grandolfo@fastwebnet.it

**Cristiana Vidali**

S.C. di Radioterapia  
Agenzia Ospedaliera-Universitaria di  
Trieste  
e-mail: cristiana.vidali@aots.sanita.fvg.it

**Per Informazioni e Corrispondenza**

**Francesca Ballarini**

Tel. 0382 987949

e-mail: francesca.ballarini@pv.infn.it

Editrice: Società Italiana  
per le Ricerche sulle Radiazioni

Registrazione del Tribunale di Roma  
n. 406 del 6 Agosto 1998

Grafica: Renato Cafieri

Stampa:



Pubblicità: **TIPOLITOGRAFIA**  
Zona Industriale Sotterone - 48019 VIGEVANO  
Tel. 0761527323 - Fax 0761527523

## IPERTEMIA REGIONALE PROFONDA: PRINCIPI FISICI E PIANIFICAZIONE TRAMITE HYPERPLAN

Pasetto S., Dall'Oglio S., Grandinetti A., Maluta S.

3

## IPERTEMIA ONCOLOGICA:

### METODI, INDICAZIONI CLINICHE E LIVELLI DI EVIDENZA

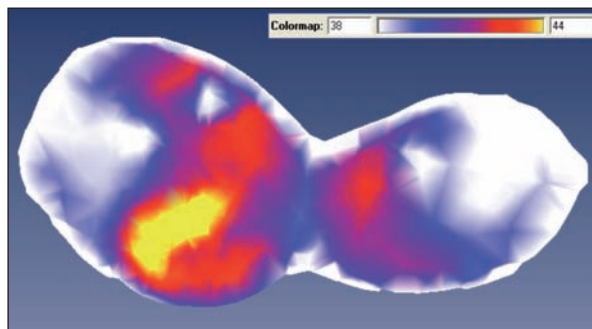
Maluta S., Dall'Oglio S., D'Amico A., Pioli F., Pasetto S.

6

## RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI DI XRCC1 E XRCC3 NELLA RADIOSENSIBILITÀ INDIVIDUALE: ANALISI DEL DANNO AL DNA INDOTTO DALLE RADIAZIONI IONIZZANTI

Poggioli T., Palma S., Cornetta T., Sterpone S., Novelli F.,  
Tirindelli D., Cozzi R., Testa A.

12



In copertina: Esempio di distribuzione di temperatura ottimizzata tramite HyperPlan. Immagine dall'articolo di: Pasetto S., Dall'Oglio S., Grandinetti A., Maluta S. Radioterapia Oncologica, Ospedale Civile Maggiore - Verona.



**Redazione Editoriale**

**Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni**

Sezione Tossicologia e Scienze Biomediche

ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016

Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA

☎ 06/30484671 Fax 06/30484891

e-mail: devita@enea.it

http://www.sirr.unina.it

**Segreteria S.I.R.R.**

Sezione Tossicologia e Scienze Biomediche

ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016

Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma

☎ 06/30484442 Fax 06/30486559

e-mail: pacchier@enea.it

# IPERTERMIA REGIONALE PROFONDA: PRINCIPI FISICI E PIANIFICAZIONE TRAMITE HYPERPLAN

Pasetto S., Dall'Oglio S., Grandinetti A., Maluta S.

Radioterapia Oncologica, Ospedale Civile Maggiore - Verona  
e-mail: stefano.pase@gmail.com

L'ipertermia è una modalità terapeutica in ambito oncologico, che prevede una somministrazione di calore, il più possibile selettiva, a un tessuto tumorale, al fine di raggiungere in esso una temperatura compresa tra 42 e 45 °C.

Esistono vari modi per generare ipertermia all'interno dell'organismo, che dipendono dalla forma di energia utilizzata. In particolare possiamo distinguere tra:

- 1) Ultrasuoni, onde meccaniche con frequenze comprese tra 0.3 e 3 MHz;
- 2) Microonde, radiazioni elettromagnetiche di frequenza compresa tra 300 e 2450 MHz;
- 3) Radiofrequenze, radiazioni elettromagnetiche di frequenza inferiore ai 300 MHz.

Gli ultrasuoni permettono di focalizzare l'energia su piccoli volumi anche a notevole profondità ma subiscono pesantemente il fenomeno della riflessione all'interfaccia tra tessuti con impedenze acustiche diverse. Accanto a ciò si presenta frequentemente dolore, dovuto all'assorbimento vibrazionale a livello osseo dell'onda.

Da un punto di vista clinico risulta più funzionale l'utilizzo delle radiazioni elettromagnetiche; nel caso dell'applicazione in ipertermia si tratta di radiazioni non ionizzanti, dette anche NIR (Non Ionizing Radiation). La penetrazione è di pochi centimetri nel caso delle microonde, mentre si raggiungono profondità che superano la decina di centimetri con tecniche a radiofrequenza. La profondità di penetrazione, infatti, aumenta al diminuire della frequenza [2]. Per questo motivo le microonde vengono utilizzate nei trattamenti superficiali, mentre le radiofrequenze nei trattamenti profondi.

## Interazione tra campo elettromagnetico e materiali biologici

Le interazioni tra un campo elettromagnetico e un mezzo materiale si esplicano attraverso le forze esercitate dal campo elettrico e dal campo magnetico sulle

cariche elettriche presenti nel materiale. In realtà i materiali biologici, avendo permittività magnetica relativa circa uguale a uno, sono sostanzialmente inerti dal punto di vista puramente magnetico [2]. Relativamente all'interazione con il campo elettrico, invece, si possono distinguere:

- 1) cariche che, sotto l'azione di campi elettrici, possono muoversi liberamente dando luogo a correnti elettriche;
- 2) cariche che, soggette all'azione di campi elettrici, non sono libere di muoversi in quanto legate alla struttura molecolare o atomica del materiale.

Nel primo caso, il parametro di interesse è la conducibilità elettrica  $\sigma$ .

Nel secondo caso, invece, le cariche possono contribuire a costituire dipoli elettrici, i quali, in presenza di campo elettrico, tendono a disporsi parallelamente ad esso. Il maggior contributo dipolare proviene dalle molecole d'acqua. Il parametro che caratterizza il materiale sotto il profilo della polarizzazione è il vettore polarizzazione elettrica  $\vec{P}$ , il quale è proporzionale al campo elettrico  $\vec{E}$  secondo la formula  $\vec{P} = \epsilon_0(\epsilon_r - 1)\vec{E}$ , dove  $\epsilon_0$  è la permittività elettrica del vuoto e  $\epsilon_r$  la permittività elettrica relativa del materiale [3]. Si tratta di una costante adimensionale che quantifica la presenza di cariche libere di polarizzazione; essa assume valore 1 nel vuoto e maggiore di 1 in un mezzo (Tab. 1).

	$\sigma$ (S/m)	$\epsilon_r$
Muscolo	0.8	80
Grasso	0.04	10
Osso	0.02	9
Addome	0.55	36
Vescica	0.6	78
Rene	1.0	83
Fegato	0.6	78

Tabella 1: Valori di conducibilità e permittività elettrica di alcuni tessuti a 100 MHz [6].

Quando il campo elettromagnetico oscilla con una certa frequenza, le cariche libere si muovono dando luogo a correnti variabili con la stessa frequenza del campo; i dipoli a loro volta si orientano nel campo, dando luogo a una polarizzazione che oscilla anch'essa con la medesima frequenza. I due parametri quindi che caratterizzano il mezzo in relazione all'interazione con i campi elettromagnetici sono la conducibilità elettrica  $\sigma(\nu)$  e la permittività elettrica  $\epsilon_r(\nu)$ , dipendenti entrambi dalla frequenza  $\nu$  della radiazione incidente.

A seguito di tale interazione, tra gli altri effetti, si verifica un trasferimento di energia dal campo alle cariche elettriche e ai dipoli presenti nel materiale, con successiva trasformazione in energia termica del reticolo: l'energia del campo si riduce e, conseguentemente, aumenta l'energia termica del materiale. L'ipertermia sfrutta l'innalzamento locale di temperatura determinato dal processo appena descritto.

Un obiettivo importante, quindi, nell'analisi dell'interazione tra campi elettromagnetici e materiali biologici è la determinazione dell'energia elettromagnetica assorbita da questi ultimi. Nel range di frequenze tipico dell'ipertermia, la grandezza che meglio si addice a descrivere tale fenomeno è il SAR (*Specific Absorption Rate*), ovvero la potenza assorbita per unità di massa [W/Kg]. Il SAR locale, relativo a ciascun punto all'interno del corpo, è così definito [4]:

$$SAR = \frac{\sigma E^2}{\rho}$$

dove  $\rho$  è la densità di massa del mezzo.

L'organismo reagisce all'immissione di calore cercando di eliminarlo sia tramite la vasodilatazione, con conseguente incremento nella perfusione sanguigna, che tramite trasferimento del calore verso la superficie del corpo.

#### Sistema BSD 2000

Alla luce di quanto visto nel precedente paragrafo, l'obiettivo clinico che si deve perseguire è quello di ottenere una distribuzione del SAR, all'interno dell'organismo, che preveda il suo valore massimo in corrispondenza della massa tumorale da trattare. Il sistema BSD 2000 per ipertermia regionale profonda rappresenta la tecnologia d'avanguardia in tale direzione. Il principio che viene sfruttato è il fenomeno dell'interferenza tra onde elettromagnetiche: la situazione ideale vorrebbe interferenza costruttiva nella zona tumorale e interferenza distruttiva altrove. Nella pratica, evidentemente, come spesso accade in radioterapia, si cerca il miglior compromesso possibile tra i due obiettivi, privilegiando la corretta e completa copertura del target. Per ottenere ciò si utilizza un sistema di antenne a radiofrequenza posizionate su un applicatore: il più

interessante è il Sigma-Eye (figura 1), costituito da 12 antenne a radiofrequenza (RF), distribuite su tre anelli a tre diverse profondità nella direzione dell'asse dell'applicatore. Durante il trattamento, tra il paziente e l'applicatore si interpone un bolus contenente acqua deionizzata, che ha il ruolo di accoppiamento tra antenne e paziente, allo scopo di evitare il fenomeno della riflessione dell'onda da parte dell'aria.



Figura 1: Applicatore Sigma-Eye per BSD 2000

Tutti i canali emettono alla stessa frequenza, fissata a 100 MHz. Sono invece variabili la potenza e la fase: facendo opportunamente variare questi due parametri, relativamente a ciascun canale, è infatti possibile ottenere quella situazione di interferenza costruttiva nella zona del tumore cui abbiamo accennato in precedenza. Nella pratica clinica, generalmente, si fanno variare solo le fasi, mentre le potenze vengono impostate uguali per tutti i canali, ponendo come vincolo solo la potenza massima totale. Il software del sistema include un algoritmo per la determinazione della fase di ciascun canale, in base alla posizione del target impostata dall'operatore. Si tratta però di un algoritmo basato su simulazioni su fantocci, appositamente creati per l'ipertermia, ma ben lontani dal riprodurre fedelmente ciò che avviene nell'organismo [5]. Ad esempio non si considera il fenomeno della riflessione all'interfaccia tra tessuti diversi (come tra grasso e muscolo). Inoltre ci si limita a considerazioni che riguardano il SAR, ma non la temperatura. Allo scopo di rendere più rigorosa la procedura di pianificazione di un trattamento di ipertermia tramite BSD 2000, si può ricorrere all'ausilio di HyperPlan.

#### HyperPlan

Il sistema di pianificazione HyperPlan è stato sviluppato allo Zuse Institute Berlin (ZIB) in cooperazione con il Charite Berlin, Campus Virchow Klinikum [6]. L'obiettivo finale di HyperPlan consiste nel determinare le distribuzioni di temperatura, oltre che del campo elettrico, in modo da ottimizzare i parametri di potenza

e fase di ciascun canale, nota la posizione del tumore. Le operazioni preliminari della pianificazione prevedono, nell'ordine: acquisizione di una scansione CT o MRI del paziente, segmentazione delle immagini (occorre distinguere grasso, muscolo e osso) con contornamento del target, e creazione di un modello 3D di un'ipotetica sfera contenente il paziente, il bolus d'acqua e l'aria immediatamente circostante, tramite ripetizione nello spazio di diverse migliaia di tetraedri. Tali tetraedri costituiscono le unità elementari su cui si basa la successiva fase di calcolo.

Il primo fenomeno da simulare è la propagazione delle onde elettromagnetiche all'interno del corpo. Per ciascun punto è necessario conoscere la permittività e la conducibilità elettrica, i cui valori, per i vari tessuti, sono già implementati nel software. In tal modo è possibile risolvere le equazioni di Maxwell per il campo elettrico tramite sistemi numerici predittivi, quali il FE (*Finite Element*) e il FDTD (*Finite-Difference Time-Domain*). A questo punto è possibile ottenere la distribuzione del campo elettrico, da cui si risale facilmente anche alla distribuzione del SAR. In HyperPlan il contributo di ciascun canale dell'applicatore RF viene simulato separatamente: questo fa sì che il campo elettrico risultante da qualsiasi set di potenze e fasi, si possa ottenere per semplice sovrapposizione lineare.

Dal punto di vista terapeutico, tuttavia, il parametro più significativo non è il SAR, bensì la temperatura. Il passaggio successivo è quindi la simulazione del campo termico generato da un determinato pattern di potenza. Sfortunatamente, per la temperatura non esiste un analogo delle equazioni di Maxwell per il campo elettrico. HyperPlan utilizza allora un modello semplificato, la cosiddetta equazione di Pennes, o del biocalore [7]:

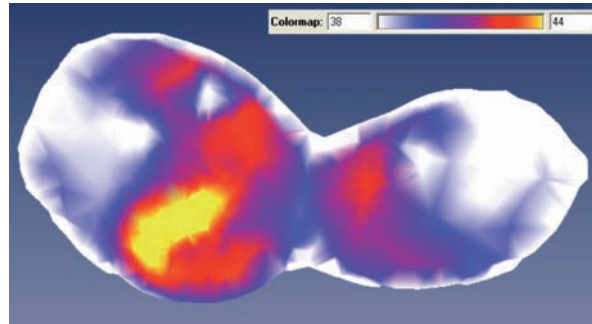
$$\rho c \frac{dT}{dt} = k \nabla^2 T - \rho_s w c_s (T - T_c) + Q_m + \rho SAR$$

dove  $\rho$  è la densità del tessuto considerato (il pedice  $s$  è relativo al sangue),  $c$  il calore specifico,  $k$  la conducibilità termica,  $w$  la perfusione del sangue,  $Q_m$  il calore generato dall'attività metabolica e  $T_c$  la temperatura interna del corpo umano.

Questa equazione non tiene conto dei vasi sanguigni, ma assume che lo scambio di calore tra tessuti e sangue avvenga solo a livello dei capillari. Pertanto, l'effetto termico della perfusione sanguigna è descritto per mezzo di un termine isotropico.

Tutti i parametri che compaiono nell'equazione del biocalore sono implementati in HyperPlan come valori medi per ciascun tipo di tessuto. L'equazione di Pennes viene risolta, per ciascun tetraedro del modello, tramite un particolare metodo numerico alle differenze finite (FE): si ottiene così una approssimazione del pattern di temperatura.

L'ultimo passo consiste nell'ottimizzazione della temperatura (fig. 2): nota la posizione del target, un apposito algoritmo determina i parametri ottimali di potenza e fase per ciascun canale RF, in modo da garantire il massimo riscaldamento in corrispondenza del target.



**Figura 2:** Esempio di distribuzione di temperatura ottimizzata tramite HyperPlan.

I parametri così ottenuti possono infine essere trasferiti al sistema BSD 2000 per l'avvio del trattamento.

## Referenze

1. P. Wust. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncology*, 2002; 3, 487-497.
2. A. Massa, Interazione di radiofrequenze e di campi di induzione magnetica, nella terapia oncologica, mediante ipertermia. Tesi Sperimentale di Laurea Specialistica in Ingegneria Biomedica, a.a. 2006/2007.
3. C. Mencuccini, V. Silvestrini. Elettromagnetismo-Ottica, Corso di fisica per le facoltà scientifiche. Liguori editore, 1998.
4. C. Baroni, Metodologia di caratterizzazione di attrezzature a radiofrequenza per ipertermia profonda. Tesi di Specializzazione in Fisica Sanitaria, a.a. 1997/1998.
5. R.J. Myerson. Phantom studies and preliminary clinical experience with the BSD 2000. *Int. J. Hyperthermia*, 1991; 7(6), 937-951.
6. G. Sreenivasa et al. Clinical use of the hyperthermia treatment planning system HyperPlan to predict effectiveness and toxicity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003; 55(2): 407-419.
7. M. Vessi, Trasmissione del calore nei sistemi biologici. Tesi di Laurea in Ingegneria, 2003.

# IPERTEMIA ONCOLOGICA: METODI, INDICAZIONI CLINICHE E LIVELLI DI EVIDENZA

**Maluta S., Dall'Oglio S., D'Amico A., Pioli F., Pasetto S.**

U.O. di Radioterapia Oncologica, Azienda Integrata Ospedale - Università di Verona  
e-mail: sergio.maluta@azosp.vr.it

I metodi e le indicazioni cliniche della moderna ipertermia oncologica prendono il via dalla Consensus Conference tenutasi ad Osaka nel Giugno 2004, dove erano presenti rappresentanti della *European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO)*, della *Asian Society of Hyperthermic Oncology (ASHO)* e della *Society for Thermal Medicine (STM)* che riunisce vari gruppi nordamericani.

Il testo di seguito riportato è frutto del lavoro di un gruppo di specialisti scelti tra quelli presenti al meeting, coordinati da J. van der Zee, Z. Vujaskovic, M. Kondo and T. Sugahara: J.M.C. Bull, Y. Harima, N.G. Huilgol, M.D. Hurwitz, C.K. Lee, S. Maluta, S. Osinsky, V.V. Ostapenko, H. Sahinbas, H. Terashima, R. U, H. Ueda (clinical group consensus).

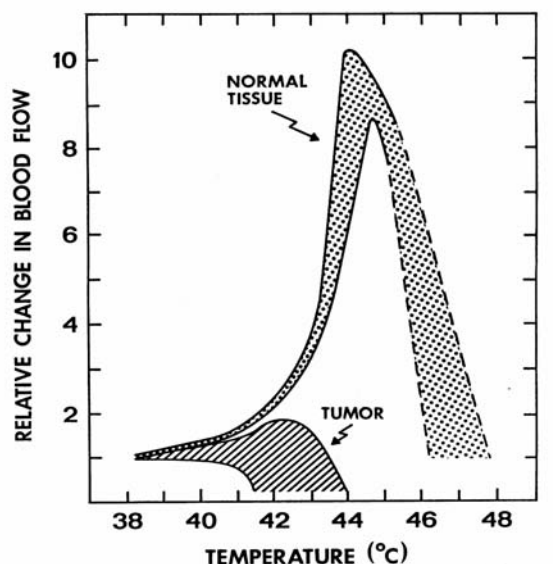
### Introduction

Hyperthermia is the elevation of temperature above the physiological level with the objective to achieve therapeutic gain. Hyperthermia is generally defined as a modest elevation of temperature to a range of 39-45 °C. The use of elevated temperatures in the treatment of cancer has been well documented for centuries [1]. Clinical hyperthermia is achieved by exposing tissues to conductive heat sources, or non-ionizing radiation (e.g. electromagnetic or ultrasonic fields). Although these modalities deposit energy in tissue by different physical mechanisms, they have general similarities. Hyperthermia can be administered either invasively, or non invasively using externally applied power. It can be delivered locally, regionally or as a whole body hyperthermia.

### Local hyperthermia

Local hyperthermia can be applied by external, intraluminal or interstitial methods. Electromagnetic or ultrasound energy is directed at the

treatment volume. The volume that can be heated depends on the physical characteristics of the energy source and on the type of applicator (array) [2]. Methods to apply hyperthermia externally can be divided into superficial and deep techniques (energy directed from around the part of the body in which the target volume is located). The energy distribution within the tissues is strongly dependent on tissue characteristics and thereby is inhomogeneous. The temperature variance is not simply a result of the energy distribution, but also depends on thermal tissue characteristics and blood flow (Figure 1).



**Figure.1.** Blood flow in normal and tumoral tissue during hyperthermia.

### Regional hyperthermia

Regional hyperthermia is applied by perfusion of a limb, organ, or body cavity with heated fluids [3,4]. When regional hyperthermia is applied to limbs, and without a cytotoxic agent, the temperature can be

increased to about 43°C for a duration of two hours. When used in combination with cytostatic drugs, the temperature must be lower to avoid unacceptable toxicity.

### Whole-body hyperthermia

For whole-body hyperthermia, several methods have been used. A common characteristic is the introduction of energy into the body, while at the same time energy losses are minimised. The temperature increase is usually limited in order to reach 41.8-42°C. Recent experience with radiant heat methods, for which the patients need only sedation during the treatment, has shown that this procedure is well tolerated [5,6]. A newer approach is to increase the temperature to about 40°C for a longer duration, which, in combination with cytokines and cytotoxic drugs is expected to lead to a greater therapeutic index than whole-body hyperthermia at the maximum tolerated level [7].

### Clinical studies

Strong proof of effectiveness comes from studies in which hyperthermia was used alone. A review on 14 of these studies including a total of 343 patients, reported complete response rates varying from 0 to 40% (overall 13%) and partial response rates from 0 to 56%, with an overall objective response rate of 51% [8]. Three additional studies report complete response rates of 11, 16 and 18% [9-11]. Only small and superficially located tumours can be heated to an adequate level over the whole volume and the response duration is short with a median of only 6 weeks. The use of hyperthermia alone is therefore not recommended.

Relatively strong evidence comes from several studies on “matched lesions”: multiple lesions within the same patient are treated with radiotherapy, with or without hyperthermia. A summation of the data from these studies (total 713 lesions) shows an increase in complete response rate from 31% to 67% [12].

### Level I evidence

Level I evidence is summarized in Table 1 [13-32]. The majority of this evidence concerns the addition of local hyperthermia to radiotherapy. Tumour types in which significant improvements were observed include head and neck tumours, melanoma, breast cancer, glioblastoma multiforme, rectum, bladder and cervix cancer, esophageal cancer and various superficial tumours. One study shows better results when local hyperthermia is added to chemotherapy, for patients with vulva and vagina malignancies. Two studies have shown that local hyperthermia in addition to radio plus chemotherapy improved the results in esophageal carcinoma.

### Level II evidence

A few non-randomized studies have led to the acceptance of hyperthermia as part of standard care in the Netherlands and Germany. In patients with thoracic wall invasion of malignant mesothelioma, addition of hyperthermia to radiotherapy resulted in considerably higher response and palliation rates, and much lower tumour regrowth and pain recurrence rates [33]. In children with a first relapse of germ cell tumours, addition of hyperthermia to chemotherapy resulted in much better disease free and overall survival [34,35].

### Level III evidence

Two studies have led to the acceptance in the Netherlands of combined hyperthermia and cisplatin in patients with locoregional recurrences of cervix following radiotherapy.

Simultaneous combination of cisplatin and hyperthermia resulted in 50% response [36,37], compared to a 15% (maximum expected) with cisplatin alone. In six of 49 patients, the combination resulted in long-term disease free survival [Rietbroek, de Wit].

The results of the first two randomised studies performed in the United States were disappointing, as these failed to show a beneficial effect of adding hyperthermia to radiotherapy. Retrospectively, these negative results have been explained by the use of hyperthermia treatment techniques that were inadequate for the patients included in these studies [38-40]. In the studies by Perez et al. [38,39] the more easily heated lesions (smaller than 3 cm in diameter) showed a difference in complete response rate (52% vs. 39%), while the larger lesions did not (25% vs. 27%). A study on recurrent breast cancer showed that the complete response rate in tumours larger than 3 cm increased from 31% to 65% with the use of a better heating technique in addition to reirradiation [41].

Thermometry procedures differs between institutes and may, within the same institute, change over time. For example, within the five combined randomised trials on breast cancer [16], the studies showing a large improvement from adding hyperthermia to radiotherapy had no higher thermal dose parameters. A better measure for adequacy appears to be the use of specific absorption rate (SAR) coverage of the treatment volume. Lee et al. [42] found that when the tumour volume was covered by 25% SAR, a higher complete response rate resulted than when SAR fell below 25%.

### Toxicity

Experimental studies have shown that most normal tissues are not damaged when the temperature over 1 hour treatment does not exceed 44°C [43]. The toxic-

ty from superficial hyperthermia is usually a skin burn in about 25% of the patients with recurrent breast cancer [16,41,42], healing with conservative treatment. Subcutaneous fat burns were seen in 3-12% of the patients treated with deep hyperthermia. The risk to develop skin burns appears higher following treatment with a radiofrequency capacitive heating technique (5-16%) than with a radiative heating technique (0-3%) [18,44-46].

Toxicity from whole body hyperthermia besides temperature depends on: the patient's general condition, condition of organ systems, and the physiological conditions during the treatment [7]. Serious toxicity from regional hyperthermic perfusion with modern technology and proper choice of perfusate composition, flow rate and pressure, blood gas values, drug doses, temperature dose and scheduling, is limited [47].

**Conclusions**

Both whole body and regional hyperthermia are time-consuming procedures requiring appropriate equipment and skilled personal. Nevertheless, thanks to the large therapeutic gain achieved, the cost-effectiveness of hyperthermia appears acceptable. Within the Dutch randomised trial on intrapelvic tumours, the cost-per-life-year-gained for cervical cancer was less than Euro 3000 [48].

Since the number of indications for the use of hyperthermia is limited, institutes are hesitant to invest in equipment and staff.

Additional techniques should expand the number of tumour locations that can be treated adequately. Further research should aim at improvement of existing techniques [49-51]. More attention should be given to the development and verification of hyperthermia

<i>Ref nr</i>	<i>Tumour</i>	<i>Treatment</i>	<i>Patients (lesions)</i>	<i>endpoint</i>	<i>Effect with HT</i>	<i>Effect without HT</i>
13, 14	Lymph nodes of head & neck tumours	RT +/- LHT	41 (44)	CR rate 5-yr local control 5-yr survival	83% 69% 53%	41% 24% 0%
15	Melanoma	RT +/- LHT	70 (138)	CR rate 2-yr local control	62% 46%	35% 28%
16	Breast	RT +/- LHT	306	CR rate	59%	41%
17	Glioblastoma multiforme	RT +/- LHT postoperative	68	Median survival 2-yr survival	85 weeks 31%	76 weeks 15%
18	Bladder, cervix and rectum	RT +/- LHT	298	CR rate 3-yr survival	55% 30%	39% 24%
19	Rectum	RT +/- LHT preoperative	115	5-yr survival	36%	7%
20	Cervix	RT +/- LHT	64	CR	55%	31%
21	Various superficial	RT +/- LHT	92	Response	82%	63%
22	Cervix	RT +/- LHT	40	CR	85%	50%
23	Rectum	RT +/- LHT	14	Response	100%	20%
24	Bladder	RT +/- LHT preoperative	102	3-yr survival	94%	67%
25	Oesophagus	RT +/- LHT	125	3-yr survival	42%	24%
26	Rectum	RT +/- LHT preoperative	122	pCR	23%	5%
27	Vulva/vagina	CT +/- LHT	65	Response	59%	19%
28	Bladder	CT +/- RHT preoperative	52	pCR	66%	22%
30	Lung	CT +/- WBHT	44	Response	68%	36%
31	Oesophagus	RT + CT +/- LHT	66	CR	25%	6%
32	Oesophagus	RT + CT +/- LHT preoperative	53	Palliation	70%	8%

**Table 1.** Level I evidence from randomized trials showing significant better results following combination of radiotherapy (RT), chemotherapy (CT), or RT plus CT with hyperthermia (HT), compared to the same treatment without HT. LHT=local HT, RHT=regional HT, WBHT=whole body HT. CR=complete response



treatment planning systems [52-54] and to that of non-invasive thermometry, requiring large technical efforts in combining MRI systems with heating equipment, and programming for data analysis [55,56].

#### Addendum

Ai lavori randomizzati di fase III prima citati vanno aggiunti un lavoro di Jones sui tumori superficiali dove viene dimostrata una remissione completa del 66% nei pazienti trattati con radioterapia e ipertermia e del 42% nei pazienti sottoposti a sola irradiazione. Questo beneficio aumenta nei pazienti precedentemente irradiati [57].

Più recentemente Issels ha presentato i dati relativi ad uno studio randomizzato sui sarcomi ad alto rischio delle parti molli trattati con chemioterapia neoadiuvante con o senza ipertermia, dove ha dimostrato una differenza statisticamente significativa nella DFS a 6 mesi tra pazienti sottoposti a chemioterapia e ipertermia (87.7%) verso i pazienti trattati con sola chemioterapia (73.8%) [58].

#### References

- Seegenschmiedt MH and Vernon CC. A historical perspective on hyperthermia in oncology. In: Seegenschmiedt MH, Fessenden P, and Vernon CC, eds. *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy volume 1*. Berlin, Springer Verlag 1995: 3-44.
- Myerson RJ, Moros E, Roti Roti JL. Hyperthermia. In: Perez CA and Brady LW, eds. *Principles and practice of radiation oncology*, third edition. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers 1997: 637-683.
- Coit DG. Hyperthermic isolation limb perfusion for malignant melanoma: a review. *Cancer Investigation* 1992; 10: 277-284.
- Ceelen WP, Hesse U, De Hemptinne B, and Pattyn P. Hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion in the treatment of locally advanced intra-abdominal cancer. *Br J Surgery* 2000; 87: 1006-1015.
- Robins HI, on behalf of SHOWG members. Meeting report. Systemic hyperthermia oncological working group. *Oncology* 1995; 52: 260-263.
- Robins HI, Dennis WH, Neville AJ, Shecterle LM, Martin PA, Grossman J, Davis TE, Neville SR, Gillis WK, and Rusy BF. A nontoxic system for 41.8°C whole-body hyperthermia: results of a phase I study using a radiant heat device. *Cancer Research* 1985; 45: 3937-3944.
- Bull JCM. Clinical practice of whole-body hyperthermia: new directions. In: Seegenschmiedt MH, Fessenden P, and Vernon CC. *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy volume 2*. Berlin, Springer Verlag 1995: 303-322.
- Hetzel FW and Mattiello J. Interactions of hyperthermia with other modalities. In: Paliwal BR, Hetzel FW, and Dewhirst MW, eds. *Medical Physics Monograph no. 16*. Biological, Physical and clinical aspects of hyperthermia. *Am Inst Phys* 1987: 30-56.
- Manning MR, Cetas TC, Miller RC, Oleson JR, Connor WG, and Gerner EW. Clinical hyperthermia: results of a phase I trial employing hyperthermia alone or in combination with external beam or interstitial radiotherapy. *Cancer* 1982; 49: 205-216.
- Dunlop PRC, Hand JW, Dickinson RJ, and Field SB. An assessment of local hyperthermia in clinical practice. *Int J Hyperthermia* 1986; 2: 39-50.
- Gabriele P, Orecchia R, Ragona R, Tseroni V, and Sanazzari GL. Hyperthermia alone in the treatment of recurrences of malignant tumors. *Cancer* 1990; 66: 2191-2195.
- Van der Zee J, Treurniet-Donker AD, The SK, Helle PA, Wijnmaalen AJ, Van den Berg AP, Van Rhoon GC, Broekmeyer-Reurink MP, and Reinhold HS. Low dose reirradiation in combination with hyperthermia: a palliative treatment for patients with breast cancer recurring in previously irradiated areas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15: 1407-1413.
- Valdagni R, Amichetti M, and Pani G. Radical radiation alone versus radical radiation plus microwave hyperthermia for N3 (TNM-UICC) neck nodes: a prospective randomized clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15: 13-24.
- Valdagni R, and Amichetti M. Report of long-term follow-up in a randomized trial comparing radiation therapy and radiation therapy plus hyperthermia to metastatic lymphnodes in stage IV head and neck patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 28: 163-169.
- Overgaard J, González González D, Hulshof M, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, and Bentzen SM. Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. *Lancet* 1995; 345: 540-543.
- Vernon CC, Hand JW, Field SB, Machin D, Whaley JB, Van der Zee J, Van Putten WLJ, Van Rhoon GC, Van Dijk JDP, González González D, Liu F-F, Goodman P, and Sherar M. Radiotherapy with or without hyperthermia in the treatment of superficial localized breast cancer: results from five randomized controlled trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 35: 731-744.
- Sneed PK, Stauffer PR, McDermott W, Diederich CJ, Lamborn KR, Prados MD, Chang S, Weaver KA, Spry L, Malec MK, Lamb SA, Voss B, Davis RL, Wara WM, Larson DA, Phillips TL, and Gutin PH. Survival benefit of hyperthermia in a prospective randomized trial of brachytherapy boost ± hyperthermia for glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 287-295.
- Van der Zee J, González González D, Van Rhoon GC, Van Dijk JDP, Van Putten WLJ, and Hart AAM, for the Dutch Deep Hyperthermia Group. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2000; 355: 119-1125.
- Berdow BA, and Menteshashvili. Thermoradiotherapy of patient with locally advanced carcinoma of the rectum. *Int J Hyperthermia* 1990; 6: 881-890.
- Datta NR, Bose AK, and Kapoor HK. Thermoradiothera-

- py in the management of carcinoma cervix (stage IIIb): a controlled clinical study. *Indian Med Gazette*, 1987; 121: 68-71.
21. Egawa S, Tsukiyama I, Watanabe S, Ohno Y, Morita K, Tominaga S, Onoyama Y, Hashimoto S, Yanagawa S, Uehara S, Abe M, Mochizuki S, Sugiyama A, and Inoue T. A randomized clinical trial of hyperthermia and radiation versus radiation alone for superficially located cancers. *J Jpn Soc Ther Radiol Oncol* 1989; 1: 135-140.
  22. Harima Y, Nagata K, Harima K, Ostapenko VV, Tanaka Y, and Sawada S. A randomized clinical trial of radiation therapy versus thermoradiotherapy in stage IIIb cervical carcinoma. *Int J Hyperthermia* 2001; 17: 97-105.
  23. Kakehi M, Ueda K, Mukojima T, Hiraoka M, Seto O, Akanuma A, and Nakatsugawa S. Multi-institutional clinical studies on hyperthermia combined with radiotherapy or chemotherapy in advanced cancer of deep-seated organs. *Int J Hyperthermia* 1990; 6: 719-740.
  24. Strotsky AV, Fradkin SZ, Zhavrid EA, and Karpovich UA. Combined therapy of bladder cancer with the use of hyperthermia. *Strahlenther Onkol* 1991; 167: 346.
  25. Wang J, Li D, and Chen N. Intracavitary microwave hyperthermia combined with external irradiation in the treatment of esophageal cancer. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1996; 18: 51-54.
  26. You Q-S, Wang R-Z, Suen G-Q, Yan F-C, Gao Y-J, Cui S-R, Zhao J-H, Zhao T-Z, and Ding L. Combination pre-operative radiation and endocavitary hyperthermia for rectal cancer: long-term results of 44 patients. *Int J Hyperthermia* 1993; 9: 19-24.
  27. Kohno I, Kaneshige E, Fujiwara K, and Sekiba K. Thermochemotherapy (TC) for gynecologic malignancies. In: Overgaard J, ed. *Hyperthermic Oncology* 1984 volume 1. London, Taylor and Francis 1984: 753-756.
  28. Colombo R, Da Pozzo LF, Gev A, Freschi M, Gallus G, and Rigatti P. Neoadjuvant combined microwave induced local hyperthermia and topical chemotherapy versus chemotherapy alone for superficial bladder cancer. *J Urology* 1996; 155: 1227-1232.
  29. Colombo R, Da Pozzo LF, Salonia A, Rigatti P, Leib Z, Baniel J, Calderera E, and Pavone-Macaluso M. Multi-centric study comparing intravesical chemotherapy alone and with local microwave hyperthermia for prophylaxis of recurrence of superficial transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4270-4276.
  30. Engelhardt R, Neumann H, Müller U, and Löhr GW. Clinical studies in whole body hyperthermia. In: Sugahara T and Saito M, eds. *Hyperthermic Oncology* volume 2. London, Taylor and Francis 1989: 509-510.
  31. Kitamura K, Kuwano H, Watanabe M, Nozoe T, Yasuda M, Dumiyoshi K, Saku M, and Sugimacahi K. Prospective randomized study of hyperthermia combined with chemoradiotherapy for esophageal carcinoma. *J Surg Oncol* 1995; 60: 55-58.
  32. Sugimachi K, Kitamura K, Baba K, Ikebe M, Morita M, Matsuda H, and Kuwano H. Hyperthermia combined with chemotherapy and irradiation for patients with carcinoma of the oesophagus: a prospective randomized trial. *Int J Hyperthermia* 1992; 8: 289-295.
  33. De Graaf-Strukowska L, van der Zee J, van Putten WLJ, and Senan S. Factors influencing the outcome of radiotherapy in malignant mesothelioma of the pleura – a single institution experience with 189 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43: 511-516.
  34. Wessalowski R, Kruck H, Pape H, Kahn T, Willers R, and Göbel U. Hyperthermia for the treatment of patients with malignant germ cell tumors. A phase I/II study in ten children and adolescents with recurrent or refractory tumors. *Cancer* 1998; 82: 793-800.
  35. Wessalowski R, Schneider D, Mils O, Calaminus G, Engelbrecht V, Pape H, Engert J, Harms D, and Göbel U. An approach for cure: regional deep hyperthermia and PEI-chemotherapy in children and adolescents with unresectable malignant tumors. Presented at the 21th Annual Meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology, 2003.
  36. Rietbroek RC, Schilthuis MS, Bakker PJM, Van Dijk JDP, Postma AJ, González González D, Bakker AJ, Van der Velden J, Helmerhorst TJM, and Veenhof CHN. Phase II trial of weekly locoregional hyperthermia and cisplatin in patients with a previously irradiated recurrent carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1997; 79: 935-943.
  37. De Wit R, Van der Zee J, Van der Burg MEL, Kruit WH, Logmans A, Van Rhooon GC, and Verweij J. A phase I/II study of combined weekly systemic cisplatin and locoregional hyperthermia in patients with previously irradiated recurrent carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer* 1999; 80: 1387-1391.
  38. Perez CA, Gillespie B, Pajak T, Hornback NB, Emami B, and Rubin P. Quality assurance problems in clinical hyperthermia and their impact on therapeutic outcome: a report by the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989, 16: 551-558.
  39. Perez CA, Pajak T, Emami B, Hornback NB, Tupchong L, and Rubin P. Randomized phase III study comparing irradiation and hyperthermia with irradiation alone in superficial measurable tumors. Final report by the Radiation Therapy Oncology Group. *Am J Clin Oncol (CCT)* 1991, 14(2): 133-141.
  40. Emami B, Scott C, Perez CA, Asbell S, Swift P, Grigsby P, Montesano A, Rubin P, Curran W, Delrowe J, Arastu H, Fu K, and Moros E. Phase III study of interstitial thermoradiotherapy compared with interstitial radiotherapy alone in the treatment of recurrent or persistent human tumors: a prospectively controlled randomized study by the Radiation Therapy Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 34: 1097-1104.
  41. Van der Zee J, Van der Holt B, Rietveld PJM, Helle PA, Wijnmaalen AJ, Van Putten WLJ, and Van Rhooon GC. Reirradiation combined with hyperthermia in recurrent breast cancer results in a worthwhile local palliation. *Br J Cancer* 1999; 79: 483-490.
  42. Lee HK, Antell AG, Perez CA, Straube WL, Ramachandran G, Myerson RJ, Emami B, Molmenti EP, Buckner A, and Lockett MA. Superficial hyperthermia and irradiation for recurrent breast carcinoma of the chest wall: prognostic factors in 196 tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 365-375.

43. Fajardo LF. Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer Research* 1984; 44: 4826s-4835s.
44. Hiraoka M, Jo S, Akuta K, Nishimura Y, Takahashi M, and Abe M. Radiofrequency capacitive hyperthermia for deep-seated tumors II. Effect of thermoradiotherapy. *Cancer* 1987; 60: 128-135.
45. Lee CK, Song CW, Rhee JG, Foy JA, Levitt SH. Clinical experience using 8 MHz radiofrequency capacitive hyperthermia in combination with radiotherapy: results of a phase I/II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32: 733-745.
46. Wust P, Stahl H, Löffel J, Seebass M, Riess H, and Felix R. Clinical, physiological and anatomical determinants for radiofrequency hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1995; 11: 151-167.
47. Cavaliere R, Di Filippo F, Cavaliere F, Carlini S, Schiratti M, Anzà M, Garinei R, Callopoli A, Capua A, Impiombato FA, Perri P, and Psaila A. Clinical practice of hyperthermic extremity perfusion in combination with radiotherapy and chemotherapy. In: Seegenschmiedt MH, Fessenden P, and Vernon CC, eds. *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy volume 2*. Berlin, Springer Verlag 1996: 323-345.
48. Van der Zee J, and González González D. The Dutch Deep Hyperthermia Trial: results in cervical cancer. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 1-12.
49. Wust P, Fahling H, Helzel T, Kniephoff M, Włodarczyk W, Monich G, and Felix R. Design and test of a new multi-amplifier system with phase and amplitude control. *Int J Hyperthermia* 1998; 14: 459-477.
50. Van Rhoon GC, Rietveld PCM, and Van der Zee J, A 433 MHz Lucite Cone waveguide applicator for superficial hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1998; 14: 13-27.
51. Rietveld PJM, Van Putten WLJ, Van der Zee J, and Van Rhoon GC. Comparison of the clinical effectiveness of the 433 MHz Lucite Cone applicator with that of a conventional waveguide applicator in applications of superficial hyperthermia. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43: 681-687.
52. Wust P, Seebass M, Nadobny J, Deuffhard P, Monich G, and Felix R. Simulation studies promote technological development of radiofrequency phased array hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1996; 12: 477-494.
53. Lagendijk JJW. Hyperthermia treatment planning. *Phys Med Biol* 2000; 45: R61-R76.
54. Gellermann J, Wust P, Stalling D, Seebass M, Nadobny J, Beck R, Hege H-C, Deuffhard P, and Felix R. Clinical evaluation and verification of the hyperthermia treatment planning system Hyperplan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47: 1145-1156.
55. Carter DL, MacFall JR, Clegg ST, Wan X, Prescott DM, Charles HC, and Samulski TV. Magnetic resonance thermometry during hyperthermia for human high-grade sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 815-822.
56. Hentschel M, Dreher W, Wust P, Roll S, Leibfritz D, and Felix R. Fast spectroscopic imaging for non-invasive thermometry using the Pr[MOE-DO3A] complex. *Phys Med Biol* 1999; 44: 2397-2408
57. Jones E, Oleson JR, Prosnitz LR, et Al.. Randomized Trial of Hyperthermia and Radiation for Superficial Tumors. *J Clin Oncol* 2005 ; 23:3079-85).
58. Issels RD. Regional hyperthermia in high-risk soft tissue sarcomas. *Curr Opin Oncol* 2008;20:438-43.

## X INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL MUTAGENS

### *The Renaissance of Environmental Mutagenesis*

Palazzo dei Congressi  
Firenze, 20-25 Agosto 2009

ICEM



FIRENZE, ITALY, 2009

Per informazioni  
consultare il sito: [www.icem2009.org](http://www.icem2009.org)

Segreteria Congressuale: OIC srl, e-mail: [a.batistini@oic.it](mailto:a.batistini@oic.it)

# RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI DI XRCC1 E XRCC3 NELLA RADIOSENSIBILITÀ INDIVIDUALE: ANALISI DEL DANNO AL DNA INDOTTO DALLE RADIAZIONI IONIZZANTI

Poggioli T.<sup>1</sup>, Palma S.<sup>1</sup>, Cornetta T.<sup>2</sup>, Sterpone S.<sup>2</sup>, Novelli F.<sup>2</sup>,  
Tirindelli D.<sup>1</sup>, Cozzi R.<sup>2</sup>, Testa A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche ENEA C.R. Casaccia - Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia, "Università degli Studi Roma Tre"

e-mail: antonella.testa@enea.it

## Introduzione

La risposta biologica alle radiazioni ionizzanti presenta un'ampia variabilità inter-individuale: essa può essere determinata sia da differenze qualitative e quantitative dell'esposizione che dal *background* genetico di ciascun individuo. Le radiazioni ionizzanti interagiscono con le cellule provocando diverse conseguenze di cui il danno al DNA risulta essere il più importante. Tale danno richiede il coinvolgimento di un grande numero di proteine implicate nei meccanismi di riparazione e deputate al mantenimento dell'integrità strutturale [1]. È stato stimato che, all'interno di una popolazione generale, una buona percentuale (10-15%) di individui sani mostri un fenotipo con ridotta capacità (68-80%) di riparazione del DNA [2].

Esistono diversi meccanismi necessari per la riparazione delle differenti tipologie di danno al DNA: le rotture a singolo filamento (SSBs) vengono riparate principalmente attraverso il Nucleotide Excision Repair (NER) e il Base Excision Repair (BER), mentre i meccanismi attivi nella riparazione delle rotture a doppio filamento (DSBs) sono l'Homologous Recombination (HR) e il Non-Homologous End Joining (NHEJ).

I polimorfismi genetici presenti in un grande numero di geni della riparazione del danno al DNA sono stati proposti come fondamentali determinanti della variabilità individuale nella radiosensibilità. In particolare, i Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) continuano ad essere oggetto di numerosi studi sulla risposta cellulare alle radiazioni.

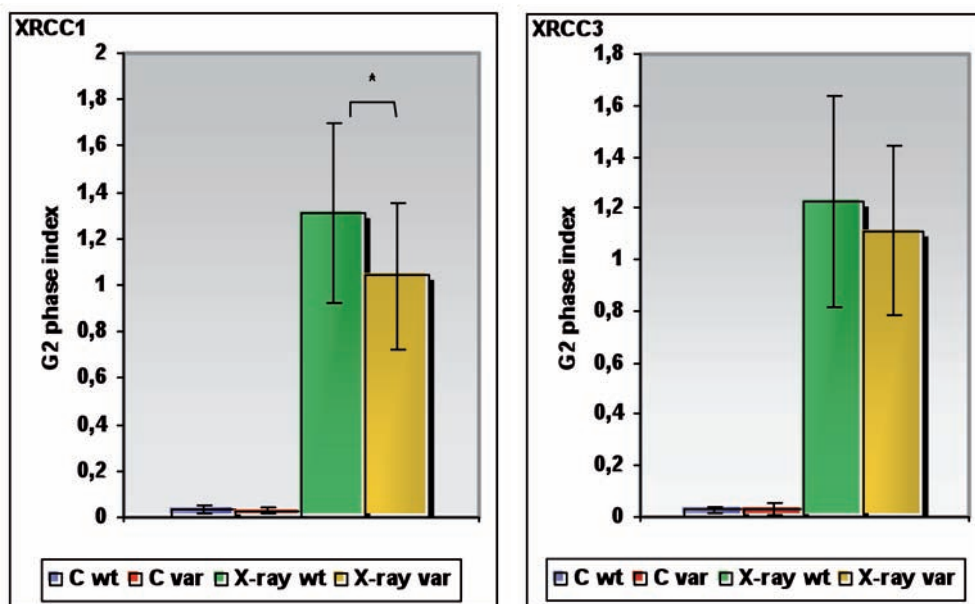
L'attenzione del nostro studio si è concentrata su due specifiche varianti di due geni della riparazione: la variante polimorfica Arg399Gln di XRCC1 che implica una transizione G>A e la variante polimorfica Thr241Met di XRCC3, legata ad una transizione C>T.

La proteina XRCC1 partecipa al meccanismo di riparazione del BER tramite un'attività di proteina *scaffold*, necessaria per convogliare sul sito di rottura i diversi complessi con cui interagisce (ligasi 3 $\alpha$ , PARP1-2, APE1, PNK, OGG1) [3]. XRCC3 è, invece, una proteina RAD51-simile che interviene nel meccanismo di riparazione dell'Homologous Recombination [4]. In letteratura esistono diversi lavori che indicano un'associazione, sia positiva che negativa, delle due varianti polimorfiche con un diverso grado di radiosensibilità ed una diversa suscettibilità allo sviluppo di alcune forme di cancro [5,6].

Il nostro obiettivo è stato valutare una possibile correlazione tra la presenza di questi polimorfismi ed una differente modulazione del danno al DNA indotto da radiazioni ionizzanti. L'approccio sperimentale di questo lavoro è avvenuto attraverso l'applicazione del *G<sub>2</sub> phase radiosensitivity assay*, considerato da molti come il *gold-standard* della radiosensibilità cromosomica [7,8]. Il *G<sub>2</sub> assay* è un saggio citogenetico che permette di valutare la presenza di danno al DNA di tipo cromatidico indotto nella fase post-replicativa del ciclo cellulare in linfociti di sangue periferico (PBL) [9]. Come è stato recentemente confermato, questo test permette di valutare chiaramente eventuali differenze nella radiosensibilità inter-individuale [10]. Il protocollo standard implica il trattamento di linfociti di sangue periferico con una dose di 0,4 Gy di raggi X e la successiva analisi delle aberrazioni cromatidiche rilevate dopo due ore dal trattamento.

## Risultati

Il *G<sub>2</sub> radiosensitivity assay* è stato applicato ad un totale di 41 soggetti sani di entrambi i sessi, selezionati all'interno di una popolazione totale di 150 individui in



**Figura 1.** Valori medi delle frequenze del  $G_2$  phase index. I dati sono divisi per genotipo relativo ad XRCC1 e XRCC3. \* $p < 0.05$  differenza significativa calcolata con unpaired Student t-test.

base al genotipo relativo ai polimorfismi dei geni XRCC1 (Arg399Gln) e XRCC3 (Thr241Met). Tale selezione ha permesso di ottenere una buona rappresentazione di tutte le classi genotipiche per i due geni in esame.

Il parametro di danno utilizzato per il confronto tra i diversi soggetti è il  $G_2$  phase index, che indica il valore netto del danno indotto. Questo si ottiene sottraendo il valore del danno basale presente nel campione di controllo al valore delle aberrazioni cromatidiche indotte da esposizione a raggi X.

Stratificando questi valori per i genotipi di XRCC1 e XRCC3, i risultati indicano la presenza di una minor frequenza di aberrazioni cromatidiche nei soggetti che portano la variante polimorfica di XRCC1 rispetto ai soggetti wild-type ( $p < 0,05$ ) (Figura 1; Tabella 1). Questo dato viene confermato anche combinando i genotipi di XRCC1 e XRCC3. Si riscontra infatti una differenza statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nel confronto tra i campioni che portano la variante di XRCC1 (omozigoti + eterozigoti) e quelli wild-type (Tabella 2). Al contrario, non è stata riscontrata alcuna differenza a carico del gene XRCC3.

### Discussione

I dati ottenuti sembrano indicare interessanti conclusioni che da un lato confermano alcune evidenze presenti in letteratura, mentre da un altro ne divergono. Le nostre aspettative erano in parte rivolte verso una maggiore differenza a carico del gene XRCC3, vista la sua documentata partecipazione ai meccanismi di ripara-

zione delle rotture a doppio filamento [11]. Questa specifica qualità di danno è esattamente quella rilevata tramite l'applicazione del  $G_2$  radiosensitivity assay.

Dal nostro studio è possibile indicare che XRCC1 interviene nella modulazione della riparazione del danno al DNA indotto da raggi X, e che esiste una differenza nella capacità riparativa tra la forma wild-type e la forma polimorfica Arg399Gln del gene. Tuttavia, sulla base dei nostri risultati, non ci è possibile affermare se questa modulazione corrisponda effettivamente con una maggiore efficienza nella riparazione.

La differenza nel danno al DNA osservata tra la forma wild-type e la forma polimorfica potrebbe dipendere da un'alterazione del dominio BRCTI della proteina determinata dalla presenza del polimorfismo. BRCTI è un dominio altamente conservato che permette l'interazione tra XRCC1 e alcune proteine coinvolte nel BER (PARP1-2, APE, Pol  $\beta$ ).

I risultati ottenuti, sembrano indicare una possibile partecipazione di XRCC1 nella riparazione delle rotture a doppio filamento. Questo dato viene supportato da alcuni lavori riportati in letteratura [12, 13, 14]. In questo meccanismo, XRCC1 interverrebbe nel posizionamento della *ligasi* necessaria per la fase terminale della riparazione delle rotture a doppio filamento.

Ulteriori test di danno al DNA e un'analisi della vitalità cellulare e del livello di induzione apoptotica nelle cellule dopo irraggiamento saranno utili per confermare i risultati da noi ottenuti.

**Tabella 1.** Valori medi delle frequenze del G<sub>2</sub> phase index raggruppati per genotipo.

Genotipo	No. Soggetti	CtA (v) ± SD		G <sub>2</sub> phase index
		Non trattato	Trattato	
<b>Totale</b>	41	0,030 ± 0,019	<b>1,202 ± 0,373*</b>	<b>1,165 ± 0,371*</b>
<b>XRCC1</b>				
•Arg399Arg (wt)	19	0,031 ± 0,017	1,336 ± 0,386	1,310 ± 0,386
•Arg399Gln (het)	7	0,031 ± 0,016	1,100 ± 0,305	1,057 ± 0,305
•Gln399Gln (hom)	15	0,030 ± 0,020	<b>1,080 ± 0,346**</b>	<b>1,033 ± 0,331**</b>
•Arg399Gln + Gln399Gln (var)	22	0,030 ± 0,019	<b>1,086 ± 0,327***</b>	<b>1,041 ± 0,316***</b>
<b>XRCC3</b>				
•Thr241Thr (wt)	19	0,029 ± 0,013	1,263 ± 0,409	1,226 ± 0,412
•Thr241Met (het)	11	0,035 ± 0,022	1,000 ± 0,260	0,964 ± 0,238
•Met241Met (hom)	11	0,029 ± 0,021	1,300 ± 0,352	1,264 ± 0,356
•Thr241Met + Met241Met(var)	22	0,032 ± 0,013	1,150 ± 0,339	1,114 ± 0,333

\*P < 0,0001 differenza significativa con il non trattato calcolata con paired Student t-test

\*\*P ≤ 0,05 differenza significativa confrontando i soggetti wt con i soggetti hom per XRCC1 calcolata con unpaired Student t-test.

\*\*\*P ≤ 0,05 differenza significativa confrontando i soggetti wt con i soggetti var per XRCC1 calcolata con unpaired Student t-test.

**Tabella 2.** Valori medi delle frequenze del G<sub>2</sub> phase index in relazione alle combinazioni dei differenti polimorfismi genetici.

Genotipo	No. Soggetti	CtA (v) ± SD		G <sub>2</sub> phase index	
		Non trattato	Trattato		
XRCC1 399 Arg →Gln	XRCC3 241 Thr →Met				
wt	wt	9	0,027 ± 0,009	1,455 ± 0,441	1,422 ± 0,449
var	wt	10	0,031 ± 0,017	<b>1,090 ± 0,303*</b>	<b>1,050 ± 0,295*</b>
wt	var	10	0,035 ± 0,022	1,230 ± 0,312	1,210 ± 0,307
var	var	12	0,030 ± 0,021	<b>1,083 ± 0,358**</b>	<b>1,033 ± 0,345**</b>

CtA (v) = frequenza aberrazioni cromatidiche; wt= allele wild type; var= omozigote + eterozigote

\*P ≤ 0,05 differenza significativa confrontando il wt/wt con il var/wt calcolata con unpaired Student t-test.

\*\*P ≤ 0,05 differenza significativa confrontando il wt/wt con il var/var calcolata con unpaired Student t-test.

**Bibliografia**

- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411, 366-374.
- Hu, J.J., Mohrenweiser, H.W., Bell, D.A., Leadon, S.A., Miller, M.S. (2002), Symposium overview: genetic polymorphisms in DNA repair and cancer risk, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185, 64-73.
- Caldecott, K. (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 2, 955-69.
- Liu, Y., J. Masson, R. Shah, P. O'Regan & S. West(2004) RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science*, 303, 243-6
- Duell, E., J. Wiencke, T. Cheng, A. Varkonyi, Z. Zuo, T. Ashok, E. Mark, J. Wain, D. Christiani & K. Kelsey

- (2000). Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, 21, 965-71.
6. Winsey, S., N. Haldar, H. Marsh, M. Bunce, S. Marshall, A. Harris, F. Wojnarowska & K. Welsh (2000). A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res*, 60, 5612-6.
  7. De Ruyck, K., Van Eijkeren, M., Claes, K., Morthier, R., De Paepe, A., Vral, A., De Ridder, L., Thierens, H. (2005). Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: association with single nucleotide polymorphisms in XRCC1, XRCC3, and OGG1 genes and in vitro chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 15;62(4):1140-9.
  8. Smart V, Curwen GB, Whitehouse CA, Edwards A, Tawn EJ. (2003) Chromosomal radiosensitivity: a study of the chromosomal G(2) assay in human blood lymphocytes indicating significant inter-individual variability. (2005). *Mutat Res.*, 528(1-2):105-10.
  9. Vral, A., H. Thierens, A. Baeyens & L. De Ridder (2002) Induction and disappearance of G2 chromatid breaks in lymphocytes after low doses of low-LET gamma-rays and high-LET fast neutrons. *Int J Radiat Biol*, 78, 249-57.
  10. Borgmann, K., Haeberle, D., Doerk, T., Busjahn, A., Stephan, G., Dikomey, E. (2007) Genetic determination of chromosomal radiosensitivities in G0- and G2-phase human lymphocytes. *Radiother Oncol.* 2, 196-202.
  11. Liu, N., J. Lamerdin, R. Tebbs, D. Schild, J. Tucker, M. Shen, K. Brookman, M. Siciliano, C. Walter, W. Fan, L. Narayana, Z. Zhou, A. Adamson, K. Sorensen, D. Chen, N. Jones & L. Thompson (1998) XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell*, 1, 783-93.
  12. Audebert, M., B. Salles & P. Calsou (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 279, 55117-26.
  13. Audebert M, B. Salles & P. Calsou (2008) Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochem and Biophys Res Communications* 369, 982-988
  14. Lévy, N., A. Martz, A. Bresson, C. Spenlehauer, G. de Murcia & J. Ménissier-de Murcia (2006) XRCC1 is phosphorylated by DNA-dependent protein kinase in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 34, 32-41.

## FEDERAZIONE ITALIANA RICERCHE SULLE RADIAZIONI



### WORKSHOP INTERDISCIPLINARE FIRR

# Radiazioni: Biologia, Clinica, Ambiente e Protezione

ENEA - Centro Ricerche Casaccia - Roma, 14 maggio 2009

### Informazioni generali

Il Workshop, a numero chiuso e senza quota d'iscrizione, è aperto ai  
Soci delle Società Federate FIRR  
Crediti E.C.M. per Medico, Biologo, Fisico, Farmacista e Chimico.

### Segreteria Organizzativa FIRR

Sezione Tossicologia e Scienze Biomediche ENEA - Centro Ricerche Casaccia s.p. 016  
Via Anguillarese 301 - 00123 Roma Tel.: 06 30484671 – Fax: 06 30484891  
e-mail: [devita@enea.it](mailto:devita@enea.it) - <http://biotec.casaccia.enea.it/firr/>

# È arrivato il momento del calore in **Radioterapia**



## SISTEMI PER IPERTERMIA

- » **3D Regionale Profonda**
- » **Superficiale, Interstiziale ed Endocavitaria**

**TECNOSAN**  
T e c n o l o g i e  
S a n i t a r i e

Importatore esclusivo per l'Italia dei  
sistemi per ipertermia BSD MEDICAL



Via S. Bernadino 19  
38100 TRENTO



info@tecnosan.it



www.tecnosan.it