UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia "Galileo Galilei"

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Analisi della sopravvivenza di cellule tumorali trattate con Ag-111 libero per il progetto ISOLPHARM

Relatore

Prof. Marcello Lunardon

Correlatore

Dr. Alberto Arzenton

Laureando

Luca Bortot

Anno Accademico 2023/2024

Abstract

Il progetto ISOLPHARM ha l'obiettivo di produrre radiofarmaci innovativi a partire dai radionuclidi ottenibili tramite la tecnica ISOL (Separazione Isotopica On-Line) nella struttura SPES, recentemente entrata in funzione ai Laboratori Nazionali INFN di Legnaro. Il progetto è supportato da una vasta collaborazione nazionale, che comprende diverse sezioni INFN, università e ospedali.
In questo contesto, un grande interesse è stato attirato dal radioisotopo beta-emettitore Ag-111, ottimo candidato per applicazioni terapeutiche e teranostiche contro vari tipi di cancro. Per caratterizzare gli effetti della sua radiazione a livello cellulare, la collaborazione ISOLPHARM ha intrapreso nel 2024 una campagna di esperimenti *in vitro* utilizzando cellule tumorali.
La presente tesi ha lo scopo di seguire uno di questi esperimenti, con particolare attenzione alla dosimetria cellulare e all'analisi dei dati di sopravvivenza ottenuti attraverso un saggio clonogenico. Si procede quindi esaminando le curve di sopravvivenza in funzione dell'attività somministrata e della dose assorbita e si valuta quale modello biofisico si possa adattare meglio alla spiegazione dei dati. Infine si valuta l'effetto del rateo di dose sulla sopravvivenza cellulare.

Indice

Abstract **iii**

1 Introduzione **1**
1.1 Motivazione 1

2 Modelli biofisici per la sopravvivenza cellulare **3**
2.1 Dose assorbita 3
2.2 Interazione della radiazione con il DNA 3
2.3 Modello lineare quadratico 4
2.4 Modello a riparazione indotta 5

3 Metodologia sperimentale e analisi dei risultati **7**
3.1 Tecnica del Test Clonogenico 7
3.2 Dati Sperimentali 8
3.3 Stima della Frazione di Sopravvivenza 10
3.4 Analisi dei Risultati 11
3.5 Confronto e Discussione dei Risultati 13

4 Conclusioni **15**

Bibliografia **16**

1 Introduzione

1.1 Motivazione

Uno degli obiettivi principali della medicina è fornire strumenti efficienti ed efficaci per la diagnosi e il trattamento di un'ampia gamma di malattie e tumori. Tra gli strumenti più studiati e sviluppati nella medicina nucleare ci sono i radiofarmaci, ossia farmaci contenenti radionuclidi che somministrano una dose predefinita di radiazione ai tessuti bersaglio per scopi diagnostici o terapeutici. La radiazione ad alta penetrazione, come l'emissione di raggi γ, è principalmente usata per la diagnosi, mentre le emissioni di particelle, come α, β ed elettroni Auger, inducono la morte cellulare. L'intento finale dei trattamenti a base di radionuclidi è somministrare un livello citotossico di radiazioni al sito della malattia senza compromettere i tessuti sani.
La maggior parte dei radioisotopi attualmente in uso per la terapia radiofarmaceutica sono prodotti in ciclotroni o reattori nucleari, con possibili limitazioni dovute a costi elevati dei bersagli altamente arricchiti e contaminanti indesiderati. Un metodo di produzione ideale, alternativo a questi metodi tradizionali, è in fase di sviluppo presso i Laboratori Nazionali INFN di Legnaro. Il progetto ISOLPHARM, nato nel 2017, ha lo scopo di fornire una vasta gamma di radioisotopi ad alta purezza sfruttando la tecnologia ISOL (Isotope Separation On-Line) nella nuova facility SPES (Selective Production of Exotic Species) [1]. ISOLPHARM sfrutta un fascio di protoni accelerato a 40 MeV da un ciclotrone che collidendo con un bersaglio di carburo di uranio induce reazioni nucleari che generano radionuclidi ricchi di neutroni [2]. Questi vengono successivamente ionizzati e accelerati. Sfruttando un separatore di massa elettromagnetico si è in grado di creare un fascio isobarico eliminando i contaminanti isotopici. Il fascio ultrapuro viene poi raccolto da un bersaglio secondario, che viene processato per recuperare i radionuclidi e così i pochi contaminanti isobarici rimasti possono essere eliminati per separazione chimica. Il processo è riassunto in figura 1.1. Il punto cruciale è proprio la separazione di massa che permette di selezionare gli isotopi desiderati e ottenere radionuclidi medicali con un'attività specifica estremamente elevata.

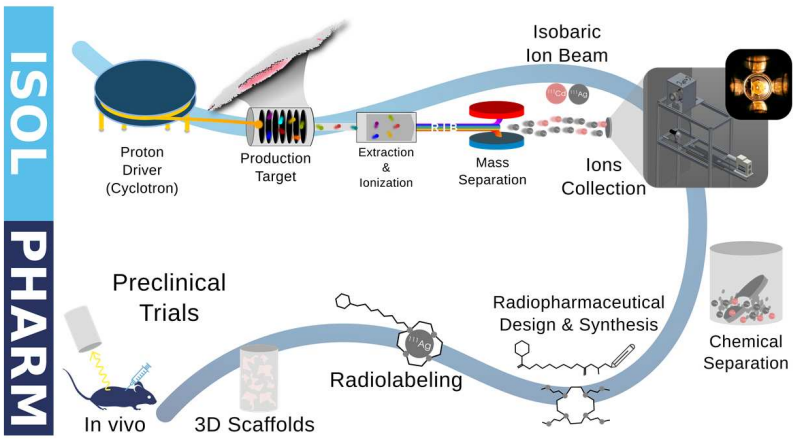


Figura 1.1: schema del metodo ISOLPHARM

Il metodo ISOLPHARM sarà quindi in grado di fornire radionuclidi difficilmente producibili con altri metodi; tra questi, l'Ag-111 si è rivelato particolarmente promettente per la terapia radiofarmaceutica. Esso è un emettitore β^- con tempo di dimezzamento di 7.45 giorni, energia media 360 keV, penetrazione media dei tessuti di 1.8 mm e una bassa percentuale ($\sim$ 6%) di emissione γ associata (Figura 1.2). Queste caratteristiche lo rendono un promettente nuovo candidato per la TRT (*Targeted Radionuclide Therapy*). La produzione in forma altamente pura ottenuta utilizzando la tecnica ISOL e la sua somministrazione mirata per scopi medici sono attualmente oggetto di studio all'interno del progetto ISOLPHARM. [3]
In particolare è in corso ADMIRAL (*Advanced Dosimetry Methods and In-vitro Radiobiology of Ag-111 Labeled radiopharmaceuticals*), un nuovo esperimento che ha lo scopo di valutare il potere diagnostico e terapeutico del radionuclide Ag-111. ADMIRAL è diviso in 4 Work Packages:

- WP1 *Produzione del radiofarmaco*: mentre la facility SPES è in costruzione, l'Ag-111 viene prodotto a Pavia presso il Laboratorio Energia Nucleare Applicata (LENA) nel reattore nucleare TRIGA Mark II.
- WP2 *β-imaging*: finalizzato allo sviluppo di un nuovo detector 2-D per β-imaging ad alta risoluzione.
- WP3 *γ-imaging*: riguardante la progettazione, simulazione e costruzione di una γ-camera per la rilevazione delle radiazioni γ derivanti dal decadimento di Ag-111 e la successiva produzione di immagini.
- WP4 *Targeted radiobiology*: finalizzato all'indagine degli effetti di Ag-111 sulla sopravvivenza cellulare. L'argento-111 viene testato *in vitro* in colture 2D e 3D con diversi livelli di attività e tempi di esposizione (Figura 1.3). I test sono associati a simulazioni effettuate con Geant4, PHITS e MCNP che permettono di studiare la dosimetria associata. L'obiettivo è quello di migliorare la predittività e le strategie dei test, in modo da ridurre il numero di test *in vivo* ed *ex vivo* su animali.

Il seguente lavoro di tesi si inserisce nel WP4 ed ha lo scopo di studiare la sopravvivenza cellulare in seguito a somministrazione di Ag-111 libero a delle colture cellulari. Più precisamente si focalizza sull'analisi di un esperimento avvenuto in ottobre 2024 a Pavia, con il fine di quantificare la frazione di sopravvivenza in relazione alla dose somministrata.

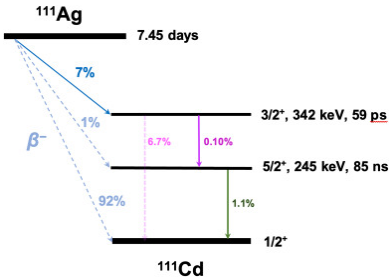


Figura 1.2: Schema del decadimento dell'Ag-111

Figura 1.3: Studio della sopravvivenza cellulare *in vitro* 2D (WP4)

2 Modelli biofisici per la sopravvivenza cellulare

2.1 Dose assorbita

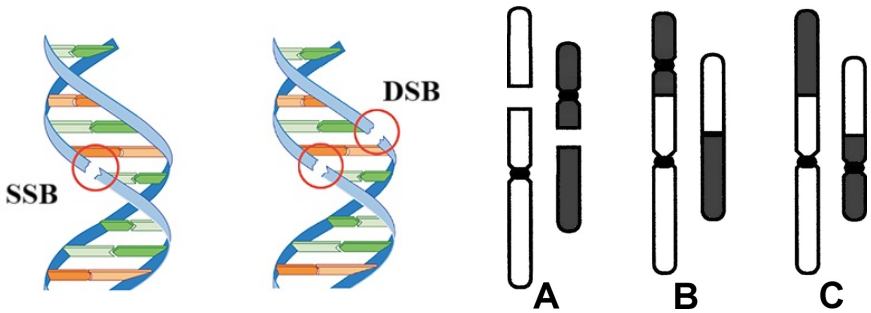
In medicina nucleare le radiazioni sono utilizzate sia in diagnosi che in terapia. La radiazione ionizzante viene quantificata in funzione dell'energia rilasciata nella materia. Nel caso in analisi, in cui si vuole studiare la sopravvivenza delle cellule in seguito alla somministrazione di Ag-111, si considera la dose assorbita. Per l'analisi si utilizzerà il formalismo presentato dallo schema MIRD (*Medical Internal Radiation Dose*) [4]. Si supporrà che le masse della sorgente e del bersaglio rimangano invariate durante il periodo di irradiazione, per cui la dose media assorbita può essere espressa nella seguente forma indipendente dal tempo:

$$D(r_T, T_D) = \sum_{r_S} \tilde{A}(r_S, T_D) S(r_T \leftarrow r_S) \tag{2.1}$$

in cui $\tilde{A}(r_S, T_D) = \int_0^{T_D} A(r_S, t)dt$ è l'attività della sorgente r_S integrata nel periodo di esposizione T_D e $S(r_T \leftarrow r_S)$ è un valore che dipende dal radionuclide ed esprime il tasso medio di dose assorbito dal bersaglio r_T per unità di attività nella sorgente. In aggiunta si ricorda che il valore di S, oltre a dipendere dal tipo di radiazione, è legato alle caratteristiche geometriche del sistema, al materiale e alle caratteristiche fisiche e compositive del bersaglio.

2.2 Interazione della radiazione con il DNA

Un isotopo deve essere in grado di causare danno rilevante alle cellule malate per poter essere usato per terapia radionuclidica. Il bersaglio di questo tipo di terapia è il DNA, infatti altre parti della cellula si sono dimostrate soltanto minimamente sensibili alla radiazione [5]. La radiazione può danneggiare il DNA direttamente, causando ionizzazione e rompendo i legami della molecola stessa, oppure indirettamente, ionizzando altre molecole (in particolare acqua) che possono poi andare a interagire rompendo il DNA. Da queste interazioni possono aver luogo diversi tipi di lesioni, ma generalmente si possono suddividere in due categorie: danno alle basi e rotture dei filamenti.
Il danno alle basi rappresenta cambiamenti strutturali nelle coppie di basi del DNA che costituiscono il codice genetico. Le rotture dei filamenti (*Strand Breaks*) si riferiscono a danni allo scheletro zucchero-fosfato che compromettono la struttura della doppia elica del DNA.
Quest'ultime si possono ulteriormente suddividere in rotture a singolo filamento (*Single-Strand Breaks SSB*), dove un solo filamento è danneggiato, e rotture a doppio filamento (*Double-Strand Breaks DSB*), dove i filamenti opposti sono danneggiati in prossimità (tipicamente a distanza inferiore di dieci coppie di basi o 4 nm) e possono portare alla completa separazione della molecola di DNA.
Danni alle basi e SSBs hanno soltanto un impatto biologico minimo. In entrambi i casi, è probabile che la struttura generale della molecola di DNA rimanga intatta e la cellula possa riparare il danno velocemente e accuratamente sfruttando il filamento opposto non danneggiato come modello per garantire l'integrità genetica.
Le DSBs, nonostante la loro relativa rarità, sono ampiamente considerate come il fattore primario dell'effetto radiobiologico nelle cellule. Infatti, corrispondendo alla rottura di due filamenti, comportano una modifica o perdita di più coppie della base, che, in assenza del filamento complementare facente da modello, necessitano di processi più complessi per la riparazione. DSBs possono formarsi



(a) (b)

Figura 2.1: a) Schema Single Strand Break e Double Strand Break. b) Schema aberrazione cromosomica [7].

direttamente dall'interazione di una singola particella incidente oppure da una combinazione di SSB e altri danni da multiple particelle.
Dall'esposizione di una cellula a radiazione ionizzante si hanno mediamente 30-40 DSBs per Gray [6], tuttavia anche in cellule relativamente radiosensibili si osserva meno di un evento letale per Gray. Ciò indica che la maggior parte delle DSBs vengono riparate correttamente, nonostante siano considerate la causa primaria per la morte cellulare. I principali meccanismi per la riparazione di DSBs sono non-homologous end joining (NHEJ) e homologous recombination (HR). Sebbene questi garantiscano che i filamenti siano ricombinati resta comunque un rischio di riparazione scorretta che può avere effetti negativi sulla cellula.
Una riparazione errata può introdurre piccole variazioni al genoma per la mancanza di un modello di riferimento per il filamento. Si può avere la perdita, duplicazione o alterazione di una o qualche coppia di basi. Queste mutazioni solitamente hanno un impatto trascurabile, spesso sono stabili e compatibili con la sopravvivenza e la proliferazione della cellula, anche se occasionalmente possono dimostrarsi cancerogene. Errori di questo tipo sono i più comuni, più raramente può però succedere che durante la riparazione avvenga l'unione scorretta di due estremità appartenenti a DSBs distinti. Questo causa una riorganizzazione del materiale genetico su larga scala ed è anche conosciuto come aberrazione cromosomica. Nonostante le aberrazioni cromosomiche siano molto rare in relazione al numero di DSBs prodotti, sono l'effetto delle radiazioni con maggiori conseguenze biologiche e rendono la sopravvivenza della cellula molto difficile. Una delle principali ragioni per cui esse portano alla morte è legata alla compromissione della divisione cellulare.
Nel complesso si hanno una serie di diversi effetti che contribuiscono alla morte delle cellule. Per descrivere la loro relazione con le dosi di radiazione da somministrare per trattamenti, risultano di fondamentale importanza i modelli matematici, che permettono di approssimare un'ampia gamma di processi biologici. Tra questi il modello lineare quadratico LQ è uno dei più utilizzati ed è il metodo preferito per caratterizzare gli effetti di radiazioni sia in laboratorio che in clinica.

2.3 Modello lineare quadratico

Il modello lineare quadratico è tra gli strumenti più utili per gli studi radiobiologici ed è usato estensivamente per analizzare e prevedere la risposta a radiazione ionizzante sia *in vitro* che *in vivo*. Fornisce una semplice relazione tra la sopravvivenza cellulare S, ovvero la frazione di cellule che sopravvivono, e la dose assorbita D:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \tag{2.2}$$

dove α e β sono paramentri che descrivono la radiosensibilità della cellula.
L'andamento della curva di sopravvivenza, quando rappresentata in scala logaritmica, è quadratico. Come si vede nell'esempio in figura 2.2, la regione iniziale è dominata dal termine lineare α a basse dosi, ed è seguita da una curvatura crescente man mano che il termine quadratico β diventa più significativo. Il grado di curvatura viene spesso definito in termini del rapporto α/β (questo ha unità di misura in Gray) e corrisponde alla dose in cui i contributi lineari α e quadratici β sono uguali. Di conseguenza, le cellule con un alto rapporto α/β mostrano un tasso di mortalità cellulare relativamente

costante all'aumentare della dose, mentre quelle con un basso rapporto α/β mostrano una curvatura pronunciata.
Il modello lineare-quadratico descrive la morte cellulare causata dalla radiazione ionizzante attraverso due meccanismi principali, rappresentati da un contributo lineare e uno quadratico rispetto alla dose somministrata.

- Contributo lineare (danno diretto): le singole tracce di ionizzazione possono causare direttamente danni letali al DNA, come rotture a doppio filamento. Questi danni sono proporzionali alla dose ricevuta, poiché ogni traccia è in grado di provocare un danno indipendentemente dalle altre. Questo meccanismo rappresenta il termine lineare del modello.

- Contributo quadratico (riparazione errata): quando due DSB, originate da tracce di ionizzazione distinte, interagiscono erroneamente durante i processi di riparazione, si generano lesioni letali. Questo fenomeno, noto come riparazione binaria erronea, è proporzionale al quadrato della dose. Poiché le tracce di ionizzazione sono indipendenti, le due DSB possono verificarsi in momenti diversi. Ciò offre alle cellule il tempo di riparare una DSB prima che interagisca con un'altra. Tuttavia, se la riparazione fallisce, il risultato è una lesione letale.

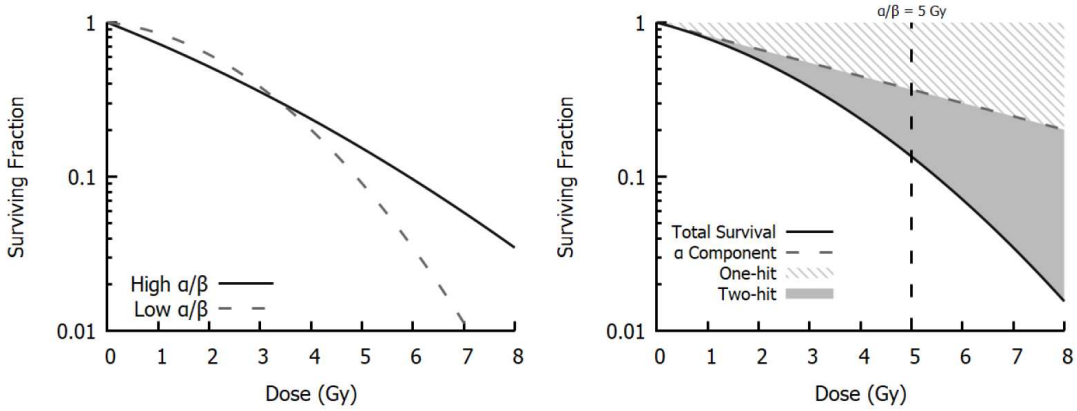


Figura 2.2: Esempio di curve LQ [8]

2.4 Modello a riparazione indotta

Nonostante il modello lineare quadratico fornisca generalmente una buona descrizione degli effetti della radiazione a dosi elevate, nel caso di basse dosi non si adatta adeguatamente alla risposta cellulare. Infatti negli ultimi anni sono stati studiati più approfonditamente gli effetti radio-biologici a basse dosi e fatte importati scoperte sulla sopravvivenza cellulare caratterizzata dall'iper-radiosensibilità a basse dosi (HRS).
Come accennato nella sezione 2.2, l'estrema sensibilità delle cellule durante la mitosi implica una riduzione notevole della sopravvivenza se il DNA è danneggiato in questo processo. Per questo le cellule hanno un meccanismo di difesa (G2 checkpoint arrest) che previene l'inizio della mitosi fintanto che il danno non è riparato. Le cellule però possono non essere in grado di riconoscere piccole quantità di danno, originando così la cosiddetta *low-dose hypersensitivity*: a dosi molto basse le cellule sfuggono al G2 arrest ed hanno un elevato rischio di morte, mentre a dosi elevate si attiva l'arresto dando alle cellule ulteriore tempo per la riparazione ed aumentando le probabilità di sopravvivenza.
Per questo a basse dosi risulta più utile applicare al posto del modello LQ il modello a riparazione indotta IR (*Induced Repair model*) di Joiner [9]. I dati provenienti da diversi laboratori hanno ora verificato in modo inequivocabile l'esistenza dell'iper-radiosensibilità a basse dosi e dimostrato che la sopravvivenza cellulare a basse dosi non può essere prevista per la maggior parte delle linee cellulari semplicemente facendo un'estrapolazione a ritroso delle misurazioni effettuate a dosi più alte.

Il modello a riparazione indotta (IR) è descritto dall'equazione:

$$S = exp\left\{-\alpha_r\left(1+\left(\frac{\alpha_s}{\alpha_r}-1\right)e^{-D/D_c}\right)D-\beta D^2\right\} \tag{2.3}$$

In questa il valore di α che descrive la regione HRS (α_s) a basse dosi è diverso da quello che descrive la risposta ad alte dosi (α_r). Il valore D_c di dose critica indica il punto di transizione in cui si passa da HRS ad un aumento della radioresistenza IRR (*Increased RadioResistance*). A dosi molto elevate ($D \gg D_c$), l'equazione tende a un modello LQ con parametri α_r e β, mentre a dosi molto basse ($D \ll D_c$), tende sempre a un modello LQ ma con parametri α_s e β. L'andamento della curva è mostrato nel grafico esemplificativo di figura 2.3.

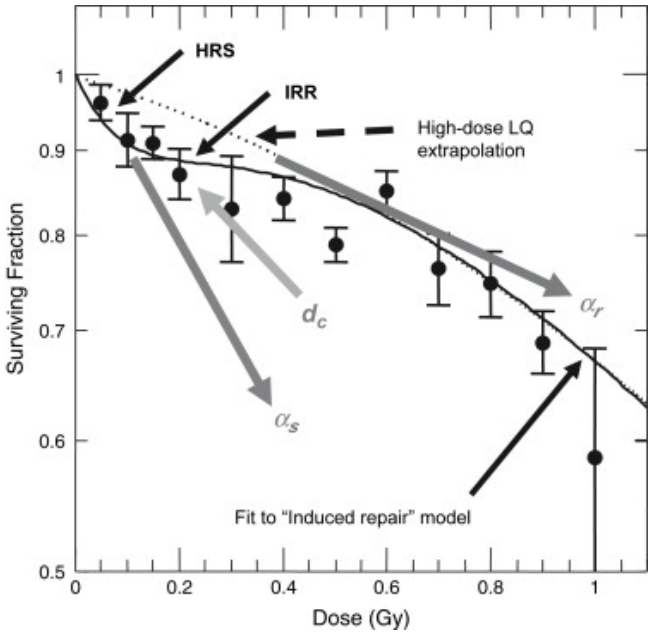


Figura 2.3: Esempio di curva IR. [10]

3 Metodologia sperimentale e analisi dei risultati

Si presenta di seguito l'esperimento del progetto ADMIRAL svolto a ottobre 2024 presso il laboratorio LENA dell'Università di Pavia, che ha il fine di studiare gli effetti della somministrazione di Ag-111 in forma libera sulla sopravvivenza di cellule tumorali.
In continuità con gli esperimenti svolti nei mesi di aprile e luglio [11], l'esperimento in analisi ha lo scopo di approfondire e sviluppare ulteriormente i risultati ottenuti. Mentre nei precedenti esperimenti è stata utilizzata una conta in camera di Burker come metodo per stimare la frazione di sopravvivenza cellulare, in questo esperimento si effettua un saggio clonogenico.

3.1 Tecnica del Test Clonogenico

L'esperimento è stato condotto dall'Unità Integrata di Chirurgia Sperimentale, Microchirurgia Avanzata e Medicina Rigenerativa del Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche dell'Università di Pavia e consiste nella somministrazione di Ag-111 libero a colture cellulari *in vitro*. Vengono studiati gli effetti di diverse attività specifiche e di diversi tempi di esposizione definiti a partire dai risultati e dalle misure degli esperimenti precedenti. Il radionuclide è stato prodotto al LENA a partire da un bersaglio arricchito di Pd-110 tramite la reazione $^{110}\mathrm{Pd}(n,\gamma)^{111}\mathrm{Pd} \rightarrow^{111} \mathrm{Ag} + e^- + \bar{\nu}_e$.
L'esperimento è stato eseguito utilizzando la linea cellulare di osteosarcoma murino UMR-106, un tipo di cellula tumorale particolarmente adatta a test preliminari grazie alla sua facilità di trattamento in laboratorio. Poiché è stato utilizzato il radionuclide libero e non direzionato, non è stato necessario scegliere cellule che esprimessero marcatori specifici. La linea cellulare cresce in adesione su terreno DMEM arricchito con il 10% di siero fetale bovino e l'1% di gentamicina. 48 ore prima dell'esposizione, sono state preparate 3 piastre Petri per ogni concentrazione di attività prescelta, ognuna seminata con 10.000 cellule. Prima della somministrazione del radionuclide, tutte le piastre sono state osservate al microscopio per verificarne l'omogeneità. Inoltre, è stato preparato un campione di controllo, a cui non è stato somministrato l'Ag-111, per permettere un confronto con le piastre sottoposte a irraggiamento.
L'attività della soluzione contenente l'Ag-111 è stata determinata con spettroscopia gamma utilizzando un rivelatore al germanio disponibile presso il laboratorio LENA di Pavia. Il sistema di misura, comprensivo del software proprietario, presenta un'incertezza del 10%. È stato deciso di preparare due campioni cellulari da esporre alla stessa dose, ma con tempi di irradiazione differenti, pari a 4 giorni e 6 giorni, al fine di confrontare gli effetti dell'assorbimento della dose in intervalli di tempo diversi e valutare l'influenza del rateo di dose sulla sopravvivenza cellulare. Dopo aver stabilito le attività da somministrare in base alle dosi desiderate e aver sostituito il terreno arricchito presente nelle piastre Petri, il radioisotopo è stato somministrato alle cellule utilizzando una pipetta a singolo canale VWR EHP per garantire un dosaggio preciso della soluzione. Tutte le procedure sulle piastre Petri sono state eseguite sotto cappa, in condizioni sterili. Al termine della somministrazione, le cellule sono state collocate in un incubatore Series 8000DH CO2 Incubator - Thermo Scientific.
Al termine del tempo di osservazione prestabilito, dopo aver eliminato il terreno arricchito, le cellule contenute nelle 3 Petri sono state così trattate:

- 1 Petri: fissazione con etanolo 70% e colorazione con Blu di Toluidina allo scopo di poter osservare macroscopicamente e microscopicamente la crescita e la morfologia cellulare;
- 2 Petri: tripsinizzazione per la risospensione delle cellule; mix delle due aliquote e conteggio in camera di Burker delle cellule presenti nelle varie condizioni esaminate. In seguito alla conta è

stato predisposto il test di clonogenicità.

La valutazione della sopravvivenza delle cellule esposte a dosi crescenti di Ag-111 per 4 e 6 giorni è stata effettuata mediante il test di clonogenicità. Al termine del tempo di contatto le cellule trattate e quelle dei rispettivi controlli, dopo opportuna diluizione, sono state seminate a 3/4 concentrazioni diverse in 3 capsule Petri ciascuna. Le concentrazioni cellulari sono state scelte sulla base della sopravvivenza attesa, entro un intervallo compreso tra 50 e 1000 cellule. Dopo un periodo di coltura di 8 giorni, le colonie cellulari originatesi nelle capsule Petri sono state lavate con tampone Hank, fissate con etanolo 70% e colorate con blu di toluidina. In ogni capsula Petri sono state contate le colonie costituite da un numero uguale o maggiore di 50 cellule, in quanto derivanti da cellule sopravvissute al trattamento. La frazione di sopravvivenza è stimata a partire dal rapporto tra l'efficienza di piastramento (EP) del campione trattato e quella del controllo, dove l'EP è definita come il rapporto tra le colonie contate e le cellule seminate.

3.2 Dati Sperimentali

Di seguito vengono presentati i risultati sperimentali, successivamente utilizzati per l'analisi. La dose è stata calcolata seguendo lo schema MIRD, a partire dalla relazione $D(T) = \int_0^T SA_c e^{-\lambda t} dt$, che porta alla seguente espressione della dose in funzione del tempo di esposizione T al variare della concentrazione di attività somministrata A_c:

$$D(T) = S \cdot A_c \cdot \frac{1 - e^{-\lambda T}}{\lambda} \tag{3.1}$$

dove λ è la a costante di decadimento dell'Ag-111 e vale $\lambda = (107.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}\text{s}^{-1}$ [12], mentre S è l'S-value specifico S(terreno→nucleo), che descrive la dose assorbita nel nucleo cellulare partendo dall'attività distribuita nel terreno di coltura.
Come introdotto nel capitolo precedente, quest'ultimo è una grandezza complessa che tiene conto delle proprietà fisiche e geometriche del sistema, oltre che delle caratteristiche del radionuclide utilizzato. Un valore di S adatto al contesto dell'esperimento è stato calcolato nella tesi di E. Reniero [13] tramite simulazioni Monte Carlo con il codice Geant4, dove è stato osservato che, per determinare l'S-value della radiazione di Ag-111 nel terreno di coltura, è sufficiente considerare una sfera di terreno radioattivo con raggio di 3 mm.
Nel caso in analisi, l'Ag-111 è presente in forma libera e non si considerano meccanismi di internalizzazione cellulare. La dose assorbita da una cellula è stata precedentemente stimata in due scenari distinti:

- Distribuzione uniforme nel mezzo extracellulare: il radionuclide è distribuito omogeneamente nell'ambiente circostante.
- Distribuzione equamente suddivisa tra ambiente e citoplasma: parte del radionuclide è presente nel citoplasma della cellula, mentre il resto rimane nel mezzo extracellulare.

Come mostrato nella tesi di C. Spadetto [11], il contributo alla dose derivante dall'effetto del citoplasma sul nucleo è trascurabile rispetto a quello dell'ambiente sul nucleo. Per questo motivo, il calcolo è effettuato considerando solo quest'ultimo contributo. Il valore di S utilizzato è dunque $S = 5.8 \cdot 10^{-11}\text{Gy/Bq/s} \cdot \text{ml}$, ricavato dalla simulazione di E. Reniero, con un'incertezza dell'ordine dell'1%.
I risultati ottenuti dalle conte cellulari effettuate con la camera di Burker per i tempi di esposizione di 4 e 6 giorni sono presentati rispettivamente nelle Tabelle 3.1 e 3.2. Nelle tabelle sono riportate dose, attività, la media tra i due conteggi delle cellule per millilitro nelle Petri e il numero totale di cellule nelle Petri stimato dalla media. L'errore associato alla conta cellulare secondo la letteratura [14] si calcola utilizzando la formula $\sigma = \sqrt{n} \cdot c$, in cui n è il numero di cellule che vengono contate nella camera (solitamente nell'ordine delle centinaia) e c è il numero di volte che viene eseguita la conta. L'errore considerato sull'attività somministrata è del 10%, come gia menzionato nella sezione 3.1.

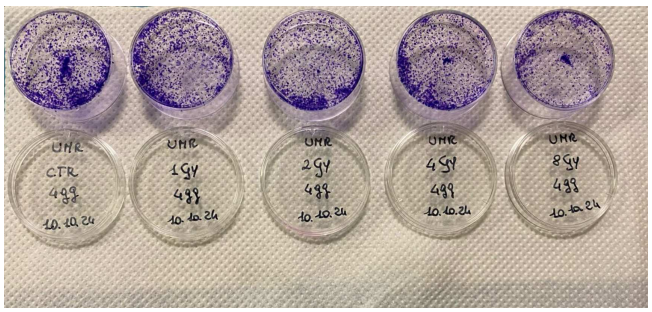


Figura 3.1: Petri contenenti le cellule fissate con etanolo 70% e colorate con blu di toluidina alle varie condizioni di trattamento per il tempo di esposizione di 4gg

Dose $[Gy]$	A_c $[kBq/ml]$	$Media$ $[10^5 cell/ml]$	Tot $[10^5 cell/Petri]$
-	-	4.5 ± 0.3	11.3 ± 0.8
1.0 ± 0.1	59 ± 6	4.7 ± 0.3	11.7 ± 0.8
2.0 ± 0.2	119 ± 12	3.9 ± 0.3	9.7 ± 0.7
4.0 ± 0.4	239 ± 24	3.1 ± 0.2	7.8 ± 0.6
8.0 ± 0.8	478 ± 48	0.66 ± 0.05	1.6 ± 0.1

Tabella 3.1: Dati sperimentali della conta in camera di Burker per un tempo di esposizione di 4 giorni

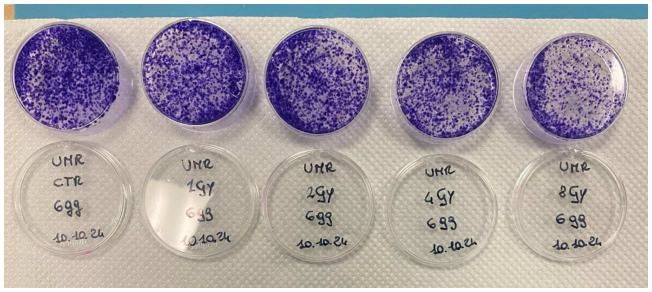


Figura 3.2: Petri contenenti le cellule fissate con etanolo 70% e colorate con blu di toluidina alle varie condizioni di trattamento per il tempo di esposizione di 6gg

Dose $[Gy]$	A_c $[kBq/ml]$	$Media$ $[10^5 cell/ml]$	Tot $[10^5 cell/Petri]$
-	-	17.4 ± 1.2	44 ± 3
1.0 ± 0.1	43 ± 4	16.6 ± 1.2	42 ± 3
2.0 ± 0.2	87 ± 9	12.9 ± 0.9	32 ± 2
4.0 ± 0.4	174 ± 17	9.1 ± 0.6	23 ± 2
8.0 ± 0.8	347 ± 35	3.0 ± 0.2	7.4 ± 0.5

Tabella 3.2: Dati sperimentali della conta in camera di Burker per un tempo di esposizione di 6 giorni

Nel test clonogenico le concentrazioni di semina per ogni condizione di trattamento sono state le seguenti:

- Controllo (CTR): 50, 100, 250 cellule
- Dose 1 Gy: 50, 100, 250 cellule
- Dose 2 Gy: 50, 100, 250 cellule
- Dose 4 Gy: 100, 250, 500 cellule
- Dose 8 Gy: 100, 250, 500, 1000 cellule

3.3 Stima della Frazione di Sopravvivenza

La frazione di sopravvivenza stimata mediante la conta in camera di Burker è calcolata come il rapporto tra il numero totale di cellule contate nel campione trattato e quello nel campione di controllo, dai dati presentati nelle tabelle 3.1 e 3.2. L'errore associato deriva dalla formula di propagazione. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 3.3. Si osserva che all'aumentare della dose diminuisce la frazione di sopravvivenza.

4 giorni			6 giorni		
Dose $[Gy]$	A_c $[kBq/ml]$	FS	Dose $[Gy]$	A_c $[kBq/ml]$	FS
-	-	1.0	-	-	1.0
1.0 ± 0.1	59 ± 6	1.04 ± 0.10	1.0 ± 0.1	43 ± 4	0.95 ± 0.10
2.0 ± 0.2	119 ± 12	0.86 ± 0.09	2.0 ± 0.2	87 ± 9	0.74 ± 0.07
4.0 ± 0.4	239 ± 24	0.70 ± 0.07	4.0 ± 0.4	174 ± 17	0.52 ± 0.05
8.0 ± 0.8	478 ± 48	0.146 ± 0.015	8.0 ± 0.8	374 ± 35	0.17 ± 0.02

Tabella 3.3: Frazioni di sopravvivenza ottenute dalla conta in camera di Burker

Per stimare la frazione di sopravvivenza mediante il test clonogenico, il metodo di calcolo non è univoco, poiché varia in base alle modalità con cui il test è stato eseguito e alle scelte dell'autore. In questo caso, si è deciso di adottare il metodo *"PE-based normalization"* proposto nell'articolo di Brix, Nikko, et al. [15].
L'efficienza di piastramento (EP) viene calcolata come il rapporto tra il numero di colonie contate (C) e il numero di cellule seminate (S), secondo la formula $EP = C/S$. Per ciascun campione, si determina la media delle EP ottenute nelle diverse condizioni di semina.
La frazione di sopravvivenza di ciascun campione (SF_i) viene calcolata come il rapporto tra l'EP media del campione ($\langle EP \rangle_i$) e l'EP media del controllo ($\langle EP \rangle_{CTR}$), ossia $SF_i = \langle EP \rangle_i / \langle EP \rangle_{CTR}$. Successivamente, la frazione di sopravvivenza per ciascuna dose somministrata è ottenuta come la media delle SF_i, con il relativo errore della media. I risultati finali sono riportati nelle tabelle 3.4 e 3.5.

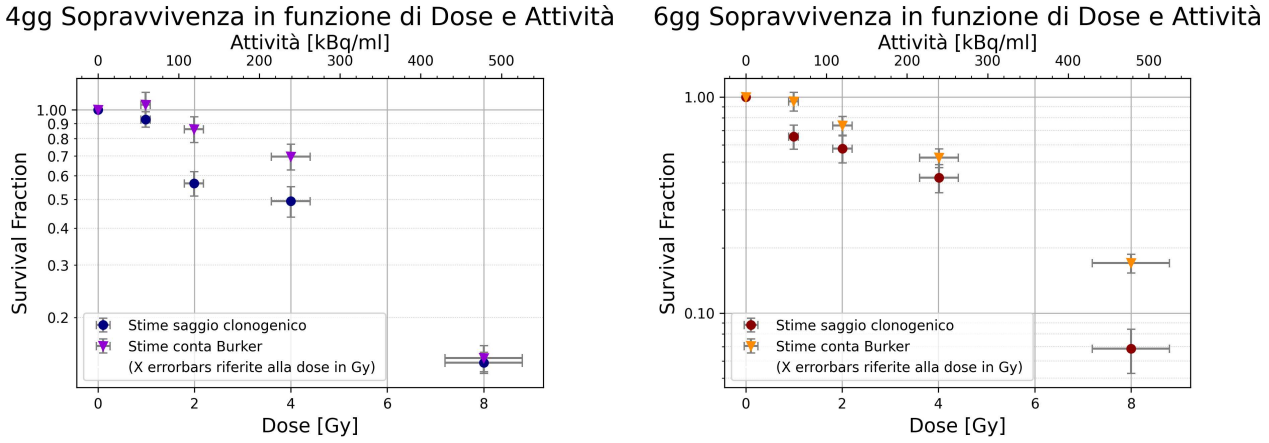
	4 giorni			
	SF_1	SF_2	SF_3	$\langle SF \rangle$
CTR	1	1	1	1
(1.0±0.1) Gy	1.01 ± 0.02	0.93 ± 0.11	0.84 ± 0.12	0.92 ± 0.06
(2.0±0.2) Gy	0.47 ± 0.09	0.61 ± 0.07	0.61 ± 0.12	0.57 ± 0.05
(4.0±0.4) Gy	0.46 ± 0.08	0.60 ± 0.09	0.41 ± 0.08	0.49 ± 0.06
(8.0±0.8) Gy	0.120 ± 0.009	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.141 ± 0.011

Tabella 3.4: Frazioni di sopravvivenza ottenute dal test clonogenico per il tempo di esposizione di 4 giorni

	6 giorni			
	SF_1	SF_2	SF_3	$\langle SF \rangle$
CTR	1	1	1	1
(1.0±0.1) Gy	0.72 ± 0.12	0.6 ± 0.2	0.69 ± 0.14	0.66 ± 0.08
(2.0±0.2) Gy	0.74 ± 0.09	0.48 ± 0.09	0.51 ± 0.11	0.58 ± 0.08
(4.0±0.4) Gy	0.45 ± 0.13	0.39 ± 0.10	0.43 ± 0.10	0.42 ± 0.06
(8.0±0.8) Gy	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.02

Tabella 3.5: Frazioni di sopravvivenza ottenute dal test clonogenico per il tempo di esposizione di 6 giorni

Nei grafici in figura 3.3 sono rappresentate le frazioni di sopravvivenza calcolate in relazione alla dose e all'attività somministrata per i due diversi tempi di esposizione.

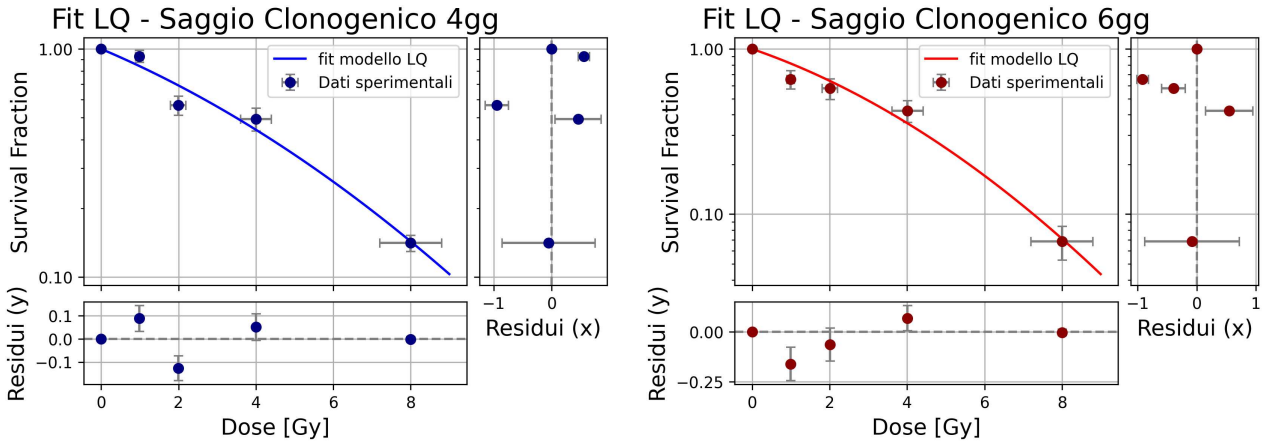


(a) (b)

Figura 3.3: A sinistra il grafico relativo al tempo di esposizione di 4 giorni, a destra 6 giorni.

3.4 Analisi dei Risultati

Calcolate le frazioni di sopravvivenza si procede l'analisi con i modelli già presentati nelle sezioni 2.3 e 2.4. Dalla figura 3.3 si nota che la frazione di sopravvivenza stimata tramite conta in camera di Burker è sempre superiore rispetto a quella ottenuta con il test clonogenico. Questo risultato è atteso, poiché il test clonogenico tiene conto degli effetti a lungo termine. A differenza della conta in camera di Burker, che rileva semplicemente il numero di cellule intatte, il test clonogenico valuta la vitalità cellulare considerando anche la capacità riproduttiva delle cellule ed è considerato il *"gold standard"* per studi di questo tipo. Pertanto l'analisi successiva e i relativi fit verranno eseguiti sui dati ottenuti dal test clonogenico.
Per l'analisi della sopravvivenza cellulare in funzione della dose assorbita si utilizzano il modello LQ e il modello IR. Si eseguono i fit delle funzioni 2.2 e 2.3 sui dati sperimentali utilizzando il pacchetto *scipy.odr* di Python, che minimizza la distanza ortogonale tra dati sperimentali e funzione, tenendo conto delle incertezze sia in ordinata che in ascissa. La stima dei parametri del fit con relativa incertezza è calcolata dal programma attraverso una linearizzazione dell'esponenziale. In figura 3.4 sono riportati i grafici ottenuti con il modello LQ, insieme ai relativi residui. I parametri calcolati sono riportati nelle tabelle 3.6 e 3.7.



(a) (b)

Figura 3.4: A sinistra il grafico relativo al tempo di esposizione di 4 giorni, a destra 6 giorni.

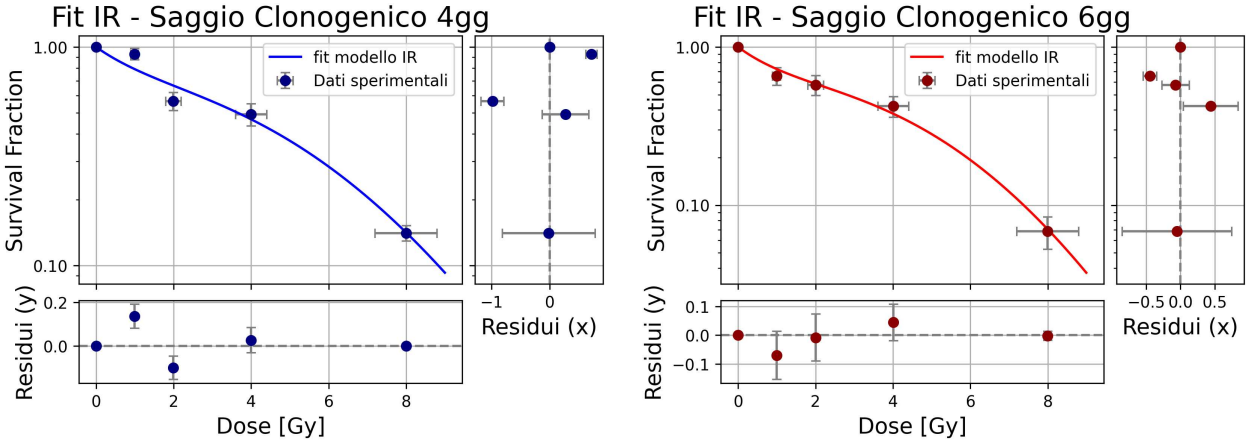
α [Gy^{-1}]	β [Gy^{-2}]
0.16 ± 0.06	0.010 ± 0.008

Tabella 3.6: Parametri fit LQ per esposizione 4 gg

α [Gy^{-1}]	β [Gy^{-2}]
0.19 ± 0.07	0.018 ± 0.010

Tabella 3.7: Parametri fit LQ per esposizione 6 gg

Dai grafici 3.4 si nota che a basse dosi (1, 2 Gy per 3.4 (b) e 2 Gy per 3.4 (a)) i punti risultano più bassi rispetto all'andamento LQ. Questo indica la presenza di *hyper-radiosensitivity* (HRS) a basse dosi. Dunque si effettua il fit del modello IR per poter descrivere meglio l'andamento anche a basse dosi dove sono presenti HRS e IRR.
Per evitare problemi di overfitting legati al numero limitato di dati, il fit è ottenuto fissando il parametro di dose critica, ovvero il punto in cui avviene la transizione tra HRS e IRR, pari a $D_c = 2.5$ Gy, sulla base di quanto osservato nei precedenti studi [11]. Restano quindi 3 parametri liberi, α_r, β e α_s, che sono calcolati dal programma. Si riportano in figura 3.5 i grafici ottenuti del fit del modello a Riparazione Indotta con i relativi residui. I parametri calcolati si riportano nelle tabelle 3.8 e 3.9.



(a) (b)

Figura 3.5: A sinistra il grafico relativo al tempo di esposizione di 4 giorni, a destra 6 giorni.

α_r [Gy^{-1}]	β [Gy^{-2}]	α_s [Gy^{-1}]
0.05 ± 0.22	0.02 ± 0.03	0.3 ± 0.2

Tabella 3.8: Parametri fit IR 4 gg

α_r [Gy^{-1}]	β [Gy^{-2}]	α_s [Gy^{-1}]
0.000 ± 0.006	0.039 ± 0.004	0.42 ± 0.09

Tabella 3.9: Parametri fit IR 6 gg

Entrambi i casi mostrano che il parametro α_r, legato al contributo lineare ad alte dosi, risulta compatibile con zero. Questo suggerisce che oltre la dose critica il termine quadratico β diventa predominante, indicando che i danni causati da interazioni multiple della radiazione con il DNA sono più difficili da riparare rispetto ai danni singoli. Tale comportamento potrebbe riflettere una saturazione dei meccanismi di riparazione cellulare o un cambiamento nei processi biologici che gestiscono i danni, evidenziando la vulnerabilità delle cellule a eventi più complessi ad alte dosi.
Nonostante le limitazioni legate al numero ristretto di dati, dall'osservazione dei grafici 3.5, si conclude che la frazione di sopravvivenza è ben giustificata dal modello a riparazione indotta. A 4 giorni, probabilmente anche a causa delle maggiori fluttuazioni nei dati, il modello LQ sembra adattarsi leggermente meglio, mentre a 6 giorni il modello IR fornisce una descrizione significativamente migliore, in linea con l'aspettativa che tale modello sia più efficace a ratei di dose più bassi.

3.5 Confronto e Discussione dei Risultati

Nel grafico 3.6 è riportato un confronto del modello LQ tra i due tempi di esposizione. Si osserva chiaramente che per un'esposizione di 6 giorni la frazione di sopravvivenza cellulare è significativamente più bassa, soprattutto alle dosi più elevate. Inoltre, la maggiore curvatura relativa a 6 giorni suggerisce una componente β più marcata, associata all'accumulo di danni sub-letali che diventano letali nel tempo. Questo indica che un'esposizione prolungata riduce la capacità delle cellule di riparare i danni indotti dalla radiazione, amplificando l'effetto citotossico complessivo.
Osservando i parametri riportati nelle tabelle 3.6 e 3.7, si nota in entrambi i casi che il valore di α è significativamente maggiore di β. Questo implica che la linea cellulare è particolarmente sensibile alle basse dosi di radiazione, dove il danno lineare domina rispetto al contributo quadratico. Complessivamente, i risultati evidenziano una minor radiosensibilità con esposizioni più brevi e un ruolo crescente del danno sub-letale con l'allungarsi del tempo di esposizione.

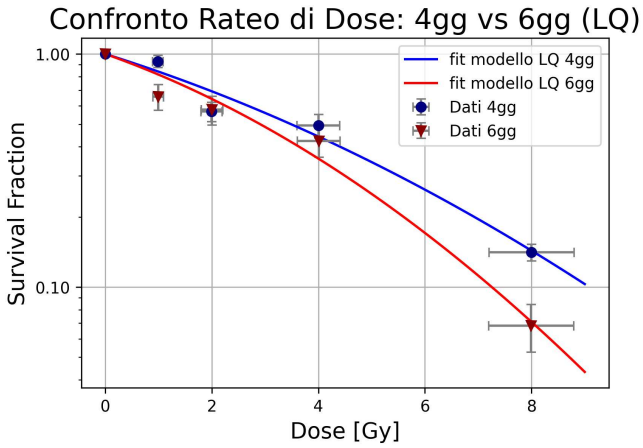


Figura 3.6: Confronto della curva di sopravvivenza LQ tra il tempo di esposizione di 4 giorni e 6 giorni

Nella figura 3.7 è riportato un confronto del modello a riparazione indotta (IR) tra i due tempi di esposizione. Anche in questo grafico la curva per un'esposizione di 6 giorni mostra sopravvivenza minore. Osservando i parametri riportati nelle tabelle 3.8 e 3.9 si nota che i valori di α_r sono minori di quelli ottenuti con il modello LQ, il che suggerisce che il contributo immediato della risposta lineare viene ridotto o mascherato da altri meccanismi, come un accumulo di danni riparabili o sub-letali. I parametri β sono più grandi e questo è coerente con l'idea che il danno sub-letale si accumuli nel tempo, diventando più significativo e contribuendo maggiormente alla letalità cellulare. Si sottolinea comunque che il numero limitato di punti sperimentali e l'ampiezza degli errori associati rendono difficile trarre conclusioni definitive dai parametri ottenuti dal fitting.

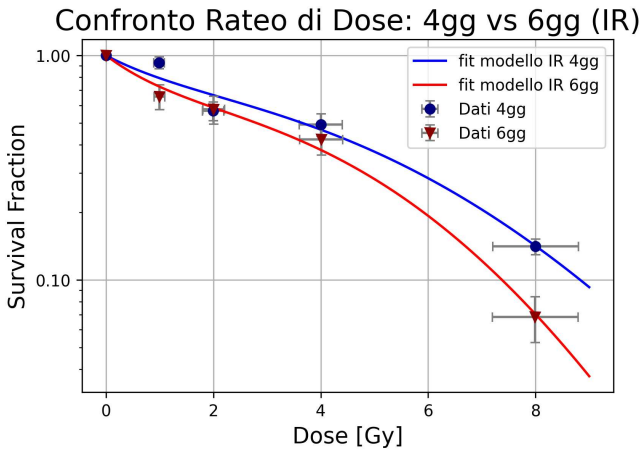


Figura 3.7: Confronto della curva di sopravvivenza IR tra il tempo di esposizione di 4 giorni e 6 giorni

Come asserito nella sezione 2.2, il modello LQ è ampiamente utilizzato per studiare gli effetti radiobiologici sulla sopravvivenza cellulare. Grazie alla sua semplicità, riesce ad adattarsi a molteplici scenari, considerando diversi meccanismi di interazione tra radiazioni e cellule. Come mostrato in figura 3.4, il modello descrive in modo soddisfacente la curva di sopravvivenza osservata nell'esperimento in analisi, in particolare per dosi elevate, come 4 Gy e 8 Gy. Tuttavia, la sua efficacia nel descrivere il comportamento a basse dosi risulta più limitata. Questa limitazione del modello LQ non è solo evidente nei dati sperimentali raccolti, ma è anche documentata in letteratura [16].
Nell'esperimento in esame, oltre a dosi basse, è stato utilizzato un rateo di dose estremamente ridotto, dovuto a tempi di esposizione significativamente più lunghi rispetto a quelli tipicamente impiegati nelle radioterapie convenzionali. Queste condizioni sperimentali giustificano l'esigenza di adottare un modello alternativo, come il modello a riparazione indotta. Questo approccio è particolarmente adatto a descrivere il comportamento a basse dosi, poiché incorpora i meccanismi di riparazione cellulare. Inoltre, il modello è in grado di rappresentare fenomeni radiobiologici specifici come l'HRS e l'IRR, effetti già osservati e studiati sia in letteratura [10] su diverse linee cellulari, sia in esperimenti precedenti condotti nell'ambito del progetto ADMIRAL. L'integrazione di un modello che tenga conto di questi fenomeni permette di superare i limiti del modello LQ, offrendo una descrizione più accurata degli effetti radio-biologici nelle condizioni specifiche di questo esperimento.

4 Conclusioni

In questo lavoro si analizzano gli effetti della somministrazione *in vitro* alla linea cellulare di osteosarcoma murino UMR-106 del radioisotopo Ag-111, che verrà prodotto nella facility SPES di Legnaro, per lo sviluppo di un radiofarmaco innovativo nel progetto ISOLPHARM. Dopo aver introdotto il contesto in cui si è svolto l'esperimento, si descrivono brevemente gli effetti della radiazione e i due modelli matematici, lineare quadratico (LQ) e a riparazione indotta (IR), utilizzati poi per l'analisi dei risultati.
Nell'esperimento svolto presso il laboratorio LENA di Pavia sono state somministrate alle cellule dosi di radiazione pari a 1, 2, 4 e 8 Gy, con due tempi di esposizione diversi di 4 e 6 giorni. L'intento è di esaminare la curva di sopravvivenza e studiare quale tempo di irradiamento risulti più efficace. In precedenza erano già stati svolti esperimenti simili, ma questa volta si è eseguito un test clonogenico per migliorare i risultati e non ci si è limitati unicamente ad una conta in camera di Burker.
Dallo studio con i test clonogenici si sono calcolate le frazioni di sopravvivenza cellulare alle diverse dosi nelle due condizioni di trattamento. Analizzando la relazione tra la dose somministrata e la frazione di sopravvivenza si è cercato il modello biofisico che fosse in grado di descrivere meglio i risultati ottenuti. Si è visto che il modello lineare quadratico spiega bene l'andamento della frazione di sopravvivenza ad alte dosi, ma per dosi più basse non risulta adeguato. Infatti, dal grafico emerge che alle dosi 1 e 2 Gy le frazioni di sopravvivenza sono più basse dell'andamento descritto dal modello lineare quadratico, che è un chiaro segno della presenza di una zona di iper-radiosensibilità (HRS). Per questo si è poi considerato il modello a riparazione indotta, che risulta più idoneo alla situazione in analisi. Quello che si deduce da questo studio è che la frazione di sopravvivenza diminuisce all' aumentare della dose, ma nei dati a basse dosi è presente una zona HRS seguita da un aumento della radioresistenza (IRR). Il modello che offre quindi la miglior rappresentazione dei risultati è il modello a riparazione indotta.

Dal confronto tra i risultati ottenuti per il tempo di esposizione di 4 e 6 giorni emerge che la frazione di sopravvivenza è minore per l'esposizione più lunga. Questo implica che le cellule risultino maggiormente radio-sensibili a un rateo di dose minore e che quindi un trattamento più lungo, a parità di dose, potrebbe risultare più efficace contro le cellule maligne.
Nelle radioterapie convenzionali spesso accade la situazione opposta, in cui una dose somministrata in poco tempo è più dannosa per le cellule rispetto a quando viene frazionata o dilazionata nel tempo. Questo perchè i meccanismi di riparazione dei danni al DNA non fanno a tempo ad attivarsi e quindi prevenire la morte cellulare. Il caso studiato in questo lavoro è però differente, in quanto la dose viene somministrata in un tempo estremamente lungo rispetto alle radioterapie convenzionali e questo porta al coinvolgimento di meccanismi biologici differenti. Si ha quindi il cosiddetto effetto dose-rate inverso (*inverse dose-rate effect*). In letteratura [17] questo effetto viene studiato su diverse linee cellulari per radiazione con basso LET a ratei di dose molto bassi (2 cGy h^{-1} – 1 Gy h^{-1}), paragonabili a quelli utilizzati nell'esperimento in analisi ($\sim$ 0.7 cGy h^{-1} – 8 cGy h^{-1}), dove è stato dimostrato che l'effetto dose-rate inverso è legato all'ipersensibilità a basse dosi. Quindi si ipotizza che i meccanismi cellulari responsabili per l'HRS abbiano anche a che fare con la vulnerabilità delle stesse cellule a basso rateo di dose. Una possibile spiegazione è che per dosi molto basse le cellule non riescano a riconoscere il danno e quindi attivare alcuni meccanismi di riparazione.

Complessivamente dall'esperimento risulta che nelle condizioni di trattamento esaminate le cellule presentano ipersensibilità a basse dosi e maggiore radiosensibilità per basso rateo di dose. L'effetto dose-rate inverso si ritiene legato all'HRS e si suppone che i meccanismi biologici dei due siano correlati.

Una possibile direzione di miglioramento consiste nel raccogliere un maggior numero di dati e somministrare più dosi nel range 0.5-3 Gy per riuscire a caratterizzare meglio la curva di sopravvivenza nella regione di ipersensibilità a basse dosi (HRS). Potrebbe inoltre risultare interessante un confronto con linee cellulari differenti, per vedere se rispondono nello stesso modo alla radiazione e provare a indagare ulteriormente i meccanismi biologici che causano HRS, IRR e inverse dose rate effect.

Bibliografia

[1] E Vettorato, L Morselli, M Ballan, A Arzenton, OS Khwairakpam, M Verona, D Scarpa, S Corradetti, P Caliceti, V Di Marco, et al. A new production method of high specific activity radionuclides towards innovative radiofarmaceuticals: The Isolpharm project. In *RAD Conference Proceedings*, volume 6, pages 8–14, 2022.

[2] Stefano Corradetti, Lisa Biasetto, Mattia Manzolaro, Daniele Scarpa, S Carturan, Alberto Andrighetto, Gianfranco Prete, Jose Vasquez, Pier Zanonato, Paolo Colombo, et al. Neutron-rich isotope production using a uranium carbide-carbon nanotubes spes target prototype. *The European Physical Journal A*, 49:1–10, 2013.

[3] INFN - ISOLPHARM Project. ISOLPHARM Project - Radioisotopes for Medical Applications. `https://isolpharm.pd.infn.it/web/?page_id=3744`, 2024. Accesso: novembre 2024.

[4] Wesley E Bolch, Keith F Eckerman, George Sgouros, and Stephen R Thomas. Mird pamphlet no. 21: a generalized schema for radiopharmaceutical dosimetry—standardization of nomenclature. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(3):477–484, 2009.

[5] TR Munro. The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chinese hamster fibroblasts. *Radiation research*, 42(3):451–470, 1970.

[6] John F Ward. Dna damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 35:95–125, 1988.

[7] David J Brenner. The linear-quadratic model is an appropriate methodology for determining isoeffective doses at large doses per fraction. In *Seminars in radiation oncology*, volume 18, pages 234–239. Elsevier, 2008.

[8] Stephen Joseph McMahon. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Physics in Medicine & Biology*, 64(1):01TR01, 2018.

[9] B Marples and MC Joiner. The response of chinese hamster v79 cells to low radiation doses: evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. *Radiation research*, 133(1):41–51, 1993.

[10] Brian Marples and Spencer J Collis. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 70(5):1310–1318, 2008.

[11] Caterina Spadetto. Misure di sopravvivenza cellulare con Ag-111 libero per l'esperimento ISOLPHARM, 2024.

[12] International Atomic Energy Agency (IAEA). Nuclear Data Services - Chart of Nuclides. `https://www.nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html`, 2024. Accesso: novembre 2024.

[13] Emma Reniero. Cellular dosimetry using geant4 in the context of the isolpharm project. Master's thesis, Università degli studi di Padova, 2023.

[14] Howard M Shapiro. "cellular astronomy"—a foreseeable future in cytometry. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 60(2):115–124, 2004.

[15] Nikko Brix, Daniel Samaga, Claus Belka, Horst Zitzelsberger, and Kirsten Lauber. Analysis of clonogenic growth in vitro. *Nature protocols*, 16(11):4963–4991, 2021.

[16] L Jones, P Hoban, and P Metcalfe. The use of the linear quadratic model in radiotherapy: a review. *Australasian Physics & Engineering Sciences in Medicine*, 24:132–146, 2001.

[17] Catherine R Mitchell, Melvyn Folkard, and Michael C Joiner. Effects of exposure to low-dose-rate 60co gamma rays on human tumor cells in vitro. *Radiation research*, 158(3):311–318, 2002.