Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base Area Didattica di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Fisica "Ettore Pancini"



Laurea Triennale in Fisica

La Proton Boron Fusion Therapy: potenziamento dell'efficacia radiobiologica della protonterapia mediante una reazione nucleare

Relatore:

Prof. Lorenzo Manti

Candidata:

Elisa Maria Gandolfo Matricola N85/533

A.A. 2016/2017

Alla mia famiglia, a chi l'ha resa tale

Indice

	Int	roduzione	1
1.	Ce	nni di radiobiologia	5
	1.1.	Interazione della radiazione ionizzante con la materia	.6
	1.2.	Dosimetria1	0
	1.3.	L'effetto biologico della radiazione ionizzante1	2
		1.3.1. Conseguenze a livello cellulare1	3
2.	Svi	luppo delle adroterapie1	6
	2.1.	Terapie con particelle cariche1	6
		2.1.1. Protonterapia1	7
		2.1.2. Carbonterapia2	0
		2.1.3. Vantaggi e problematiche2	2
	2.2.	Boron Neutron Capture Therapy2	3
		2.2.1. Principi biofisici e problematiche	23
3.	La	Proton Boron Fusion Therapy2	6
	3.1.	Reazione nucleare p + ¹¹ B2	7
	3.2.	Possibili applicazioni della PBFT2	8
	3.3.	Esperimento in vitro	0
		3.3.1. Classificazione delle aberrazioni	1
		3.3.2. Analisi dati e discussione	3
	Сот	nclusioni3	7
	Bib	liografia3	8

Introduzione

La tecnica che prevede l'utilizzo di fasci adronici per la cura di tumori (adroterapia) si è velocemente diffusa (inizialmente negli Stati Uniti, dove fu abbandonata per poi essere ripresa in Giappone ed in Europa) grazie soprattutto al cruciale vantaggio di poter localizzare più accuratamente il rilascio della dose terapeutica di radiazione ionizzante. Ciò scaturisce dalle peculiari proprietà fisiche con cui i fasci di particelle perdono energia nell'attraversare la materia, ed in particolare, dal profilo inverso dose-profondità, come descritto dalla curva di Bragg. Nell'ambito delle radioterapie con fasci esterni di particelle accelerate, la protonterapia rappresenta pertanto un nuovo ed importante approccio terapeutico permettendo a gran parte del tessuto sano di assorbire meno dose al contrario di quanto avviene nelle convenzionali terapie tramite fotoni o elettroni: fissata l'energia del fascio di protoni il rilascio della maggior parte dell'energia da esso trasportato si concentra in corrispondenza del picco di Bragg, che può essere conformato spazialmente alla massa tumorale (Spreadout Bragg Peak, o SOBP). A fine range, infatti, le particelle depositano la gran parte della loro energia, con una elevata densità di ionizzazione, funzione crescente del loro Z. Nonostante gli innegabili vantaggi offerti dalla protonterapia, esistono però delle limitazioni che trovano la loro origine nel fatto che dal punto di vista radiobiologico l'efficacia con cui i protoni inducono danno al DNA, e quindi possono causare l'inattivazione delle cellule tumorali, è praticamente uguale a quella dei fotoni/elettroni. Ciò ha portato alla ricerca di altri tipi di particelle cariche, più pesanti, come è il caso degli ioni carbonio. Questi non solo conservano la precisione balistica garantita dalla curva di Bragg, ma presentano anche una maggiore efficacia radiobiologica (RBE o Relative Biological Effectiveness) in quanto, a parità di dose rispetto a fotoni e protoni, sono in grado di causare una maggiore percentuale di morte cellulare (e di danno citogenetico in generale). In linea di principio, l'adroterapia con ioni carbonio risulta, pertanto, ideale per tumori profondi, ossia prossimi ad organi e/o tessuti a rischio, e radioresistenti. Tuttavia, fenomeni di frammentazione dovuti all'interazione con tessuti ossei di tali ioni alle energie tipiche del trattamento antitumorale (nell'ordine delle centinaia di MeV/n) comportano un rilascio di energia non trascurabile nella zona oltre il SOBP, con conseguente aumento del danneggiamento del tessuto sano circostante il tumore. Inoltre, il tessuto sano antistante il tumore stesso riceverà una dose inferiore a quella che avrebbe assorbito in presenza di fotoni/protoni, ma avente appunto un RBE maggiore, i cui effetti a lungo termine non sono ancora del tutto chiari. Infine, un fattore non trascurabile è il rapporto costo-beneficio di questo tipo di terapia, la quale richiede macchine acceleratrici costose in termini di installazione e gestione.

Una nuova frontiera è costituita da quelle che si possono definire, facendo un parallelismo, "radioterapie interne" che prevedono la presenza di particelle proiettile, così come avviene per la terapia con fasci esterni, che interagendo con un composto opportuno (tipicamente un farmaco) iniettato all'interno del tumore producano particelle secondarie, possibilmente di bassa energia così che abbiano un range limitato ed una elevata densità di ionizzazione (Linear Energy Transfer o LET). Ciò comporta un irraggiamento localizzato e con alto RBE. E' il caso della BNCT (Boron Neutron *Capture Therapy*) che si basa sul bombardamento tramite neutroni termici di tumori poco profondi iniettati con sostanze ad alto contenuto di 10B in quanto sfrutta una nota reazione di fusione nucleare $p({}^{10}B,\alpha)^7Li$. I prodotti di reazione essendo emessi con energie dell'ordine di qualche MeV hanno alto LET e quindi causano un elevato danno delle cellule circostanti con un raggio di azione dell'ordine di una decina di µm cioè confrontabile con il raggio medio di una cellula tumorale, assicurando così il confinamento della terapia. Nonostante i vari aspetti positivi di questo tipo di approccio tra cui appunto l'alto LET delle particelle rilasciate e la disponibilità di svariati composti borati biocompatibili, la BNCT non è finora riuscita ad affermarsi come un trattamento praticabile clinicamente. I neutroni termici sono difficili e costosi da ottenere e stabilizzare, e se usati per tumori profondi causano un danno al tessuto intollerabilmente elevato. La tecnica quindi si rivela utile solo nel caso di tumori superficiali a causa del rapido assorbimento dei neutroni termici da parte dei tessuti (3÷4 cm). Altrettanto critico è l'aspetto della localizzazione del boro all'interno dei tessuti: affinché l'approccio sia realmente vantaggioso, il composto borato dovrebbe essere selettivamente assorbito dalle sole cellule tumorali altrimenti i prodotti di reazione danneggerebbero anche le cellule sane.

La crescente disponibilità di fasci di protoni usati clinicamente e l'esistenza di un'altra nota reazione di fusione nucleare ha motivato un filone di ricerca volto ad ottenere una maggiore efficienza radiobiologica della protonterapia mantenendone gli indiscussi vantaggi balistici, aprendo uno scenario innovativo: la *Proton Boron Fusion Therapy* (PBFT), oggetto del presente lavoro di tesi.

Essa si propone di sfruttare la reazione nucleare di protoni su ¹¹B che restituisce come prodotti di reazione tre particelle α . Queste garantiscono, come nel caso della BNCT, un danno elevato alla massa tumorale, molto maggiore in linea di principio rispetto alla protonterapia, con l'ulteriore vantaggio di non dover usare come proiettili neutroni e di poter quindi preservare maggiormente il tessuto sano rispetto alla BNCT. Ancora più importante è il concetto che, essendo la sezione d'urto della reazione p-¹¹B massima per energie dei protoni di poche centinaia di keV, che corrispondono alla zona del SOBP, l'eventuale potenziamento dell'RBE della protonterapia non necessiterebbe di composti borati selettivamente assorbiti dalle cellule tumorali rispetto a quelle sane. Allo stato attuale, le simulazioni dei pochi studi teorici esistenti confermano il netto aumento di efficacia e l'alta potenzialità di questa nuova terapia.

Il lavoro della seguente tesi è incentrato sull'analisi dei primi dati sperimentali radiobiologici in assoluto ottenuti presso i Laboratori di Biofisica delle Radiazioni usando il fascio di protoni terapeutici dei Laboratori Nazionali del Sud (LNS-INFN) irraggiando cellule in vitro in presenza di un composto con abbondanza isotopica naturale di ¹¹B. Lo scopo è stato quello di validare la PBFT dal punto di vista radiobiofisico, l'effetto radiobiologico studiato è stato l'induzione di danno al DNA sotto forma di aberrazioni cromosomiche.

Nel primo capitolo verranno riassunti concetti basilari della radiobiologia con particolare riferimento all'interazione delle particelle (cariche e non) con la materia. Nel secondo capitolo verranno trattate in modo più approfondito le tecniche di radioterapia, confrontando in particolare le più diffuse, ossia quelle con fasci esterni di protoni e ioni carbonio; nell'ultimo capitolo verrà analizzata la reazione nucleare sulla quale si basa la PBFT e saranno presentati i risultati dello studio *in vitro* delle cellule trattate sfruttando questo approccio.

1. Cenni di radiobiologia

L'uomo, come la totalità degli esseri viventi, è stato da sempre soggetto fin dalla sua prima comparsa sulla terra ad una radiazione ionizzante (RI) di fondo naturale. Se nel corso dei millenni l'evoluzione ha permesso di adattarci a quest'ultima, la scienza, man mano che le fonti di tale esposizione naturale venivano comprese e altre venivano inventate per la sua produzione, ci ha fornito i mezzi per studiarne le proprietà e sfruttare a nostro vantaggio alcuni degli effetti che essa causa a livello biologico.

Parlando di RI distinguiamo, infatti, quella di tipo *naturale* e quella di tipo *artificiale*; la prima è dovuta in parte all'emissione per decadimento radioattivo e in parte alla radiazione cosmica che giunge sulla Terra. La scoperta della radioattività naturale nel 1896 (H. Becquerel) e di elementi radioattivi come il Polonio o il Radio da parte dei coniugi Curie aprì la strada allo studio di elementi naturali pesanti con caratteristiche radioattive. Uno degli elementi naturali più intensamente studiati per i suoi potenziali rischi per la salute umana è il Radon, un gas inerte e radioattivo derivante dal decadimento del Radio e presente, in misura variabile, in alcuni tipi di suoli e rocce e quindi potenzialmente presente in uffici e abitazioni; studi effettuati su gruppi di minatori hanno evidenziato una stretta correlazione tra l'inalazione in dosi elevate del radon e l'insorgenza di tumori polmonari (WHO – IARC 2001). L' esposizione alle radiazioni di tipo artificiale è principalmente legata alle loro applicazioni biomediche, quali diagnostica e radioterapia.

Lo studio degli effetti biologici della RI portò alla nascita della radiobiologia, la quale può essere fatta coincidere con la scoperta dei raggi x nel 1895 (W.C. Röntgen) seguita, l'anno successivo, dalle prime applicazioni di quest'ultimi per la cura del cancro allo stomaco (V. Despeignes), del lupus volgaris (E. Schiff) e varie altre patologie^[7]. Nel tempo una ricerca più intensa ha portato ad una profonda conoscenza dell'interazione tra la radiazione e i diversi tipi di tessuti viventi, permettendo così la scoperta e l'utilizzo di tecniche radiobiologiche sempre più avanzate. Sono state condotte numerose ricerche con l'intento di dimostrare una correlazione tra radiazione e danno biologico, una fonte importantissima di conoscenze al riguardo è rappresentata dagli studi epidemiologici sui sopravvissuti di Hiroshima e Nagasaki^[6]. I risultati ottenuti da tali analisi unitamente agli studi *in vitro* hanno permesso di legare in maniera causale l'esposizione all'incremento di rischio di tumore. La possibilità di collegare la dose di RI assorbita al danno biologico causato ha portato al miglioramento dell'efficacia delle radioterapie per un numero sempre più vasto di tipologie di tumori. In questo capitolo si presenteranno i vari tipi di radiazione e i principali meccanismi di interazione di quest'ultime con la materia; si introdurranno alcuni concetti fondamentali in radiobiologia per quantificare gli effetti radioindotti quali la dose, il LET e l'RBE, prima di fare una rapida panoramica dei principali effetti biologici.

1.1 Interazione della radiazione ionizzante con la materia

Per radiazione ionizzante (RI) si intende quel tipo di radiazione il cui assorbimento di energia porta alla ionizzazione della molecola e/o atomo a cui essa è ceduta con conseguente espulsione di uno o più elettroni orbitali; la ionizzazione delle molecole presenti nei composti organici può causare dei processi chimici capaci a loro volta di innescare una vasta gamma di effetti.

Sulla base delle modalità di trasporto dell'energia distinguiamo la RI di tipo elettromagnetica, quale ad esempio raggi γ o raggi x, e quella di tipo particolata con la quale si indicano le radiazioni dovute a particelle, che siano esse cariche o meno. Il primo tipo può essere visto come una successione di onde elettromagnetiche, o analogamente come un fascio di fotoni che interagiscono con la materia tramite pacchetti d'onda di energia discreta *hv* danneggiando le biomolecole tramite reazioni indirette, di cui si parlerà in seguitò; la radiazione particolata, deposita energia o attraverso interazioni di tipo coulombiano con gli elettroni degli atomi e molecole del mezzo (particelle cariche) o attraverso reazioni di scattering con i loro nuclei nel caso dei neutroni.

<u>Raggi X e raggi γ</u>

Rilasciano energia nell'attraversare la materia principalmente per effetto fotoelettrico, effetto Compton e creazione di coppie producendo in tutti e tre i casi elettroni veloci di rinculo. Dal momento che tutti questi processi sono accompagnati dalla creazione di ioni e elettroni liberi, man mano che aumenta il livello di penetrazione, e con esso il numero di eventi di ionizzazione, la perdita di energia associata ai fotoni è paragonabile sempre più a quella degli elettroni. Questo tipo di radiazione può causare danno sia in maniera diretta, tramite la ionizzazione del DNA da parte degli elettroni di rinculo, sia in maniera indiretta per ionizzazione da parte dell'elettrone delle molecole circostanti e quindi formazione di radicali liberi, tuttavia la modalità più probabile con la quale i raggi X o γ interagiscono è quella indiretta.

<u>Neutroni</u>

Analogamente a tutte le particelle neutre non sono soggetti a interazioni di tipo coulombiano con gli elettroni e i nuclei della materia ma solo ad interazioni di tipo forte con i nuclei della materia. Questo tipo di interazioni avvengono solamente quando il neutrone dista meno di 10⁻¹⁵ m dal nucleo, il che lo rende altamente penetrante. Anch'essi interagiscono in maniera indiretta con il materiale andando a formare in primo luogo dei protoni di rinculo che poi generano reazioni successive. A seconda delle energie alle quali i neutroni vengono emessi si possono avere diverse interazioni: per neutroni con energie dell'ordine dell'eV (neutroni termici) l'interazione principale è la cattura neutronica da parte dell'atomo e la sua conseguente diseccitazione; i neutroni veloci sono soliti interagire tramite urti elastici con i nuclei; per neutroni con energia superiore alle centinaia di MeV è tipico il processo di spallazione, ovvero la frammentazione del nucleo in più parti in seguito all'interazione con il neutrone.

<u>Elettroni</u>

Interagiscono con la materia per lo più tramite urto elastico con gli elettroni atomici (o più raramente con i nuclei) perdendo gran parte della loro energia. Il percorso effettuato è del tutto casuale essendo essi di massa uguale, o nettamente minore, ai bersagli incontrati e per tanto soggetti ad eventi di scattering difficilmente prevedibili. Un altro modo in cui essi possono perdere energia è attraverso l'interazione con il campo elettromagnetico generato dall'atomo il quale tende a frenare il cammino degli elettroni e stabilizzarli nelle proprie shell.

Particelle cariche

Una particella carica che attraversa un mezzo perde energia tramite numerosi urti elastici con gli elettroni ma il suo cammino resta pressoché invariato a causa dell'elevata differenza di massa. Un processo meno probabile è l'urto tra la particella e il nucleo di un atomo che porta ad una considerevole perdita di energia ed al conseguente frazionamento del nucleo, analogamente al caso dei neutroni.

Particelle cariche come i *protoni* interagiscono sia con gli elettroni orbitali, che con i nuclei atomici producendo particelle secondarie pesanti sempre più frequentemente al crescere dell'energia dei protoni proiettile. Anch'essi possono interagire sia in maniera



diretta che indiretta ma al crescere della densità di ionizzazione della traccia aumenta l'importanza dell'azione diretta e quindi il danno biologico. La profondità di penetrazione R dei protoni dipende in modo approssimativamente lineare dall'energia

quest'ultima.

posseduta (Figura 1.1) e ovviamente dalla densità del mezzo attraversato: risulterà maggiore in mezzi meno densi; ad esempio, all' energia di 6 MeV in aria $R \approx 40$ cm, mentre in acqua (della quale è composto in maggior misura il tessuto umano) $\mathbf{R} \approx 0.5$ cm. Particelle cariche più pesanti, come ad esempio gli ioni carbonio, presentano un comportamento analogo con densità di ionizzazioni diverse a seconda della massa in considerazione e crescenti al crescere di quest'ultima.

Indipendentemente dal tipo di particella carica la relativa perdita di energia per unità di cammino $-\Delta Ec/\Delta x$ (*stopping power*) è massima alle basse energie e diventa all'incirca costante per energie più elevate (Figura 1.2). Essa dipende da vari fattori quali la

massa, la velocità, la carica etc. e può essere espressa dal punto di vista classico dalla relazione di Bohr. Se le particelle in esame viaggiano ad una velocità prossima alla luce le approssimazioni classiche non sono più valide ed è necessario introdurre correzioni relativistiche alla formula di Bohr: sulla base di queste considerazioni si ottiene la formula di Bethe–Bloch (B-B) il cui andamento è illustrato in figura 1.3. Essa esprime lo stopping power della particella in un materiale con una data densità elettronica in funzione del prodotto

$$\begin{array}{c}
10 \\
8 \\
6 \\
6 \\
5 \\
6 \\
7 \\
9 \\
9 \\
9 \\
1 \\
1 \\
0.1 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0 \\
1.0$$

Figura 1.3 - Andamento della formula di Bethe-Bloch per particelle cariche in diversi mezzi. Si noti che sulle ascisse è riportata la perdita di energia in rapporto alla densità del materiale, in questo modo è stato possibile rappresentare l'andamento della formula in diversi mezzi.

$$\beta \gamma \text{ dove } \beta = v/c \text{ e } \gamma = 1/\sqrt{1-\beta^2}$$

Dalla relazione di B-B si possono ricavare alcune importanti considerazioni sulla perdita di energia:

dipende direttamente dalla carica e indirettamente dalla massa della particella proiettile ed in prima approssimazione può considerarsi indipendente dal mezzo attraversato;

- per grandi valori di gamma tende ad un valore costante;
- è proporzionale al quadrato della carica della particella per cui particelle alfa avranno una perdita di energia 4 volte maggiore rispetto ad un protone.

1.2 Dosimetria

Una grandezza utile per poter quantificare dal punto di vista radiobiologico l'effetto dell'irraggiamento è la quantità di energia depositata dalla radiazione per unità di massa del materiale ricevente, indipendentemente dal tipo di radiazione ionizzante con cui si ha a che fare. Questa grandezza viene indicata con il nome di *dose assorbita*, la cui unità di misura è il Gray definito come segue: 1 Gray = 1 Joule/kg.

L'andamento della dose rilasciata nel mezzo (e quindi la perdita di energia per unità di percorso) in funzione della profondità di penetrazione, cioè dello spessore del mezzo attraversato è espresso dalla curva di Bragg (Figura 1.4). Il numero di eventi di ionizzazione per cm, ossia la *densità di ionizzazione*, è ovviamente in relazione diretta con la quantità di energia rilasciata dalla particella e aumenta al diminuire dell'energia



Figura 1.4 - Curva di Bragg per un protone. Nella prima parte del percorso la perdita di energia è minore e pressoché costante (plateau), nel tratto finale è presente un elevato aumento nell'energia (picco di Bragg) in corrispondenza circa del termine del percorso della particella all'interno del mezzo.

di quest'ultima nel mezzo fino a raggiungere un picco, detto picco di Bragg, oltre il quale può ritenersi Proprio trascurabile. grazie alla presenza di questo picco è possibile migliorare la precisione balistica delle mediante radioterapie l'uso di particelle cariche che come visto, al contrario di quanto accade con i fotoni, rilasciano gran parte della propria in energia in corrispondenza di un zona spaziale piuttosto limitata.

Nell'intento di definire la quantità di energia assorbita in una zona "ristretta" di materiale per unità di percorso è stato introdotto il Linear Energy Transfer (LET) la cui definizione analitica è il rapporto tra l'energia trasferita localmente in media nel mezzo (dE) in una data distanza attraversata (dl). Rispetto alla stopping power precedentemente analizzata, il LET tiene conto solamente dell'energia rilasciata fino alla seconda ionizzazione ossia fino alla formazione degli elettroni secondari, restringendo così il range spaziale di interesse a circa 5 nm (in acqua), dimensioni confrontabili con quelle del DNA (circa 2 nm). Il LET consente di rapportare gli effetti dell'esposizione alla qualità della radiazione, a particelle ad alto LET infatti è associato un effetto della radiazione di tipo diretto. Il LET però è da considerarsi un parametro utile per avere una stima del danno riportato solo in prima approssimazione: essendo infatti una quantità valutata sulla base di una media, spaziale o energetica, la conoscenza del solo LET può risultare insufficiente quando si vuole considerare lungo il cammino effettuato la quantità del rilascio energetico, la quale può variare sensibilmente nell'arco di pochi mm come avviene nel caso dei protoni. Ad un aumento dell'energia della particella corrisponde una diminuzione del relativo LET: protoni di 10 MeV hanno un LET di circa 4,7 keV/µm mentre ad un protone di 150 MeV è associato un valore di circa $0.5 \text{ keV}/\mu\text{m}$.

Un altro parametro tipicamente usato in radiobiologia che risulta particolarmente utile dal punto di vista comparativo è la *Relavite Biological Effectiveness* (RBE) definita come il rapporto tra una dose campione, solitamente di raggi x, e la dose incognita necessaria a indurre uguale danno biologico.

L'RBE è una quantità dipendente sia dal tipo di particella, e da dose e LET relativo, che dalle caratteristiche del tessuto sottoposto a radiazione. Il suo valore si può estrapolare dalle curva di sopravvivenza (Figura 1.5); le suddette curve mostrano la relazione tra la frazione di cellule irradiate che non vanno in contro a morte riproduttiva (e quindi considerate sopravvissute) e la dose di radiazione ricevuta.

A causa della non linearità della curve di sopravvivenza e del loro differente andamento a seconda della radiazione considerata, il valore dell'RBE può variare a seconda della dose (o ugualmente della frazione di sopravvivenza) considerata.



Figura 1.5 – Confronto tra curve di sopravvivenza cellulare per raggi x e per una generica particella.

1.3 L'effetto biologico della RI

A seconda delle modalità con le quali viene indotto il danno all'interno della cellula si parla di radiazione *direttamente* o *indirettamente* ionizzante. Nonostante la convenzionale suddivisione entrambi i processi possono avvenire simultaneamente.

Per azione diretta della radiazione si intende il processo per il quale la radiazione agisce direttamente con il target critico delle cellule (DNA) e quest'ultimo viene ionizzato o eccitato causando alterazioni molecolari che durante la successiva fase chimica e biologica dell'azione della radiazione possono tradursi in lesioni permanenti del DNA stesso.

L'azione indiretta è quella secondo cui la radiazione danneggia il DNA tramite due step: produzione per ionizzazione di particelle secondarie, principalmente radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno derivanti dalla radiolisi dell'acqua, e danneggiamento effettivo del DNA tramite quest'ultime.

I radicali liberi sono delle molecole o atomi che presentano un elettrone spaiato nella shell più esterna che li rende altamente reattivi dal punto di vista chimico. Una tipica reazione che avviene all'interno della cellula (costituita prevalentemente da acqua) che porta alla formazione di radicali liberi è quella relativa alla ionizzazione della molecola di acqua:

$$H_20 \rightarrow H_20^+ + e^-$$

Lo ione radicale H_2O^+ decade velocemente per interazione con l'acqua nel radicale libero OH· il quale è neutro ma ha ancora un elettrone spaiato ed è possibile che interagisca con il DNA. Mentre la fisica del processo di assorbimento si svolge in un arco di tempo dell'ordine di 10⁻¹⁵ s, i cambiamenti chimici dovuti alla rottura dei legami molecolari cellulari si ripercuotono a livello biologico in tempi diversi: a seconda di vari fattori la loro manifestazione può avvenire in un arco temporale che va da ore a decenni.

Le particelle cariche pesanti agiscono prevalentemente attraverso l'azione diretta, a differenza della radiazione sparsamente ionizzante (fotoni). Come vedremo, questo ha delle importanti ripercussioni sull'efficacia con cui la prima induce effetti biologici relativamente ai fotoni. Inoltre, l'effetto diretto della radiazione ionizzante è tipicamente non modificabile al contrario invece dell'effetto indiretto le cui conseguenze possono essere modulate tramite l'utilizzo di opportune sostanze radioprotettrici se esse hanno potere anti-ossidante, così da combinarsi con i radicali liberi mitigandone il danno, o radiosensibilizzanti se queste esibiscono proprietà pro-ossidanti^[1]. Tali sostanze, specificatamente farmaci, sono per esempio largamente usate nella radioterapia convenzionale per contrastare la radioresistenza intrinseca di alcuni tumori, spesso causata dalla presenza di regioni ipossiche^[8].

1.3.1 Conseguenze a livello cellulare

I radicali liberi derivanti dall'azione della radiazione possono creare danni principalmente ai lipidi, alle proteine e al DNA.

Il componente cellulare che risente del danno dei radicali liberi ai lipidi è la membrana, essendo composta da un doppio strato di fosfolipidi: la presenza di ossigeno molecolare, sotto forma di radicali liberi, causa la perossidazione lipidica e la conseguente erosione della membrana della cellula la quale va in contro ad un invecchiamento precoce; le patologie indotte possono essere più o meno gravi a seconda dell'estensione del danno. I radicali liberi possono ossidare anche i gruppi laterali degli amminoacidi delle proteine causandone l'alterazione della loro funzione



Figura 1.6 – Rappresentazioni schematiche di SSB (in alto) e DSB (in basso)

e la formazione di legami incrociati.

L'effetto più deleterio causato dalla radiazione, che sia essa di tipo diretto o indiretto, è il danneggiamento della catena nucleotidica e/o delle basi azotate di cui è composto il DNA, che costituisce quindi il target principale della radiazione. Esso è presente in un'unica copia all'interno della cellula; ciò significa che singole alterazioni possono causare conseguenze permanenti e letali all'interno dell'organismo. Nella materia vivente non è raro che avvengano erronee trascrizioni del codice genetico durante la duplicazione del DNA; questi eventi vengono controllati e limitati da particolari proteine (MGMT, DNA-glicosilasi, AP-endonucleasi etc.) che assicurano il riparo di eventuali errori garantendo che la probabilità di mutazioni sia considerevolmente bassa nel passaggio da una generazione di cellule all'altra; quando le cellule, o in generale gli organismi, vengono sottoposte a

radiazione possono riportare danni lungo la catena del DNA che vanno ad aggiungersi a quelli stocastici di cui sopra accennato. Se la radiazione ha un'elevata densità di ionizzazione, descritta come visto nel paragrafo 1.2 dal LET, non è detto che il meccanismo di riparo cellulare riesca a gestire e correggere la totalità dei danni riportati. Ad un evento di ionizzazione quindi può seguire il riparo di quest'ultimo tramite meccanismi cellulari (che non sempre risultano perfetti) o una destabilizzazione del genoma la cui entità del danno non è connessa direttamente alla quantità delle lesioni ma piuttosto alla loro qualità.

Tra i molteplici danni che la RI può causare al DNA, come ad esempio la formazione di legami incrociati tra il DNA e le proteine o tra i filamenti del DNA stesso, i più importanti dal punto di vista radiobiologico sono i cosiddetti SSB *(single-strand break)* e DSB *(double-strand break)*: i primi corrispondono ad una rottura di uno dei due filamenti del DNA e sono solitamente facilmente riparabili grazie all'utilizzo del filamento complementare come modello. I DSB si riferiscono alla rottura contemporanea dei due filamenti di DNA opposti o separati da un numero trascurabile di basi e causa l'interruzione della continuità cromatinica (Figura 1.6). I DSB sono considerati le lesioni radioindotte più gravi per le cellule in quanto possono portare alla morte cellulare, a mutazioni ed a carcinogenesi. Al crescere del LET della radiazione, si osserva una crescente "clusterizzazione" del danno, con più DBS e SSB spazio-temporalmente ravvicinati: questo si ritiene essere alla base del maggiore RBE delle particelle cariche pesanti in quanto i meccanismi di riparo intracellulari non riescono a gestire molteplici danni concomitanti.

La conseguenza diretta dei danni al DNA è l'insorgenza di alterazioni sia nella struttura che nel numero di cromosomi della cellula: le aberrazioni cromosomiche. Quest'ultime possono essere classificate in vari tipi a seconda della tipologia del danno da cui sono causate e dalla fase del ciclo cellulare in cui si trova la cellula al momento dell'irraggiamento. La tipologia e la quantità di aberrazioni cromosomiche indotte sono espressione della radiorisposta della cellula al trattamento ed indice della qualità della radiazione, come verrà discusso del capitolo 3.

2. Sviluppi delle adroterapie

2.1 Terapie con particelle cariche

Le terapie antitumorali con fasci di particelle cariche (adroterapia) sono utilizzate fin dal 1954 in campo medico; nel corso del tempo sono stati trattati più di 25 000 pazienti tramite protonterapia e circa 4 000 tramite terapie con ioni pesanti, principalmente ioni carbonio. L'obiettivo principale delle radioterapie consiste nel preservare il più possibile la zona sana circostante il tumore massimizzando il danno a quest'ultimo, a tale scopo sono volte le ricerche riguardanti queste terapie all'avanguardia, le quali al contrario di ciò che accade per le terapie convenzionali risultano essere più efficaci e di gran lunga meno invasive.

Dal punto di vista fisico, la differenza più evidente, e promettente, tra le terapie con fotoni e l'adroterapia sta nel profilo di dose invertito, come si può notare dalla figura



Figura 2.1 – Dose rilasciata all'interno del tessuto in funzione della profondità raggiunta dalle particelle all'interno di quest'ultimo. La linea tratteggiata è relativa ai fotoni mentre quella continua a ioni carbonio.

2.1. Ciò significa che, nel caso delle terapie convenzionali, la gran parte della dose è rilasciata nella regione iniziale ossia in entrance, al contrario di quanto avviene per fasci di ioni.

Nel seguito si farà una distinzione tra protonterapia e carbonterapia: per entrambe saranno illustrate le caratteristiche, gli aspetti positivi e le problematiche ancora aperte.

Nel paragrafo successivo si parlerà delle terapie con particelle neutre per poi

introdurre e analizzare la PBFT nel capitolo a seguire.

2.1.1 Protonterapia

Come sopra accennato, il motivo per il quale nasce e si sviluppa la protonterapia è la necessità di conformare al meglio possibile la dose erogata alle zone tumorali. Le energie di interesse per fasci di protoni utilizzati a tali scopi vanno dai 150 ai 200 MeV per trattamenti alle profondità di 16-26 cm, mentre per tumori più superficiali, come il melanoma oculare si utilizzano fasci ad energie minori (nell'ordine delle decine di MeV).

Analizzando le diverse difficoltà nell'uso della radioterapia adronica trattiamo innanzitutto il problema della quantità di dose assorbita. Ovviamente la sensibilità delle cellule alla radioterapia è diversa a seconda del tipo di cellula e in questo la natura



Figura 2.2 – Confronto tra trattamento con radioterapia (sinistra) e con protonterapia (destra). Si noti il notevole effetto di sparing del tessuto sano nel caso della protonterapia.

viene in contro alle nostre necessità in quanto diversi studi confermano che nella maggior parte dei casi (vedremo discordanti nella sezione esempi successiva) le cellule tumorali risultano più sensibili alle radiazioni rispetto a quelle sane. Dall'analisi delle curve dose-profondità per i fotoni si nota un andamento di tipo esponenziale decrescente nell'assorbimento di quest'ultimi durante la radioterapia, per quanto riguarda le terapie con protoni esse, al pari di quelle con ioni carbonio, presentano una regione ad alto rilascio di dose entro

una distanza finita, che può essere fatta coincidere con la zona tumorale. La distanza alla quale si ha il rilascio della percentuale più alta di energia si trova in corrispondenza del picco di Bragg avente una larghezza limitata e definita; come si nota in figura 2.2 gran parte del tessuto retrostante il tumore può considerarsi esente da danni per radiazione. Per quanto riguarda il tessuto antistante in figura 2.1 è mostrato come il plateau iniziale risulti trascurabile rispetto alla zona corrispondente al picco il quale si estende per distanze dell'ordine del mm.

Per il trattamento di zone più estese dunque, i fasci così descritti non sono sufficienti in quanto non riuscirebbero a coprire la zona tumorale (dell'ordine del cm) e non garantirebbero la morte cellulare della totalità del target. Per questo motivo, in radioterapia è necessario realizzare il cosiddetto picco di Bragg allargato o SOBP (*Spread-Out Bragg Peak*). Esso si ottiene mediante la convoluzione di vari picchi di Bragg di varie energie (e quindi diversi range) in modo tale da conservare il plateau iniziale e, allo stesso tempo, allargare la zona nella quale si ha il massimo rilascio di energia (Figura 2.3).

Al pari delle curve dose-profondità dei singoli fasci di protoni, anche il picco allargato risultante ha un rapido fall-off oltre il quale gli eventi di ionizzazione, e dunque la dose assorbita dal corpo, è trascurabile. Al SOBP corrisponde anche un innalzamento del plateau iniziale che continua ad essere trascurabile rispetto alla dose rilasciata all'end-point e, in ogni caso, risulta sempre al di sotto della dose relativa ai fasci di elettroni o fotoni (ad energie necessarie per ottenere lo stesso risultato terapeutico) in corrispondenza delle zone sane circostanti il tumore, come mostrato in figura 2.3. Un altro punto importante è la dispersione laterale dell'energia del fascio:



Figura 2.3 – In giallo e blu rispettivamente la curva doseprofondità(curva di Bragg) per fotoni ed elettroni. In rosso è rappresentato il picco di bragg di varie curve di Bragg a varie intensità. In verde è rappresentato il SOBP corrispondente al contributo totale delle curve a diverse intensità e tenente conto anche dell'innalzamento del plateau iniziale. Si noti come le intensità dei picchi per i protoni sono posizionati in modo da coprire l'intera zona tumorale al di là della quale si ha una rapida ricaduta di energia rilasciata.

all'aumentare della massa delle particelle diminuiscono gli scattering multipli e migliora il fall-off laterale e distale, ossia la traccia di ionizzazione della particella risulta più lineare, come si può notare in figura 2.4. Figura 2.4 – Tracce di ionizzazione di varie particelle all'interno di materiale biologico [i puntini bianchi rappresentano un evento di ionizzazione.] è L'immagine ottenuta sovrapponendo tracce simulate con una foto al microscopio elettronico di una cellula. Si noti come, al crescere dell'energia delle particelle, diminuiscano i fenomeni di ionizzazione e quindi il LET, il che comporta una diminuzione a sua volta dell'efficacia radiobiologica della radiazione. La traccia dei protoni a 500 keV risulta netta e lineare, con eventi di scattering multiplo laterale piuttosto rari. Lo stesso non si può dire per le tracce sottostanti riguardanti gli elettroni.



Bisogna inoltre distinguere tra quantità di danno e qualità di danno: radiazioni con un numero di eventi di ionizzazione alto ma con una frequenza bassa sono meno efficaci di radiazioni con un numero di eventi per unità di cammino (*densità di ionizzazione*) più alto. Assumendo che il DNA sia il target principale, nel primo caso i danni saranno per lo più SSB, più facilmente riparabili dalla cellula. Nel caso di densità di ionizzazione molto alta, come il caso dei protoni e in generale di particelle cariche pesanti, eventi di DSBs saranno più probabili e aumenterà il rischio di danno permanente riducendo la probabilità di sopravvivenza cellulare.

Dalla figura 2.4 si nota quindi che in radiobiologia è fondamentale la scelta del tipo di radiazione oltre che della dose rilasciata da quest'ultima. Ugual dose di due diversi tipi di particelle non significa ugual danno in quanto la densità di ionizzazione e la tipologia di danno rivestono un ruolo fondamentale essendo strettamente legati al concetto di LET e RBE: tracce con densità di ionizzazione alta avranno un LET maggiore, creeranno danni più importanti al target designato e di conseguenza l'RBE sarà più alto.

2.1.2 Carbonterapia

Mentre in alcuni casi oncologici i tumori sono irrorati dai vasi sanguigni al pari del tessuto circostante, a volte nel processo di crescita della massa tumorale si ha un collasso di quest'ultima su se stessa, il che provoca un deficit nell'irrorazione. Al contrario di quanto si possa pensare, il minore afflusso di sangue non mina le capacità proliferative delle cellule tumorali anzi rende più ostica la rimozione di quest'ultime tramite radioterapia convenzionale in quanto la minor presenza e/o l'assenza di ossigeno implica una netta diminuzione dei prodotti dell'azione indiretta della radiazione. In casi come questo le radioterapie (RT) in uso non risultano adatte e i tumori vengono definiti radioresistenti.



Figura 2.5 – Confronto tra tracce di ionizzazione in cellule[In verde sono sappresentati i DSB], saggio ottenuto sfruttanto la proprietà di fosforilazione degli istoni. A) cellule irradiate con raggi-X.B) con ioni carbonio. Si noti come nel primo caso i DSB sono sparsi in modo casuale mentre nella figura b) seguono un andamento lineare con pochi eventi che si discostano dalla traccia principale.

Terapie più efficienti sono quelle con ioni carbonio: in quanto particelle cariche più pesanti dei protoni, essi conservano le proprietà fisiche balistiche tipiche dei protoni, di maggiore precisione rispetto ai fotoni, ai cui benefici si aggiunge una maggiore efficacia biologica. Anche per gli ioni C quindi si ha un maggiore sparing del tessuto sano e la possibilità di confinare la zona irradiata. Si ricorda infatti dalla formula di B-B che l'energia rilasciata in un mezzo è proporzionale al numero di cariche elementari della particella incidente che ovviamente risulta maggiore nel caso degli ioni C rispetto ai protoni; ciò si traduce in una maggiore densità di ionizzazione che si traduce in un maggiore RBE.

Come per i protoni anche gli ioni C hanno una traccia di ionizzazione ben definita, ma l'aumento di massa porta ad un incremento della linearità di quest'ultima a causa della minore probabilità di perdere energia per scattering. Anche gli eventi di ionizzazione laterali risultano minori rispetto alle RT sia con raggi x che con protoni.



Figura 2.6 – Andamento della dose (in alto), della frazione di cellule sopravvissute (al centro) e dell'RBE (in basso) in funzione della distanza percorsa in acqua per ioni carbonio.

Dal punto di vista biofisico gli ioni carbonio risultano convenienti rispetto ai protoni in quanto si ha un rapporto maggiore tra l'energia rilasciata in corrispondenza del picco e quella relativa al plateau iniziale. Dall'analisi dell'andamento dell'RBE in diversi tipi di tessuto e a LET diverso si può estrapolare che il suo valore risulta piuttosto alto soprattutto per linee cellulari radioresistenti e con alta capacità di riparo. Nello specifico, il valore dell'RBE è maggiore in corrispondenza del maggior rilascio di energia come si può notare dalla figura 2.6 nella quale è messa in evidenza la relazione di cellule il numero tra sopravvissute ad una cerca profondità e il valore dell'RBE a quella stessa distanza.

Il valore dell'RBE in ingresso è basso in confronto a quello in corrispondenza del picco di Bragg relativo ad un alto LET della radiazione, ad una deposizione di energia

maggiore e ad una maggiore efficacia radiobiologica.

L'alto valore dell'RBE per la RT a ioni carbonio predilige il suo utilizzo per casi di tumori radioresistenti situati in zone sensibili per i quali gli effetti della protonterapia sono risultati confrontabili con quella della RT a raggi x.

2.1.3 Vantaggi e problematiche

Le RT con protoni e con ioni C risultano indubbiamente vantaggiose sotto vari punti di vista. Per quanto riguarda la dose rilasciata in funzione della profondità, entrambe vantano della presenza della zona del picco di Bragg, che garantisce una migliore precisione balistica nella scelta del target ricevente dose maggiore. In figura 2.7 sono confrontate le tipologie di radiazione finora discusse: si noti come le RT a particelle presentano la nota caratteristica della curva dose-profondità invertita rispetto a quella a raggi x garantendo così un maggiore sparing. Per la RT a ioni C è evidente il maggior rapporto rispetto alla curva dei protoni tra radiazione assorbita in corrispondenza del picco e quella relativa al tratto antecedente. Una considerazione



importante può essere fatta sulla parte finale della curva relativa agli ioni carbonio: mentre per i protoni si ha un rapido e netto fall-off successivo al picco di Bragg, per quanto riguarda gli ioni carbonio il fall-off non risulta altrettanto netto in quanto si ha la presenza di una coda che si protrae per distanze variabili a seconda del tessuto e dell'intensità

Figura 2.7 – *Curva dose* – *profondità per raggi x, protoni e ioni carbonio. In grigio sono evidenziate le zone relative al tessuto sano e al tumore (target principale).*

della radiazione. Ciò è dovuto al fenomeno della frammentazione, tipico di ioni pesanti come il carbonio e dovuto all'interazione ad alta energia di quest'ultimi con le molecole circostanti. Sebbene la radiazione relativa a questo fenomeno risulti minima non è detto che possa considerarsi trascurabile nei casi di tumore circondati da zone altamente sensibili.

Esperimenti *in vivo* hanno mostrato come la protonterapia risulti efficiente in casi di tumori presenti in zone sensibili che necessitano di precisione quanto più alta possibile, come quelli pediatrici, mentre la carbonterapia risulti più adatta per tumori radioresistenti circondati da zone sensibili come ad esempio i cordomi situati alla base cranica. L'alto RBE della RT a ioni carbonio, inoltre, suggerisce la possibilità di diminuire la frequenza delle sedute pur ottenendo gli stessi effetti; in questo modo sarebbe possibile trattare un maggior numero di pazienti in un arco temporale minore.

2.2 Boron Neutron Capture Therapy

La BNCT è una tecnica altamente selettiva sviluppata sulla scia della ricerca in ambito radiobiologico di tecniche sempre più avanzate e precise per il trattamento di tumori e delle relative metastasi. I primi studi riguardanti questa terapia furono condotti a partire dagli anni '60 al BNL (Brookhaven National Laboratory) e all' MIT (Massachusetts Institute of Technology) ottenendo risultati non incoraggianti. La BNCT ritornò in auge grazie a studi promettenti da parte di Hatanaka e Nakagawa nel '94 ed alla crescente conoscenza e disponibilità dei composti borati utilizzati per questa terapia. Nonostante i dati in materia siano poco numerosi come anche i campioni sui quali sono stati condotti gli esperimenti^[25], la BNCT è ancora considerata una delle terapie all'avanguardia in campo radiobiologico e una delle speranze future per la cura di tumori letali come il glioblastoma multiforme o il melanoma allo stadio metastatico.

2.2.1 Principi biofisici e problematiche

La BNCT si basa sulla cattura neutronica da parte del ¹⁰B e sulla successiva emissione delle particelle prodotte dalla reazione nucleare.

Esistono numerosi nuclidi con un'elevata propensione ad assorbire neutroni a bassa energia. Il ¹⁰B è uno dei candidati migliori per la sua facile reperibilità in natura e la sua stabilità dal punto di vista radioattivo, la grande conoscenza maturata riguardo la chimica del boro e dei relativi composti e l'alto LET dei composti derivanti dalle reazioni con neutroni termici ed epitermici. La BNCT è una terapia di tipo binario, avviene ciò in due step: la prima fase consiste nella somministrazione all'organo/tessuto/cellula di un composto di boro al fine di arricchire la concentrazione di quest'ultimo nelle cellule; a seguire, il target viene sottoposto all'irraggiamento con neutroni. L'aspetto positivo delle terapie binarie è che i processi che le compongono possono essere studiati ed implementati separatamente per poi essere calibrati e messi in atto nell'insieme nel modo e con le tempistiche più opportune. Le richieste necessarie affinché questa terapia abbia validi risultati sono un'alta concentrazione di composto borato all'interno delle cellule tumorali e un flusso appropriato di neutroni termici ad energie tali da permettere la reazione: analizziamo nel dettaglio questi due punti cruciali.

Per quanto riguarda la produzione di fasci di neutroni adatti alla terapia, furono riscontrati problemi fin dai primi tentativi di applicazione. Quest'ultimi infatti fallirono soprattutto a causa dell'energia non sufficientemente bassa dei neutroni collidenti con il boro all'interno delle cellule. Oggigiorno il problema è stato risolto con l'utilizzo di neutroni epitermici la cui sezione d'urto per cattura da parte del boro è molto elevata (3840 barn) rispetto a quella da parte degli altri elementi presenti nei composti organici.

Le reazioni di interesse sono:

$$n_{epith} + {}^{10}B \rightarrow \begin{cases} \alpha \ (1.78 \ MeV) + {}^{7}Li \ (1.01 \ MeV) \\ \alpha (1.47 \ MeV) + {}^{7}Li^* \ (0.84 \ MeV) \rightarrow {}^{7}Li + \gamma \ (0.477 \ MeV) \end{cases}$$
(6%) (94%)

I prodotti di reazione sono, in entrambi i casi, particelle ad alto LET con range molto basso (circa 8 μ m e 5 μ m rispettivamente per le particelle alfa e per i nuclei di litio) ed inferiore al diametro cellulare tipico (circa 20 μ m). Ciò significa che i prodotti rilasciano tutta la loro energia, e quindi creano la totalità degli eventi di ionizzazione, all'interno della cellula nella quale avviene la cattura neutronica da parte del boro causandovi danni per lo più letali. Da qui il problema di iniettare una concentrazione sufficiente del composto ed in modo selettivo alle sole cellule tumorali.

Infatti, nonostante la sezione d'urto per cattura neutronica degli elementi presenti nei composti biologici sia di vari ordini di grandezza minore rispetto a quella del boro, le elevate concentrazioni di questi elementi aumentano sensibilmente la probabilità che avvengano reazioni come quelle con azoto ¹⁴N (n, p)¹⁴C o con idrogeno ¹H (n, γ)²H. Studi in merito hanno dimostrato che una concentrazione di boro di 50 $\mu g/g$ all'interno della cellula tumorale garantirebbe l'assorbimento da parte di quest'ultima dell'86% della radiazione^[24]. Un ruolo importante per la BNCT viene assunto quindi dalla concentrazione relativa di boro all'interno delle cellule tumorali rispetto a quelle sane, il cui rapporto deve essere superiore ad un certo valore limite (variabile a seconda della zona di interesse), al di sotto del quale la terapia non risulta più efficace. Per questo motivo gran parte della ricerca scientifica in merito si è concentrata sulla tipologia di composto borato da utilizzare: i più qualificati al momento risultano essere il BPA e il BSH. Vari esperimenti sull'effettiva capacità di questi composti nel legarsi ad un tipo di cellule piuttosto che ad un altro hanno dimostrato risultati positivi anche se il campo di sperimentazione risulta piuttosto limitato per suggerire un'applicazione vera e propria a livello medico. Nonostante ciò la letteratura scientifica presenta casi recenti di applicazione in via sperimentale di questa terapia ad una cerchia ristretta di pazienti con esiti a volte positivi e a volte dalla dubbia validità^[25]. La grande attenzione posta nei confronti della BNCT risiede nel fatto che in via teorica essa costituisce il metodo più efficace per selezionare ed eliminare target di dimensioni minime e situati in qualsivoglia posizione risparmiando il tessuto circostante. Il suo inserimento nella cerchia delle terapie scientificamente approvate sarà effettivo se e quando saranno risolti i problemi riguardanti la ricerca di composti borati il più possibile selettivi e lo sviluppo di metodologie sicure per rendere disponibili acceleratori di neutroni epitermici all'interno di strutture mediche.

3. La Proton Boron Fusion Therapy

Nel capitolo precedente sono state analizzate le più recenti tecniche che sfruttano particelle cariche (o come fasci esterni o prodotte a mezzo di reazioni nucleari), ognuna delle quali come visto presenta vantaggi e limiti. La protonterapia rappresenta una tecnica ad altissima precisione e quindi una valida alternativa alle convenzionali RT, soprattutto per casi di tumori pediatrici o circondati da zone sane radiosensibili. Le limitazioni per questo tipo di approccio terapeutico sono costituite per lo più dai tumori più radioresistenti, per i quali l'efficacia biologica dei protoni è paragonabile a quella delle terapie a raggi x, pur sempre col vantaggio del risparmio delle zone non tumorali. In tali casi, l'adroterapia con ioni carbonio costituisce l'alternativa più efficace grazie alla maggiore capacità di queste particelle, a parità di dose di protoni o fotoni, di causare danni letali alle cellule tumorali in corrispondenza del picco di Bragg. Diversi ostacoli impediscono un'adozione della terapia a ioni carbonio su vasta scala: l'incertezza sugli effetti a lungo termine causati lungo il plateau nelle cellule del tessuto sano, fenomeni di frammentazione in prossimità del picco che danno luogo alla formazione di particelle secondarie con energia sufficiente ad oltrepassare il SOBP e quindi danneggiare tessuti/organi sani e/o a rischio, ed, infine, gli elevati costi di costruzione e gestione degli acceleratori di particelle per accelerare questi ioni ad energie compatibili con il loro uso clinico, nell'ordine cioè di 300 MeV/n. Per questo motivo sono state esplorate nuove tipologie di terapie, dette binarie, come la precedentemente illustrata BNCT, che in via teorica risponde alle esigenze di precisione e risparmio del tessuto sano. Dal punto di vista pratico, però, esistono serie difficoltà per un'applicazione di routine di questa terapia, tra cui l'esigenza di disporre di composti borati altamente selettivi; inoltre l'utilizzo di neutroni termici, non aventi uno stopping power definito, pone dei dubbi riguardo l'effettiva capacità della terapia di agire esclusivamente in zone predefinite e di non intaccare i tessuti circostanti. Una nuova terapia che sembra includere i vantaggi delle precedenti e lasciare da parte gli aspetti negativi è la Proton Boron Fusion Therapy (PBFT).

Anch'essa è una terapia binaria basata però sulla reazione di cattura protonica da parte dei nuclei di ¹¹B iniettati nella zona di interesse. Il primo evidente vantaggio è quello di avere a che fare con una reazione "neutron-free" eludendo così i problemi riguardanti la produzione di neutroni, i quali sarebbero sostituiti con protoni, i cui fasci risultano più semplici da produrre e per la cui produzione si potrebbero utilizzare le strutture preesistenti usate per la protonterapia.

Oltre ad un vantaggio di tipo pratico, si riscontrano sostanziali benefici dal punto di vista radiobiologico. Dalla reazione in esame sono prodotte tre particelle α ad alto LET (nel caso della BNCT ne veniva prodotta una sola) per ogni protone incidente, ciò si traduce in una maggiore dose rilasciata al tessuto e quindi una maggiore capacità di indurre la morte cellulare. Inoltre, avendo a che fare con particelle cariche l'andamento della perdita di energia in funzione del percorso effettuato è ben descritto dalla curva di Bragg, pertanto è conservata la possibilità di rilasciare la maggior parte dell'energia in una zona ben determinata garantendo la medesima precisione della protonterapia.

Nei paragrafi seguenti verranno analizzate nel dettaglio le caratteristiche della PBFT.

3.1 Reazione nucleare p + ¹¹B

La reazione di cattura protonica da parte del ¹¹B fu investigata fin da prima degli anni novanta per la sua capacità di produrre particelle ad alta energia ed il suo possibile utilizzo nei reattori a fusione termonucleare^[33].

Essa è una reazione di nucleo composto con un elevato Q-valore positivo di 8.7 MeV, presenta una risonanza a 675 keV corrispondente alla formazione dello stato eccitato del ¹²C^[34]. Il nucleo composto formatosi decade β^+ in uno stato eccitato del ⁸Be e in una particella alfa primaria, in casi più rari (sezione d'urto di due ordini di grandezza minore) il carbonio decade nello stato fondamentale del berillio ma in entrambi i casi il berillio derivante dal decadimento del nucleo composto decade a sua volta in due particelle alfa secondarie. In casi ancor meno probabili (meno del 5%), il carbonio può decadere emettendo direttamente tre particelle alfa^[31]. Le possibili reazioni descritte sono così schematizzate:

$$p + {}^{11}B \rightarrow {}^{12}C^* \rightarrow \begin{cases} {}^{8}Be^* + \alpha \rightarrow 2\alpha + \alpha \\ {}^{8}Be + \alpha \rightarrow 2\alpha + \alpha \\ & 3\alpha \end{cases}$$

Per ognuna delle tre possibilità il risultato ultimo della reazione è la formazione di tre particelle alfa con energia tra i 2.5 MeV e i 5.5 MeV^[31].

Protoni e particelle alfa, essendo particelle cariche, perdono energia nella materia con un andamento descritto dalla curva di Bragg: per entrambe è presente un picco in corrispondenza del quale rilasciano la percentuale maggiore di energia. L'effetto della presenza di una regione arricchita di boro (BUR: Boron Uptake Region) in corrispondenza del picco è quello di aumentare la dose e migliorare il fall-off di quest'ultimo (Figura 3.1)



Figura 3.1 – Profilo laterale della dose rilasciata da fasci di protoni in acqua (rosso) e in presenza di composto borato (nero).

senza modificare la posizione del picco stesso^{$\lceil 29 \rceil$}.

3.2 Possibili applicazioni della PBFT

Le proprietà della reazione descritta sembrano risultare adatte, in linea di principio, per la sua applicazione in campo medico alla cura dei tumori in quanto permetterebbero di superare gli ostacoli presenti nelle altre tipologie di terapie.

Sfruttando la selettività e la precisione dei protoni e la loro caratteristica di perdere gran parte dell'energia entro un limitato intervallo spaziale ad una profondità variabile a seconda delle necessità, vengono risolti i problemi della BNCT concernenti la ricerca di composti borati altamente selettivi in quanto la presenza o meno di questo composti nei tessuti circostanti la zona di interesse risulta irrilevante. Infatti, anche se fosse presente del composto borato all'interno delle cellule sane che circondano il tumore, la probabilità che avvenga effettivamente la reazione in tali zone risulterebbe essere molto bassa in quanto il protone non avrebbe a disposizione sufficiente energia, al contrario di quanto avverrebbe nella zona prescelta.

Per quanto riguarda le particelle alfa prodotte, anch'esse presentano il caratteristico picco ed inoltre rilasciano la totalità della loro energia entro un range limitato, inferiore alle dimensioni tipiche delle cellule tumorali (circa $30 \ \mu m$).

Dal punto di vista radiobiologico esse sono considerate particelle ad alto LET, aventi una densità di ionizzazione molto alta: dalle considerazioni fatte nei capitoli precedenti è evidente che particelle con caratteristiche di questo tipo sono capaci di indurre dei danni non solo in quantità maggiore ma anche con conseguenze più gravi dal punto di vista della sopravvivenza cellulare.

Grazie a queste caratteristiche, la PBFT risulta essere potenzialmente altamente efficace nell'indurre la morte cellulare; inoltre, dato che con l'incidenza di un singolo protone si producono tre particelle alfa, il flusso necessario per indurre la stessa quantità di danno indotta dalla BNCT è minore rispetto a quest'ultima, tramite la quale per ogni reazione si ottiene una singola particella alfa.

Un' altra interessante caratteristica della PBFT è la possibilità di monitorare in tempo reale la zona nella quale avvengono le reazioni nucleari all'interno del tessuto grazie all'emissione di raggi γ a 718 keV rilevabili tramite SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography). L'intensità di questo tipo di emissione varia a seconda del composto borato utilizzato: da simulazioni condotte in merito^[30] è scaturito che i raggi γ emessi da interazioni di protoni con composti costituiti al 100% da ¹¹B sono sette volte meno intensi rispetto a quelli emessi da composti con una concentrazione naturale di boro (20% di ¹⁰B e 80% di ¹¹B) e trenta volte meno intensi rispetto a quelli emessi con composti costituiti al 100% da ¹⁰B. Ciò suggerisce l'utilizzo di composti con percentuali diverse di ¹¹B a seconda del tipo di tumore da trattare e dell'intensità del raggio γ necessaria al monitoraggio.

3.3 Esperimento in vitro

L'esperimento di cui presenterò parte dei risultati è stato effettuato presso il Centro di AdroTerapia e Applicazioni Nucleari Avanzate di Catania (CATANA), situato presso i Laboratorio Nazionali del Sud (LNS-INFN)^[35].

Cellule epiteliali mammarie non tumorigeniche MCF-10A sono state irradiate con fasci protonici di 62 MeV posizionandole al centro del SOBP (18 mm di profondità). Il corrispondente LET incidente calcolato è di 5 keV/mm^[35].

L'obiettivo dell'esperimento è quello di verificare che le particelle particelle-prodotto della reazione alla base della PBFT siano effettivamente ad alto LET tramite lo studio dell'induzione del danno di queste particelle alla cellula, misurato in termini di frequenza di aberrazioni cromosomiche per cellula. In particolare l'analisi della frequenza di aberrazioni di tipo complesso sarà rilevante al fine di definire qualitativamente il tipo di radiazione in esame in quanto gli scambi complessi sono considerati il più affidabile biomarcatore di azione di radiazione ad alto LET^[36].

Allo scopo di studiare le aberrazioni cromosomiche indotte dalla radiazione sia in presenza che in assenza di BSH e la dipendenza della frequenza di aberrazioni dalla dose assorbita, le cellule sono state irradiate con dosi di 0, 0.5,2 e 4 Gy di protoni in presenza e non di composto borato (BSH a 80 ppm di ¹¹B).

L'utilizzo della linea cellulare MCF-10A non tumorigenica consente di ridurre gli effetti della presenza di danno fisiologico di base che portano alla formazioni di aberrazioni cromosomiche e di valutare quest'ultime principalmente come conseguenze dell'azione della radiazione, al contrario di quanto avverrebbe utilizzando cellule tumorali le quali tendono di per sé alla formazioni di aberrazioni.

Tramite il metodo della FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) sono state ottenute le immagini delle metafasi cellulari alle diverse dosi in esame, sia nel caso con BSH che senza. Esse ritraggono la prima metafase successiva all'irradiazione. Tramite il programma VRAIC le suddette immagini sono state analizzate e classificate come metafasi normali o aberranti. Nel caso di metafasi aberranti le aberrazioni sono state suddivise in base alla loro tipologia.

3.3.1 Classificazione delle aberrazioni

Si distinguono aberrazioni di tipo cromosomico e di tipo cromatidico. Le prime occorrono quando l'irraggiamento precede la duplicazione dei cromosomi durante l'interfase, le seconde quando l'irraggiamento è successivo alla suddetta fase.

A causa dell'impossibilità di classificare le aberrazioni cromatidiche tramite il programma utilizzato sono state considerate solamente quelle cromosomiche. Le tipologie di aberrazioni cromosomiche considerate sono:

- Reciproche: Traslocazione e Dicentrico (complete e non)
- Frammenti
- Complesse: Scambi non reciproci e Inserzioni

La *traslocazione completa* (scambio simmetrico) consiste nello scambio reciproco di un tratto tra due differenti cromosomi. La sua forma *incompleta* si può manifestare in vari modi:

- un cromosoma(1) con un tratto terminale appartenente ad un altro cromosoma(2);
- un cromosoma descritto come il caso precedente, con l'aggiunta di un frammento acentrico derivante dalla rottura del cromosoma(1).

I risultati ottenuti da questo tipo di aberrazione possono essere trasmessi (non senza implicazioni genetiche) alle generazioni cellulari successive in quanto non comportano difficoltà meccaniche durante la separazione dei cromatidi fratelli durante l'anafase. Nel caso di traslocazioni incomplete in cui si ha la formazione del frammento acentrico esso, non avendo un centromero e quindi non potendo essere direzionato verso uno dei poli della cellula durante l'anafase, viene eliminato dal patrimonio genetico delle cellule figlie. Si ha un *dicentrico completo* quando si ottiene un cromosoma con due centromeri unitamente ad un frammento acentrico composto da tratti dei due cromosomi coinvolti. Casi di *dicentrico incompleto* sono:

- un cromosoma con due centromeri ed un frammento acentrico derivante esclusivamente da uno dei due cromosomi;
- un cromosoma con due centromeri senza alcun tipo di frammento;
- un frammento composto dall'unione dei tratti terminali dei cromosomi coinvolti.

Durante la prima anafase subita dalla cellula il cromosoma dicentrico causerà serie difficoltà meccaniche alla separazione cellulare mentre viene escluso dal patrimonio genetico delle cellule figlie. Gran parte delle cellule figlie vanno incontro ad apoptosi nel giro di pochi cicli cellulari.



Figura 3.2 – Sulla sinistra: esempio di traslocazione incompleta. Sulla destra: esempio di aberrazione cromatidica, non considerata nello scoring.

I *frammenti* sono tratti acentrici di cromosomi derivanti dalla rottura degli stessi, con questa dicitura sono stati indicati esclusivamente i frammenti appartenenti ad un solo tipo di cromosoma. Come nel caso dei frammenti ottenuti da traslocazioni e dicentrici essi vengono eliminati dal patrimonio genetico delle generazioni successive a causa dell'assenza di un centromero che risulta essenziale durante l'anafase.

Si definiscono scambi complessi quelli che coinvolgono più cromosomi contemporaneamente: le *inserzioni* corrispondono a cromosomi nei quali sono presenti più tratti di uno o più cromosomi diversi, gli *scambi non reciproci* sono quelli che

coinvolgono almeno due rotture in tre cromosomi il che può comportare ad esempio la formazione di:

- un cromosoma con un tratto terminale di un secondo cromosoma ed un frammento acentrico composto da tratti terminali dei due cromosomi coinvolti;
- un cromosoma dicentrico ed un terzo cromosoma con un tratto terminale appartenente ad uno dei due cromosomi formanti il dicentrico.

3.3.2 Analisi dati e discussione

Il primo set di dati relativo alle cellule irradiate con protoni in assenza di BSH funge da punto di riferimento per l'analisi del secondo set di dati relativi alle cellule irradiate in presenza di composto borato (80 ppm) e permette, tramite confronto, di verificare l'efficacia della PBFT (secondo set) rispetto alla semplice protonterapia (primo set). In figura 3.3 è possibile notare il confronto tra la frequenza delle aberrazioni totali

In figura 3.3 e possibile notare il contronto tra la frequenza delle aberrazioni totali per i due casi. A 0 Gy i punti sperimentali sono coincidenti nei limiti degli errori, ciò implica che il numero di aberrazioni per cellula è indipendente dalla presenza del BSH e, in assenza di radiazione, corrisponde al numero che si otterrebbe come effetto della presenza di danno fisiologico. L'analisi delle cellule a 0 Gy in presenza di BSH ha in effetti lo scopo di verificare la non tossicità del composto borato iniettato; la coincidenza dei punti sperimentali tra cellule iniettate con BSH e non a 0 Gy costituisce la conferma di tale ipotesi la quale risulta fondamentale per l'attuazione della PBFT.

Per entrambe le curve sperimentali la frequenza di metafasi aberrate risulta crescere rapidamente, in modo non lineare, al crescere della dose impartita; in particolare, ad ogni dose, si nota una maggiore frequenza di aberrazioni nel caso delle cellule con BSH rispetto a quelle in assenza: la frequenza raggiunge un massimo del 56% circa nel primo caso (punti in arancione) per 4 Gy, diversamente da quanto accade per il secondo caso (punti in blu) per il quale si ha una percentuale massima del 43% circa a parità di radiazione.

Un indice di alta densità di ionizzazione della radiazione in esame è la frequenza di aberrazioni per ogni metafase aberrata^[36]: radiazioni con densità di ionizzazione



Aberrazioni totali

Figura 3.3 – Confronto tra le curve sperimentali relative all'irradiazione con protoni di cellule iniettate con BSH (80 ppm di ¹¹B) e cellule in assenza di BSH.

elevata produrranno dei danni più ravvicinati tra loro che si traducono in una maggiore frequenza di danni in ogni cellula irradiata e soprattutto in una maggiore frequenza di aberrazioni di tipo complesso. Dall'analisi dei dati si nota che la frequenza di aberrazioni per metafase aberrata va da $1,18\pm0,11$ a $1,36\pm0,07$ rispettivamente a 0 e 4 Gy per le cellule irradiate in assenza di BSH e da $1,19\pm0,08$ a $1,38\pm0,06$ a 0 e 4 Gy per le cellule irradiate iniettate con BSH. La frequenza delle aberrazioni risulta crescente all'aumentare della dose impartita, lo scarto tra il massimo e il minimo è circa del 20% in entrambi i casi. Nel caso di cellule iniettate con BSH si ha un leggero aumento della frequenza di aberrazioni per metafase.

Il dato di fondamentale importanza per l'analisi qualitativa della PBFT è la frequenza di aberrazioni complesse in funzione della dose ed in riferimento al primo set di dati (Figura 3.4). Come detto in precedenza la presenza di un numero elevato di aberrazioni complesse per cellula è una condizione necessaria e fondamentale per definire la radiazione ionizzante in esame come radiazione ad alta densità di ionizzazione e quindi ad alto $LET^{[36]}$.

Anche in questo caso le frequenze a 0 Gy risultano essere uguali nei limiti degli errori. All'aumentare della dose si ha un aumento sensibile per entrambi i set di dati; la frequenza di aberrazioni complesse in presenza di composto borato però risulta



Aberrazioni complesse

Figura 3.4 – Frequenze delle aberrazioni complesse per cellule irradiate con protoni in assenza (blu) e in presenza (arancione) di BSH in funzione della dose.

nettamente più alta. Inoltre, si registra non solo un aumento di frequenza in presenza di BSH piuttosto che in assenza, ma anche la differenza di frequenza a parità di radiazione risulta aumentata in maniera direttamente proporzionale alla radiazione stessa. La presenza di un numero sostanziale di aberrazioni complesse in assenza di BSH conferma l'adeguatezza della sola protonterapia nell'indurre danno biologico, ma la decisamente minore frequenza di aberrazioni rispetto al caso con BSH, e quindi alla PBFT, è indice della migliore efficacia nell'indurre danno di quest'ultima rispetto alla protonterapia.

L'elevata frequenza di aberrazioni complesse sottolinea la migliore efficacia radiobiologica della PBFT e soprattutto costituisce la prova che le particelle alfa prodotte dalla reazione sono effettivamente particelle ad alto LET in grado di produrre maggiore danno biologico rispetto alla protonterapia.

La presenza di questo tipo di aberrazioni, inoltre, è indice di una sostanziale perdita del patrimonio genetico cellulare e della conseguente impossibilità di sopravvivenza se non per un numero esiguo di ciclo cellulari.

Conclusioni

Dall'analisi svolta si può concludere che la PBFT in linea teorica racchiude tutti i benefici delle terapie a particelle cariche: rilascio di energia in una zona limitata (protonterapia) e aumento dell'efficacia radiobiologica e della percentuale di dose impartita al tumore rispetto a quella lungo il plateau (carbonterapia); inoltre sfruttando i vantaggi delle terapie binarie come la BNCT riesce ad ottenere un incremento della capacità di selezionare la zona in cui si innesca la reazione tramite l'utilizzo di composti borati.

Dal punto di vista sperimentale i dati riguardanti le aberrazioni cromosomiche indotte sembrano essere coerenti con quanto atteso. L'elevata frequenza di aberrazioni complesse è indice dell'alto LET delle particelle utilizzate per la PBFT e ciò implica una maggiore probabilità di indurre morte riproduttiva alle cellule tumorali, scopo di ogni radioterapia.

Per esperimenti futuri sarebbe opportuno esaminare la dipendenza dall'energia dei protoni in altre posizioni lungo il SOBP, ad esempio in entrance (energia massima del fascio di protoni incidente e quindi sezione d'urto più sfavorevole per la reazione p-B) e sul picco distale (energia minima del fascio, in corrispondenza della quale si attende un aumento della sezione d'urto e quindi degli effetti biologici della produzione di alfa).

Bibliografia

- 1. Hall, Giaccia Radiobiology for radiobiologist. Lippincott Williams & Wilkins. 2012.
- Sito http://www.epicentro.iss.it/problemi/radon/radon.asp Epidemiologia per la salute pubblica.
- 3. B. Alberts, D. Bray, J. D. Watson, J. Lewis, K. Roberts, M. Raff *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli 2016
- 4. Sito Zona Nucleare http://www.zonanucleare.com/scienza
- H. Suit, M.Urie Proton Beams in Radiation Therapy. J Natl Cancer Inst (1992) 84 (3): 155-164
- 6. DL e Thompson DE (1994) Cancer incidence in atomic bumb survivors. Part I: use of the tumor registries in Hiroshima and Nagasaki for incidence studies. Radiat Res 137: 1-16
- Belot, Nahan Radium und Rontgenthérapie des Lupus vulgaris. Ref. Arch. Derm. Syph (Berl.) 122,372 (1918)
- 8. GH Haddadi, A Rezaeyan, MA Mosleh-Shirazi, M Hosseinzadeh, R Fardid, M Najafi, A Salajegheh - Hesperidin as Radioprotector against Radiation-induced Lung Damage in Rat: A Histopathological Study. J Med Phys. 2017 Jan-Mar;42(1):25-32
- 9. Suit HD Protons to replace photons in external beam radiation therapy? Clin Oncol (R Coll Radiol). 2003 Feb;15(1): S29-31.
- 10. A.M. Allen a, T. Pawlicki, L. Dong, E. Fourkal, M. Buyyounouski, K. Cengel, J. Plastaras, K. Bucci, T. I. Yock, L. Bonilla, R. Price, E. E. Harris, A. A. Konski - An evidence based review of proton beam therapy: The report of ASTRO's emerging technology committee - Radioterapy and oncology 2012
- H. Tsujii, T. Kamada, M. Baba, H. Tsuji, H. Kato, S. Kato, S. Yamada, S. Yasuda, T. Yanagi, H. Kato, R. Hara, N. Yamamoto, J. Mizoe - *Clinical advantages of carbon-ion radiotherapy* -New Journal of Physics 2008
- 12. R. Ridolfi Tesi Adroterapia: principi e applicazioni Università di Bologna 2014/2015
- 13. D. Sculz-Ertner, M.D., C.P. Karger, Ph.D., A. Feuerhake, A. Nikoghosyan, S.E. Combbs, O. Jakel, L. Edler, M. Scholz, J. Debus *Effectiveness of carbon ion radiotherapy in the treatment of skull-base chordomas Elsevier* Clinical Investigation 2007
- 14. M. Scholz Heavy ion tumour therapy Elsevier 2000
- 15. J. Doyena, P.Y. Bondiaua, K. Benezerya, J. Thariata, M. Vidala, A. Gérarda, J. Héraulta, C. Carrieb, J.M. Hannoun-Lévia *Indications et résultats de la protonthérapie dans le traitement des cancers* Elsevier 2016
- 16. D. Olsena, Ø. S. Brulanda, G. Frykholmc, I. N. Norderhaugd Proton therapy A systematic review of clinical effectiveness Radioterapy and Oncology 2007

- 17. Daniela Schulz-Ertner, Oliver Jäkel, PhD, Wolfgang Schlegel, PhD Radiation Therapy With Charged Particles - Elsevier 2006
- 18. W. K. Weyrather, s. ritter , M. Scholz, G. Kraft RBE for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity Radiat. Biol 1999
- 19. Nobuyuki Hamada Recent Insights into the Biological Action of Heavy-Ion Radiation J. Radiat.
 Res, 50, 1-9 (2009)
- 20. D. Schulz-Ertner, A. Nikoghosyan, C. Thilmann, T. Haberer, O. J'akel, C. Karger, G. Kraft, M. Wannenmacher - *Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients* - Elsevier 2003
- 21. Rolf F. Barth, Albert H. Soloway and Ralph G. Fairchild Boron Neutron Capture Therapy of Cancer – Cancer Res 1990
- 22. S. Green Developments in accelerator based boron neutron capture therapy Pergamon 1998
- 23. M. Frederick Hawthrone New horizons for therapy based on the boron neutron capture reaction - Molecolar Medicine Today 1998
- 24. Rolf F. Barth, Jeffrey A. Coderre, M. Gra_a H.Vicente, ThomasE Blue Boron Neutron Capture Therapy of Cancer: Current Status and Future Prospects - Clin Cancer Res. 2005
- 25. S.J. Gonza' leza, M.R. Bonomib, G.A. Santa Cruza, H.R. Blaumanna, O.A. Calzetta Larrieua, P. Mene'ndezb, R. Jime'nez Rebagliatia, J. Longhinoa, D.B. Felda, M.A. Dagrosaa, C. Argerichh, S.G. Castigliaa, D.A. Batistonia, S.J. Libermana, B.M.C. Roth -*First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome* -Elsevier 2004
- 26. Manjeet Chadha, Jacek Capala, Jeffrey A. Coderre, Eric h. Elowitz, Jun-ichi Iwai, Darrel D. Joel, Hungyuan B. Liu, Lucian Welpolski, Arjun D. Chanana Boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme (GBM) using the epithermal neutron beam at the brookhaven national laboratory Elsevier, Radiation Oncology vol.40, No. 4 pp 829-834,1998
- 27. S. Altieri, T. Pinelli, P. Bruschi, F. Fossati, A. Zonta, C. Ferrari, U. Prati, L. Roveda, S. Barni, P. Chiari, R. Nano *Le basi fisiche della terapia per cattura neutronica* Il Giovane Artigiano 2003
- 28. M. Longo Tesi: Autoradiografia neutronica di tessuti polmonari umani irradiati presso LINAC ospedalieri con metodi di BNCT Università degli studi di Trieste 2008/2009
- Do-Kun Yoon, Joo-Young Jung, Tae Suk Suh Application of proton boron fusion reaction to radiation therapy: A Monte Carlo simulation study - Applied Physics Letters 105, 223507 (2014); doi: 10.1063/1.4903345
- 30. L. Giuffrida, D. Margarone, G.A.P. Cirrone, A. Picciotto, G. Korn Prompt gamma ray diagnostics and enhanced hadron-therapy using neutron-free nuclear reactions AIP Advances 6, 105204 (2016)
- 31. V. F. Dmitriev α -Particle Spectrum in the Reaction $p+11B \rightarrow \alpha + 8Be^* \rightarrow 3\alpha$ ISSN 1063-7788, Physics of Atomic Nuclei, 2009
- 32. D.C. Moreau Potentiality of the proton-boron fuel for controlled thermonuclear fusion Nuclear Fusion 1977

- 33. M.L.E. Oliphant, Lord Rutherford *Experiments on the transmutation of elements by protons* 1933
- 34. S. Stave, M.W. Ahmeda, R.H. France III, S.S. Henshawa, B. Müller, B.A. Perduea, R.M. Priord, M.C. Spraker, H.R. Weller Understanding the ¹¹B(p, α)αα reaction at the 0.675 MeV resonance Physics Letters B 696 (2011) 26–29 Elsevier
- 35. GAP Cirrone, L.Manti, D. Margarone, L.Giuffrida, A. Picciotto, G. Cuttone, V. Marchese, G. Miluzzo, G. Petringa, F.Perozziello, F. Romano, V. Scuderi, G. Korn - Nuclear fusion enhances cancer cell killing efficacy in a protontherapy model - arXiv:1701.07504 [physics.medph] Jan 2017
- 36. E. Janet Tawn, Gillian B. Curwen, Patricia Jonas, Anthony E. Riddell, Leanne Hodgson -Chromosome aberrations determined by sFISH and G-banding in lymphocytes from workers with internal deposits of plutonium - Int J Radiat Biol. 2016 Jun 4; 92(6): 312–320.