

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*

# **Protonterapia con fasci accelerati mediante tecniche laser**

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Lorenzo Manti

**Candidato:**

Enea Vincenzo Napolitano  
Matricola N85001263

A.A. 2019/2020

*a mia madre, che ci ha creduto prima che ci credessi io...*

# Indice

## Introduzione

### 1. Radioterapia e protonterapia

- 1.1. Principali meccanismi fisici alla base dell'azione biologica delle radiazioni ionizzanti (RI)
- 1.2. Principali effetti biologici delle RI a livello cellulare e molecolare
- 1.3. Razionale radiobiologico della radioterapia (RT)
- 1.4. Protonterapia
- 1.5. Vantaggi della protonterapia sulla radioterapia convenzionale

### 2. Tecnica laser-driven per l'accelerazione di particelle cariche

- 2.1. Meccanismi di accelerazione delle particelle attraverso laser
- 2.2. Problematiche legate al trasporto del fascio e alla dosimetria
- 2.3. Problematiche radiobiologiche

### 3. Verso un possibile utilizzo clinico dell'accelerazione mediante laser di fasci di protoni

- 3.1. Stato dell'arte
- 3.2. Elimaia, il futuro dell'applicazione della tecnica di accelerazione laser-driven

## Conclusioni



# INTRODUZIONE

Il tumore ad oggi, nei paesi più sviluppati è la prima causa di decesso. Statisticamente, una persona su tre nell'arco della propria vita si trova a combattere questa malattia. Proprio questo alto tasso di mortalità e la sua elevata diffusione su scala globale hanno spinto i ricercatori, a trovare sempre nuovi metodi per contrastare il cancro. A tutto il 2019, stando ai dati pubblicati dal Ministero della Salute, e fatte salve le differenze, a volte notevoli fra tipologie di tumori, il tasso di sopravvivenza è in aumento. Il 63% delle donne ed il 54% degli uomini sono vivi a 5 anni dalla diagnosi ed almeno un paziente su quattro, è tornato ad avere la stessa aspettativa di vita della popolazione generale e può considerarsi guarito. Questo *trend* positivo è dovuto soprattutto alle continue innovazioni tecnologiche messe a disposizione dell'oncologia. Oggi la terapia medica utilizzata nel circa il 50% dei casi è la radioterapia (RT), spesso combinata con altri trattamenti come la chirurgia, la chemioterapia, l'ormonoterapia o l'immunoterapia. La RT consiste nell'uso di radiazioni ionizzanti ad alta energia per inattivare le cellule tumorali, cercando al tempo stesso di preservare il più possibile le cellule sane. Una forma alternativa di RT che impiega fasci accelerati di particelle cariche (protoni o ioni carbonio), detta adroterapia, si sta diffondendo sempre di più, a discapito del trattamento tradizionale che prevede l'utilizzo di fotoni e/o elettroni.

I vantaggi dell'adroterapia, sono sia fisici che radiobiologici. Le particelle cariche, durante il percorso attraverso la materia, presentano infatti, un andamento della perdita di energia descritto dalla curva di Bragg, ionizzando le molecole dei tessuti attraverso interazioni coulombiane e rilasciando la maggior parte della propria energia a fine percorso, nel cosiddetto "picco di Bragg", mentre in ingresso la cessione energetica è costante e relativamente bassa. Modulando opportunamente le energie in modo da avere una convoluzione di tali picchi, le particelle cariche sono quindi in grado di danneggiare preferenzialmente i tessuti malati in quanto il massimo di cessione della loro energia può essere conformato spazialmente alla regione tumorale. Per merito di tale "picco di Bragg allargato" (*Spread-out Bragg Peak* o SOBP) protoni accelerati ad oltre 200 MeV e ioni carbonio accelerati a circa 300 MeV permettono di trattare tumori profondi (fino a 25 cm sotto la pelle) seguendone il contorno con precisione millimetrica e risparmiando i tessuti sani molto più di un fascio di raggi X. In aggiunta a tali vantaggi balistici, gli ioni carbonio, essendo molto più densamente ionizzanti dei protoni, sono anche più efficaci per il trattamento dei tumori radioresistenti. Tuttavia, essi presentano una serie di problematiche, legate alla produzione di frammenti con energia tale da penetrare nei tessuti sani o organi a rischio oltre il SOBP ed al fatto che tale maggiore efficacia biologica potrebbe tradursi anche in una maggiore incidenza di danni a lungo termine nei tessuti sani in ingresso. Ciò spiega perché, nell'ambito dell'adroterapia, la maggior parte dei nuovi centri in costruzione o progettati, prevede l'utilizzo della protonterapia (PT)

La PT, tuttavia, soffre dell'esigenza di richiedere una strumentazione particolarmente esosa, ossia gli acceleratori di particelle (ciclotroni o sincrotroni), i costi per la cui costruzione, installazione ed esercizio, sono ancora proibitivi per diversi Paesi o sistemi sanitari nazionali, potendo arrivare a costare diverse centinaia di milioni di euro. Il fattore economico è quindi il principale fattore limitante la diffusione della PT. Da ciò, nasce quindi l'esigenza di trovare nuove tecniche che permettano la diffusione su larga scala della protonterapia. Negli ultimi anni è sempre più in auge una tecnica che utilizza l'interazione laser-materia, che si propone validamente come futura alternativa all'accelerazione tradizionale di particelle. Questa tecnica si propone di utilizzare raggi laser di brevissima durata (dai femtosecondi ai picosecondi) ed altissima intensità ( $\geq 10^{19} \text{ W/cm}^2$ ) che interagendo con bersagli solidi dovrebbero generare fasci di protoni *laser-driven*, con energie adatte per le applicazioni mediche (dell'ordine di 250 MeV). Un raggio ionico guidato dal laser è il risultato di un'accelerazione a doppio stadio che inizia con un'accelerazione diretta di elettroni, prodotta nell'interazione laser-bersaglio, che a sua volta, mediante separazione della carica, genera un campo elettrostatico che genera ioni ed è responsabile della loro accelerazione. Le *facility* attualmente esistenti non hanno ancora sviluppato laser con le caratteristiche di potenza richieste e richiede uno sforzo notevole dal punto di vista della ricerca di metodologie e strumentazioni utili per un'adroterapia basata su tecniche ottiche di accelerazione. A regime, l'ipotesi di base è che questi sistemi saranno più compatti ed economici degli acceleratori convenzionali attualmente in uso. L'utilizzo di ratei energetici così elevati potrebbe essere del tutto rivoluzionario nel senso che apre prospettive di ricerca sui processi di interazione tra radiazione e materia su scale temporali mai raggiunte prima. Nello specifico, sarà necessario studiare le proprietà radiobiologiche di questi fasci, dal momento che mentre esiste una consolidata letteratura sugli effetti a livello cellulare a ratei di dose bassi o cronici fino a mGy/min, solo di recente la tecnologia ha reso possibile irradiare a ratei molto elevati. A questo proposito, va citato l'enorme interesse suscitato da recenti studi che hanno dimostrato come in vivo, ratei di 40Gy/s di fasci di elettroni sembrano ridurre il danno ai tessuti sani in regimi radioterapeutici. I meccanismi radiobiofisici alla base di questo fenomeno sono ancora però da chiarire. A questo proposito va sottolineato che gli ioni emessi dal plasma, creato dall'interazione tra i futuri laser ad elevatissima potenza e bersaglio saranno caratterizzati da ratei ultra elevati, teoricamente superiori a  $10^9 \text{ Gy/s}$ , che sono diversi ordini di grandezza superiori al regime di lavoro terapeutico convenzionale di 1-10 Gy/min.

La tecnologia *laser-driven* ha inoltre bisogno di alcuni vincoli fisici per essere sfruttata clinicamente, quali, ad esempio, la riproducibilità, l'omogeneità e la stabilità del fascio. Tra le preoccupazioni che suscita l'introduzione di questa tecnica, ci sono la capacità di controllare il trasporto e soprattutto l'accuratezza della dosimetria. I fasci prodotti con questa tecnica sono infatti caratterizzati da *burst* altamente impulsati.

Scopo di questa tesi, sarà quello di introdurre e discutere la tematica della possibile amministrazione della PT mediante accelerazione laser rispetto all'accelerazione convenzionale (attraverso ciclotroni o sincrotroni) e cercare di capire i vantaggi che ci sono nell'utilizzo dei laser nel processo di accelerazione. A tale scopo saranno illustrati i risultati radiobiologici sugli effetti di fasci accelerati con questa tecnica e si introdurrà un grande progetto finanziato dall'UE chiamato ELIMED (applicazioni mediche *ELI-Beamlines*), che fa

parte della rete internazionale ELIMAIA (Applicazioni multidisciplinari ELI dell'accelerazione laser-ionica). Questo è in fase di sviluppo presso la struttura ELI-Beamlines (*Extreme Light Infrastructure*) di Praga, Repubblica Ceca; in stretta collaborazione con l'INFN (Istituto Nazionale di Fisica Nucleare). Proprio sul progetto ELIMED verrà posto un particolare accento; in quanto da luglio 2018 rappresenta uno dei più grandi centri di sperimentazioni *laser-driven* su scala globale ed è in avanzata fase di attuazione la costruzione di un laser con le caratteristiche energetiche richieste dalla PT clinica. La tesi è composta da un primo capitolo che introduce concetti basilari per la comprensione del tema della PT, quali i meccanismi di base per l'azione biologica delle RI ed il razionale radiobiologico dell'adroterapia ed i suoi vantaggi sulla RT convenzionale. Nel secondo capitolo si tratterà dell'accelerazione di protoni mediante tecniche laser: di come sia possibile e quali siano le problematiche legate all' utilizzo di questa tecnica. Infine nel terzo capitolo, cuore della tesi, si discuterà sullo stato attuale della tecnologia laser-driven applicata alla biologia e, in prospettiva, alla medicina, attraverso l'illustrazione di alcuni risultati sperimentali, soffermandosi infine sul progetto ELIMAIA per provare a fare una previsione di quello che sarà il futuro clinico di questo approccio innovativo.

# Capitolo 1

## Radioterapia e protonterapia

Le radiazioni vengono solitamente suddivise in: radiazioni ionizzanti (IR, dall' inglese *Ionising Radiation*) e radiazioni non ionizzanti (NIR). Riferendosi allo spettro elettromagnetico le NIR comprendono la porzione di elevata lunghezza d'onda ( $> 100 \text{ nm}$ ) e di bassa frequenza ( $< 10^{16} \text{ Hz}$ ). Le IR comprenderanno quindi le radiazioni ad alta frequenza <sup>[1]</sup>.

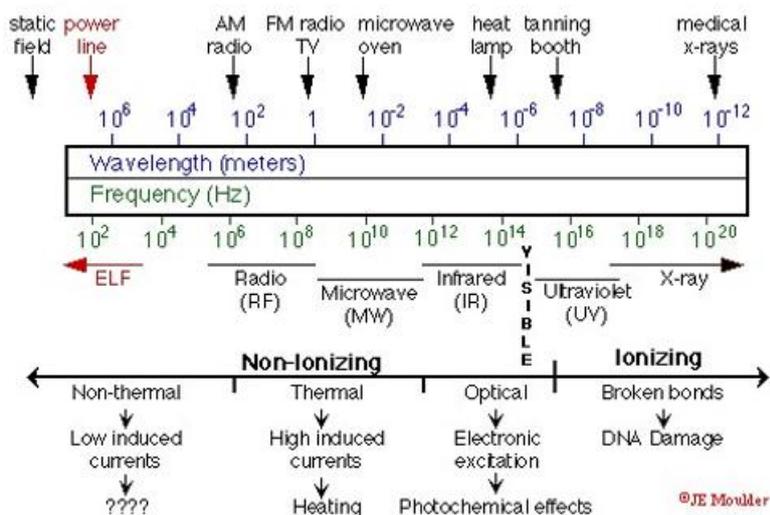


Figura 1- Spettro elettromagnetico ed effetti biologici associati <sup>[1]</sup>

Come riportato in Fig.1, le NIR includono: le onde radio, le microonde e la luce visibile. Le IR comprendono invece parte dell'ultravioletto e i raggi X e  $\gamma$ . I raggi X furono scoperti nel 1895 dal fisico tedesco Wilhelm Conrad Röntgen che riferì di "un nuovo tipo di raggio" emesso da un tubo di scarico di gas che era in grado di imprimere una pellicola fotografica posta in contenitori ermetici. Röntgen chiamò questi raggi "X" con riferimento alla loro natura incognita. Il primo uso terapeutico di queste radiazioni risale alla scoperta del decadimento radioattivo dell'Uranio nel 1896. Nel giro di qualche anno poi, grazie all'isolamento del Polonio e del Radio a cura dei coniugi Curie, si rese possibile l'utilizzo del Radio per trattamenti del cancro <sup>[2]</sup>. Da quel momento le radiazioni ionizzanti divennero la base per lo sviluppo di quella che sarebbe stata poi la Radioterapia <sup>[3]</sup>.

## 1.1 Principali meccanismi fisici alla base dell'azione biologica delle radiazioni ionizzanti (IR)

L'assorbimento di energia dalle radiazioni in un materiale biologico può portare ad eccitazione o ionizzazione delle biomacromolecole costituenti. La promozione di un elettrone in un atomo o molecola ad un livello di energia più elevato, senza espulsione dell'elettrone si chiama eccitazione. Se la radiazione ha energia sufficiente per espellere uno o più elettroni orbitali dall'atomo o molecola, il processo è chiamato ionizzazione e si dice che la radiazione è ionizzante. La caratteristica importante delle IR è il rilascio localizzato di grandi quantità di energia. L'energia minima necessaria per provocare la ionizzazione della materia irradiata è di 33 eV. Le IR vengono classificate in due tipi: elettromagnetiche o particellari. Le radiazioni elettromagnetiche maggiormente utilizzate in radioterapia sono i raggi X o  $\gamma$ . I raggi X e  $\gamma$  non differiscono sostanzialmente per proprietà radiobiologiche, ciò che le caratterizza è il modo in cui esse sono prodotte: i raggi X sono prodotti dalle transizioni tra orbitali elettronici; i raggi  $\gamma$  sono prodotti per via intranucleare. In termini pratici, questo significa che per produrre raggi X bisogna utilizzare un dispositivo elettrico che accelera elettroni ad alta energia e poi li ferma bruscamente su un bersaglio solitamente costituito da tungsteno o oro. I raggi  $\gamma$ , invece vengono emessi da isotopi radioattivi; rappresentano l'energia in eccesso che viene emessa quando il nucleo instabile si rompe e decade nei suoi nuclei figli, per raggiungere una forma stabile. D'ora in avanti ci si riferirà ai raggi X. I raggi X possono essere considerati di duplice natura: come onde di energia elettromagnetica o come flussi di fotoni ("pacchetti" di energia). Il concetto di raggi X composto da fotoni è molto importante in radiobiologia. Se i raggi X vengono assorbiti nel materiale vivente, l'energia viene depositata nei tessuti e nelle cellule. Questa energia si deposita in modo non uniforme in pacchetti discreti. L'energia in un fascio di raggi X è quantizzata in grandi pacchetti singoli, ciascuno dei quali abbastanza grande da rompere un legame chimico e iniziare la catena di eventi che culmina in un cambiamento biologico. Altri tipi di radiazioni che si verificano in natura e che vengono anche utilizzati sperimentalmente sono quelle con le particelle, coinvolgono quindi: elettroni, protoni, particelle  $\alpha$ , neutroni, mesoni  $\pi$  negativi e ioni carichi pesanti. Alcuni sono anche usati nella radioterapia e hanno un potenziale in radiologia diagnostica non ancora esplorato. Gli elettroni possono essere accelerati ad alta energia ad una velocità prossima a quella della luce per mezzo di un dispositivo elettrico, come un betatron o un acceleratore lineare. I protoni invece, essendo relativamente massivi (con una massa quasi 2.000 volte maggiore di quella di un elettrone), richiedono attrezzature più complesse e costose, come un ciclotrone, per essere accelerati ad energie utili, ma nonostante i costi, i protoni vengono utilizzati per il trattamento del cancro grazie alla distribuzione favorevole della dose (PICCO DI BRAGG, vedi paragrafo 1.5). Le radiazioni possono essere classificate come direttamente o indirettamente ionizzanti. Le particelle cariche (a partire dai protoni fino agli ioni per Z crescente) sono direttamente ionizzanti; cioè, a condizione che le singole particelle abbiano energia cinetica sufficiente, possono alterare la struttura atomica dell'assorbitore attraverso cui passano direttamente, interagendo in maniera coulombiana e producendo cambiamenti chimici e biologici potenzialmente permanenti. Gli elettroni, perdono energia a causa degli urti che avvengono

durante il moto con gli elettroni atomici, o mediante *bremstrahlung* [4]. Le radiazioni elettromagnetiche (raggi X e  $\gamma$ ) sono invece, indirettamente ionizzanti. Non producono da sole danni chimici e biologici, ma quando vengono assorbite nel materiale attraverso cui passano, cedono la loro energia per produrre particelle cariche (elettroni), che a loro volta sono in grado di ionizzare e quindi, capaci di produrre danni. Il processo mediante il quale i fotoni vengono assorbiti dipende dall'energia dei fotoni interessati e lo Z del materiale assorbente. Ad alte energie, domina il processo Compton (figura 2b).

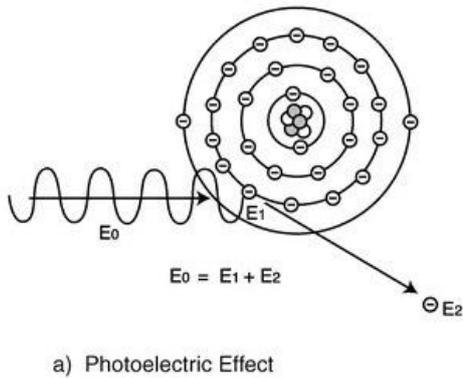


Figura 2a- Effetto fotoelettrico

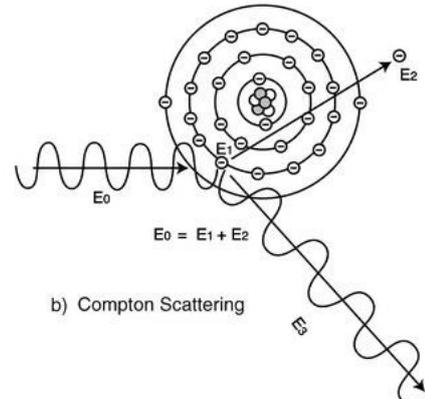


Figura 2b- Scattering Compton

In questo processo, il fotone interagisce con quello che di solito viene chiamato elettrone "libero", un elettrone la cui energia di legame è trascurabilmente piccola rispetto all'energia del fotone. Parte dell'energia del fotone viene data all'elettrone come energia cinetica; il fotone, con qualunque energia rimanga, prosegue il suo moto, deviato dal suo percorso originale. Al posto del fotone incidente, c'è un elettrone con una certa velocità e un fotone di energia ridotta, che può continuare a prendere parte ad ulteriori interazioni. In questi casi l'elettrone può perdere porzioni di energia che vanno dallo 0% all'80%. In pratica, se un fascio di raggi X viene assorbito dal tessuto, diversi fotoni interagiranno con più atomi e su base statistica, si verificano

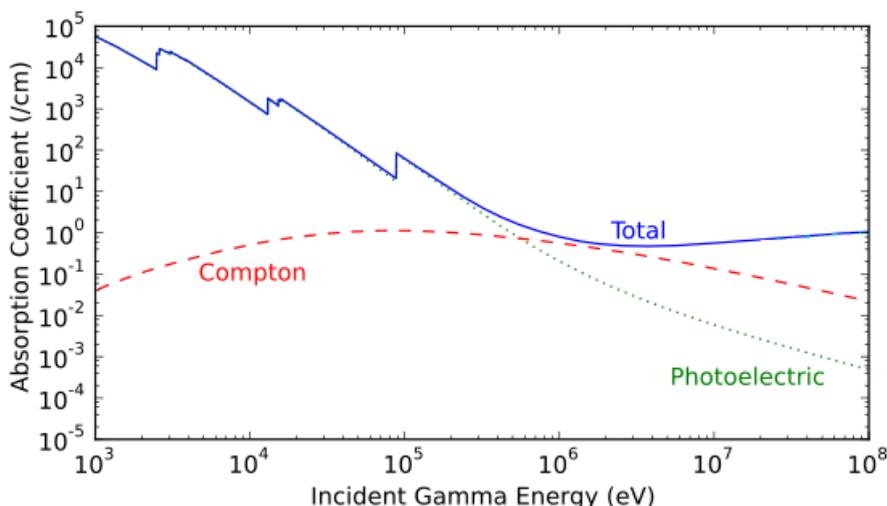


Figura 3- Processo dominante in funzione dell'energia

considerevoli perdite di energia. Il risultato finale è la produzione di diversi elettroni, molti dei quali possono ionizzare altri atomi dell'assorbitore e avviare la catena di processi chimico-biologici che alla fine si esprime come danno a livello del DNA o della cellula. Ad energie più basse prevale il processo fotoelettrico (figura 2a), in cui il fotone interagisce con un elettrone legato e il fotone cede tutta la sua energia all'elettrone. L'energia cinetica dell'elettrone espulso (KE) è, quindi, data dall'espressione  $KE = h\nu - E_B$  in cui  $h\nu$  è l'energia del fotone incidente ed  $E_B$  è l'energia di legame dell'elettrone nella sua orbita. Il posto vacante lasciato nel guscio atomico a seguito dell'espulsione di un elettrone, quindi, deve essere riempito da un altro elettrone, che decade da un guscio esterno dello stesso atomo o da un elettrone di conduzione dall'esterno dell'atomo. Il movimento di un elettrone da un guscio all'altro rappresenta un cambiamento di stati energetici. Poiché l'elettrone è carico negativamente, il suo movimento rappresenta una diminuzione di energia potenziale; questo cambiamento di energia è bilanciato dall'emissione di un fotone di radiazione elettromagnetica "caratteristica". Nei tessuti molli, questa radiazione caratteristica ha un livello energetico basso, tipicamente 0,5 kV, e ha poca conseguenza biologica [5].

## 1.2. Principali effetti biologici delle IR a livello cellulare e molecolare

Gli effetti biologici, sia delle IR che delle NIR, sono dannosi per i tessuti viventi. Esse procurano danno diretto, rompendo legami di biomolecole, come ad esempio la rottura dei legami dell'acido desossiribonucleico (DNA); possono indurre, poi, danno indiretto producendo particelle secondarie che interagiscono con le biomolecole. Le particelle prodotte nella produzione di danno indiretto, sono per lo più radicali liberi; un radicale libero è una molecola o un atomo altamente reattivo dal punto di vista chimico, grazie alla presenza di un elettrone spaiato nella shell più esterna. Poiché il corpo umano è formato da una grande quantità di acqua, è molto probabile la formazione di radicali derivanti dalla radiolisi dell'acqua. Se la radiazione colpisce una molecola di  $H_2O$  si può ottenere la reazione:  $H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^-$  con  $H_2O^+$  radicale ionico, esso in seguito può reagire con un'altra molecola di  $H_2O$ :  $H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH$ , questi radicali essendo molto reattivi, se riescono a diffondersi senza andare incontro a reazioni di ricombinazione, possono danneggiare il DNA. Esistono diversi tipi di danni possibili al DNA: dalla perdita delle basi alla rottura di un filamento (o di entrambi) della doppia elica che vengono classificati (in ordine crescente di permanenza):

- *Base loss e base modification* se il danneggiamento avviene in corrispondenza di una base;
- *Single-Strand Break (SSB)* se si verifica la rottura di un filamento;
- *Double-Strand Break (DSB)* se due rotture del singolo filamento sono spaziotemporalmente ravvicinate.

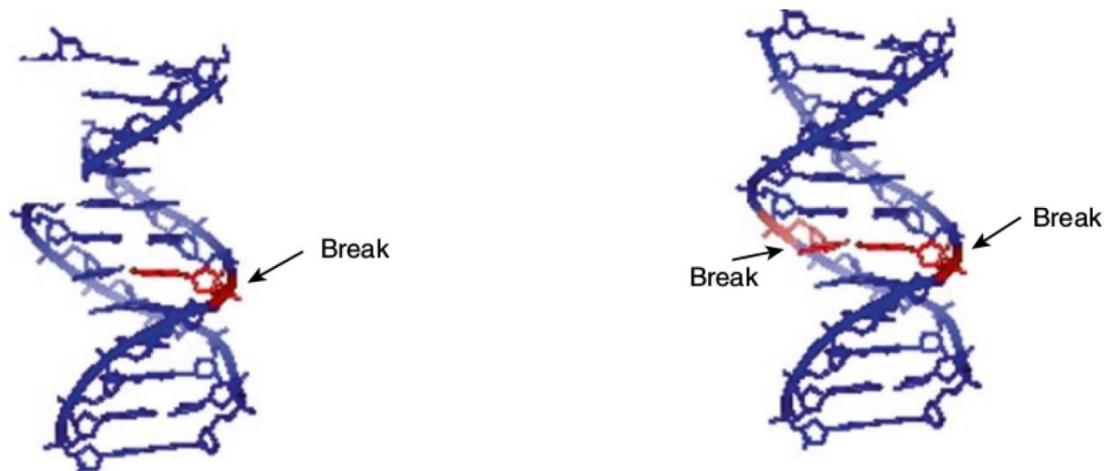


Figura 4- A sinistra SSB, a destra DSB

Le SSB avvengono in seguito all'idrolisi del legame fosfodiesterico e all'eliminazione di un gruppo fosfato attraverso un meccanismo che coinvolge i radicali liberi. Anche in assenza di radiazioni, non è raro che si presentino errate trascrizioni del codice genetico durante la duplicazione del DNA, controllate e riparate da particolari proteine, le quali assicurano una bassa probabilità di mutazioni nel passaggio da una cellula genitore ad una cellula figlio. Le cellule quindi, posseggono già naturalmente i mezzi di correzione della catena e le SSB vengono riparate nel giro di qualche ora utilizzando l'altro filamento come stampo. Le DSB consistono nel taglio dei due filamenti complementari di DNA a causa della cessione dell'energia da parte della radiazione. Esse possono essere localizzate nello stesso sito oppure possono essere distanti poche paia di basi o ancora possono essere lesioni localizzate complesse che in alcuni casi possono causare perdita di informazioni genetiche. La perdita dell'informazione genetica dipende dall'esito del meccanismo di riparo, ovviamente, più il danno è semplice, più la riparazione è efficace; ciò si ha nel caso si manifestino solo SSB o DSB isolati. A seconda della severità del danno si hanno diverse risposte dalle cellule, la severità è determinata dalla riparabilità del danno, che è funzione del LET. Il LET (dall'inglese *Linear Energy Transfer*), che è una grandezza utilizzata per valutare gli effetti biologici di una IR, cioè la densità di energia di ionizzazione, permette di prevedere gli effetti sui tessuti. Le possibili risposte cellulari sono: la morte cellulare alla prima mitosi post-irraggiamento, la sopravvivenza della cellula danneggiata o l'apoptosi. La sopravvivenza della cellula danneggiata nel caso di una cellula non tumorale, aumenta il rischio della trasformazione in cellula neoplastica; l'apoptosi, invece, corrisponde alla morte programmata della cellula nel caso il danno inferto sia irreparabile, per evitare che venga trasmessa alle generazioni successive. La riparabilità del danno, come detto prima, è funzione del LET; bisogna quindi citare oltre ai SSB e DSB, anche i *clusters*; essi sono effetti tipici delle radiazioni ad elevato LET e sono composti da più DSB e SSB spaziotemporalmente ravvicinati. I *clustered damages*, assumono un ruolo importantissimo nella lotta ai tumori, infatti la loro presenza in seguito ad un'irradiazione, assicura un effetto biologico maggiore, ciò perché i meccanismi di riparo intracellulari non riescono a gestire molteplici danni concomitanti.

## 1.3 Razionale radiobiologico della radioterapia (RT)

La radiobiologia studia gli effetti biologici delle IR sia a livello molecolare e cellulare che a livello delle conseguenze che l'esposizione alla radiazione può avere sui tessuti, come risultato finale di tali effetti. Grazie alla radiobiologia, che permette di capire come rispondono le cellule e i tessuti alle radiazioni, si sono poste le basi di quella che è oggi la RT. La RT ha come scopo quello di danneggiare letalmente le cellule tumorali, attraverso i processi visti nel paragrafo 1.2; cercando contemporaneamente di salvaguardare il più possibile, i tessuti sani e gli organi più sensibili. Questa prerogativa di tutelare i tessuti sani circostanti il tumore, oggi viene applicata attraverso l'utilizzo di regimi multifrazione; fra gli anni 50 e 60 del secolo scorso, Elkind e Sutton dimostrarono sperimentalmente che frazionando la dose, fosse possibile avere lo stesso livello di tumore, ma con una radiotossicità del tessuto sano molto inferiore. Il razionale radiobiologico alla base della moderna RT può essere riassunto in quelle che sono dette: "le **4R** della radiobiologia" [6].

Esse sono:

- 1) **Riparazione** del danno subletale (SLD, *Sub-Lethal Damage*);
- 2) **Ridistribuzione** delle cellule nel ciclo cellulare;
- 3) **Ripopolamento** tissutale;
- 4) **Riossigenazione** delle cellule ipossiche;

La base del frazionamento in RT può essere compresa in termini semplici, sulla base dei fenomeni sopra elencati, il cui contributo relativo durante un trattamento radioterapico determina il successo o il fallimento del trattamento. La divisione di una dose in più frazioni risparmia i tessuti normali a causa della riparazione del danno subletale tra le frazioni di dose e del ripopolamento delle cellule, se il tempo complessivo è sufficientemente lungo. È stato osservato, infatti, che in generale la capacità di riparazione delle cellule tumorali è minore di quella delle cellule normali a parità di dose ricevuta. Questo perché le cellule tumorali spesso presentano difetti in geni preposti a tali funzioni, che poi sono gli stessi geni che codificano per proteine che sopprimono la trasformazione neoplastica [7]. Va anche detto, tuttavia, che un numero crescente di studi ha poi evidenziato come alcuni tipi di cellule tumorali possano sviluppare una resistenza alla RT attraverso una serie di complessi meccanismi biomolecolari legati anche al microambiente tumorale [8]. Allo stesso tempo, la divisione di una dose in più frazioni aumenta il danno al tumore a causa della riossigenazione e del riassortimento delle cellule in fasi radiosensibili del ciclo tra le frazioni di dose. I vantaggi del prolungamento del trattamento sono quelli di evitare reazioni precoci e di consentire un'adeguata riossigenazione nei tumori. Un prolungamento eccessivo, tuttavia, consente alle cellule tumorali sopravvissute di proliferare durante il trattamento. In seguito se ne darà una spiegazione più dettagliata.

Per danno subletale, si intende un danno che può essere riparato in condizioni fisiologiche per la cellula. La **riparazione** SLD è il termine operativo per indicare l'aumento della sopravvivenza cellulare, osservato se una data dose di radiazioni viene suddivisa in due frazioni separate da

un intervallo di tempo. Alla base di questo processo è la riparazione delle SSB, che risulta maggiormente efficiente grazie al frazionamento, poiché, alcune SSB prodotte dalla prima dose vengono riunite e riparate prima che venga somministrata la seconda. Lo stesso non vale per le DSB e a maggior ragione per i danni complessi di tipo clusterizzato (vedi paragrafo precedente). Sulla base di questa interpretazione, la riparazione di SLD riflette la riparazione e il ricongiungimento di DSB prima che possano interagire per formare lesioni letali [5], per questo motivo la riparazione del danno subletale comporta, un aumento nella sopravvivenza cellulare in seguito al frazionamento della dose [9]. La **ridistribuzione** o riassortimento delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare è un effetto che si basa su esperimenti radiobiologici che dimostrarono come la radiosensibilità cellulare dipende dalla fase del ciclo in cui la cellula si trova al momento dell'irraggiamento [10]. Ciò si basa sul fatto che l'azione di una data singola dose comporta la morte preferenziale delle cellule che si trovano nelle fasi più radiosensibili (tarda G<sub>2</sub> e mitosi M). Dopo una semisincronizzazione della popolazione residua nelle fasi più radioresistenti, il far passare un opportuno intervallo di tempo prima della somministrazione della successiva dose, comporta a sua volta, il fatto che le cellule sopravvissute si desincronizzano transitando nelle fasi radiosensibili, permettendo alle successive frazioni di dose di trovarsi di volta in volta, di fronte a una popolazione sempre più radiosensibile. Il processo del **ripopolamento**, si verifica però proprio se le dosi vengono frazionate in seguito alla proliferazione delle cellule sopravvissute: nel caso dei tessuti sani, questi spesso aumentano la loro attività proliferativa richiamando in funzione anche cellule a riposo. Tale fenomeno quindi, è positivo nel caso dei tessuti sani, ma problematico nel caso delle cellule tumorali.

Il processo della **riossigenazione** (figura 5) delle aree ipossiche, cioè quelle zone con carenza di ossigeno, si ha nell'intervallo tra le singole frazioni di dose a seguito della morte ed eliminazione delle cellule ben ossigenate, con conseguente: decompressione di piccoli vasi,

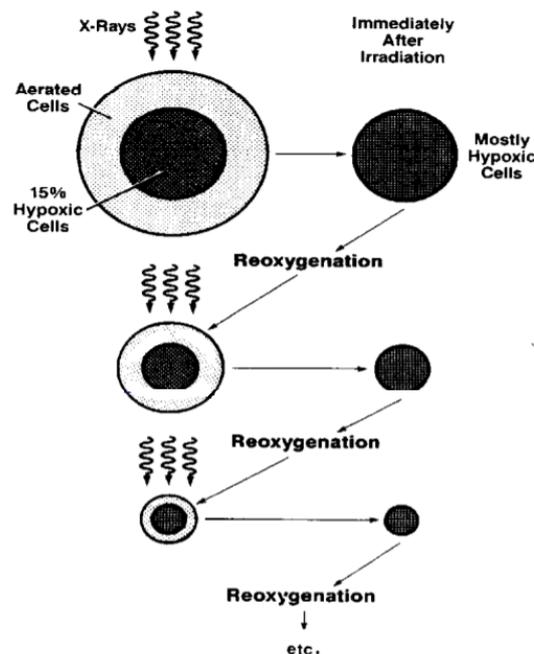


Figura 5- Effetto ossigeno

riduzione della distanza tra capillari e cellule ipossiche e minore discrepanza tra apporto e fabbisogno di ossigeno.

Durante l'irraggiamento le prime cellule a morire saranno le meglio ossigenate, la loro carenza permette all'ossigeno di arrivare nelle zone che necessitano del gas, per poter ristabilire una normale pressione parziale. Importante, in aggiunta alle **4R**, è anche una quinta grandezza: la **Radiosensibilità** intrinseca, che dipende da diversi fattori, per cui cellule dello stesso tipo tumorale, per esempio, rispondono diversamente a seconda dell'individuo. Fondamentale per valutare la radiosensibilità sia del tessuto sano che delle cellule tumorali sono le cosiddette curve di sopravvivenza clonogenica, mediante le quali è possibile quantificare la capacità riproduttiva, o meglio la sua perdita (morte cellulare) in funzione della dose di radiazione <sup>[11]</sup>. Tali curve dose-risposta si ottengono mediante il saggio clonogenico e sono state al centro di importanti discussioni negli anni, perché dal loro andamento è stato possibile elaborare diversi modelli radiobiofisici per interpretare l'azione biologica della radiazione. Il modello attualmente adottato, che descrive al meglio l'andamento di tali curve, è il modello lineare quadratico <sup>[12]</sup>. In questo modello la frazione di cellule sopravvissute è rappresentata da:  $S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ ; dove D è la dose,  $\alpha$  e  $\beta$  sono 2 costanti:  $\alpha$  rappresenta il logaritmo naturale delle cellule uccise per Gy e  $\beta$  il logaritmo naturale delle cellule uccise per Gy<sup>2</sup>. Secondo questo modello ci sono 2 componenti che determinano la morte cellulare da radiazioni, una componente proporzionale alla dose somministrata ( $\alpha$ ); una componente proporzionale al quadrato della dose ( $\beta$ ).

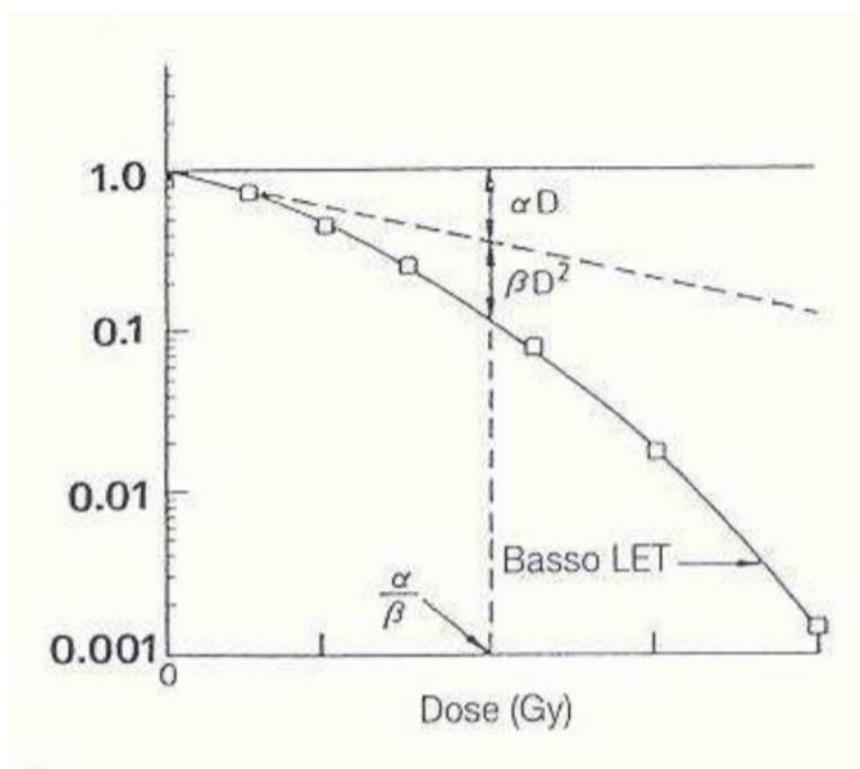


Figura 6- Andamento delle cellule sopravvissute in funzione della dose

La componente  $\alpha D$  rappresenta un danno non riparabile (il rapporto dose/effetto è lineare, da urto singolo, e perciò anche le piccole dosi sono in grado di determinare il danno). La componente  $\beta D^2$  indica l'esistenza dei processi di recupero (eventi a più urti) per vincere i quali la dose deve aumentare in maniera quadratica; ruolo importante svolgono questi due parametri nel modello quadratico, vengono utilizzati infatti, per stabilire i piani di trattamento in RT <sup>[13]</sup>.

## 1.4 Protonterapia (PT)

La Protonterapia (PT) è una terapia medica che utilizza dei fasci di protoni accelerati per la distruzione di cellule tumorali. Rientra nella famiglia dell'adroterapia, ovvero la RT che utilizza particelle cariche. Robert Wilson fu il primo ad indicare l'utilizzo dei protoni per la cura dei tumori nel 1946, in un articolo pubblicato su *Radiology*, riconoscendo l'importanza della deposizione altamente localizzata di energia dei protoni (e comune alle particelle cariche più pesanti) come un modo di minimizzare la dose ai tessuti normali. I ricercatori del *Lawrence Berkeley Laboratory* (LBL), negli USA, condussero i primi studi approfonditi sui protoni confermando le previsioni fatte da Wilson. I primi trattamenti sull'uomo consistevano nell'irradiazione dell'ipofisi in pazienti con carcinoma mammario metastatico dove, per sfruttare la ormonosensibilità di questo tumore, si bloccava la produzione ipofisaria di fattori di stimolo ovarico. Nel 1950 i trattamenti vennero riprodotti con successo su altri pazienti presso l'impianto di Uppsala, in Svezia. L'*Harvard Cyclotron Center* di Boston (USA) si interessò alle cure con protoni dopo aver studiato ed osservato le prime esperienze in PT sia a LBL che Uppsala iniziando il trattamento sulla ghiandola pituitaria e poi sviluppando tecniche specializzate per il trattamento di altre lesioni, come le malformazioni artero-venose (MAV). All'inizio degli anni '60, queste strutture continuarono a lavorare per espandere il campo di interesse dei trattamenti con protoni sino ad includere melanomi della corioide, e varie altre neoplasie intracraniche. Tuttavia, questi primi sforzi furono limitati principalmente dalla non ancora sviluppata strumentazione a disposizione dei medici per la diagnostica. Con l'introduzione in uso clinico della TAC si migliorò nettamente la definizione dell'obiettivo per il trattamento di qualsiasi distretto corporeo. Nel 1970 il *Massachusetts General Hospital* di Boston (USA) condusse la prima ricerca sulla RT con fasci misti di protoni e raggi X per il trattamento del cancro alla prostata. Purtroppo, in quel decennio, il ruolo dei protoni in RT era significativamente sottovalutato a favore della terapia con neutroni. Tuttavia, la PT, superato questo momento di interesse limitato, si è poi rapidamente sviluppata fino all'apertura del primo centro clinico, a Loma Linda (California-USA). Lo sviluppo successivo di risonanza magnetica, SPECT e PET ha migliorato ulteriormente la definizione del *target* terapeutico permettendo l'ottenimento di ulteriori benefici da terapie estremamente precise e selettive come la PT. La PT si è ulteriormente sviluppata dagli anni '90 in poi e sono stati costruiti numerosi centri basati sull'uso di fasci di protoni o di ioni carbonio; questi sono usati principalmente per la cura dei tumori radioresistenti in virtù della loro maggiore capacità di causare danni irreparabili al DNA delle cellule tumorali <sup>[14]</sup>. Numerose ulteriori strutture sono attualmente in costruzione o in fase di pianificazione e la progressione nella implementazione di nuovi centri è stata particolarmente attiva nell'ultimo decennio. Stando a quanto riportato dal sito del PTCOG (*Particle Therapy Co-Operative Group*) ci sono ben 36 impianti per la PT in costruzione in tutto il mondo, dei quali almeno 20 inizieranno il trattamento pianificato entro la fine del 2020. Le dimensioni dell'incremento della attività, soprattutto in PT, sono facilmente valutabili considerando l'enorme aumento delle citazioni ottenibili col motore di ricerca sulla piattaforma *PubMed* usando il termine "*proton therapy*". Dalla prima pubblicazione nel 1957 ad oggi sono rilevabili ben 7467 citazioni (solo 3598 nel 2015) <sup>[15]</sup>. L'andamento della diffusione della PT sembra trovare in essa l'evoluzione della RT convenzionale. A favorire lo sviluppo

sempre più rapido della PT sono, soprattutto i vantaggi che danno l'utilizzo dei protoni rispetto ai fotoni e/o gli elettroni, come trattato nel paragrafo successivo.

## 1.5 Vantaggi della PT sulla RT convenzionale

Il principale vantaggio clinicamente rilevante della PT rispetto alla RT convenzionale è una maggiore accuratezza balistica nel rilascio della dose nel sito del tumore; ciò è una diretta conseguenza della natura fisica del modo in cui l'energia si deposita lungo e attorno al percorso dei fasci ionici nella materia, descritto dalla curva di Bragg. La curva di Bragg come si può vedere nella figura 7, ha un andamento crescente di energia depositata all'aumentare della profondità, fino ad un massimo ("picco di Bragg") vicino alla fine del *range* del fascio di protoni. Il vantaggio che ricaviamo dal picco di Bragg è che la regione di massima deposizione di energia può essere posizionata all'interno del bersaglio per ciascuna direzione del fascio. Questo crea una regione ad alta dose altamente conforme, con la possibilità di coprire il volume del tumore con elevata precisione. Allo stesso tempo, questa tecnica fornisce dosi inferiori al tessuto sano rispetto alle tecniche convenzionali con fotoni o elettroni. Tuttavia, oltre alla differenza nella distribuzione della dose in profondità, c'è una leggera differenza quando si considera la penombra laterale (distanza laterale dalla dose dell'80% al livello di dose del 20%). Per grandi profondità, la penombra per i fasci di protoni è leggermente più larga di quella per i fasci di fotoni tipicamente di pochi mm. Il picco di un fascio monoenergetico, risulta però troppo piccolo per poter essere confrontato col bersaglio tumorale e per questo motivo solitamente i trattamenti di PT sono effettuati usando il cosiddetto picco di Bragg allargato o SOBP (*Spread-Out Bragg peak*).

Il SOBP (figura 8) si ottiene usando nella sua forma più semplice, modulando il picco di Bragg per un fascio monoenergetico in profondità ed energia, utilizzando una ruota di modulazione rotante di spessore variabile: in questo modo si inviano simultaneamente numerosi fasci di energia variabile, ciascuno caratterizzato dalla propria curva di Bragg, la cui convoluzione restituisce il SOBP. La tecnica di modulare anche la corrente del fascio, indipendentemente dalla rotazione della ruota fornisce un controllo aggiuntivo sulle intensità dei picchi di Bragg.

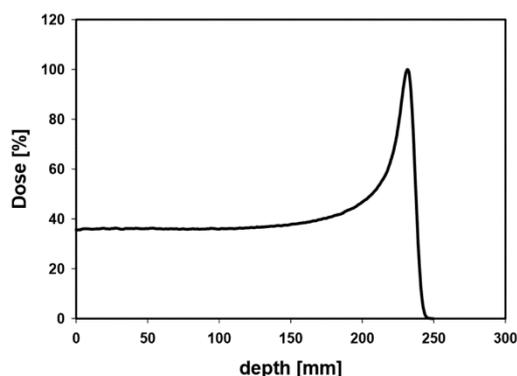


Figura 7- Tipico andamento del deposito di dose in funzione della profondità in un fascio di protoni

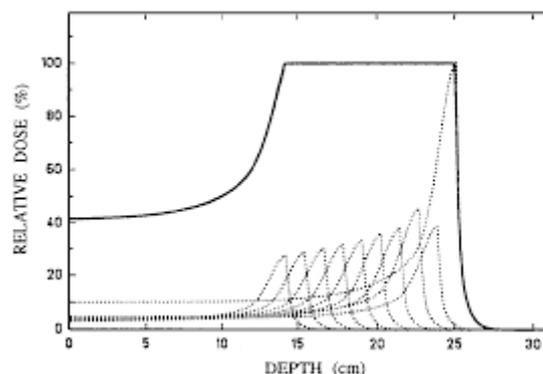


Figura 8- Picco di Bragg allargato, SOBP

Per questa sua caratteristica la terapia protonica è di particolare interesse per quei tumori situati vicino a tessuti organizzati in serie dove un piccolo sovradosaggio locale può causare complicazioni fatali come la maggior parte dei tumori vicino al midollo spinale. Le lesioni di forma irregolare vicino a strutture critiche sono adatte per i protoni. In questo caso, la PT ha offerto un alto grado di conformità ai volumi bersaglio e gradienti di dose ripidi, portando così a un sostanziale risparmio di tessuto normale nelle aree ad alto e basso dosaggio. Studi su vari tumori del sistema nervoso centrale hanno rivelato che gli effetti collaterali acuti o precoci tardivi erano bassi. Spesso in sostituzione della RT convenzionale, invece della PT si utilizzano fasci di ioni carbonio, questi non hanno di certo la precisione balistica dei protoni, ma hanno una maggiore efficacia radiobiologica. Poiché quindi, a parità di dose, radiazioni diverse generano effetti diversi, si parla di una migliore Efficienza Biologica Relativa (RBE, dall'inglese *Relative Biological Effectiveness*). L'RBE è il rapporto tra la dose di una radiazione di riferimento e la dose della radiazione in esame per produrre lo stesso effetto biologico causato dalla radiazione di riferimento (figura 10).

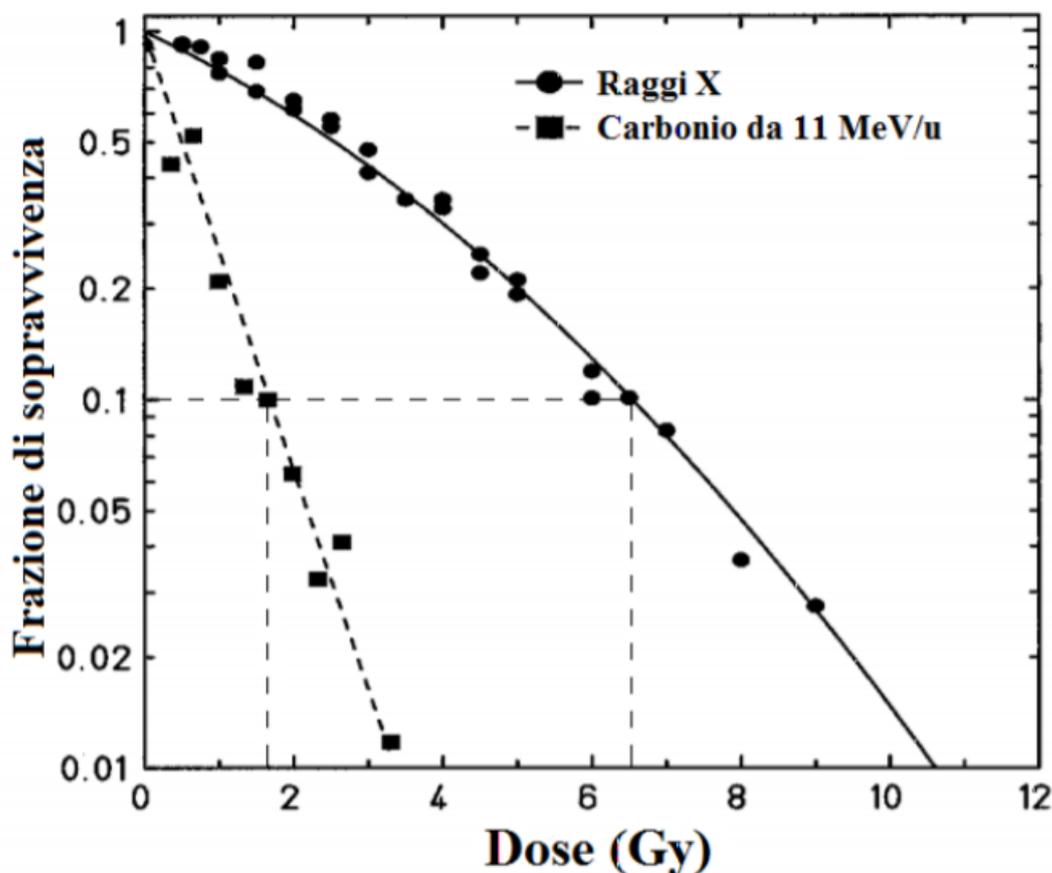


Figura 9-Curve di sopravvivenza di cellule di criceto cinese (CHO), irraggiate con raggi X e nuclei di Carbonio con energia di 11 MeV per nucleone

L'RBE di una particella dipende dal numero di ionizzazioni e dalla loro distribuzione lungo il percorso. Particelle ad alto LET sono più dannose per unità di dose che le radiazioni a basso LET. Con basso LET si ha recupero, mentre non lo si osserva per alto LET. L'RBE di una radiazione aumenta con il LET. L'andamento RBE/LET è riportato nella figura seguente.

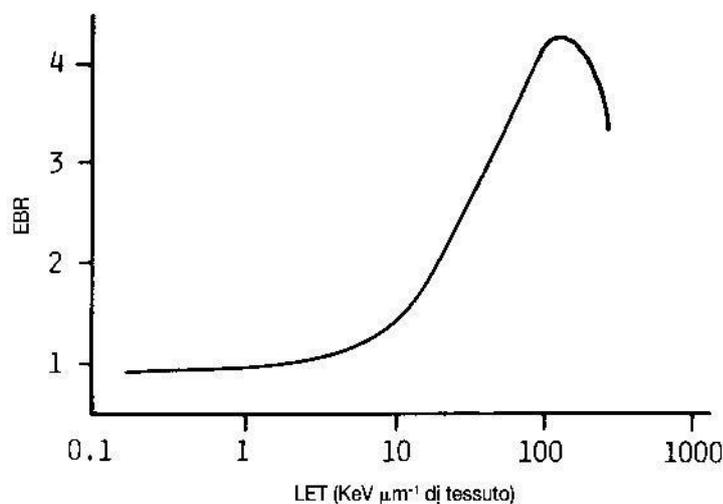


Figura 10- Relazione fra RBE di una radiazione e il suo LET

Tuttavia, per la sua precisione la PT resta il trattamento di adroterapia con più potenzialità, l'ostacolo maggiore che sta impedendo alla PT di diffondersi in maniera ancora più veloce, sono i costi legati alla necessità di avere sincrotroni/ciclotroni, macchine molto costose e complesse che non tutti i centri medici o sistemi sanitari nazionali possono permettersi. Ciò spiega anche il fiorire di diversi centri privati di PT. Una struttura completa per l'utilizzo di protoni a scopo terapeutico è formata da un complesso di attrezzature ad alta tecnologia simile ad un laboratorio per la ricerca in fisica nucleare. Essa è formata sostanzialmente di un sistema di produzione ed accelerazione del fascio di particelle cariche, di un sistema di trasporto per portare queste particelle fino alla sala di trattamento e di sale di trattamento equipaggiate, attraverso le quali avviene l'erogazione del trattamento al paziente, aggiungendo al problema finanziario anche un problema logistico, poiché poche strutture sono abbastanza grandi da poter contenere un tale acceleratore [16].

## 2. Tecnica laser-driven per l'accelerazione di particelle cariche

I limiti che hanno rallentato la diffusione della protonterapia (PT) non hanno tuttavia fermato del tutto il progresso nell'applicazione della fisica alla medicina. I maggiori tra tali limiti sono legati al costo ed alla logistica, il che ha quindi portato a cercare un modo per poter ottenere lo stesso effetto della PT, ma con delle soluzioni tecnologiche alternative all'accelerazione convenzionale. Una tra le soluzioni più innovative e promettenti potrebbe essere la PT che accelera i protoni tramite tecniche laser. L'accelerazione di particelle mediante tecniche *laser-driven* porterebbe, in prospettiva a macchine, molto più compatte rispetto agli acceleratori di particelle attualmente utilizzati. Con le potenze dei laser attualmente disponibili è possibile raggiungere picchi di energia nei fasci protonici di diverse decine di MeV, a fronte degli oltre 200 MeV necessari per la PT destinata al trattamento dei tumori solidi profondi; inoltre, la produzione di particelle *laser-driven* è attualmente caratterizzata da un'elevata variabilità tra colpi (*shot-to-shot variation*) e non è ancora, del tutto disponibile una strumentazione (o tecnica) che permetta di poter controllare in maniera affidabile e riproducibile parametri tipici dell'accelerazione come: trasporto, stabilità e dosimetria. Accanto a queste problematiche, esistono poi delle incognite di natura biofisica legate al fatto che gli effetti biologici dei fasci *laser-driven*, che come vedremo sono intrinsecamente caratterizzati da ratei ultra elevati (teoricamente superiori a  $10^9$  Gy/s, che sono diversi ordini di grandezza superiori al regime di lavoro terapeutico convenzionale di 1-10 Gy/min.), sono praticamente sconosciuti, e quindi richiederanno approfonditi studi radiobiologici in vitro e su modelli animali prima che eventualmente la PT *laser-driven* diventi una realtà clinica. Quindi, a fronte della conservazione della precisione balistica, tipica dell'utilizzo dei fasci di protoni in oncologia, si presentano comunque diverse problematiche, da risolvere, dal cui esito dipenderà la futura applicazione medica dei protoni *laser-driven* (di cui si discuterà nei paragrafi 2.2 e 2.3).

### 2.1. Meccanismi di accelerazione delle particelle attraverso laser

Alla base del processo di accelerazione tramite laser, c'è sempre un'interazione laser-bersaglio, che avrà come effetto secondario l'accelerazione di varie particelle, tra cui i protoni; non si tratta quindi di un'accelerazione diretta. Il processo si basa sull'impulso di un laser molto intenso ( $I > 10^{18}$  W/cm<sup>2</sup>) di una durata inferiore ai nanosecondi verso un bersaglio (fogli sottili con substrati di densità variabile (tra i decimi e le decine di  $\mu\text{m}$ ) o spessi di materiali a bassa densità (fino a 125  $\mu\text{m}$ )).

L'idea di fondo è quella di creare una perturbazione all' equilibrio elettrostatico di un plasma, mediante impulsi laser ultra-brevi; nella scia di questa perturbazione si creano delle onde di plasma, i cui campi elettrici possono poi essere utilizzati per accelerare pacchetti di particelle cariche opportunamente iniettati nell'onda creata. Un'analogia che possa dare l'idea di ciò che accade è quella di un surfista che cerca di accelerare cavalcando le onde di scia di una barca nel mare.

I laser possono agire in vari modi, per poter accelerare i protoni; ad oggi, sono due le tecniche maggiormente utilizzate: la *chirped pulse amplification* (CPA) [17] e la *target normal sheath acceleration* (TNSA) [18].

La CPA (fig.11) ad oggi è la tecnica più utilizzata e all'avanguardia, l'idea è di controllare un impulso molto breve in modo reversibile. L'intero processo può essere diviso in tre parti; nella prima fase la durata temporale dell'impulso viene dilatata con l'utilizzo di reticoli e fibre ottiche che scindono le varie componenti cromatiche che compongono il raggio e le indirizzano in cammini ottici separati. Da ciò, deriva anche il termine *chirped*, cioè una frequenza che varia tra il fronte e la coda. Tutto ciò a parità di energia ha come effetto l'allungamento dell'impulso e la riduzione dell'ampiezza dei campi elettromagnetici, il che favorisce l'amplificazione che avviene nella seconda fase; l'amplificazione avviene grazie alla presenza di un mezzo di propagazione (ad esempio un cristallo) detto mezzo di guadagno. Nella terza fase, l'impulso così amplificato ripercorre a ritroso il percorso fatto nella prima fase; questo porta a un accorciamento dell'impulso amplificato e, di nuovo a parità di energia, a un corrispondente aumento dell'intensità dei campi. La CPA permetterebbe di amplificare impulsi ultra brevi (fino a durate dell'ordine delle decine di femtosecondi ( $10^{-15}$  s) e con lunghezze d'onda dell'ordine dei micrometri) fino a potenze dell'ordine dei petawatt ( $10^{15}$  W).

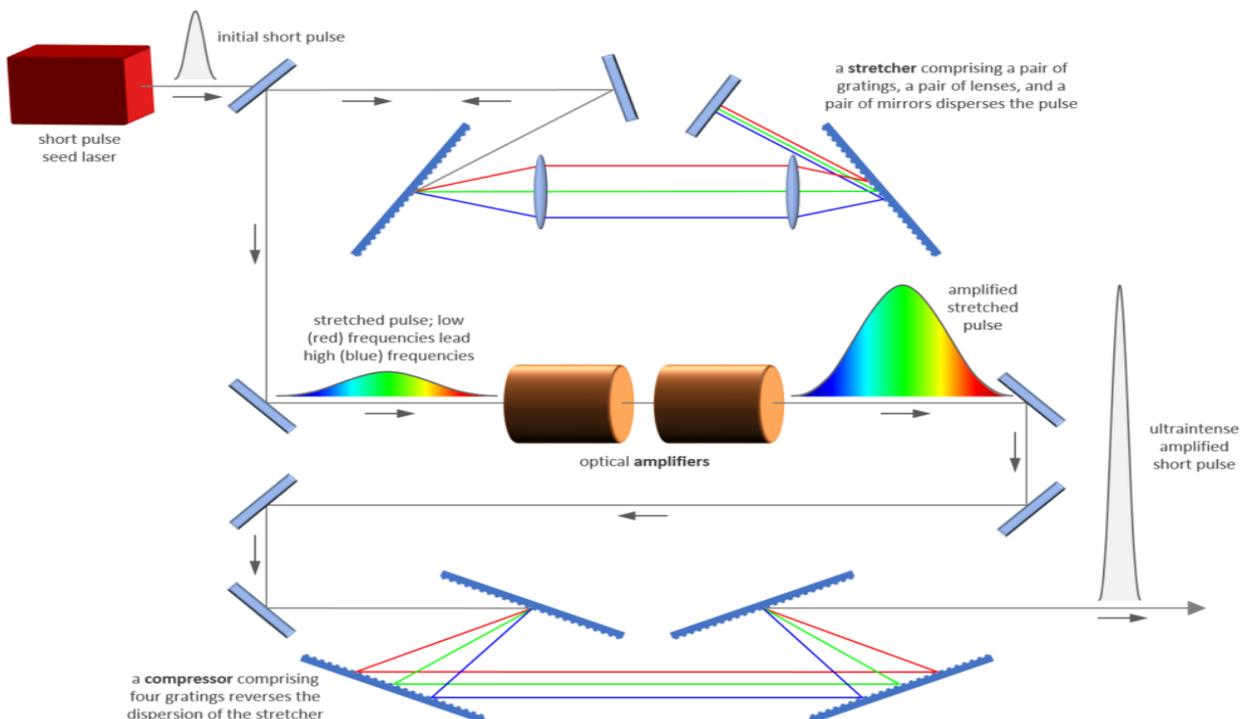


Figura 11- Schematizzazione del processo CPA

Il processo TNSA può essere diviso invece in 4 fasi (fig. 12). Nella prima fase un pre-plasma viene generato sulla superficie frontale del *target* da un pre-impulso; nella seconda fase l'impulso principale colpisce il pre-plasma e si propaga fino alla superficie critica. La terza fase si ha quando, gli elettroni relativistici generati dall'interazione dell'impulso principale con il *target*, assorbono una percentuale consistente dell'energia laser che ne causa il riscaldamento. Gli "elettroni caldi" hanno un percorso libero medio maggiore dello spessore del bersaglio, quindi iniziano ad espandersi attraverso di esso. Attraverso un angolo di divergenza gli elettroni vengono trasportati nel bersaglio e raggiungono la superficie posteriore formando una nuvola di densa guaina elettronica. Il forte campo elettrico dell'ordine di TV/m generato dalla separazione di carica è in grado di ionizzare gli atomi nella parte posteriore. Infine gli ioni, a causa di tale intenso campo elettrico, vengono accelerati nella direzione del bersaglio. Al termine del processo di accelerazione, il bersaglio viene colpito in tempi dell'ordine dei nanosecondi. Il metodo TNSA, rispetto al CPA è capace di raggiungere picchi energetici più elevati; questo dipende anche dallo spessore del bersaglio. Infatti è stato ricavato sperimentalmente che al diminuire dello spessore del *target*, l'energia massima del protone aumenta, sebbene vi sia un limite causato dalla rottura del bersaglio (dell'ordine dei  $\mu\text{m}$ ). Il fenomeno è dovuto alle diverse temperature e densità raggiunte dagli elettroni dopo l'interazione laser-bersaglio.

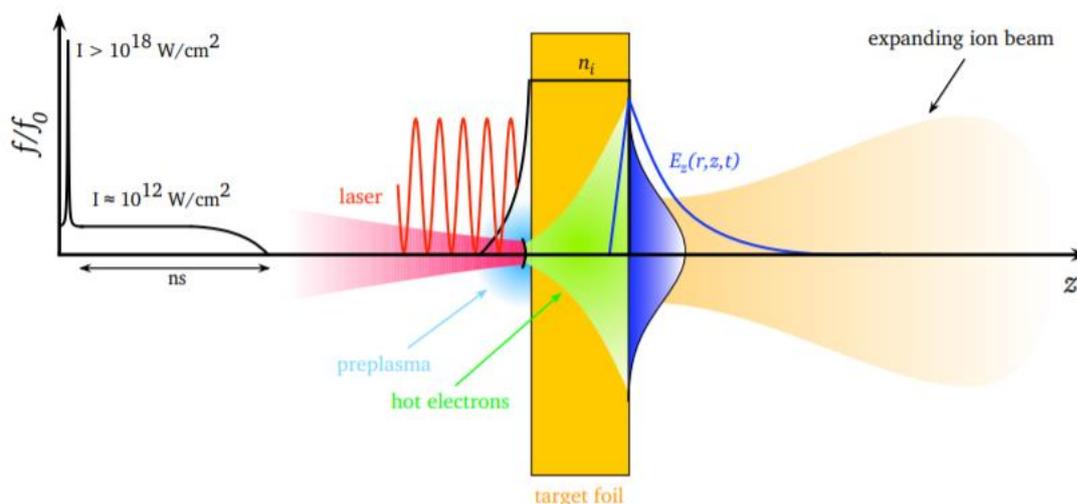


Figura 12- Schematizzazione del processo TNSA

## 2.2. Problematiche legate al trasporto del fascio e alla dosimetria

La PT con protoni *laser-driven*, ha ancora bisogno delle opportune migliorie per poter diventare applicabile nella pratica clinica, ossia sui pazienti, ma sembra essere sulla buona strada per diventare un importante ausilio della lotta ai tumori. Nell'utilizzo dei raggi laser si presentano, infatti, problematiche legate al trasporto delle particelle generate. I fasci di protoni sono emessi tipicamente con angoli di deviazione diversi; inoltre, nell'interazione laser-bersaglio capita che ad essere accelerate, oltre ai protoni siano particelle cariche diverse (ioni pesanti, elettroni) insieme a raggi gamma e neutroni, tutti emessi dal bersaglio dopo essere stato colpito. Tuttavia, il raggio proveniente da un minuscolo foro laser è tale che può essere facile rimettere a fuoco i protoni accelerati dal laser con magneti o altri mezzi. Inoltre, la selezione dell'energia (filtraggio) e la messa a fuoco anche per fasci di protoni con ampi spettri di energia e ampia divergenza si sono dimostrati possibili sperimentalmente, facendo passare protoni *laser-driven* attraverso delle microlenti.<sup>[19]</sup>

Per i protoni accelerati dal laser, la direzione del raggio desiderata può essere impostata scegliendo la direzione di irradiazione laser e i magneti vengono introdotti solo per la separazione delle componenti del fascio desiderate da quelle non desiderate. Pertanto, i livelli di campo magnetico (e quindi la dimensione dei magneti) possono essere quasi un ordine di grandezza inferiori a quelli utilizzati tradizionalmente, dove un fascio di particelle cariche è tipicamente deviato di 90 gradi o 135 gradi <sup>[20]</sup>.

Affetta ancora da diverse incertezze, resta la parte della dosimetria. Poiché lo spettro energetico delle particelle con accelerazione laser è piuttosto ampio, rispetto ai fasci monoenergetici delle macchine convenzionali, è stato proposto l'utilizzo di spettri più ampi per il trattamento di almeno alcune parti del volume del tumore per rendere il processo più efficiente. È dimostrato <sup>[21]</sup> che l'incertezza sull'energia è indicata dal cambiamento del numero totale di particelle e dal cambiamento nella distribuzione dell'energia delle particelle. Il primo fattore può essere monitorato da un semplice rilevatore di fluenza (dose totale accumulata nel tempo). Questo fattore introduce solo piccole modifiche alla curva dose-profondità risultante. Pertanto, non dovendo monitorare tutti i colpi, ciò potrebbe consentire una gestione più semplice dell'incertezza.

Degno di nota è l'esperimento che è stato condotto utilizzando l'impulso ultra-breve del *Ti:Sapphire laser system Draco at H'DR* <sup>[22]</sup>, effettuato fornendo un'energia di 1,8 J sul bersaglio, contenuta in un impulso di durata di 30-fs. Focalizzando unicamente su un bersaglio di lamina di titanio di 2  $\mu\text{m}$  di spessore, si sono raggiunti picchi di  $5 \times 10^{20} \text{ W/cm}^2$ . La radiazione protonica generata dal meccanismo di accelerazione, presenta uno spettro di energia esponenzialmente crescente con una caratteristica energia di taglio fino a 15 MeV. La procedura di allineamento del bersaglio, controllata da remoto, garantisce un'elevata riproducibilità. Uno speciale dispositivo (figura 13) di scambio di lamina come bersaglio consente circa 1.000 colpi senza rompere il vuoto, sufficienti per irradiare omogeneamente circa 40 campioni di cellule con una dose di 2 Gy.

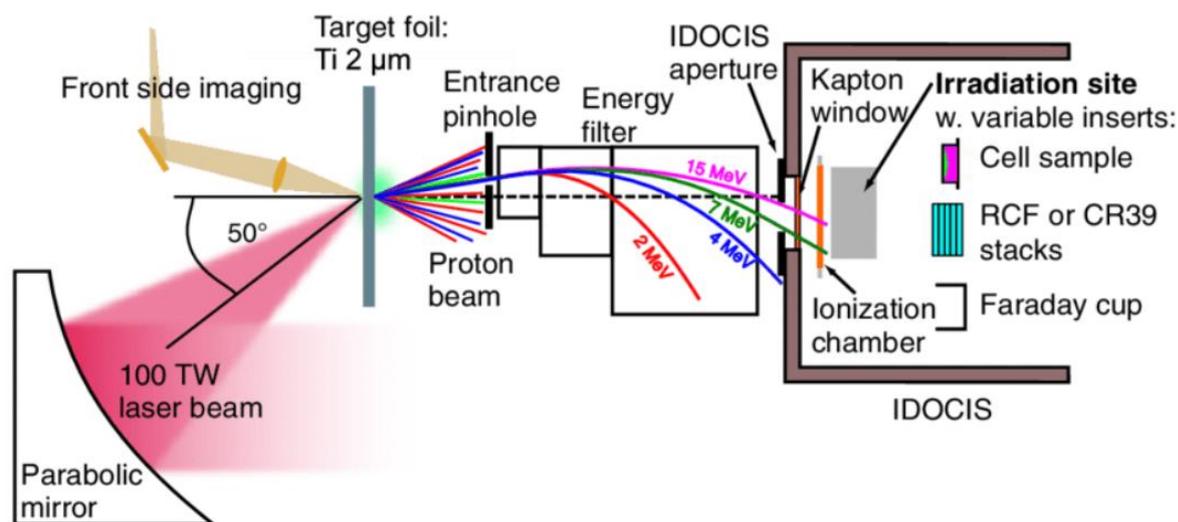


Figura 63- Schema della configurazione sperimentale presso l'acceleratore di particelle laser DRACO, compreso il filtro di energia

Direttamente dietro il bersaglio, i protoni passano attraverso un filtro magnetico di dipolo, applicato per pulire l'impulso di tutti i protoni, con energie inferiori a 8 MeV. A valle del filtro magnetico si trova il sistema integrato di dosimetria e irraggiamento cellulare (IDOCIS). Le sue componenti interne per la dosimetria e l'irraggiamento cellulare sono separate dal vuoto della camera bersaglio da una sottile finestra di plastica. Il modulo IDOCIS integra una sottile camera di ionizzazione di trasmissione, per il controllo in tempo reale della somministrazione della dose.

Conclusione di questo esperimento, è che l'uso di energie protoniche sufficientemente elevate nella posizione dello strato cellulare (>6.5 MeV) ha garantito un costante trasferimento lineare di energia (LET) in corrispondenza del picco di Bragg (ciò permette di normalizzarlo ad 1). Pertanto, è stata raggiunta un'incertezza significativamente minore nella perdita di energia rispetto al caso in cui il picco di Bragg fosse posizionato alla profondità del monostrato cellulare [23]. Ciò che manca di sapere è quanto un impulso laser ad altissima energia e di brevissima durata incida sulle cellule.

## 2.3 Problematiche radiobiologiche

Negli ultimi anni diverse campagne sperimentali [23-32], hanno dimostrato che i protoni accelerati mediante laser hanno un'efficacia dei risultati radiobiologici molto vicina a quella dei protoni accelerati convenzionalmente.

Il prerequisito dell'utilizzo dei laser in applicazioni biomediche come la PT è che, nonostante la natura altamente impulsata dei fasci e dei conseguenti elevatissimi ratei di dose raggiunti ( $\sim 10^9$  Gy/s), l'efficacia radiobiologica sia quanto meno la stessa (se non superiore) per quanto riguarda la capacità di inattivazione delle cellule tumorali di quella esibita dai fasci accelerati convenzionalmente. Per poter descrivere queste proprietà, partiamo dai risultati di alcuni esperimenti effettuati col laser multi-terawatt SAPHIR a LOA (dal francese, *Laboratoire d'Optique Appliquée*) del luglio 2019[26]. Risultato principale ottenuto è stato che i protoni

guidati da laser (LDP, *laser driven protons*) sono efficienti quanto i protoni convenzionali accelerati (CAP, *conventionally accelerated protons*) e i raggi X nell'indurre rotture del doppio filamento del DNA e la morte cellulare in linee cellulari di glioblastoma.

La balistica favorevole dei fasci di protoni rende tale trattamento efficiente per i tumori cerebrali, base del cranio, testa e collo. Poiché gli esperimenti precedenti sono stati eseguiti su roditori o cellule polmonari è stato studiato l'impatto di LDP sulle linee di cellule di glioblastoma, note per essere particolarmente radioresistenti, rispetto a CAP o raggi X. Prima sono state confrontate le rotture del doppio filamento del DNA indotte da LDP (*Double-Strand Break*, DSB). Le cellule (appartenenti alla linea denominata SF763) sono state fissate una o 24 ore dopo tre e sei *bunch* di LDP (con dose  $2,1 \pm 0,42$  Gy per i tre *bunch* e  $4,2 \pm 0,84$  Gy per i sei *bunch*) rilasciati ogni 30 secondi, o 2 Gy per i 3 *bunch* e 4 Gy per i sei *bunch* di CAP o raggi X. Come prevedibile, la quantità di DSB aumenta con l'aumentare della dose; diminuisce invece tra 1 h e 24 h, il che riflette il processo di riparazione del DNA [34].

Una quantità simile è stata valutata per LDP, CAP o raggi X un'ora dopo l'irradiazione in un'altra linea cellulare di glioblastoma (U87-MG). A 24h (figura 14a) dopo l'irraggiamento, non sono state osservate differenze, mentre il numero di focolai residui sembrava essere più alto per LDP rispetto ai raggi CAP e X nella seconda tipologia di cellule. Tuttavia, questa differenza non era statisticamente significativa. Questi risultati suggeriscono che LDP induce rotture del doppio filamento del DNA nelle linee cellulari del glioblastoma resistente alla stessa stregua di CAP e raggi X. In seguito, è stato valutato come la sopravvivenza cellulare fosse influenzata dall'LDP. A tale scopo, le due linee cellulari di glioblastoma furono irradiate con da 0 a 12 *bunch* di protoni (corrispondenti a dosi che vanno da 0 a 10 Gy) di LDP e le curve di sopravvivenza della risposta alle dosi risultanti ottenute da saggi di sopravvivenza clonogenici (tecniche per studiare l'efficacia degli agenti specifici sulla sopravvivenza e la proliferazione delle cellule) sono state confrontate con quelle ottenute con cellule irradiate con CAP o raggi X. Avendo ottenuto curve sovrapponibili, è possibile dire che l'impatto dell'LDP sulla sopravvivenza delle cellule è simile a quello dei raggi CAP o X.

Questi risultati mostrano che non è stata rilevata alcuna differenza significativa nelle rotture del doppio filamento del DNA e nella sopravvivenza cellulare in linee cellulari di glioblastoma altamente radioresistenti. Queste osservazioni sono in accordo con studi precedenti effettuati utilizzando ulteriori linee cellulari, a conferma che i LDP sono in grado di danneggiare le cellule tumorali con la stessa efficacia rispetto alle CAP. Nella stessa serie di esperimenti è stato dimostrato che cambiare la modalità di somministrazione della dose, modificando il tasso di ripetizione dei gruppi di LDP, può provocare l'oscillazione della sopravvivenza cellulare, che potrebbe dipendere da una proteina chiamata PARP1 (presente nelle cellule tumorali). Diversi campioni sono stati irradiati con un ritardo variabile tra i colpi, da 2 a 60 secondi. La sopravvivenza cellulare di ogni linea cellulare è stata monitorata e riportata in funzione del ritardo tra i fasci di LDP, tali variazioni non hanno influenzato la sopravvivenza né delle cellule SF763 né delle cellule U87-MG (figura 14b).

Tra i problemi legati alla dose, restano delle incognite, ad esempio la dose totale minima o massima da fornire per sostenere il grande potenziale terapeutico della tecnologia plasmatica laser; non ancora verificato risulta inoltre, che la deposizione di grandi quantità di particelle in un tempo molto breve e con un alto tasso di ripetizione potrebbe comportare un aumento della formazione e dell'accumulo di danni complessi al DNA [33].

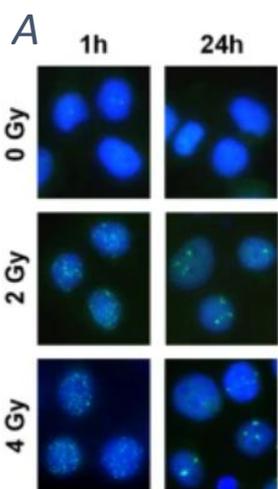


Figura 14a-Immagini immunofluorescenti rappresentative delle cellule SF763 ottenute 1h e 24 h dopo l'esposizione alle dosi indicate di protoni guidati dal laser. Mostrati come spot luminosi sono i siti dove si trovano i DSB.

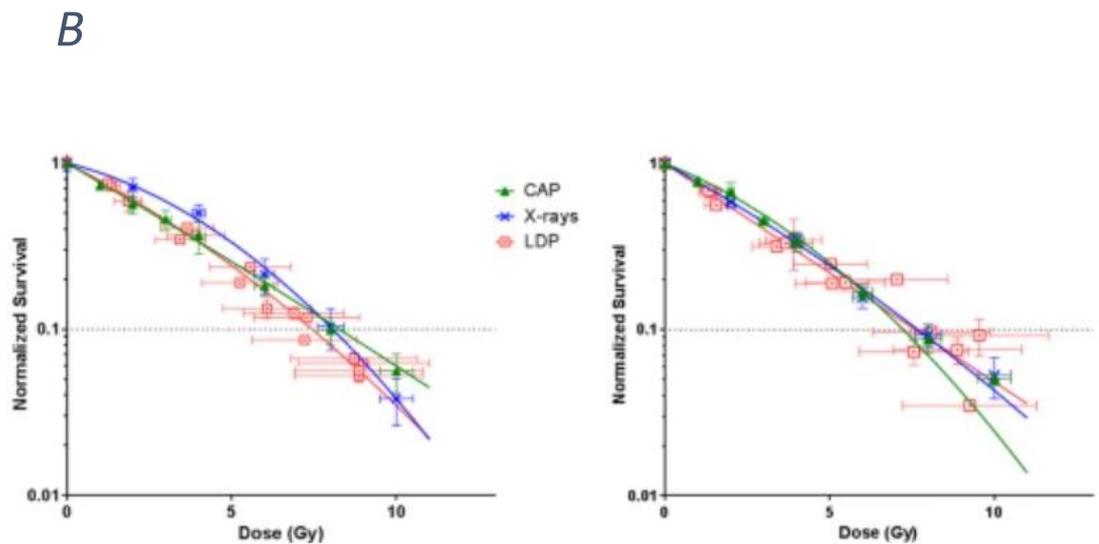


Figura 14b- Sopravvivenza cellulare normalizzata risultante dall'esposizione a dosi crescenti di LDP, CAP e raggi X rispettivamente nelle cellule SF763 e U87-MG.

In contemporanea all'espansione delle tecniche di accelerazione laser, è sempre più diffuso lo studio di un nuovo processo radiobiologico, noto come *FLASH effect*, che permetterebbe l'aumento del risparmio sui danni ai tessuti sani. La radiazione erogata, con tecniche convenzionali, ma a tassi di dose molto elevati ( $> 40 \text{ Gy/s}$ ) sembrerebbe ridurre l'induzione di danni nelle cellule normali mantenendo invariata la sua capacità di uccidere le cellule tumorali; proprio dall'elevato rateo di dose deriva il nome "*flash*" [34]. Il FLASH effect permetterebbe inoltre di ridurre le incertezze dovute ai movimenti effettuati dal paziente tra la somministrazione di dosi, che di norma riducono la precisione della RT. La prima e più evidente differenza tra FLASH-RT (microsecondi) e radioterapia con dose convenzionale (minuti) è appunto il tempo di esposizione alla radiazione. A livello molecolare, la principale differenza tra la RT FLASH e la RT convenzionale è ciò che avviene durante la fase chimica che normalmente segue l'assorbimento di energia nei materiali biologici/acqua. Gli effetti messi in moto durante lo stadio chimico dalla deposizione energetica, avvenuta nello stadio fisico, dipendono fortemente dalla concentrazione di ossigeno nei tessuti. I meccanismi alla base del FLASH effect non sono ancora del tutto chiari; un'ipotesi riguarda il ruolo dell'ossigeno, secondo cui potrebbe essere che i tessuti sani risultano meno danneggiati, nonostante non si manifesti nessuna variazione della radiosensibilità a livello del tumore, poiché i tessuti sani e i tessuti tumorali hanno concentrazione di ossigeno diverse e di conseguenza risposte diverse a radiazioni "*flash*". L'erogazione della dose in un tempo estremamente breve (ns) con ratei di dose elevata ( $40 \text{ Gy/s}$ ) causerebbe un rapido consumo di ossigeno locale (*oxygen depletion effect*). Il rapido esaurimento dell'ossigeno provocherebbe quindi un'ipossia indotta da radiazioni, di natura transitoria: ciò si tradurrebbe nell'incremento della radioresistenza dei tessuti sani mentre non avrebbe conseguenze sui tumori, già di per sé parzialmente ipossici, mantenendo i livelli di inattivazione cellulare registrati a ratei "convenzionali" ( $1-10 \text{ Gy/min}$ ). Il risultato netto sarebbe, pertanto, un aumento della cosiddetta finestra terapeutica (figura 15), un concetto fondamentale in radioterapia [35].

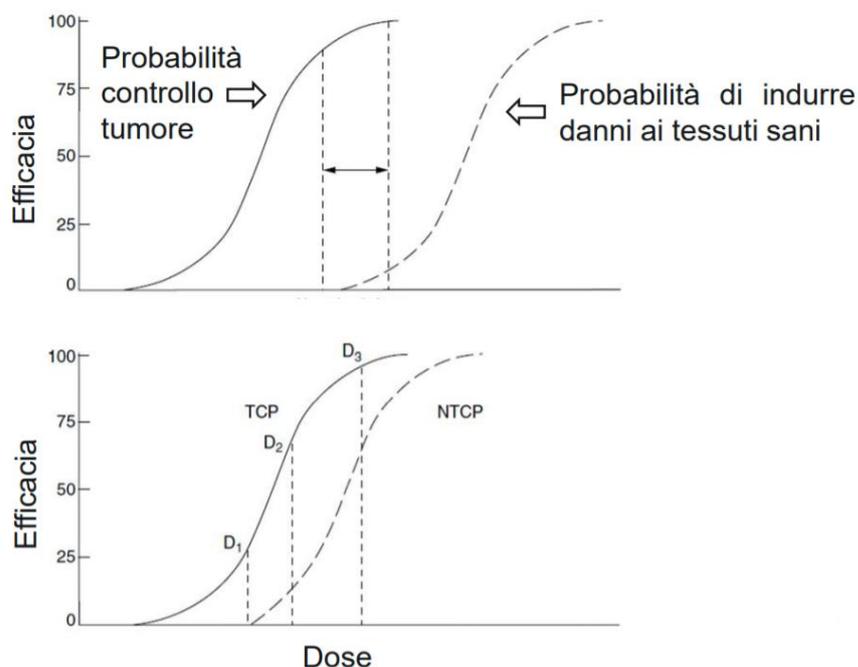


Figura 15- "La finestra terapeutica"

In letteratura è presente un cospicuo numero di esperimenti con fotoni ed elettroni, molto più semplici da accelerare per arrivare alle dosi necessarie alla FLASH- RT. I risultati con tali fasci sembrano promettere bene; dati da esperimenti condotti su animali domestici (gatti) mostrano che in 4 casi su 6 non si hanno effetti collaterali significativi sui tessuti sani, mentre negli altri due casi si evidenziava il bisogno di una dose più elevata per poter controllare tumori invasivi e diffusivi. Ciò ha permesso di spostare le sperimentazioni sugli umani, che sebbene poche, hanno dato tutte esiti positivi. Siccome la soglia dei 40 Gy/s necessaria per il FLASH *effect* è ampiamente superata nelle tecnologie *laser-driven* che prevedono teoricamente ratei superiori a  $10^9$  Gy /s, è atteso un FLASH *effect*, che finora è stato dimostrato solo con fasci accelerati convenzionalmente, anche nell'accelerazione protonica tramite laser e questa è un'ulteriore potenzialità di questa tecnologia che risulta, ad oggi, non del tutto esplorata.

### **3. Verso un possibile utilizzo clinico dell'accelerazione mediante laser di fasci di protoni**

Nonostante le difficoltà per una rapida diffusione delle tecniche di accelerazione mediante tecnologie laser, la PT con protoni *laser-driven* trova giorno dopo giorno sempre maggiore solidità. I risultati biologici, introdotti nel capitolo 2, seppur realizzati con laser di intensità minori di quelli necessari a produrre fasci clinicamente utilizzabili e privi del controllo e stabilità dei fasci, fondamentali in un contesto terapeutico, non sembrano precludere ulteriori positivi sviluppi: i costi sono minori degli acceleratori convenzionali, le attrezzature sono contenute comodamente in un'unica stanza, la precisione balistica dovuta al picco di Bragg resta invariata e l'efficacia con cui le cellule tumorali sono inattive sembra essere immutata. Addirittura, se i risultati relativi al FLASH *effect* fossero confermati anche con i regimi di ratei di dose *laser-driven*, si otterrebbe un'ulteriore diminuzione del danno ai tessuti sani. Tuttavia, non esistono ancora strumenti così avanzati da poter raggiungere i picchi energetici e la durata di impulso richiesti da questa tecnica, né abbiamo la certezza che la radiobiologia di tali regimi di irraggiamento sia esattamente la stessa di quella consolidata in decenni di esperimenti con le tecniche di accelerazione convenzionali. La storia ci ha insegnato però, che possibilità che oggi ci sembrano addirittura scontate, un tempo erano inimmaginabili da realizzare. Questo ci permette di pensare che sia solo una questione di tempo, prima di poter vedere la PT *laser-driven* in aziende ospedaliere o in istituti sanitari. Negli ultimi anni l'accelerazione tramite laser, sperimentazione dopo sperimentazione, ha garantito risultati eccezionali, che hanno consentito di poter continuare ad impiegare risorse per la ricerca mirata ad implementare una modalità per curare i tumori che risulti di più facile fruibilità per un numero sempre crescente di pazienti. Attraverso il paragrafo 3.1 si vedrà lo sviluppo attuale raggiunto dalla ricerca, ripercorrendo per tappe alcune sperimentazioni, che negli ultimi anni sono diventate pietre miliari per la crescita della LDP.

#### **3.1 Stato dell'arte**

Dal 2017 è possibile trovare un numero sempre crescente di pubblicazioni sull'argomento delle possibili applicazioni cliniche di fasci di particelle accelerate mediante tecniche ottiche (laser). Ciò è indice del fatto che un obiettivo raggiunto da un centro di ricerca, viene poi utilizzato come punto di partenza da altri centri, creando così una rete sempre più fitta di collegamenti che permettono a chiunque studi l'argomento di poter compiere importanti progressi. Verranno di seguito citati alcuni tra gli esperimenti più significativi realizzati recentemente in questo campo, per poter ripercorrere il cammino che ha portato allo stato dell'arte della PT *laser-driven*. Verranno innanzitutto citati i risultati radiobiologici raggiunti per poter capire come agiscono i protoni *laser-driven* e verrà in seguito trattato il metodo di produzione di questi raggi laser e quindi il progresso tecnologico raggiunto.

Il primo di tali esperimenti risale a marzo 2017; in esso si studiarono gli effetti cellulari sub-letali, rilevanti per l'integrità dei tessuti normali e tumori secondari, come la senescenza cellulare prematura [29]. Questo esperimento; fu il primo ad investigare l'*endpoint* della senescenza prematura in seguito all'esposizione a fasci *laser-driven*, poiché la quasi totalità degli studi precedenti si era soffermata principalmente sugli effetti letali a danno delle cellule tumorali, avendo trascurato quindi effetti tardivi. Ci sono infatti alcune evidenze [36] sia da studi epidemiologici sulla coorte dei sopravvissuti giapponesi alle atomiche di Hiroshima e Nagasaki che dal *follow-up* di pazienti, che erano state trattate per il cancro al seno, secondo cui l'esposizione alla radiazione ionizzante aumenta il rischio di malattie cardiovascolari. Ciò ha evidenziato che tra gli effetti deleteri a lungo termine che possono scaturire dal danno subletale al tessuto sano ci siano anche altri fenomeni oltre i tumori secondari. Il motivo di un incremento di rischio di patologie cardiovascolari radioindotte è presumibilmente associato all'inevitabile assorbimento da parte del cuore o dei vasi sanguigni di una certa dose. In questo esperimento, Manti et al., decisero quindi di studiare la senescenza cellulare prematura radioindotta, un processo in cui le cellule danneggiate in modo sub-letale entrano in uno stato permanente di quiescenza, prima di quando andrebbero in condizioni fisiologiche. Questo fenomeno ricade nella più ampia categoria della *Stress-Induced Premature Senescence* (SIPS), che a sua volta è legata all'insorgenza di complicazioni cardiovascolari radioindotte. SIPS si contrappone infatti, al noto fenomeno della senescenza replicativa osservata in vitro da Hayflick e Moorhead nel 1961 [39] che consiste nell'esaurimento fisiologico della capacità di proliferazione di una cellula. Questo fenomeno è meccanicamente collegato al progressivo accorciamento delle sequenze cromosomiche finali (telomeri) ed è universalmente riconosciuta come una barriera naturale alla tumorigenesi in vivo. In particolare, la radiazione ionizzante è in grado di indurre SIPS già a dosi molto basse ( $\leq 0,5$  Gy) e, cosa ancor più interessante, le particelle cariche si sono dimostrate particolarmente efficaci nell'indurre una risposta di senescenza a dosi e tassi di dose molto bassi. L'accumulo di cellule senescenti può influire negativamente sulla normale integrità o funzione di tessuti con conseguente instabilità genomica e aumento del rischio di cancro. L'esperimento, condotto nella facility **PICO<sub>2000</sub>** (nei laboratori LULI dell'École *Polytechnique* in Francia), prevedeva l'uso di protoni generati dall'interazione di raggi laser focalizzate su bersagli di oro da 25 e 50  $\mu\text{m}$ . L'energia laser era, mediamente di  $(100 \pm 10)$  J, con un impulso di 1,3 ps. Un magnete dipolo deviava i LDP di opportune ampiezze, a seconda dell'energia. Attraverso il *fit* effettuato col modello lineare-quadratico dei dati sperimentali non sono state osservate differenze statisticamente significative tra LDP e CAP per quanto riguarda la morte cellulare misurata attraverso il saggio clonogenico. Si è ricavato un RBE di 1,1 tra irraggiamento protonico e raggi X, in linea con quanto attualmente riconosciuto per i protoni accelerati convenzionalmente. Il risultato originale fu invece ottenuto, appunto sulla senescenza prematura indotta da radiazioni in cellule normali esposte a particelle accelerate dal laser. Venne riscontrato che i fasci di protoni guidati dal laser producono una percentuale inferiore a quella misurata con fasci accelerati convenzionalmente di cellule che entrano prematuramente in senescenza a dosi basse, tipiche di quelle assorbite dai tessuti sani [29].

Un altro importante esperimento venne condotto a distanza di un anno nel *Molecular Science and Biomedicine Laboratory* (MBL), in Cina [37]. Come visto precedentemente, l'ipossia può ridurre le probabilità di controllo locale (cura) di un tumore poiché conferisce radioresistenza alle cellule tumorali nel caso di trattamento con radiazioni a basso LET. In questo studio, venne sviluppata una strategia per superare la tolleranza radioterapica indotta dall'ipossia tumorale. Venne utilizzato un sistema chiamato TPAN (*Two-dimensional Pd@Au bimetallic core-shell Nanostructure*) che prevedeva una grande produzione di ossigeno a lungo termine attraverso la catalisi dell'endogeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Si prevedeva inoltre che attraverso l'utilizzo di un laser si potesse incrementare l'effetto del TPAN, innescando un effetto di risonanza sulla superficie al plasma (SPR, *surface plasmon resonance*), per diminuire l'ipossia tumorale. Migliorando così tre aspetti della lotta ai tumori: alleviare l'effetto radioresistente dell'ipossia tumorale, aumentare l'assorbimento di energia dei raggi X all'interno del tumore grazie all'alto Z di Au e Pd e infine, attraverso TPAN offrire immagini fototermiche derivate da raggi X, per guidare con precisione la terapia del cancro [37].

Importanti risultati si sono raggiunti in un'altra serie di esperimenti, presso il centro ELI-NP (*Extreme Light Infrastructure Nuclear Physics*), in Romania. Questo centro aveva come prerogativa lo studio delle caratteristiche radiobiologiche delle radiazioni secondarie ad alta dose, generate utilizzando laser ad alta potenza. Scopo dell'esperimento era quello di introdurre l'utilizzo dei biomarcatori non invasivi, per il monitoraggio in tempo reale degli effetti biologici delle radiazioni, durante le sequenze di impulsi di radiazione. Un biomarcatore permette una misura oggettiva di processi biologici e patologici che possono essere utilizzati per individuare precocemente e sistematicamente il rischio di sviluppare una malattia e aiutare nell'elaborazione della diagnosi e monitorare gli eventuali interventi terapeutici. Si tratta di alterazioni cellulari di carattere biochimico o molecolare misurabili nei tessuti umani, nelle cellule, nei fluidi e nei biofluidi; con caratteristiche altamente specifiche. I biomarcatori furono utilizzati per poter controllare gli effetti generati da un irraggiamento, cosa che fino a quel momento era possibile fare solo *in vitro*. L'UV-Vis o metodi spettroscopici fluorescenti per la rilevazione dei biomarcatori si basano sulla presenza di molecole con cromofori (raggruppamenti atomici responsabili dell'assorbimento di radiazioni nelle zone del visibile o dell'ultravioletto) o sull'introduzione di molecole biocompatibili con cromofori. L'imaging molecolare che utilizza la tomografia a emissione di positroni (PET) e la risonanza magnetica (MR) hanno il potenziale per "orientare" i piani di trattamento in RT osservandone gli effetti in vivo, ad esempio la riduzione della massa tumorale per aggiustare la conformazione di dose al volume tumorale. In termini di quantità minima di una molecola tracciante, necessaria per il rilevamento, le tecniche basate su MR che utilizzano isotopi stabili sono meno sensibili della PET. Tuttavia, sono più flessibili in termini di configurazione. Alla luce di queste evidenze, venne suggerito un piano terapeutico multifrazionato che avrebbe garantito un attento monitoraggio tramite biomarcatori.

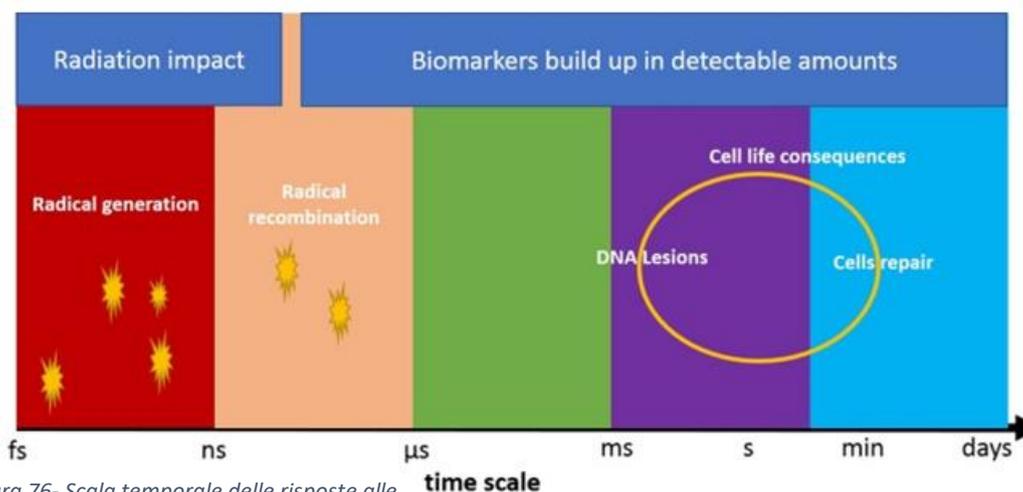


Figura 76- Scala temporale delle risposte alle irradiazioni, definita dalla quantità di radicali liberi prodotti nell'impatto iniziale

Si evidenziò che la diagnosi precoce degli effetti delle radiazioni, necessaria per orientare la RT pulsata in tempo reale, potesse essere aiutata dalla formazione di radicali liberi e molecole reattive direttamente tramite radiolisi o come risposta cellulare alle radiazioni, se prontamente rilevati. A causa della scala temporale (figura 16) in cui si formano e si ricombinano i radicali liberi radioindotti, la loro rilevazione da parte di metodi non invasivi è difficile nelle colture cellulari e ancor più negli organismi complessi. I radicali liberi persistenti generati da radiazioni ad alto tasso di dose possono essere misurati nelle cellule mediante: risonanza di spin elettronico o metodi spettroscopici in base ai quali gli effetti dell'irradiazione dei radicali liberi sulle biomolecole sono suscettibili *al monitoraggio in vivo* [38]. L'impianto concettuale di questo studio risultava però dipendere da un parametro che non poteva essere verificato in quel momento, ovvero: la compatibilità dei risultati anche con impulsi ultra brevi con elevato tasso di dose.

Siccome le sperimentazioni sull'effetto radiobiologico dei protoni *laser-driven* necessitavano di strutture tecnologiche adeguate, in contemporanea alla ricerca radiobiologica, si sono sviluppati dispositivi o metodi nuovi per la produzione di laser. A fine 2017, erano circa 10 le strutture, in tutto il mondo, che avevano interesse nell' accelerazione di particelle cariche. Un numero piccolissimo, rispetto alla situazione attuale, che sottolinea quanto pochi anni, possano essere intensi, dal punto di vista dell'innovazione [39].

Dall'esigenza di avere un nuovo sistema di somministrazione di dosi e di formazione del campo di irraggiamento, nacque, un progetto che includeva sistemi migliori di cattura del fascio e di selezione dell'energia, con un nuovo sistema di modellazione del fascio e di somministrazione delle dosi, il cosiddetto ELPIS (*broad-Energetic Large acceptance beam delivery via magnetic field shaPing Integrated with short-throw Scanning*) [40]. Il sistema ELPIS utilizzava campi magnetici, invece di retrodiffusori (*scatterers*) fisici, per ampliare lo spettro energetico dei fasci scansionandoli simultaneamente in direzioni successive, ma soprattutto prevedeva di ridurre di quattro volte le dimensioni dell'impianto, rispetto ai siti di PT convenzionale [40].

Ultimi, ma solo cronologicamente, non certo per rilevanza scientifica, sono i risultati ottenuti nell' estate 2020. Le sperimentazioni furono condotte, in questo caso, al *Dresden Laser Acceleration Source Draco* e consistevano nella progettazione e l'ottimizzazione di un fascio di protoni compatto, azionato da laser, basato su due lenti solenoidali ad alto campo pulsante e la sua implementazione presso l'impianto laser Draco, per studi di irradiazione controllati a dose di campioni biologici tridimensionali [41]. Ciò era incentrato su studi radiobiologici *in vivo*, attraverso l'irradiazione di strutture tumorali 3D con fasci di protoni ad alta dose e bassa energia. Con la traiettoria presentata, la generazione di distribuzioni di dosi SOPB volumetrici in un singolo colpo fu dimostrata per volumi target fino a  $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ , irradiati con una dose di circa 1 Gy per colpo. Il SOPB è prodotto mescolando più contributi energetici di protoni in un unico colpo, quindi sfruttando appieno l'ampio spettro energetico inerente al meccanismo TNSA, utilizzato per accelerare i protoni.

Il dispositivo fu installato in una delle aree di destinazione dell'impianto laser Draco a Helmholtz, Germania. Le sue principali caratteristiche di design sono presentate in Fig. 17. Utilizzando il fascio Petawatt di Draco su bersagli in plastica da 80 nm a 200 nm, i protoni accelerati tramite TNSA venivano poi trasportati dai componenti chiave del raggio: due solenoidi ad alto campo pulsati, progettati in modo identico: uno in prossimità del bersaglio laser installato nel vuoto (solenoido S1) e uno all'esterno della camera (solenoido S2).

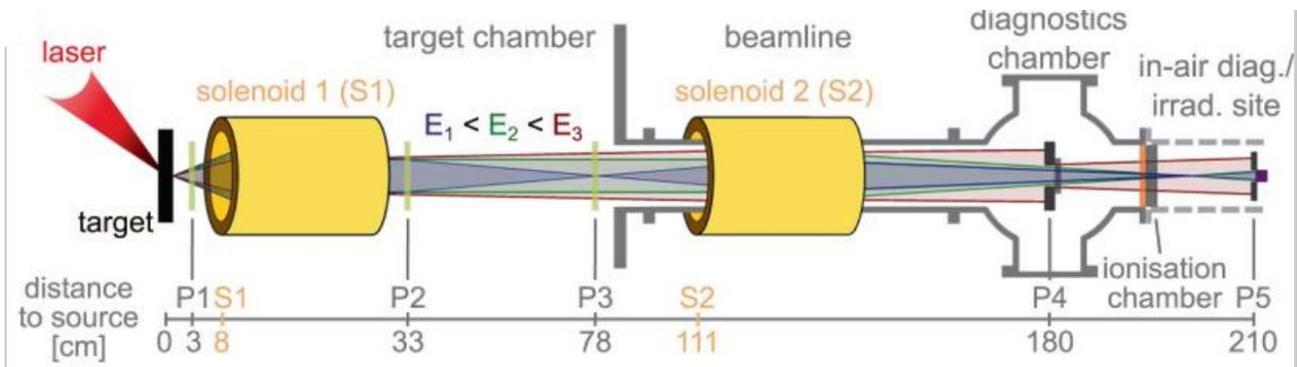


Figura 17- Dresden Laser Acceleration Source Draco

Più a valle si trovava una camera diagnostica dotata di una sottile camera di ionizzazione, di trasmissione per il monitoraggio della dose online, seguita da una finestra di Kapton da 25  $\mu\text{m}$  che fungeva da confine sottovuoto-aria. Il sito di irradiazione si trovava all'estremità dello strumento, dove era possibile installare e testare campioni radiobiologici. Nelle posizioni P1-5, potevano essere introdotti i rilevatori o elementi manipolatori del fascio (aperture, lamine di dispersione).

L'attuale configurazione del laser permette di avere protoni fino a 25 MeV, e, per come è progettata potrebbe anche arrivare a 70 MeV; sono quindi in corso delle opere di miglioria, ossia: aumentare la frequenza di ripetizione dell'impulso da realizzare tramite magneti solenoidali ad alto campo raffreddati (alimentati da driver di impulsi di corrente ad alta frequenza di ripetizione) ed il miglioramento degli spettri di origine per fornire più protoni di energia desiderata alla linea del fascio <sup>[41]</sup>. Come questo dispositivo, anche altre installazioni mirano a vincere le sfide sperimentali necessarie per una futura campagna di radiobiologia, in particolare: la movimentazione biologica dei campioni e l'implementazione del laser, l'accelerazione dei protoni azionata dal laser, la modellazione del fascio secondo le specifiche radiobiologiche, la dosimetria online e offline e l'analisi degli effetti di radiazione indotta. Tra i vari progetti in cantiere, particolare rilievo occupa il progetto ELIMAIA, di cui si tratterà nel seguente paragrafo.

## 3.2. Elimaia, il futuro dell'applicazione della tecnica di accelerazione laser-driven

Nel 2011 fu istituita una collaborazione tra l'INFN-LNS (Laboratorio di Fisica Nucleare, Catania, Italia) e l'ASCR-F-U (Istituto di Fisica dell'Accademia Ceca delle Scienze). L'obiettivo principale della collaborazione, denominata ELIMED (*ELI-Beamlines MEDical applications*), è dimostrare che i fasci ionici ad alta accelerazione ottica possono essere utilizzati per applicazioni multidisciplinari, tra cui il caso della terapia con adroni, la progettazione e l'assemblaggio di una linea di trasporto completa fornita con sezioni diagnostiche e dosimetriche che consentiranno anche ad utenti esterni, di applicare fasci ionici azionati al laser in campi multidisciplinari. Nel 2012, *ELI-Beamlines* (figura 18) ha iniziato la realizzazione dell'impianto laser, dedicando una delle sale sperimentali all'accelerazione degli ioni, inclusi protoni, tra cui, il dispositivo ELIMED. Nel 2014 è stato firmato un contratto triennale tra INFN-LNS ed *ELI-Beamlines* per sviluppare e realizzare la sezione ELIMAIA dedicata alla raccolta, al trasporto, alla diagnostica e alla dosimetria dell'accelerazione di ioni azionati dal laser. La realizzazione della linea ELIMED è stata ultimata nel maggio 2018, e nel luglio 2018 è stata installata presso



Figura 18- Struttura laser ELI-Beamlines

ELI-Beamlines a Praga. Tra i responsabili della prima misura dosimetrica e radiobiologica è prevista anche la presenza del Laboratorio di Biofisica dell'Università di Napoli Federico II, con l'apertura della linea agli utenti attesa nella seconda metà del 2021. ELI fornisce impulsi laser ultra-corti della durata dei femtosecondi (10-15 fs) e prestazioni fino a 10 PW. Ospita il laser più intenso al mondo, che dovrebbe portare innovazione in diverse aree scientifiche, sviluppando opportunità di ricerca interdisciplinare, tra cui nuove tecniche per la radioterapia.

Pertanto, il progetto ELIMED ha come scopo lo sviluppo della strumentazione, delle tecnologie e delle metodologie più avanzate per dosimetria e la radiobiologia al fine di sviluppare una struttura di adroterapia basata su raggi laser accelerati presso la struttura. Secondo lo stato dell'arte nell'accelerazione degli ioni a guida laser, le massime energie protoniche di diverse decine di MeV sono state dimostrate sperimentalmente con una resa relativamente elevata ( $10^{10}$  -  $10^{12}$  protoni/impulso) [41]. Tuttavia, i fasci ionici con accelerazione laser non sono ancora completamente maturi per alcune applicazioni in cui sono essenziali funzionalità aggiuntive, come bassa divergenza, larghezza di banda di energia ridotta, uniformità del profilo spaziale, stabilità del raggio. Le nuove tecnologie laser che saranno presto disponibili per la comunità scientifica, ad esempio i laser completamente pompati a diodi presso *ELI-Beamlines*, permetteranno di studiare nuovi regimi che sono molto promettenti in termini di uso futuro di fasci di ioni azionati al laser per varie applicazioni, anche data l'elevata stabilità prevista di questi sistemi laser. Per superare le sfide esistenti, le nuove tecnologie laser devono essere sfruttate, in particolare consentendo una potenza di picco (multi-Petawatt) e un alto tasso di ripetizione (fino a 10 Hz) che presto saranno disponibili presso *ELI-Beamlines (Doln, Bâe-any, Repubblica Ceca)*. Fino ad ora, la maggior parte degli esperimenti di accelerazione dei protoni tramite laser, è stata effettuata tramite TNSA (capitolo 2), la disponibilità di laser ad altissima intensità a *ELI-Beamlines* ( $>10^{22}$  W/cm<sup>2</sup>) consentirà di entrare in un nuovo regime di accelerazione ionico noto come *Radiation Pressure Acceleration (RPA)*. Infatti, la generazione di fasci di ioni relativistici ultra-corti ad alta densità è prevista nello schema chiamato "regime del pistone laser", dove la pressione di radiazione laser è dominante e l'energia laser viene trasformata in modo efficiente in energia ionica. L'accelerazione della pressione delle radiazioni è stata teoricamente prevista, quindi il programma di ricerca sull'accelerazione delle particelle da laser (RP3) a *ELI-Beamlines* mirerà anche a studiare le geometrie di accelerazione ionica in RPA, ancora sperimentalmente inesplorata.

Una visualizzazione 3D che mostra una tipica distribuzione della densità di ioni in tale regime è illustrata nella figura 19.

La linea di fascio ELIMAIA sarà servita principalmente, da un sistema laser unico, il primo sistema laser PW pompato a diodi e ad alta energia al mondo.

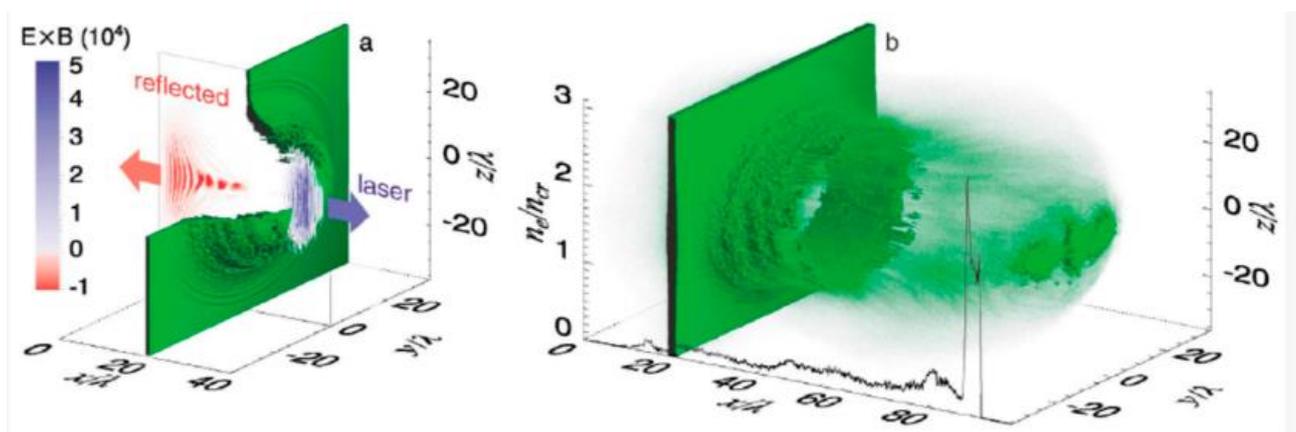


Figura 19- Simulazioni numeriche che mostrano una tipica distribuzione della densità ioni nel regime di accelerazione della pressione delle radiazioni (RPA)

Il laser è stato sviluppato presso il *Lawrence Livermore National Laboratory* (Livermore, CA, USA), con *ELI-Beamlines* che collabora allo sviluppo della diagnostica a impulsi brevi, dei controlli e alla fornitura del compressore a vuoto PW.

Il sistema, detto L4 10-PW con impulsi lunghi circa 130 fs, energia da 1,3 kJ e una velocità di tiro di 1/min, è previsto all'ELIMAIA, ma inizialmente limitato al suo fascio ausiliario di livello PW (150 J). L'architettura si basa sulla compressione diretta di un fascio a banda larga amplificato da una combinazione di diverse lastre di vetro. L4 è progettato per generare una potenza di picco estremamente elevata e senza precedenti, quindi sarà utilizzato a ELIMAIA per esplorare nuovi regimi di accelerazione (RPA-dominante) per esperimenti *proof-of-principle* poiché la velocità di ripetizione laser non sarà ideale per applicazioni utente sistematiche.

Tuttavia, oltre l'intensità, ci sono altri parametri del fascio, che sono di rilevanza e devono essere migliorati o controllati per applicazioni specifiche. Ad esempio, nei fasci di protoni TNSA, la loro divergenza è una preoccupazione per le applicazioni che richiedono il trasporto degli ioni verso un obiettivo secondario (esempio utente); gli spettri energetici TNSA sono normalmente ampi e quindi inadatti all'uso diretto in molti contesti applicativi. Inoltre, per la maggior parte delle applicazioni, compresa la terapia contro il cancro, il requisito di raggiungere energie sufficientemente elevate è accompagnato dalla necessità di avere un numero sufficientemente elevato di particelle nella gamma di energia in esame. Questi problemi motivano gli scienziati a cercare nuovi meccanismi di accelerazione degli ioni che sfruttano il potenziale sia dell'ingegneria del bersaglio avanzata, che degli effetti ottici non lineari-relativistici nei plasma. Tuttavia, la comprensione e l'attuazione sperimentale dei processi fondamentali che governano questi meccanismi sono ancora in fase di sviluppo. Come accennato in precedenza, l'RPA è considerato il meccanismo più promettente e sta attualmente attirando una notevole attenzione sperimentale e teorica a causa del previsto ridimensionamento superiore in termini di energia ionica ed efficienza di conversione degli ioni laser.

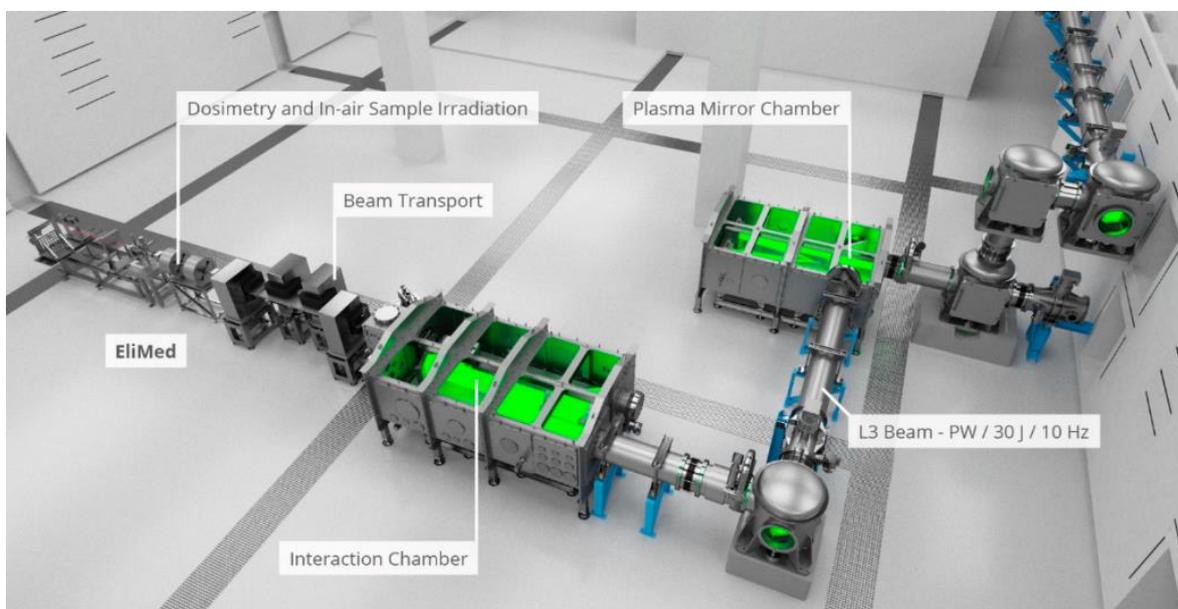


Figura 20- Un rendering 3D della linea di trave ELIMAIA (Ion Accelerator - ELIMED)

In questo contesto, lo schema noto come accelerazione *Light Sail* (LS), dove per una lamina sufficientemente sottile, l'intera area irradiata dal laser è staccata e spinta in avanti dalla pressione di radiazione laser, è particolarmente incoraggiante.

ELIMAIA (figura 20) sarà una delle principali fonti secondarie della struttura ELI-*Beamlines*. Le soluzioni tecnologiche e scientifiche proposte per l'attuazione di ELIMAIA sono il risultato di una complessa indagine condotta con l'obiettivo principale di soddisfare i requisiti specifici che provengono dalla comunità internazionale degli utenti. I principali requisiti utente identificati sono: ampia gamma di energia e flusso, piccola diffusione di energia (fasci quasi monoenergetici), distribuzione del fascio trasversale omogenea, stabilità *shot-to-shot* (energia e flusso), dimensione variabile dello spot del fascio, controllo completo del fascio (flusso e dose) con errore <5%, possibilità di irradiazione del campione in aria, uso di diverse specie di ioni. Il sistema ELIMAIA è costituito da due sottosistemi principali: l'acceleratore ionico e la sezione ELIMED e dosimetria, come si può vedere nella figura 21.

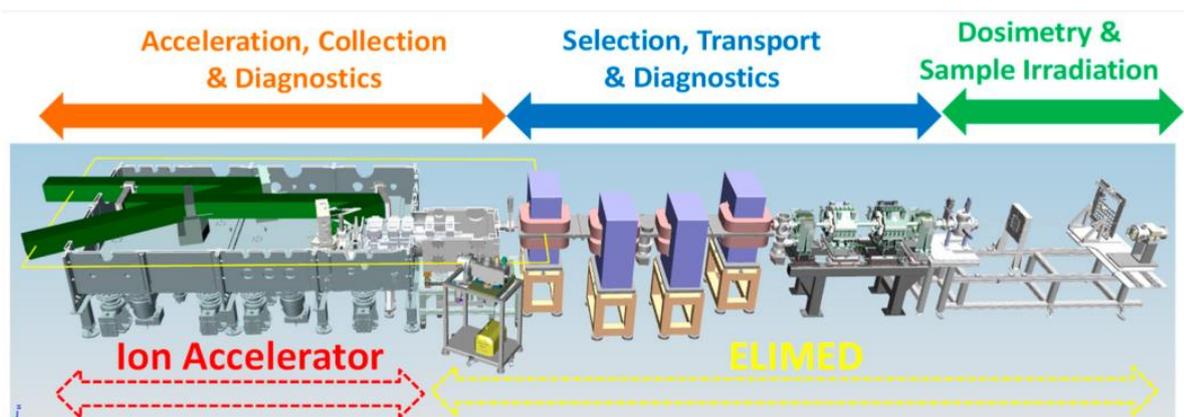


Figura 21- Le sezioni principali di ELIMAIA (Ion Accelerator e ELI MEDical applications (ELIMED))

Il primo sotto-sistema della linea di fascio ELIMAIA è lo "Ion Accelerator", che consiste in una camera a doppio specchio plasma (DPM, figura 22), una stazione di diagnostica laser locale e una camera di interazione.

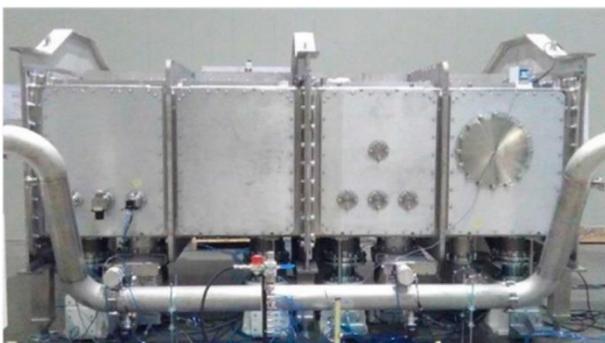


Figura 22- Camera a specchio

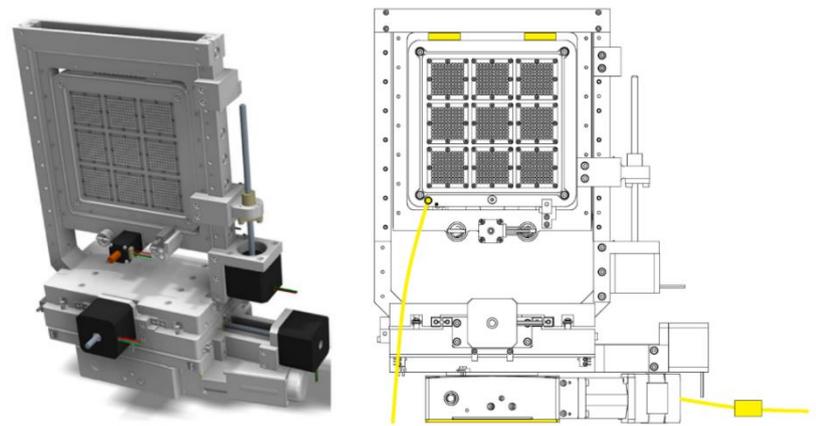


Figura 83- Rendering 3D della torre di destinazione ELIMAIA (a sinistra) e schizzo delle misure adottate contro potenziali danni elettromagnetici (EMP)(a destra).

Il sistema DPM consente di aumentare il contrasto laser sulla scala dei nanosecondi. Il fascio continua quindi la sua propagazione attraverso la sezione diagnostica laser in cui una serie di parametri laser di base (profilo spaziale ed energia) vengono monitorati in aria colpo per colpo. La durata dell'impulso laser, il fronte d'onda e il punto focale sono monitorati nel vuoto nella camera di interazione, dove una serie di specchi (tra cui uno specchio deformabile) e una parabola fuori asse sono anche posizionati per trasportare e mettere a fuoco il raggio laser fino a pochi micrometri sul bersaglio. Un sistema di consegna di destinazione (torre di destinazione traslazionale, figura 23) insieme al suo sistema di allineamento/monitoraggio viene utilizzato per ospitare obiettivi laminari di vario spessore e geometria a seconda delle esigenze dell'utente. Il fascio principale di protoni/ioni prodotto nel punto di interazione laser-bersaglio si propaga da sinistra a destra verso la sezione ELIMED.

La sezione di trasporto del fascio di ioni ELIMED è invece suddivisa in tre sotto-sistemi: collezioni di ioni, selezione dell'energia, modellazione del fascio. Il sistema di raccolta permette di mettere a fuoco il fascio di particelle accelerato nel punto di interazione laser-bersaglio e di fornire una selezione di energia approssimativa. È costituito da un insieme di cinque PMQ (*permanent magnet quadrupoles*) con alto gradiente di campo magnetico (100 T/m su un divario magnetico di 36 mm). Il sistema di raccolta è dotato di meccanica che permette di accordare l'ottica magnetica per diverse energie, migliorando così l'abbinamento con il sistema di selezione dell'energia. Ioni con una determinata gamma di energia sono concentrati al fine di posizionare la vita del fascio in corrispondenza del punto di selezione dell'energia nel piano radiale e di presentare un'apertura angolare ridotta sul piano trasversale. Questo è fondamentale per massimizzare l'efficienza del sistema di selezione dell'energia (ESS). Quest'ultimo è costituito da una doppia modalità di dispersione magnetica, a sua volta fatta di quattro dipoli elettromagnetici e una fessura di selezione impostata nel piano centrale. L'ESS ELIMED consente di selezionare gli intervalli di energia richiesti dagli utenti. È progettato per selezionare protoni con energie fino a 300 MeV e ioni più pesanti con energie fino a 60 MeV per nucleone. Il sistema di selezione dell'energia funziona su un'orbita di riferimento fissa, cioè il campo magnetico deve essere variato da 0,63 T fino a 1,22 T per coprire l'intera gamma di energia ionica prevista e la diffusione dell'energia dipende linearmente dalla dimensione dell'apertura della fessura. A valle della sezione di selezione dell'energia, il fascio ionico viene trasportato nella sezione finale di forma del fascio, costituito da due quadri di riferimento resistivi (pendenze fino a 10 T/m) e due sterzanti per una messa a fuoco fine e l'allineamento del fascio di ioni sul campione utilizzatore.

Diversi compiti devono essere soddisfatti prima delle applicazioni multidisciplinari dei raggi accelerati al laser, in particolare quelli medici. Infatti, al di là dei requisiti standard come la stabilità operativa dei colpi, è necessaria una caratterizzazione dosimetrica affidabile e precisa dei fasci di particelle con accelerazione laser. La caratteristica pulsata di tali fasci di particelle li rende significativamente diversi dai fasci accelerati in maniera standard in termini di durata del gruppo, corrente di picco e corrispondente dose di impulso. I fasci ionici con accelerazione laser sono tipicamente caratterizzati da: intensità molto elevate per impulso con una durata molto breve, tassi di dose estremamente elevati, ampi spettri di energia, rispetto ai tradizionali fasci di protoni clinici.

Queste caratteristiche specifiche degli ioni non consentono di utilizzare tassi di dose convenzionali, tipicamente impiegati e suggeriti nei protocolli internazionali per la dosimetria, principalmente a causa degli effetti di ricombinazione degli ioni. I dosimetri ELIMED sono stati progettati e realizzati per essere indipendenti dal tasso di dose, per funzionare in ambiente laser-plasma e per consentire misurazioni di dosimetria in tempo reale. In particolare, per la dosimetria relativa vengono utilizzati un monitor elettronico secondario e una camera di ionizzazione multi-gap (IC). Inoltre, è stata realizzata una coppa Faraday (FC) appositamente progettata per ridurre le incertezze nella carica raccolta per eseguire dosimetria assoluta nel punto di irradiazione del campione. Infine, alla fine della sezione in aria ELIMED viene installato un sistema di irradiazione campione (SIS) per consentire il posizionamento di vari campioni di utilizzatori, in particolare di campioni biologici, con una precisione inferiore ai mm. Uno schema della sezione ELIMED dosimetria e irradiazione campione è mostrato nella figura 24. Il rivelatore SEM, collocato in una piccola camera a vuoto dedicata, è costituito da una sottile lamina metallica il cui principio di funzionamento si basa sull'emissione di elettroni secondari.

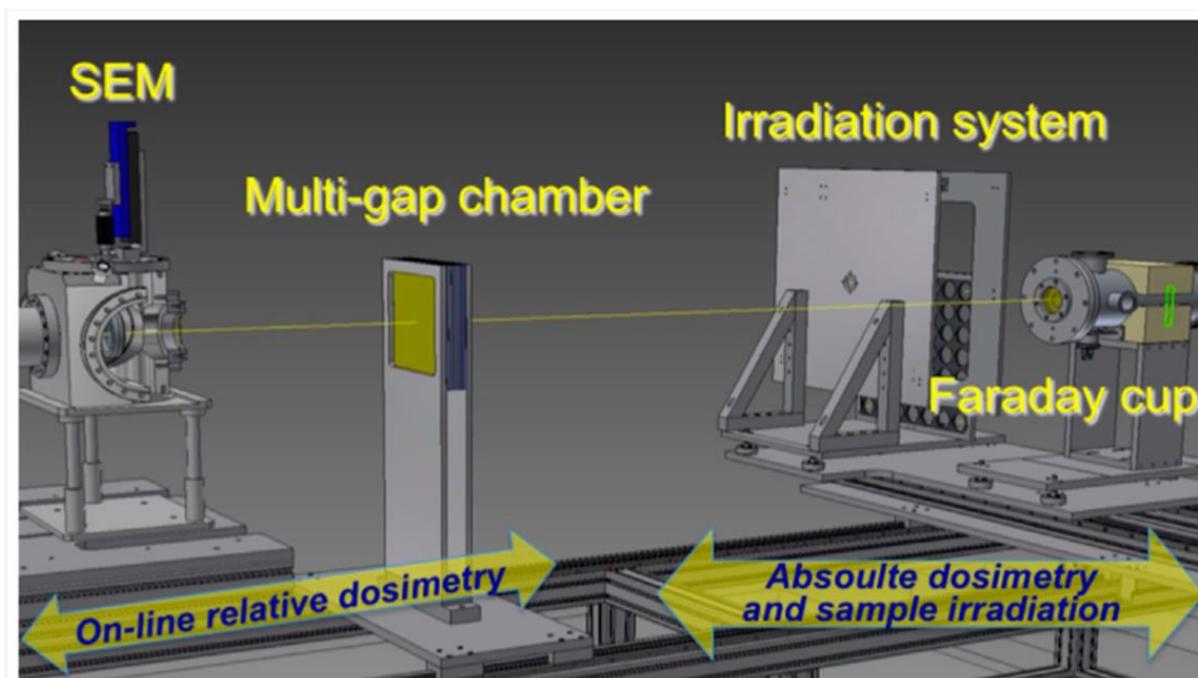


Figura 24- Schizzo della sezione di irradiazione ELIMED e del campione

L'IC multi-gap è un prototipo innovativo progettato per effettuare misurazioni non distruttive della dose somministrata sul campione utilizzato. La presenza di un secondo gap vicino al primo, permette di correggere gli effetti di ricombinazione degli ioni causati dal tasso di dose tipicamente ultra-alto dei fasci di ioni guidati dal laser. L'IC è destinato ad essere calibrato in modo incrociato rispetto al dosimetro assoluto FC. L'FC è stato progettato con cura e include un elettrodo aggiuntivo con una speciale forma geometrica per respingere ulteriormente gli elettroni secondari, aumentando così la precisione della carica misurata.

ELIMED è particolarmente interessata alle future applicazioni degli ioni a laser per l'adroterapia. Tuttavia, questa è solo una, delle potenziali applicazioni della linea ELIMAIA, che sarà aperta a diverse proposte da una comunità di utenti multidisciplinare.

Queste proposte saranno principalmente motivate dall'unicità delle sorgenti ioniche guidate dal laser, che con la loro durata di gruppo molto breve (nanosecondi o meno), sono di grande interesse per gli utenti <sup>[42]</sup>.

L'adroterapia laser ha un potenziale ad alto impatto sociale; tuttavia questa possibilità deve essere considerata come un obiettivo a lungo termine e, in questo scenario, gli approcci ottici sembrano essere i più promettenti. In tale prospettiva ELIMAIA consentirà di utilizzare fasci di protoni/ioni guidati da laser per la ricerca medica grazie all'affidabilità e all'accuratezza dei suoi dispositivi di trasporto del fascio di particelle e di monitoraggio della dose.

# Conclusioni

Il fine della tesi era di introdurre il concetto della protonterapia (PT) realizzata utilizzando fasci prodotti mediante accelerazione laser e discutere i vantaggi che presenta questa tecnica rispetto all'accelerazione convenzionale. Sono stati introdotti inizialmente, i concetti che sono alla base della radioterapia (RT) e spiegati con cura i processi fisici attraverso i quali le radiazioni ionizzanti (IR) agiscono sia dal punto di vista fisico che biologico. Le IR possono agire direttamente o indirettamente, causando danni alla catena di DNA; la gravità del danno è funzione delle caratteristiche fisiche di deposizione energetica su scala sia spaziale che temporale, in parte descritte dal parametro *Linear Energy Transfer* (LET). Al crescere di questo, e quindi della densità di eventi di ionizzazione lungo il percorso di una particella carica, aumenta il livello di clusterizzazione del danno e quindi diminuisce l'efficacia del processo di riparazione. In RT, per far in modo che i processi di riparazione vengano favoriti nelle cellule sane inevitabilmente esposte, a discapito di quelle tumorali, si applica il frazionamento della dose, grazie al quale, tra una dose e l'altra, i tessuti sani vengono risparmiati grazie alla riparazione dei danni subletali e al ripopolamento cellulare, poiché rispetto alle cellule tumorali sono più efficaci nei processi di riparazione.

Dal bisogno di una maggiore precisione balistica nella deposizione di dose al tumore, e quindi per risparmiare ulteriormente i tessuti sani e gli eventuali organi a rischio a ridosso del volume di trattamento, nasce la PT. Essa sfrutta la curva di Bragg, che descrive la deposizione energetica di particelle cariche accelerate, per cui il massimo rilascio di dose si verifica a fine range: il picco di Bragg. Facendo coincidere spazialmente questo, o meglio la convoluzione di più picchi ottenendo uno *Spread-Out Bragg Peak* (SOBP), che si conformi all'intero volume tumorale si ottimizza la cessione di energia al tumore risparmiando i tessuti sani. Dopo aver quindi discusso delle differenze che presenta la PT con la RT, si è arrivati all'evidenza che i costi troppo elevati di gestione di un impianto prototerapeutico non ne permettono la diffusione su scala ancora più ampia di quella attuale, che pure è in forte crescita nel mondo.

Per poter aggirare questi ostacoli, si è pensato ad un metodo di accelerazione tramite laser. L'accelerazione mediante laser prevede un'interazione laser-bersaglio che ha come effetto secondario l'accelerazione dei protoni. Questi meccanismi prevedono impulsi di intensità elevatissima e di durata molto breve; ad oggi le tecniche utilizzate sono due: la *chirped pulse amplification* (CPA) e la *target normal sheath acceleration* (TNSA). Poiché i *range* energetici e i ratei di dose associati a regimi altamente impulsati rappresentano una novità nei processi di accelerazione particellare, e soprattutto mai raggiunti prima, gli effetti biologici rappresentano una terra incognita al momento; soprattutto per le incertezze radiobiologiche, ma in realtà, ne esistono altre, quelle collegate al trasporto del fascio ed alla dosimetria. Di ciò si è discusso utilizzando alcuni risultati sperimentali che evidenziano la possibilità di indirizzare il fascio

attraverso l'utilizzo di campi magnetici e di ridurre l'incertezza legata alla somministrazione di dose dovuto al sistema IDOCIS che necessita di energie superiori a 6.5 MeV, per garantire un LET costante.

Se è vero che l'efficacia radiobiologica delle particelle accelerate mediante la tecnologia *laser-driven* necessita molti studi per verificare che essa sia se non migliore, almeno uguale, a quella riscontrabile con protoni accelerati convenzionalmente, interesse sta suscitando anche un effetto, al momento non direttamente correlato con la problematica *laser-driven* chiamato *FLASH effect*. Il *FLASH effect* si osserva nel caso di fotoni/elettroni accelerati convenzionalmente per tassi di dose per tassi di dose, superiori ai 40 Gy/s (quindi molto più elevati dei 10 Gy/min usati nella RT tradizionale ma di gran lunga inferiori ai ratei attesi per i laser ultra-intensi progettati per la PT, ossia  $10^9$  Gy/s). Questo fenomeno ha come effetto un'efficacia analoga a quella della RT convenzionale a livello del tumore, ma un minore impatto a livello dei danni al tessuto sano. Questo va quindi nella direzione di rafforzare l'impegno verso tecniche di accelerazione che consentirebbero ratei ancora più elevati come quelle *laser-driven*, resta ovviamente da capire se gli effetti benefici osservati per il tessuto sano con i ratei tipici della FLASH-RT, operata con tecniche di accelerazione convenzionali, valgono anche per i fasci *laser-driven*.

Ci si è quindi soffermati, sul progetto ELIMAIA (*ELI Multidisciplinary Applications of laser-Ion Acceleration*), linea installata presso ELI-Beamlines (*Extreme Light Infrastructure*) a Doln, Repubblica Ceca. Le prime misure sperimentali radiobiologiche presso tale linea, si prevedono per il 2021, con la una possibilità di utilizzo per gli utenti entro il 2022. Questi studi potrebbero avviare un ciclo virtuoso verso una più rapida ed ancora maggiore diffusione della PT dimostrandone la fattibilità con tecniche di accelerazione *laser-driven*. La relativa facilità di installazione ed il prezzo di gestione e montaggio più sostenibili per i centri sanitari rispetto ai ciclotroni o sincrotroni, potrebbero permettere di raggiungere tale obiettivo. Il futuro della lotta ai tumori passa quindi anche per Praga. Con l'auspicio di rendere più economica e quindi fruibile ad un numero sempre più vasto di pazienti la PT con i suoi vantaggi terapeutici.

## ***Bibliografia***

- [1] N. Kwan-Hoong. Non-Ionizing Radiations – Sources, Biological Effects, Emissions and Exposures (2003)
- [2] P.N. Goodwin et al. Physical Foundations of Radiology. 4th ed. New York, NY: Harper & Row; (1970).
- [3] B.R. Martin. Nuclear and Particle Physics, Wiley and Sons (2006)
- [4] W. Leo. Techniques for nuclear and particle physics experiment, Springer-Verlag (1994).
- [5] E. J. Hall and A. J. Giaccia. Radiobiology for the radiologist Eighth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer, (2019).
- [6] R. Withers. The Four R's of Radiotherapy, Advances in Radiation Biology, 5, 241-271, (1975).
- [7] J. Dai et al. Biological response of cancer cells to radiation treatment Rajamanickam Baskar, \*, Front Mol Biosci.; 1-24. (2014).
- [8] R. Huang and P. Zhou. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer/Signal Transduction and Targeted Therapy volume 5, Article number: 60 (2020).
- [9] M. M. Elkind and H. Sutton. X-Ray Damage and Recovery in Mammalian Cells in Culture Nature volume 184, pages1293-1295(1959).
- [10] T. Terasima and L.J. Tolmach Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. Nature.; 190:1210–1211, (1961).
- [11] T.T. Puck and P.I. Marcus. Action of X-rays on mammalian cells. J Exp Med.; 103:653–666(1956).
- [12] S. J. McMahon. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. Phys. Med. Biol. 64 01TR01 (24pp) (2019).
- [13] C. M. van Leeuwen et al. The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies, Radiation Oncology volume 13, Article number: 96 (2018).
- [14] M. Durante and J. S. Loeffler. Charged particles in radiation oncology. Nat Rev Clin Oncol. 7(1):37-43. (2010).
- [15] M. Cristofolini and M. Amichetti. Obiettivo Salute, Vol. 3La protonterapia: una nuova opportunità di cura e ricerca -LILT Trento (2015)
- [16] V. Verma et al. A systematic review of the cost and cost-effectiveness studies of proton radiotherapy, Cancer, Volume122, 1483-1501 (2016).
- [17] S. C Wilks et al. Energetic proton generation in ultra-intense laser-solid interactions. Phys. Plasmas (2001).

- [18] D. Strickland. and G. Mourou. Compression of amplified chirped optical pulses, *Opt. Commun*
- [19] T. Toncian et al. Ultrafast laser-driven microlens to focus and energy-select mega-electron volt protons. *Science (New York, N.Y.)* 312, 410–3
- [20] M. Murakami et al. Radiotherapy using a laser proton accelerator (April 2018).
- [21] S. Schell, J.J. Wilkens. Dosimetric effects of energy spectrum uncertainties in radiation therapy with laser-driven particle beams. *Phys Med Biol.* 2012;57(5): N47-N53.
- [22] K. Zeil et al. The scaling of proton energies in ultrashort pulse laser plasma acceleration. *N. J. Phys.* 12, 045015 (2010).
- [23] K. Zeil et al. Dose-controlled irradiation of cancer cells with laser-accelerated proton pulses. *Appl. Phys. B* 110, 437–444 (2013).
- [24] J. Bin et al. A laser-driven nanosecond proton source for radiobiological studies. *Applied Physics Letters* 101, 243701.
- [25] D. Doria et al. Biological effectiveness on live cells of laser driven protons at dose rates exceeding 109 Gy/s. *AIP Advances* 2, 011209.
- [26] L. Pommarel et al. Spectral and spatial shaping of a laser-produced ion beam for radiation-biology experiments. *Physical Review Accelerators and Beams* 20, 032801 (2017).
- [27] F. Fiorini et al. Dosimetry and spectral analysis of a radiobiological experiment using laser-driven proton beams. *Physics in Medicine & Biology* 56, 6969 (2011).
- [28] S. D. Kraft et al. Dose-dependent biological damage of tumour cells by laser-accelerated proton beams. *New Journal of Physics* 12, 101088/1367-2630/12/8/085003 (2010).
- [29] L. Manti et al. The radiobiology of laser-driven particle beams: focus on sub-lethal responses of normal human cells. *Journal of Instrumentation* 12, C03084 (2017).
- [30] S. Raschke et al. Ultra-short laser-accelerated proton pulses have similar DNA-damaging effectiveness but produce less immediate nitroxidative stress than conventional proton beams. *Scientific reports* 6, 32441.
- [31] A. Yogo et al. Measurement of relative biological effectiveness of protons in human cancer cells using a laser-driven quasimonoenergetic proton beamline. *Applied Physics Letters* 98, 053701.
- [32] A. Yogo et al. Application of laser-accelerated protons to the demonstration of DNA double-strand breaks in human cancer cells. *Applied Physics Letters* 94, 181502.
- [33] E. Bayart et al. Fast dose fractionation using ultra-short laser accelerated proton pulses can increase cancer cell mortality, which relies on functional PARP1 protein. *Sci Rep* 9, 10132 (2019).
- [34] V. Favaudon et al. Ultrahigh dose-rate flash irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 245ra93.

- [35] M.C. Vozenin et al. Biological Benefits of Ultra-high Dose Rate FLASH Radiotherapy: Sleeping Beauty Awoken. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*.;31(7):407-415 (2019 Jul).
- [36] M. Boerma et al. Effects of ionizing radiation on the heart, *Mutat. Res.* 770 (2016) 319.
- [37] Y. Yang et al. NIR-II Driven Plasmon-Enhanced Catalysis for a Timely Supply of Oxygen to Overcome Hypoxia-Induced Radiotherapy Tolerance. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019;58(42):15069-15075.
- [38] T. Asavei et al. Laser-driven radiation: Biomarkers for molecular imaging of high dose-rate effects. *Med Phys.* 2019;46(10): e726-e734.
- [39] L. Karsch et al. Towards ion beam therapy based on laser plasma accelerators. *Acta Oncol.* 2017;56(11):1359-1366.
- [40] U. Masood et al. A light-weight compact proton gantry design with a novel dose delivery system for broad-energetic laser-accelerated beams. *Phys Med Biol.* 2017;62(13):5531-5555.
- [41] F.E. Brack et al. Spectral and spatial shaping of laser-driven proton beams using a pulsed high-field magnet beamline [published correction appears in *Sci Rep.* 2020 Aug 4;10(1):13403]. *Sci Rep.* 2020;10(1):9118. Published 2020 Jun 4.
- [42] D. Margarone et al. ELIMAIA: A Laser-Driven Ion Accelerator for Multidisciplinary Applications. *Quantum Beam Sci.* 2018, 2, 8.



## *Ringraziamenti*

*Al mio relatore, il Professor Lorenzo Manti, che con infinita pazienza ed indispensabili consigli, mi ha guidato in questo mio ultimo sprint;*

*A Dasio, il mio motivatore personale;*

*A Nemesi, che è una piccola stella;*

*A mio Padre, vicino anche se lontano;*

*A Francesca, perché fin qui ci siamo arrivati per mano;*

*A Zio Giovanni e al Nonno Nicola, che da lassù mi sorridono;*

*A Nunzio, Alessio, Antonio, Michele, Giovanni, Raffaele, Francesco e Biagio, sui quali so di poter sempre contare;*

*Alla Prof Maione e alla Prof Angiero, perché hanno visto in me qualcosa di bello;*

*All' AC, che attraverso tutte le esperienze fatte in questi 3 anni e gli amici che mi accompagnano quotidianamente, mi ha reso la persona che sono;*

*Alla forza di gravità che mi tiene coi piedi per terra e alla forza di volontà che invece, mi porta verso l'alto;*

*A te che stai leggendo, perché sei qui a condividere la mia gioia;*