

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”



Laurea Magistrale in Neurobiologia

Studio radiobiologico *in-vitro* sull'efficacia della Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) per il glioblastoma multiforme: misura della sopravvivenza cellulare in funzione della dose

Relatore:

Prof. Marco Peviani

Correlatori:

Prof.ssa Silva Bortolussi

Dott.ssa Cinzia Ferrari

Tesi Sperimentale di:

Marco Crepaldi

Pavia, Anno Accademico 2020/2021

Indice

Abstract	<i>p. 1</i>
Introduzione	<i>p. 3</i>
1. Cenni di radiobiologia e grandezze dosimetriche	<i>p. 5</i>
1.1 Classificazione e proprietà fisiche delle radiazioni ionizzanti	<i>p. 5</i>
1.2 Grandezze dosimetriche	<i>p. 5</i>
1.3 Effetti biologici delle radiazioni	<i>p. 9</i>
2. Terapia di cattura neutronica del boro (BNCT)	<i>p. 13</i>
2.1 Principio fisico della terapia	<i>p. 13</i>
2.2 Applicazioni cliniche della BNCT	<i>p. 15</i>
2.3 BNCT: cenni storici	<i>p. 17</i>
2.4 BNCT a Pavia: il progetto TAOOrMINA	<i>p. 18</i>
3. Fasci di neutroni	<i>p. 19</i>
3.1 Energia del fascio neutronico	<i>p. 19</i>
3.2 Sorgenti di neutroni: reattori nucleari di ricerca e acceleratori di particelle	<i>p. 20</i>
4. Boro e composti borati	<i>p. 21</i>
4.1 Composti per la biodistribuzione selettiva di ^{10}B	<i>p. 21</i>
4.2 Misura della concentrazione di ^{10}B in campioni biologici	<i>p. 27</i>
4.3 Autoradiografia neutronica	<i>p. 27</i>
5. BNCT e glioblastoma multiforme (GBM)	<i>p. 29</i>
5.1 Glioblastoma multiforme	<i>p. 29</i>
5.2 BNCT come terapia per il glioblastoma multiforme: studi clinici	<i>p. 30</i>
6. Dosimetria della BNCT	<i>p. 33</i>

Scopo del lavoro	<i>p. 39</i>
Materiali e metodi	<i>p. 41</i>
1. Disegno sperimentale	<i>p. 42</i>
2. Linea cellulare di glioblastoma multiforme umano: U87MG	<i>p. 45</i>
2.1 Crescita bimodale delle cellule U87MG	<i>p. 45</i>
2.2 Linea cellulare U87MG: metodo di coltura e sub-coltura	<i>p. 45</i>
3. Assorbimento intracellulare di ^{10}B e sua quantificazione	<i>p. 46</i>
3.1 Preparazione della soluzione f- ^{10}BPA	<i>p. 46</i>
3.2 Somministrazione di f- ^{10}BPA alle cellule U87	<i>p. 46</i>
3.3 Valutazione della citotossicità di f- ^{10}BPA	<i>p. 47</i>
3.4 Valutazione dell'assorbimento di ^{10}B : autoradiografia neutronica	<i>p. 47</i>
3.4.1 Preparazione di campioni biologici su supporti di Mylar	<i>p. 48</i>
3.4.2 Protocollo di irraggiamento per l'autoradiografia neutronica	<i>p. 49</i>
3.4.3 Autoradiografia neutronica qualitativa	<i>p. 52</i>
3.4.4 Autoradiografia neutronica quantitativa	<i>p. 53</i>
4. Irraggiamento neutronico per la misura della sopravvivenza cellulare	<i>p. 55</i>
4.1 Sorgente di neutroni	<i>p. 55</i>
4.2 Protocollo di irraggiamento	<i>p. 56</i>
5. Irraggiamento con raggi X	<i>p. 57</i>
5.1 Sorgente di fotoni	<i>p. 57</i>
5.2 Protocollo di irraggiamento	<i>p. 58</i>
6. Test per valutare la sopravvivenza ai trattamenti radianti	<i>p. 59</i>
7. Calcolo della dose somministrata alle cellule	<i>p. 61</i>

Risultati e discussione	<i>p. 63</i>
1. Osservazione sulla linea cellulare U87	<i>p. 64</i>
2. Studio dell'assorbimento intracellulare del ^{10}B	<i>p. 65</i>
2.1 Dati sulla citotossicità di f- ^{10}BPA (80 ppm, 4 ore): test di clonogenicità	<i>p. 65</i>
2.2 Quantificazione dell'uptake di ^{10}B da parte della linea cellulare	<i>p. 66</i>
3. Studio della sopravvivenza a trattamenti radianti	<i>p. 69</i>
3.1 Sopravvivenza cellulare: irraggiamento neutronico e BNCT	<i>p. 69</i>
3.2 Sopravvivenza cellulare: irraggiamento con raggi X	<i>p. 72</i>
4. Curve dose-sopravvivenza	<i>p. 73</i>
Prospettive future	<i>p. 78</i>
Bibliografia	<i>p. 80</i>

Abstract

Lo studio oggetto di questa tesi si prefigge di verificare e quantificare la radiosensibilità della linea cellulare di glioblastoma umano U87MG in seguito all'esposizione a diversi trattamenti radioterapici: raggi X, neutroni e Boron Neutron Capture Therapy (BNCT), confrontandone le rispettive curve dose-sopravvivenza.

La BNCT è una radioterapia adronica binaria, altamente selettiva, che sfrutta la dose di radiazione rilasciata in seguito alla reazione di cattura neutronica da parte dell'isotopo ^{10}B del boro. Tale reazione nucleare ha alta probabilità di avvenire per neutroni di bassa energia, ed emette particelle cariche ad alta efficacia biologica. Lo studio è inserito in un progetto di ricerca preclinico più ampio, volto a verificare l'efficacia e l'applicabilità della BNCT per il trattamento del glioblastoma multiforme.

La ricerca *in vitro* è essenziale per gli studi radiobiologici sulla efficacia della terapia, per la valutazione della captazione dei composti borati da parte delle diverse cellule tumorali e per esprimere la dose da campo misto della BNCT in unità fotone-equivalente. Le curve dose-risposta vengono infatti impiegate per calcolare i fattori RBE o CBE (Efficacia Biologica del Composto), facendo riferimento, in questo caso, al fattore specifico per la componente di dose da boro. Questo è un passaggio cruciale per poter effettuare il calcolo della *dose equivalente*, allo scopo di confrontare la dose fornita dalla BNCT con la dose assorbita in seguito a radioterapia convenzionale.

La BNCT si basa sulla biodistribuzione selettiva e preferenziale di ^{10}B , ottenuta con opportuni farmaci, capaci di concentrarsi preferenzialmente nelle cellule tumorali, in modo che l'irraggiamento con neutroni fornisca un vantaggio terapeutico e una sostanziale salvaguardia del tessuto sano. Potenzialmente, è quindi possibile somministrare elevate dosi di radiazione in modo selettivo alle cellule tumorali, anche se si trovano infiltrate nel tessuto sano, o adiacenti a tessuti radiosensibili o disseminate in interi organi. Tale selettività è anche basata sul fatto che i prodotti della reazione di cattura sono poco penetranti, e depositano la loro energia in circa $10\ \mu\text{m}$ nei tessuti biologici. Pertanto, questi prodotti di reazione rilasciano tutta l'energia all'interno della cellula dove avviene la cattura neutronica da parte del ^{10}B senza danneggiare le cellule circostanti potenzialmente sane.

Il protocollo sperimentale seguito in questa tesi prevede 4 fondamentali fasi di lavoro:

1. Somministrazione del farmaco borato f-¹⁰BPA alla linea cellulare di glioblastoma multiforme umano e valutazione della citotossicità del composto. La tossicità viene valutata tramite un test di efficienza di piastramento (EP %).
2. Valutazione e quantificazione dell'uptake di ¹⁰B da parte della linea cellulare tramite autoradiografia neutronica quantitativa. Lo scopo di questa analisi è quello di verificare se le cellule U87 hanno assorbito in maniera uniforme la minima concentrazione di boro necessaria perché la BNCT risulti efficace (20-25 µg/g).
3. Protocollo di irraggiamento neutronico. Le cellule arricchite in ¹⁰BPA e le cellule di controllo vengono sottoposte ad irraggiamento neutronico a diverse potenze. Successivamente viene applicato un test di clonogenicità per quantificare la sopravvivenza cellulare in seguito all'assorbimento di diverse dosi di radiazione.
4. Protocollo di irraggiamento con raggi X e applicazione del medesimo test di clonogenicità.

L'analisi dei dati consiste nella costruzione di curve di sopravvivenza in funzione della dose assorbita, calcolata in base a calcoli di Monte Carlo e tenendo in considerazione la concentrazione del boro misurata (punto 2). Le curve sono poi fittate con un opportuno modello radiobiologico per ottenere i parametri necessari al calcolo dell'efficienza biologica. I risultati ottenuti permettono di concludere che:

- la somministrazione di f-¹⁰BPA non presenta alcun tipo di citotossicità sulla linea cellulare U87;
- le cellule sottoposte al trattamento f-¹⁰BPA, 80 ppm per 4 ore sono in grado di trattenere una concentrazione sufficiente di ¹⁰B (> 20 ppm);
- le curve dose-sopravvivenza, costruite in seguito ai protocolli di irraggiamento dimostrano che, a parità di dose assorbita, la BNCT risulta estremamente più efficiente rispetto al trattamento con raggi X ed al trattamento con neutroni, come dimostrano i valori ottenuti di RBE e CBE.

Introduzione

Questa tesi si inserisce nell'ambito della ricerca sulla Boron Neutron Capture Therapy (BNCT), una forma di radioterapia oncologica che richiede l'irraggiamento dei tessuti con un fascio neutronico. Lo scopo della tesi è studiare la sopravvivenza del glioblastoma multiforme in funzione della dose assorbita per valutare l'efficacia della terapia per questo tumore. Questo primo capitolo introduce dei concetti base per comprendere la dosimetria e la radiobiologia e poter quindi spiegare la rilevanza dello studio sperimentale condotto nel contesto più ampio della ricerca sulla (BNCT). In particolare, verranno illustrate le basi fisiche delle radiazioni ionizzanti, le interazioni tra le radiazioni ionizzanti e i materiali biologici e le fondamentali grandezze dosimetriche.

1. Cenni di radiobiologia e grandezze dosimetriche

1.1 Classificazione e proprietà fisiche delle radiazioni ionizzanti

Con il termine ionizzante si definisce una radiazione la cui energia sia sufficiente a produrre l'espulsione di uno o più elettroni dal sistema atomico-molecolare incontrato lungo il suo percorso. Se l'energia depositata è inferiore alla soglia caratteristica del mezzo attraversato, si possono verificare delle eccitazioni: un elettrone di valenza passa da uno stato fondamentale stabile ad uno stato eccitato instabile. L'energia tipica associata alla ionizzazione di un materiale biologico è dell'ordine di 10 eV. Si possono dunque classificare le radiazioni con energia superiore a 10 eV come radiazioni ionizzanti e le radiazioni con energia inferiore a 10 eV come non ionizzanti.

La radiazione ionizzante (con energia superiore a 10 eV) può essere carica o neutra. Tale dualità determina i meccanismi con cui avviene il trasferimento di energia nella materia: ovvero per ionizzazione diretta o indiretta. Le radiazioni ionizzanti si possono, pertanto, dividere in due categorie fondamentali: radiazioni ionizzanti cariche, direttamente ionizzanti (ad esempio α , β^- e β^+) e radiazioni ionizzanti neutre, indirettamente ionizzanti (neutroni, raggi γ , raggi X).

1.2 Grandezze dosimetriche

Dal punto di vista dell'interazione con la materia vivente, diverse radiazioni differiscono nella loro efficacia, cioè nella capacità di causare danno ad un sistema biologico. L'entità ed il tipo di effetto biologico dipendono da molti fattori, tra cui la dose di radiazione e la distribuzione spaziale della dose. In ogni caso, l'entità del danno dovuto alla ionizzazione dipende essenzialmente dalla cessione di energia della particella al mezzo attraversato.

La grandezza fisica che quantifica il deposito di energia di una radiazione è la dose assorbita (D), definita come il rapporto tra l'energia media ε assorbita e la massa m interessata.

$$D = \frac{\varepsilon}{m}$$

Da cui si ricava l'unità di misura della dose che, nel sistema internazionale è il *Gray* (Gy).

$$Gy = \frac{J}{kg}$$

Il concetto di dose (D) non è sufficiente per valutare l'effetto biologico poiché quest'ultimo dipende strettamente dalla distribuzione spaziale dei processi di ionizzazione lungo il percorso della radiazione. Infatti, oltre all'energia depositata in sé, per prevedere le conseguenze indotte nella materia, è essenziale studiare e conoscere anche la struttura della traccia di radiazione: da ciò dipenderà la maggiore o minore probabilità che le specie molecolari eccitate possano interagire tra loro producendo le alterazioni riscontrabili nella materia vivente in seguito ad irraggiamento. Una radiazione che incide su un tessuto provoca la ionizzazione degli atomi e delle molecole con conseguente emissione di elettroni, i quali, a loro volta, cedono energia al tessuto circostante.

La quantità di energia ceduta mediamente (dE) per ogni micrometro di tessuto attraversato (dl) rappresenta il *Linear Energy Transfert* (LET).

$$LET = \frac{dE}{dl}$$

Da cui si ricava l'unità di misura del LET che, nel sistema internazionale è: $keV/\mu m$

La perdita di energia delle particelle è direttamente proporzionale al quadrato della carica e inversamente proporzionale al quadrato della velocità. Date tali considerazioni, le radiazioni possono essere classificate in due grandi categorie in funzione di LET : radiazioni a medio e alto LET come protoni, particelle α e neutroni, oppure radiazioni a basso LET come i raggi X, radiazioni γ ed elettroni veloci. Poiché l'effetto biologico di una radiazione dipende dalla densità di ionizzazione e dalla loro distribuzione lungo il percorso, le particelle con elevato LET sono più dannose, per unità di dose, rispetto a quelle a basso LET .

Il diverso effetto biologico prodotto a parità di dose da radiazioni diverse viene misurato attraverso l'*Efficacia Biologica Relativa* (RBE) definita come segue:

$$RBE = \frac{D_{rif}}{D_t}$$

Dove D_{rif} è la dose depositata dalla radiazione di riferimento (Raggi X o radiazioni γ) per ottenere un dato effetto e D_t rappresenta la dose necessaria per ottenere lo stesso effetto con la radiazione da caratterizzare. Ad esempio, nel caso di studi di radiobiologia *in vitro*, in cui si misura la sopravvivenza delle cellule in funzione della dose, si fissa un valore della sopravvivenza S e l' RBE è il rapporto tra la dose della radiazione di riferimento e la dose dovuta alla radiazione di interesse che causano quel valore di sopravvivenza (**figura 1.1**). Come si vede in **figura 1.2**, RBE dipende dall'endpoint scelto (in questo caso, il valore della sopravvivenza prefissato S).

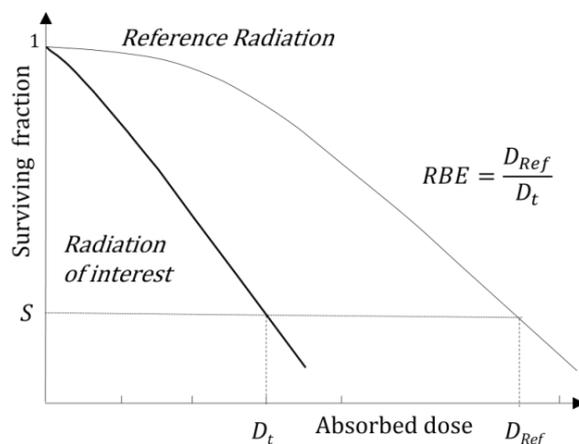


Figura 1.1 Calcolo di *RBE* date due curve di sopravvivenza cellulare ottenute tramite irraggiamento con una radiazione di riferimento e con la radiazione di interesse.

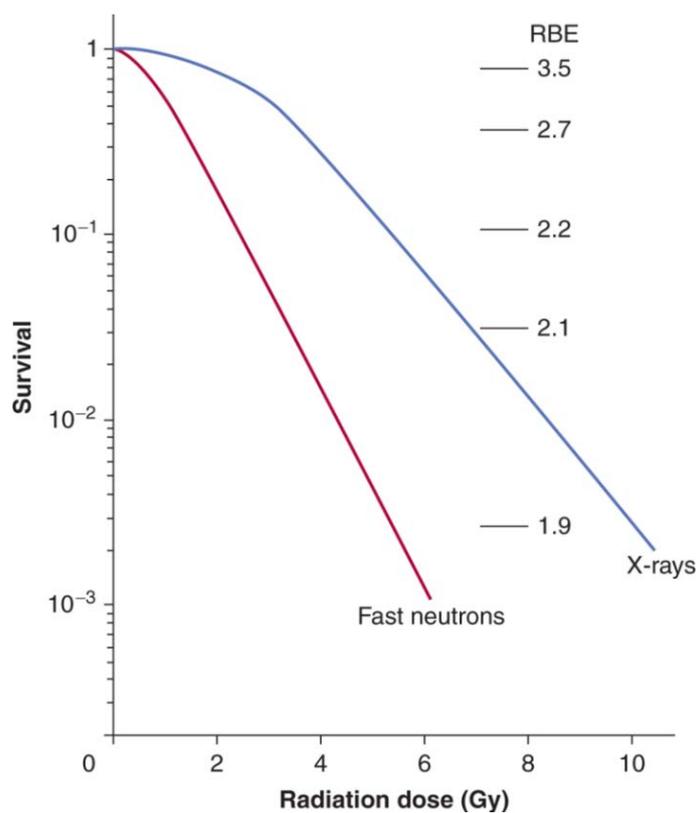


Figura 1.2 Confronto delle curve di sopravvivenza di cellule esposte a radiazioni a basso *LET* (raggi X) e ad alto *LET* (neutroni veloci). I valori *RBE* diminuiscono all'aumentare della dose e del danno biologico con conseguente riduzione della percentuale di sopravvivenza (Tannock I. et al., 2013).

Estremamente significativa è la relazione che sussiste tra *RBE* e *LET*. In **figura 1.3** è riportato l'andamento delle curve di *RBE* in funzione di *LET*. Si osserva che *RBE* inizia a crescere per *LET* inferiori a 10 keV/μm, aumentando la pendenza tra 10 e 100 keV. Ciò è conseguenza del fatto che tanto più numerosi sono gli urti ravvicinati tra loro, maggiore è la possibilità di colpire un bersaglio di piccole dimensioni; raggiunto il valore massimo però, la curva decresce per effetto *overkill*, poiché il numero sempre maggiore di urti interessa ormai bersagli già colpiti in precedenza.

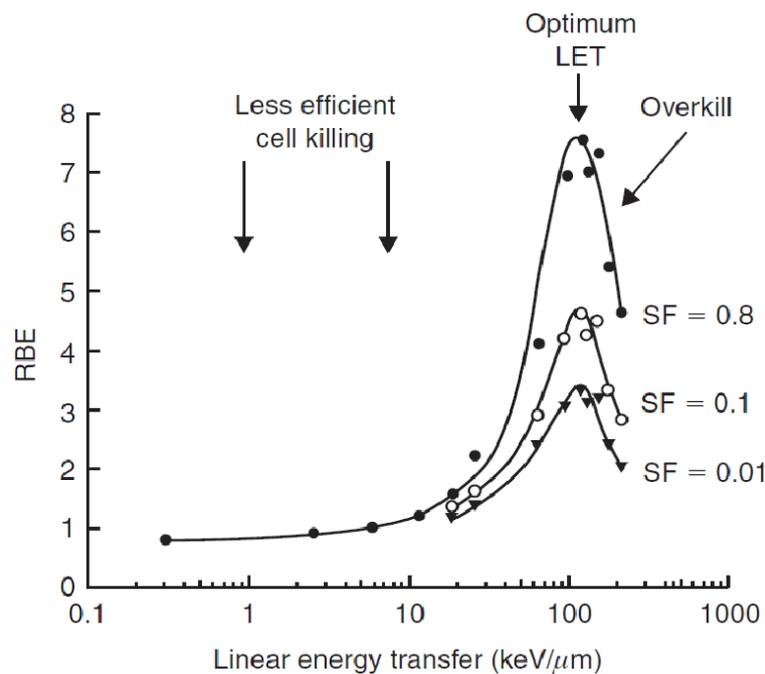


Figura 1.3 Andamento delle curve di *RBE* in funzione del *LET* al variare della sopravvivenza (Søbstad, JM., 2017). Le tre curve si riferiscono a un *RBE* corrispondente a tre diversi effetti biologici: sopravvivenza cellulare pari a 0.8, 0.1 e 0.01%. Si nota che *RBE* aumenta fino a un *LET* di circa 100 keV/μm e poi decresce. Per *LET* più alti si osserva il fenomeno dell'*overkill*: un ulteriore aumento non può provocare effetti più gravi (le cellule sono già morte).

1.3 Effetti biologici delle radiazioni

L'energia di un fascio di radiazioni, interagendo con la materia vivente, provoca degli effetti che si manifestano come un danno biologico. Esso può verificarsi attraverso un duplice meccanismo, schematizzato nella **figura 1.4**:

- danno diretto: quando la radiazione ionizza e/o eccita direttamente le macromolecole cellulari, causando una rottura dei legami covalenti;
- danno indiretto: in cui il danno a carico delle macromolecole è dovuto a radicali liberi prodotti dall'azione delle radiazioni sulla componente molecolare maggiormente rappresentata nell'organismo: l'acqua. I radicali liberi sono specie altamente reattive prodotte dal metabolismo dell'ossigeno, capaci di danneggiare le componenti cellulari. A causa dello squilibrio elettrolitico nella loro struttura, i radicali liberi interagiscono con le molecole della cellula fino a quando non riacquistano una configurazione elettronica stabile. Sono causa di lesioni a carico delle membrane cellulari (rilascio di enzimi, alterazioni della permeabilità di membrana) e degli organuli citoplasmatici (mitocondri, ribosomi).

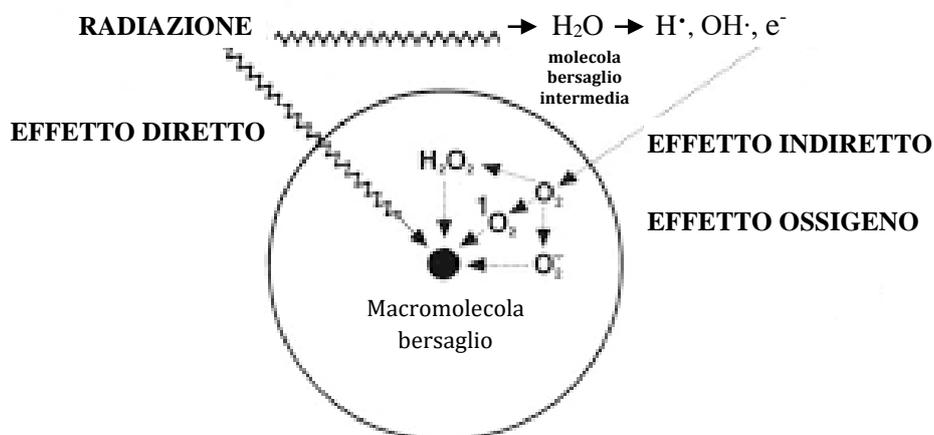


Figura 1.4 Effetti delle radiazioni ionizzanti sulla cellula. Azione diretta ed indiretta con formazione di radicali perossidi e perossido di idrogeno.

Dal punto di vista biologico non ha grande importanza se la molecola critica è danneggiata in modo diretto o indiretto. Tuttavia, nel caso della radioterapia convenzionale, che sfrutta radiazioni a basso *LET* (fotoni), è probabile che la maggior parte del danno avvenga per azione indiretta, in quanto le cellule e i tessuti sono composti dal 70-90% da acqua.

Inoltre, quando si tratta un tessuto con alto grado di ipossia, come un tessuto neoplastico, con radioterapia convenzionale (come ad esempio raggi γ), bisogna considerare che il danno indiretto provocato dalla radiazione risulta inferiore rispetto a quello provocato dalla stessa radiazione su tessuti non ipossici. Questa caratteristica conferisce radio-resistenza a molti dei tumori trattati con radioterapia convenzionale a causa dell'effetto descritto nel prossimo paragrafo.

EFFETTO OSSIGENO

Gli effetti biologici delle radiazioni sono influenzati dalla presenza dell'ossigeno e questa proprietà è conosciuta come *effetto ossigeno*. In sua presenza, infatti, tutti i sistemi biologici sono più sensibili alle radiazioni di quanto non avvenga quando l'irraggiamento è effettuato in condizioni di ipossia o di anossia. L'ossigeno modifica l'entità quantitativa del danno da radiazioni senza alterarlo qualitativamente, limitandosi a diminuire la dose necessaria ad indurre un determinato effetto. Tale grado di sensibilizzazione del tessuto, alla radiazione di riferimento, è dato dal rapporto di potenziamento da ossigeno (*OER*, Oxygen Enhancement Ratio).

Il rapporto fra la dose richiesta per ottenere lo stesso effetto biologico in assenza e in presenza di ossigeno è definito:

$$OER = \frac{D_{ipo}}{D_{O_2}}$$

Dove D_{ipo} è la dose necessaria ad indurre un danno in condizioni di scarsa ossigenazione, mentre D_{O_2} rappresenta la dose richiesta per determinare lo stesso effetto in presenza di ossigeno. Un fattore *OER* alto indica che l'ossigeno modifica la radiosensibilità del tessuto, aumentandola; invece, un *OER* circa unitario è tipico di quei tessuti che, nella loro risposta alle radiazioni, sono indifferenti alla condizione di ossigenazione.

Si ritiene che la sensibilizzazione da ossigeno sia dovuta ad un potenziamento degli effetti indiretti generati dalla reazione dell'ossigeno con i radicali liberi formati nella molecola bersaglio. Per generare questo effetto è necessario che l'ossigeno sia presente nella cellula al momento dell'irraggiamento o entro pochi millisecondi da questo, data la breve vita dei radicali liberi (fase chimica) (Micheal BD. et al., 1973).

È interessante notare, così come osservato per *RBE*, che anche in questo caso esiste una dipendenza dell'*OER* dal *LET*. Tale relazione è descritta nella **figura 1.5**: per bassi valori di *LET* (sotto i 10 keV/μm) l'*OER* è molto importante e raggiunge valori pari a 2,5 – 3. Con l'aumentare del *LET* (intorno a 100 keV/ μm) si assiste ad una diminuzione dell'*OER* che si avvicina all'unità, dimostrando come cellule ipossiche e cellule ossigenate vengano danneggiate con quasi eguale efficacia quando trattate con radiazioni ad alto *LET*.

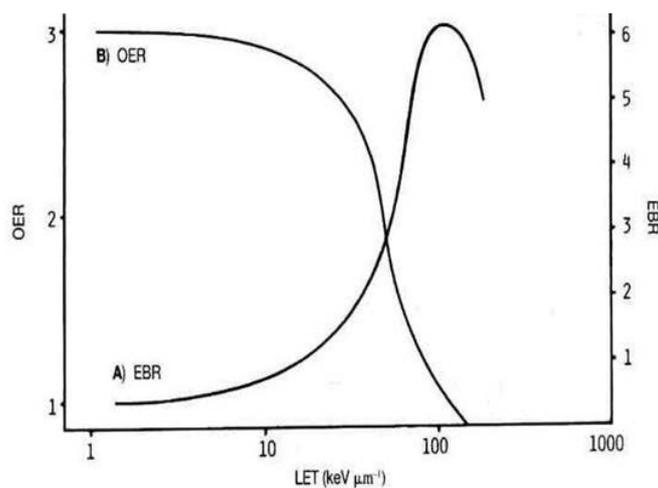


Figura 1.5 Relazione tra il trasferimento lineare di energia della radiazione (*LET*) e **A**) la sua efficacia biologica relativa (*RBE*) e **B**) il rapporto di potenziamento di ossigeno (*OER*).

Generalmente l'apporto ematico fornisce sufficiente ossigeno ai tessuti normali da renderli radiosensibili, mentre la maggior parte dei tumori contengono zone ipossiche e pertanto radioresistenti. Questa differenza nella radiosensibilità indica che una determinata radiazione a basso *LET* danneggia le cellule sane con probabilità maggiore di quanto non avvenga per le cellule neoplastiche. Per questo motivo sono stati sperimentati diversi metodi per trattare l'ipossia delle cellule tumorali ed è diventato sempre più diffuso l'impiego di radiazioni ad alto *LET* nei trattamenti radianti.

Il processo di produzione del danno ai tessuti biologici a causa della radiazione passa essenzialmente attraverso i successivi stadi:

1. *Fase fisica*: interazione delle particelle con gli orbitali elettronici e conseguenti processi di ionizzazione ed eccitazione. Tali processi si compiono in tempi estremamente brevi, da 10^{-24} a 10^{-14} s.
2. *Fase chimica*: i processi di ionizzazione ed eccitazione portano ad una rottura dei legami chimici con formazione di radicali liberi che interagiscono con altre molecole e componenti cellulari in seguito ad una serie di rapide reazioni chimiche. Questi processi si completano in pochi *ms* dopo l'esposizione alla radiazione.
3. *Fase biologica*: include tutti i successivi processi che interessano le macromolecole, in particolare il DNA, causando alterazioni cellulari e tissutali. Possono manifestarsi in tempi estremamente variabili: poche ore, mesi o decine di anni.

La **tabella I** riporta la scala temporale degli eventi indotti dalle radiazioni ionizzanti sui materiali biologici.

FASE	EVENTO	INTERVALLO DI TEMPO
Fase fisica		
	Interazione tra materia e radiazione direttamente ionizzante	$10^{-16} - 10^{-14}$ s
	Interazione tra materia e radiazione indirettamente ionizzante	$10^{-24} - 10^{-14}$ s
Fase chimica		
	Ionizzazione delle strutture molecolari	$10^{-12} - 10^{-8}$ s
	Comparsa di molecole eccitate, radicali liberi e conseguenti reazioni	10^{-7} s - ore
Fase biologica		
	Danni a proteine ed acidi nucleici; reazioni enzimatiche e di riparazione	10^{-3} s - ore
	Effetti biologici precoci: morte cellulare, dermatiti ecc.	ore - settimane
	Effetti biologici tardivi: mutazioni genetiche, induzione di neoplasie ecc.	anni - secoli

Tabella I Scala temporale degli eventi indotti sui materiali biologici in seguito al trattamento con radiazioni ionizzanti.

2. Terapia di cattura neutronica del boro (BNCT)

La Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) è una radioterapia adronica binaria, altamente selettiva, che può rappresentare una risorsa ad alto potenziale per il trattamento del cancro. Questo approccio radioterapeutico sfrutta le dosi di radiazione rilasciate in seguito alla reazione di cattura neutronica da parte dell'isotopo ^{10}B .

2.1 Principio fisico della terapia

In seguito all'irraggiamento con un fascio neutronico, il nucleo dell'isotopo stabile del boro, il ^{10}B , cattura un neutrone a bassa energia (termica), passando in uno stato eccitato ^{11}B che decade molto rapidamente ($T \approx 10^{-12}\text{s}$), secondo due possibili canali:

- $n_{th} + ^{10}\text{B} \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow 4\text{He} + 7\text{Li} + 2.3\text{ MeV} + \gamma (0.48\text{ MeV}) (94\%)$
- $n_{th} + ^{10}\text{B} \rightarrow [^{11}\text{B}] \rightarrow 4\text{He} + 7\text{Li} + 2.8\text{ MeV} (6\%)$

La sezione d'urto (σ) è una grandezza che, in fisica nucleare, indica la probabilità che avvenga una reazione. Nel caso del ^{10}B la sezione d'urto di cattura dei neutroni termici è molto elevata, circa 3840 *barn*, da 2 a 7 ordini di grandezza maggiore rispetto alle sezioni d'urto di reazione con gli altri elementi che compongono i tessuti biologici.

La reazione di cattura neutronica da parte dell'atomo di boro è rappresentata in **figura 2.1**.

I prodotti della reazione sono particelle cariche ad elevato *LET* che condividono 2,3 MeV di energia cinetica nel 94% delle reazioni e 2,8 MeV nel restante 6%. I frammenti della reazione sono particelle α e ^7Li , due particelle altamente ionizzanti, poco penetranti, che hanno la caratteristica di depositare la loro energia in un percorso di circa 10 μm (ordine di grandezza di un tipico diametro cellulare). Pertanto, questi frammenti rilasciano tutta l'energia all'interno della cellula dove avviene la cattura neutronica da parte del ^{10}B e, se quest'ultimo è presente con una concentrazione sufficientemente elevata (dell'ordine di 20 $\mu\text{g/g}$ o 10^9 atomi/cellula), la dose di radiazione è letale per quella cellula, mentre quelle adiacenti, con una concentrazione inferiore di boro, possono essere preservate con un adeguato piano di trattamento.

La cellula tumorale viene danneggiata poiché la densità di ionizzazione prodotta lungo il percorso delle particelle cariche al suo interno genera un campo elettrico che segmenta alla stessa quota le due eliche di DNA, producendo un danno che, in almeno il 95% dei casi, conduce alla morte della cellula (Coderre JA. et al., 2003).

La **figura 2.2** riassume il concetto secondo cui la reazione combinata, a breve distanza delle particelle *alfa* (9 μm) e *litio* (5 μm), prodotte dalla cattura neutronica da parte del boro, limita essenzialmente il danno da radiazione alle sole cellule contenenti ^{10}B perché tali particelle depositano la loro energia entro un diametro cellulare.

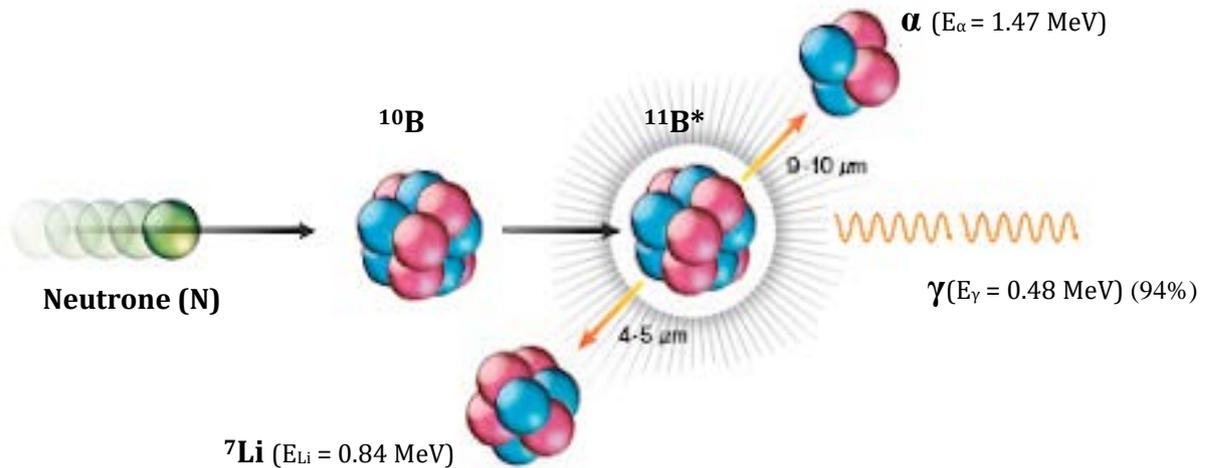


Figura 2.1 Schema della reazione di cattura neutronica da parte dell'atomo di boro (^{10}B) (Kageji T. et al., 2014).

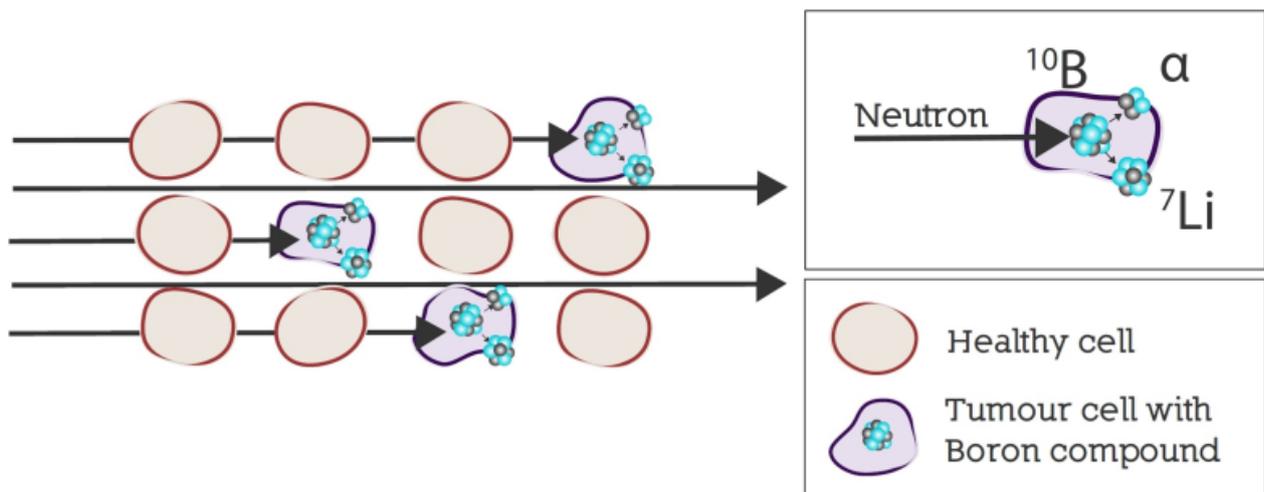


Figura 2.2 Interazione tra i prodotti ad alto *LET* generati dalla BCNT e cellule tumorali/sane (Marcaccio B., 2020).

2.2 Applicazioni cliniche della BNCT

La BNCT si basa sulla biodistribuzione selettiva e preferenziale di ^{10}B , ottenuta con opportuni farmaci capaci di concentrarsi preferenzialmente nelle cellule tumorali, e sul successivo irraggiamento con neutroni di bassa energia. Il risultato di queste due fasi distinte di intervento è una radiazione localizzata, altamente selettiva e letale per le cellule tumorali, e non pericolosa per le cellule del tessuto sano. Potenzialmente, è quindi possibile somministrare selettivamente al tumore e alle relative cellule tumorali infiltrate, elevate dosi di radiazione ad alto *LET*, risparmiando, al contempo, i tessuti sani adiacenti (Coderre J. A., Morris G. M.; 1999). Come spiegato sopra, la radiazione ad alto LET ha maggiore probabilità di danneggiare il DNA delle cellule a parità di dose assorbita, quindi la BNCT potrebbe essere una opzione terapeutica anche per tumori tipicamente radioresistenti per radiazione gamma. Inoltre, una eventuale condizione di ipossia non influirebbe sul risultato terapeutico in quanto la BNCT provoca soprattutto danni di tipo diretto.

In tutte le altre modalità di radioterapia (a fotoni o con particelle cariche), la selettività dell'effetto biologico dipende dalla conformazione del fascio. L'utilizzo della radioterapia convenzionale per la cura dei tumori metastatici e infiltranti risulta, spesso, decisamente limitata: per colpire noduli tumorali sparsi, sarebbe necessario irraggiare grandi volumi di tessuto sano che assorbirebbe una dose di radiazione troppo alta, con conseguente danno (Coderre JA. et al., 1995).

La BNCT è una terapia binaria che ha il potenziale di affrontare questa limitazione: presenta infatti un *targeting* selettivo del tumore a causa della localizzazione del boro. Dal momento che è possibile calcolare con precisione la dose di radiazione assorbita dai tessuti, nota la concentrazione del boro, è possibile irraggiare grandi porzioni di organi affetti da tumore, limitando la dose al tessuto sano coinvolto. Si ha quindi un assorbimento differenziale di dose nel sito neoplastico con un relativo risparmio del tessuto sano.

L'indiscusso vantaggio di questa terapia è dunque una selettività che non trova significativi rivali nelle altre tecniche di radioterapia. Inoltre, dal momento che l'accumulo di boro interessa indipendentemente ogni singola cellula, con la BNCT risulterebbe possibile individuare e trattare le cellule neoplastiche isolate che risultano invisibili alle indagini diagnostiche: questo aspetto fornirebbe una valida alternativa ai pazienti in stadi di metastatizzazione diffusa.

Per garantire la selettività dell'effetto terapeutico è decisamente importante avere a disposizione dei vettori borati che concentrino il boro preferenzialmente al sito neoplastico. L'intensità dei fasci neutronici attualmente disponibili richiede che, per ottenere una dose terapeutica in un tempo di irraggiamento accettabile, sia necessaria una concentrazione di ^{10}B pari o superiore a $20 \mu\text{g/g}$ nelle cellule bersaglio e che il rapporto fra le concentrazioni nel tessuto tumorale e nel tessuto sano sia di almeno 3:1 (Wittig A. et al., 2008).

Riassumendo, la BNCT è dunque una radioterapia potenzialmente di grande utilità in clinica, in termini di selettività ed efficacia, in quanto:

- il ^{10}B ha una elevata sezione d'urto (σ) di cattura per neutroni a bassa energia (3837barn a 0.025 eV) e un Q valore positivo ($Q= 2.792 \text{ MeV}$); ciò significa che la reazione di cattura neutronica è, in termini probabilistici, decisamente più frequente nelle cellule contenenti boro;
- le particelle α prodotte dalla reazione non richiedono la presenza di ossigeno per causare danni letali alle cellule; questo è importante se si considera che spesso la rapida crescita tumorale provoca una diminuzione dell'irrorazione sanguigna del tessuto neoplastico, creando un ambiente ipossico che rende meno efficienti le tradizionali radioterapie;
- le particelle α e Li possono distruggere sia le cellule in fase di divisione, sia le cellule non in mitosi, di conseguenza l'effetto terapeutico non dipende dal ciclo cellulare;
- i prodotti della reazione nucleare rilasciano tutta l'energia entro un raggio di pochi μm dal punto in cui sono stati creati (ossia all'interno della cellula in cui avviene la reazione o in quella immediatamente adiacente);
- la dose di radiazione viene rilasciata solo durante l'irraggiamento neutronico del tessuto, dato che l'attivazione indotta nei tessuti del paziente è trascurabile rispetto all'effetto dell'irraggiamento;
- trattandosi di una terapia binaria, ciascuna delle due componenti che la caratterizzano (sostanza borata selettiva e fascio neutronico) può essere modificata indipendentemente l'una dall'altra; ciò permette maggiori margini di miglioramento della tecnica.

2.3 BNCT: Cenni storici

L'idea della BNCT ha origini piuttosto precoci. Il neutrone fu scoperto da Chadwick nel 1932 e due anni dopo, nel 1934, Enrico Fermi misurò l'elevata sezione d'urto di cattura dei neutroni termici da parte del ^{10}B . A partire da queste due scoperte furono poste le basi teoriche per l'utilizzo dei neutroni in medicina e in particolare per la cura dei tumori. Il primo a proporre l'idea di utilizzare i neutroni per la cura del cancro fu Gordon J. Locher nel 1936 (Locher J. L., 1936).

Le prime applicazioni cliniche vennero effettuate negli Stati Uniti a partire dai primi anni '50, tuttavia, a causa della scarsa capacità di penetrazione dei fasci neutronici nei tessuti e a causa di composti borati inorganici poco efficienti (composti borati di prima generazione), queste applicazioni cliniche si rivelarono deludenti e poco incoraggianti, tanto da accantonare le ricerche per l'utilizzo dei neutroni in medicina nel 1961.

L'interesse e le ricerche nell'ambito della BNCT ripresero nel 1968 in Giappone, quando Hatanaka, introdusse un nuovo composto borato: il BSH o Sodio-dodecaborano ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$). Il protocollo BNCT applicato dal gruppo di Hatanaka prevedeva l'utilizzo di BSH e un fascio di neutroni termici direttamente applicati al tumore (irraggiamento intracranico). I risultati ottenuti da questi studi clinici giapponesi furono sorprendenti: la sopravvivenza media fu di 5 anni per il 58% di pazienti aventi gliomi di III o IV grado posizionati a meno di 6 cm di profondità (Hatanaka H. et al., 1994).

Negli anni '90 le sperimentazioni cliniche ripresero negli Stati Uniti e furono introdotte in Europa. In questo periodo le ricerche BNCT ebbero un notevole successo grazie all'introduzione di un nuovo composto borato, la Borofenilalanina (BPA) e grazie all'uso di fasci neutronici con un maggior potere penetrante: i neutroni epitermici. Neutroni con energia più alta, infatti, perdono energia attraversando il corpo del paziente e arrivano alla sede tumorale ad energia termica, in cui la sezione d'urto di cattura sul boro è massima.

I trials clinici descritti hanno avuto luogo in istituzioni provviste di reattori nucleari di ricerca, l'unica sorgente sufficientemente intensa per garantire trattamenti di durata accettabile.

La fase attuale dell'applicazione clinica della BNCT è caratterizzata da una importante innovazione tecnologica che permette di produrre fasci neutronici adatti alla terapia utilizzando acceleratori di protoni accoppiati a target di berillio o litio (Kreiner AJ. et al., 2016). Trials clinici basati su acceleratore sono attualmente in corso in Giappone, in tre centri: South Tohoku, Kyoto e Osaka (Kawabata S. et al., 2021). Tre ulteriori centri sono in fase di *commissioning* in Corea del Sud, Cina e Finlandia. Altri sono in fase di costruzione o in progettazione in Giappone, Argentina, Cina, Spagna, UK, Russia e in Italia, presso CNAO. Ci sono inoltre dei trials attualmente attivi presso reattori nucleari di ricerca a Taiwan, in Giappone e in Argentina.

Parallelamente agli studi clinici, la ricerca di base in ambito BNCT, si sta concentrando sullo sviluppo di composti borati e molecole maggiormente performanti nella biodistribuzione del boro, sullo sviluppo delle nuove sorgenti di neutroni basate su acceleratori, sulle tecniche di misura della distribuzione del boro nelle cellule tumorali e su tecniche più accurate per calcolare la dose di radiazione assorbita dal paziente.

2.4 BNCT a Pavia: il progetto TAO_rMINA

A partire dagli anni '80 in poi, Pavia divenne un solido punto di riferimento per la ricerca e l'applicazione clinica della BNCT.

Mentre il resto del mondo concentrava i suoi sforzi nella cura dei gliomi cerebrali e dei melanomi della pelle con fasci collimati di neutroni epitermici, il gruppo di Pavia si è dedicato alla cura di organi espianabili mediante il loro irraggiamento in un campo di neutroni termici. In quest'ottica si inserisce il progetto *TAO_rMINA* (Trattamento Avanzato di Organi Mediante Irraggiamento Neutronico e Autotrapianto), nato nel 1987 da un'idea proposta dai professori A. Zonta e T. Pinelli. *TAO_rMINA* rispondeva alla necessità di trattare organi disseminati di metastasi, per i quali la chirurgia e altri trattamenti standard non erano più praticabili. Il protocollo prevedeva l'espianto dell'organo dopo la somministrazione di BPA al paziente, l'irraggiamento al reattore e il successivo autotrapianto. In questo modo si preservano da dose tutti gli altri organi sani e si esclude il problema del rigetto, presente nel caso di trapianti convenzionali. Il 19 dicembre del 2001, per la prima volta al mondo, a Pavia, questa tecnica è stata applicata con successo su un paziente terminale affetto da metastasi epatiche diffuse da adenocarcinoma del colon. Il fegato del paziente, dopo il trattamento con una sostanza borata, è stato espianato dall'equipe chirurgica del professore A. Zonta (Policlinico S. Matteo di Pavia), irraggiato per 10 minuti nel reattore nucleare Triga Mark II dell'Università di Pavia e successivamente reimpiantato nel paziente stesso. Un secondo paziente è stato trattato con lo stesso protocollo nel 2003. Questo trattamento BNCT non viene più svolto a causa della sua complessità.

Oggi, l'Università degli Studi di Pavia e l'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) ricoprono un ruolo da protagonisti nella ricerca sulla BNCT. Le attuali linee di ricerca riguardano lo sviluppo e il test di nuovi composti borati, la progettazione di fasci neutronici basati su acceleratori, tecniche di analisi per la biodistribuzione di boro nei tessuti e nelle cellule (alfa spettrometria e autoradiografia neutronica quantitativa), dosimetria computazionale e treatment planning.

3. Fasci di neutroni

Si possono stabilire alcune caratteristiche fondamentali che un fascio neutronico dovrebbe avere per la BNCT clinica:

- I. Un elevato livello di purezza del fascio in modo che la contaminazione da neutroni veloci e raggi gamma comporti una dose minima nei tessuti normali durante l'irraggiamento con BNCT.
- II. L'intensità del flusso neutronico deve garantire un tempo di trattamento dell'ordine di un'ora e, possibilmente, in un tempo ancor più breve per facilitare un largo utilizzo della BNCT.
- III. Fasci di neutroni ben collimati sono necessari per consentire diverse posizioni del fascio con dose collaterale più bassa possibile al di fuori della regione di trattamento.
- IV. La sezione del fascio deve consentire un facile posizionamento del paziente per qualsiasi potenziale sito di malattia sul corpo umano.

3.1 Energia del fascio neutronico

A partire dai primi studi BNCT, condotti negli anni '50, sono stati utilizzati impianti dotati di reattore nucleare per ottenere i fasci di neutroni. La scelta di utilizzare i reattori nucleari è da ricercare nel fatto che i fasci di neutroni di intensità sufficiente si possono ottenere grazie alla fissione nucleare. I reattori a fissione producono neutroni in uno spettro che viene convenzionalmente diviso in tre intervalli: neutroni termici ($< 0,4$ eV), neutroni epitermici (da 0,4 eV a 10 keV) e neutroni veloci o ad alta energia (da 10 keV a 20 MeV).

- **Utilizzo di neutroni termici a bassa energia ($< 0,4$ eV)**

La reazione di cattura dei neutroni con ^{10}B avviene prevalentemente con neutroni a bassa energia, infatti i primi studi clinici BNCT sono stati condotti utilizzando fasci neutronici termici, come menzionato prima. Tuttavia, è necessario considerare che i tessuti più superficiali, come il tessuto muscolare e il tessuto osseo, attenuano la penetrazione dei neutroni termici, a bassa energia, attraverso reazioni di cattura sull'idrogeno.

Per questo motivo i primi studi BNCT hanno richiesto l'irraggiamento intra-operatorio per garantire un sufficiente flusso neutronico termico nel tumore. L'utilizzo di neutroni a bassa energia ($< 0,4$ eV), è utile per il trattamento di tumori superficiali, come il melanoma.

- **Utilizzo di neutroni epitermici (da 0,4 eV a 10 keV)**

Considerando il limitato utilizzo dei neutroni termici, la ricerca è stata fortemente indirizzata sullo sviluppo di fasci neutronici epitermici, ad energia più elevata (da 0,4 eV a 10 keV). Tale range energetico è un buon compromesso tra la penetrazione del fascio per il trattamento di tumori più profondi e la dose di radiazione depositata nei tessuti sani a causa dello scattering dei neutroni con l'idrogeno. Oggi quasi tutti i fasci neutronici progettati per uso clinico sono epitermici. Infatti, per trattare tumori più superficiali, si può termalizzare il fascio con appositi materiali interposti tra il fascio e il paziente.

3.2 Sorgenti di neutroni: reattori nucleari di ricerca e acceleratori di particelle

Per ottenere lo spettro neutronico desiderato è necessario costruire un insieme di materiali moderatori dell'energia neutronica, come grafite, alluminio, magnesio e fluoro. Tale moderatore, inoltre, deve essere dotato di materiali come il litio, capace di assorbire i neutroni di bassa energia. A questo punto, il fascio neutronico epitermico risultante viene filtrato da bismuto o piombo per rimuovere i fotoni indesiderati che accompagnano il processo di fissione e che sono prodotti da reazioni di cattura neutronica e da reazioni dei neutroni con i materiali della struttura del reattore stesso. Tale insieme di materiali moderatori si definisce *Beam Shaping Assembly* (BSA). La necessità di tale elemento esiste sia per reattori che per acceleratori, e la sua progettazione è importante per determinare la qualità del fascio che si utilizzerà per irraggiare i pazienti (Postuma I. et al., 2021).

4. Boro e composti borati

Negli ultimi anni si sono sviluppate numerose linee di ricerca che hanno come scopo quello di sfruttare il boro per la cura dei tumori e in particolar modo per la cura del glioblastoma multiforme (GBM). Attualmente la ricerca dei composti borati è perlopiù incentrata sulla sintesi e sviluppo di nuovi biotrasportatori di boro per la BNCT, tuttavia è importante considerare che la funzionalità traslazionale dei composti borati non è limitata a questa terapia: prove sostanziali dimostrano che alcuni di questi composti possiedono attività tumoricida diretta e sono in grado di interferire con diverse vie tumorali geniche. Un esempio è rappresentato dal farmaco chemioterapico Bortezomib, che sfrutta il boro come elemento attivo. Tale farmaco è oggi approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) come agente terapeutico nel mieloma multiplo (MM) e nel linfoma non-Hodgkin, ma viene anche studiato nell'ambito del glioblastoma. È stato inoltre dimostrato che alcuni sali di boro sono utili per alleviare lesioni ischemiche a carico della colonna vertebrale. Pertanto, si può considerare che i composti borati debbano essere studiati più intensamente, sia come antineoplastici diretti contro il glioblastoma, sia nel contesto della BNCT.

4.1 Composti borati per la biodistribuzione selettiva di ^{10}B

L'efficacia del trattamento BNCT dipende strettamente dalle performance di distribuzione di ^{10}B alle cellule neoplastiche da parte dei trasportatori. L'agente veicolante il boro rappresenta dunque un elemento cruciale della terapia, dal momento che da esso dipende la selettività della terapia.

Un composto borato ideale dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- fornire alle cellule tumorali una concentrazione di ^{10}B compresa tra 25-30 $\mu\text{g/g}$,
- avere un rapporto di concentrazione tessuto tumorale – tessuto sano maggiore di 3:1,
- essere espulso rapidamente dal sangue e dai tessuti sani,
- essere trattenuto all'interno della cellula tumorale per un tempo sufficiente a ricevere l'irraggiamento neutronico;
- non deve presentare tossicità.

Al momento non esiste un composto borato che soddisfi appieno tali requisiti ma grazie a nuove metodologie di sintesi, nuove conoscenze biochimiche e farmacologiche, si stanno disegnando e testando nuovi farmaci contenenti boro dotati di potenziale applicabilità in ambito BNCT (Barth RF. et al., 2018).

- **Composti borati di prima generazione**

I primi studi clinici BNCT sfruttarono composti inorganici per la biodistribuzione del boro come, ad esempio, l'acido borico (H_3BO_3). Questi farmaci di prima generazione, a causa della scarsa selettività, non permisero di ottenere risultati clinici rilevanti in BNCT. L'introduzione dei composti di seconda generazione costituì una svolta radicale per la BNCT in ambito clinico.

- **Composti borati di seconda generazione**

- BSH (Sodio-dodecaborano)

Il Sodio-dodecaborano ($Na_2B_{12}H_{11}SH$) è un composto sulfidrilico a struttura poliedrica ed è stato utilizzato nei protocolli clinici della BNCT a partire dagli anni '50 in poi per la cura dei tumori cerebrali (Soloway HA. et al., 1967).

L'accumulo di BSH nel tumore, rispetto al cervello normale, dipende strettamente dalle condizioni della barriera emato-encefalica. Infatti, il BSH non attraversa la barriera emato-encefalica (BBB) intatta nel cervello normale ma può essere assorbito selettivamente dal tumore cerebrale poiché la vascolarizzazione generata dalla neoplasia non forma le giunzioni strette associate alla BBB. Tuttavia, utilizzare il BSH comporta che ci sia la stessa concentrazione di boro nel sangue e nel tessuto neoplastico. Questo ultimo aspetto rende il BSH un trasportatore piuttosto limitato per curare i tumori in generale. Tuttavia, il fatto che BSH non sia in grado di superare la barriera emato-encefalica sana lo rende un interessante agente per l'accumulo selettivo di boro nel glioblastoma multiforme (Coderre JA. et al., 2003). I dati di biodistribuzione, provenienti da studi che utilizzano modelli animali con glioblastoma, indicano che le concentrazioni di boro sono in un rapporto tumore:sangue che può variare in un range da 0.5:1 a 1:1 (Barth RF. et al., 1997), ma sono anche stati segnalati casi in cui tale rapporto era significativamente superiori ad 1 (da 1.3:1 a 2:1) (Gabel D. et al., 1997). La primaria modalità di accumulo di BSH nel tumore cerebrale è la diffusione passiva dal sangue, come dimostrano i valori del rapporto di concentrazione tumore:sano. Pertanto, per i tumori cerebrali, i composti come BSH possono fornire quantità significative di boro al tumore principale ma è improbabile che BSH fornisca boro alle cellule di glioblastoma che si infiltrano nel parenchima sano, schermato dalla barriera emato-encefalica. (Barth RF. et al., 1997).

La combinazione di BSH con un altro composto borato è un approccio terapeutico promettente; sono stati condotti studi sperimentali e preclinici che prevedono l'utilizzo di BSH combinato a BPA (Barth RF. et al., 2003). Ulteriori dettagli sono riportati nel seguito di questa tesi.

- BPA (Boro-fenilalanina)

L'amminoacido analogo p- (diidrossiboryl) – fenilalanina (BPA) fu sintetizzato alla fine degli anni '50, allo scopo di ottenere un trasportatore di boro attivo nel tumore (Mishima Y. et al., 1987). L'utilizzo di BPA in studi terapeutici sperimentali su tumori del cervello ha mostrato evidenze che indicano un accumulo preferenziale di BPA nel gliosarcoma di ratto, un glioma umano xenotrapiantato (Saris SC. et al., 1992).

Contrariamente al BSH, la BPA viene attivamente trasportata attraverso la barriera emato-encefalica nel cervello normale. Nei modelli animali e nei pazienti, la concentrazione media di boro nel cervello normale si avvicina a quella rilevata nel sangue; ma la concentrazione media di boro nel tumore è 2-4 volte superiore rispetto al sangue e al parenchima cerebrale sano (Coderre JA. et al., 1998). È stato dimostrato che il meccanismo biochimico alla base dell'assorbimento di BPA nel tumore è correlata ad un elevato tasso di trasporto dell'amminoacido attraverso la membrana delle cellule tumorali, per mezzo del grande sistema di trasporto di amminoacidi neutri (*LATI*), che risulta maggiormente espresso sulle cellule neoplastiche (Wittig A. et al., 2008). Studi sperimentali dimostrano che BPA si accumula attivamente nelle cellule che si duplicano rapidamente e che necessitano di maggiori sostanze per la loro riproduzione e crescita (Coderre JA, Morris GM, 1999).

La scarsa solubilità di BPA può essere aumentata fino a livelli farmacologicamente utili creando un complesso con fruttosio (f.-BPA). È stato inoltre dimostrato che, sia nei modelli 9L di gliosarcoma, sia sulla linea cellulare di glioblastoma umano U-343MGa, la concentrazione intracellulare di BPA ha raggiunto livelli 3-4 volte più alti di quelli contemporaneamente presenti nel medium di incubazione. Non vi è stato alcun accumulo selettivo di BPA da parte di una normale linea cellulare di fibroblasti (Wittig A. et al., 2000). Uno studio di farmacocinetica condotto su melanoma o glioblastoma con marcatura ¹⁸F-BPA ha indicato che il tasso di incorporazione netto per il tumore era circa quattro volte superiore rispetto a quello del cervello normale (Kabalka GW. et al., 1998). È stato anche dimostrato, mediante microscopia ionica, che la BPA è in grado di accumularsi preferibilmente nelle cellule di gliosarcoma di ratto 9L che si infiltrano nel cervello sano, a diversi mm di distanza dalla massa tumorale principale (Bennett BD. et al., 1994).

Per tumori cerebrali altamente infiltrativi, come GBM, la capacità del trasportatore di boro di attraversare la barriera emato-encefalica e la sua capacità di raggiungere il cervello è di fondamentale importanza per l'efficacia della BNCT (Imahori Y. et al., 1998).

- Combinazione BPA – BSH

Sono stati condotti numerosi studi clinici BNCT in cui si sfrutta la combinazione di BPA e BSH per la biodistribuzione di boro necessaria al trattamento. Lo studio di Ono et al. ha testato sul modello animale gli effetti combinati dei due composti, mostrando che il trattamento BNCT con la BPA si rivela più efficace. Analisi più accurate dimostrano che la BPA presenta un maggior accumulo nelle cellule proliferanti mentre il BSH si deposita più efficientemente nelle cellule quiescenti. Nel complesso, con la combinazione dei due composti è stato ottenuto un maggior controllo tumorale, seppur impiegando dosi inferiori rispetto a quelle utilizzate con i singoli farmaci (Coderre JA et al., 2003). Nella **figura 4.1** vengono messe a confronto le strutture delle sostanze borate L-BPA e BSH.

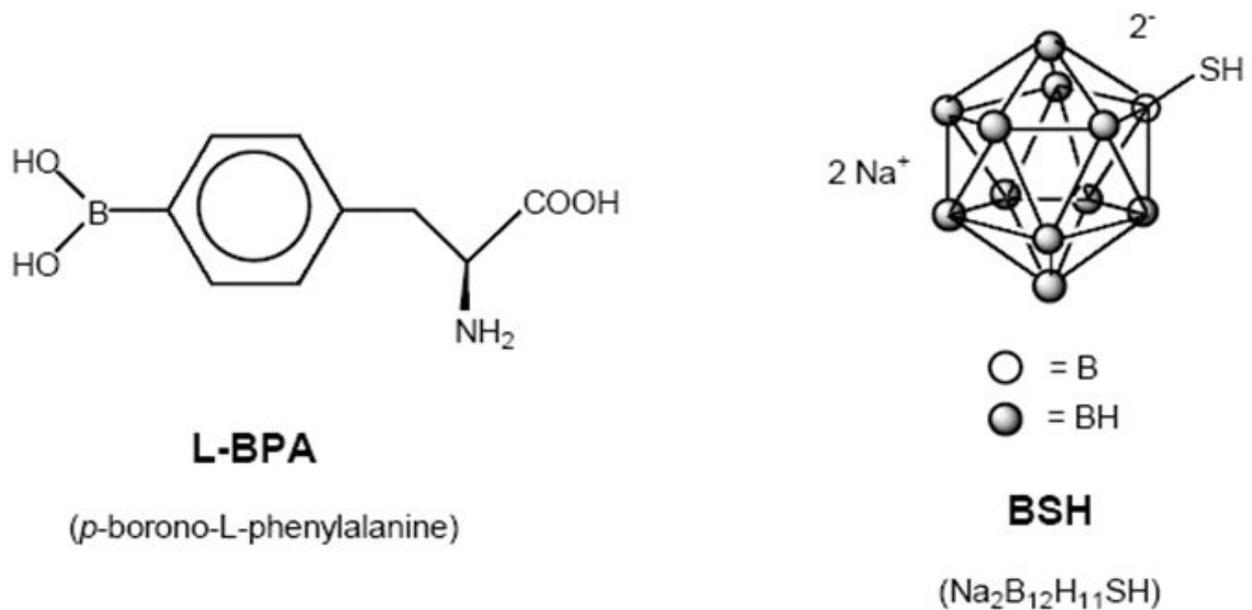


Figura 4.1 Struttura di L-BPA (*p*-borono-L-phenylalanina) e BSH (Sodio-dodecaborano) (Barth RF. et al., 2018).

- **Composti borati di terza generazione**

I composti borati di terza generazione comprendono un'enorme varietà di molecole, ognuna delle quali sfrutta una differente strategia per veicolare il boro alla neoplasia. Questi composti possono essere classificati in base al loro peso molecolare.

MOLECOLE A BASSO PESO MOLECOLARE

- Amminoacidi naturali coniugati con boro. Si tratta di molecole simili a BPA, dotate di una maggior percentuale in peso di boro. Gli amminoacidi utilizzati sono solitamente tirosina, cisteina, metionina e serina (Kabalka GW. et al., 2009).
- Amminoacidi non-naturali coniugati con boro: si tratta di molecole dotate di una maggiore stabilità metabolica rispetto ad amminoacidi naturali. Alcuni esempi sono i derivati borati di ABCHC (1-amminociclobutano-acido 1-carbossilico) e ABCPC (1-ammino-3-boronociclo-acido pentanecarbossilico). I risultati derivati da studi sperimentali BNCT che sfruttano amminoacidi coniugati con boro dimostrano che i rapporti di concentrazione di boro tra il tumore cerebrale e il sangue sono sovrapponibili a quelli ottenuti con BPA (Kabalka GW et al., 2011).
- Peptidi lineari o ciclici coniugati con BSH. I peptidi coniugati a BSH risultano promettenti poiché presentano un ottimo grado di penetrazione nei tessuti e bassi livelli di tossicità. In particolar modo risultano interessanti i ligandi peptidici per i recettori sovra-espressi dalle cellule tumorali. Alcuni esempi di tali recettori sono EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) e VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor). Il problema principale legato al targeting di VEGFR risiede nel fatto che richiederebbe ripetute applicazioni BNCT per risultare efficace. Ciò è comprensibile considerando che VEGFR è espresso in maniera molto variabile dalle cellule del glioma (Yang W. et al., 2009, Backer MW. et al., 2005).
- Purine, pirimidine, timine contenenti boro. Un esempio di questi composti è rappresentato dal 3CTA (3-carbonile timidina analogo). Questi composti prendono di mira specificatamente la timidina delle cellule tumorali che esprimono TK1 (Al-Madhoun AS. et al., 2004).
- Derivati della porfirina contenenti boro. Questi composti sono stati ampiamente studiati per la loro bassa tossicità e la naturale affinità verso i tumori. Esempi di tali composti sono BOPP, CuTCPh e H2DCP. Alcuni studi hanno dimostrato che i derivati della porfirina sono in grado di fornire quantità terapeutiche di boro a topi e ratti portatori di tumore cerebrale, tuttavia le ricerche di Kawabata e colleghi dimostrano che la biodistribuzione di boro non è localizzata unicamente nelle cellule neoplastiche. Questo ultimo aspetto suggerisce che i derivati della porfirina potrebbero risultare aspecifici nella biodistribuzione del boro (Kawabata S. et al., 2011).

MOLECOLE AD ALTO PESO MOLECOLARE

- Anticorpi monoclonali (MoAbs). Gli anticorpi monoclonali appartengono ad una classe molto promettente di agenti antitumorali a causa della loro elevata specificità. Il gruppo di ricerca di Barth et al. ha sintetizzato anticorpi monoclonali coniugati con boro progettati per legare selettivamente recettori come EGFR, espressi abbondantemente dalle cellule tumorali (Yang W. et al., 2009). Gli studi di Sun et al. invece, si sono concentrati sull'utilizzo di anticorpi monoclonali diretti contro il marker di staminalità CD133 che risulta particolarmente espresso dalle cellule del glioma (Sun T. et al., 2016).
- Polimeri. Essi sono veicoli alternativi per i composti del boro. L'interesse verso queste molecole deriva dal fatto che esse garantiscono una migliore solubilità ed aumentano l'emivita del farmaco, migliorandone le performance farmacocinetiche. Va considerato però che gli studi *in vivo*, condotti per testare queste sostanze, presentano importanti effetti collaterali (Dewl N. et al., 2016).
- Liposomi. Una metodologia molto promettente è l'incapsulazione di composti borati all'interno di liposomi, vescicole contenenti un volume acquoso internamente, racchiuso da un doppio strato fosfolipidico. Uno studio interessante, condotto *in vitro*, ha sfruttato l'impiego di liposomi contenenti BPA. La scelta di incapsulare BPA nei liposomi è da ricondurre al tentativo di ovviare alla sua scarsa solubilità in acqua ed alla sua veloce eliminazione dal torrente ematico. I risultati ottenuti in termini di dimensione, efficienza di incapsulazione e stabilità, indicano che la BPA introdotta nei liposomi possiede le potenzialità per l'applicazione in BNCT (Nakamura H. et al., 2012).

4.2 Misura della concentrazione di ^{10}B in campioni biologici

La possibilità di misurare la concentrazione di boro con alta precisione nei tessuti che verranno irraggiati rappresenta un passaggio fondamentale per un trattamento BNCT sicuro ed efficace. Infatti, la dose assorbita dipende criticamente da quante interazioni avvengono tra il fascio di neutroni e il boro presente nei tessuti, e la terapia avrà efficacia maggiore quanto più alto sarà il rapporto di concentrazione tra il tumore e il tessuto sano. La quantificazione della biodistribuzione di ^{10}B è quindi essenziale per calcolare la dose di radiazioni assorbita dai tessuti durante un irraggiamento. Inoltre, queste tecniche di analisi rappresentano un passaggio fondamentale anche nella ricerca di base, in quanto permettono di misurare con estrema precisione l'efficienza e la selettività di nuovi farmaci e composti borati in opportuni modelli preclinici *in vitro* e *in vivo*. A partire dai primi studi clinici BNCT sono stati sviluppati numerosi metodi per quantificare la biodistribuzione del boro nei tessuti e nelle cellule.

Nel paragrafo successivo sarà introdotta l'autoradiografia neutronica, tecnica utilizzata in questo lavoro per quantificare la concentrazione di ^{10}B nei campioni biologici.

4.3 Autoradiografia neutronica

L'autoradiografia neutronica è un sistema di analisi nucleare che si può utilizzare per misurare la quantità di boro contenuto in campioni biologici. Questo genere di analisi è applicabile a tessuti prelevati dal paziente o dall'animale, ed anche a campioni ottenuti da colture cellulari per esperimenti *in vitro*. L'autoradiografia neutronica si basa sulla rivelazione di tracce lasciate dalle particelle alfa e dagli ioni ^7Li su rivelatori passivi di tracce nucleari, in seguito ad irraggiamento neutronico. Questo metodo si basa sul fatto che le particelle ad alto LET che attraversano un materiale dielettrico trasferiscono un'elevata frazione di energia per unità di percorso: così facendo danneggiano le molecole presenti lungo la loro traiettoria, producendo una traccia.

Il danno chimico prodotto dalle particelle su tali materiali è dell'ordine dei nanometri e sono dette latenti, in quanto invisibili anche al microscopio. Per questo motivo è necessario un attacco chimico (*etching*, o sviluppo) con una soluzione corrosiva, che permette di ingrandire e rendere visibili le tracce lasciate dalle particelle cariche. Una volta sviluppate, le tracce possono essere analizzate al microscopio ottico.

A Pavia viene utilizzato il rivelatore CR-39, un polimero organico che si presta bene a rilevare particelle dovute a reazioni nucleari e che ha il vantaggio di non essere sensibile alla radiazione gamma e X. Nel caso specifico, il rivelatore, a contatto con il campione e irraggiato in un campo di neutroni termici, permette di evidenziare le tracce delle particelle α e i nuclei di ^7Li prodotti a seguito della reazione $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ nelle cellule che hanno assorbito il ^{10}B .

L'autoradiografia neutronica è una tecnica molto versatile e può essere utilizzata sia per ottenere imaging della distribuzione di boro nel campione (*autoradiografia neutronica qualitativa*), sia per misurarne la concentrazione (*autoradiografia neutronica quantitativa*). Per ottenere questi due diversi risultati si agisce sul tempo di irraggiamento (che influenza la densità spaziale di tracce generate) ed il tipo di sviluppo chimico (soluzione e tempo di sviluppo).

L'immagine mostrata in **figura 4.1**, è un esempio di autoradiografia neutronica quantitativa di un campione cellulare: sulla superficie del rivelatore si osservano le tracce generate dalle particelle ad alto LET prodotte in seguito alle reazioni di cattura neutronica da parte del boro assorbito dalle cellule (Gadan et al., 2012).

Maggiori dettagli sulla autoradiografia neutronica qualitativa e quantitativa verranno descritti nella sezione *Materiali e Metodi*.

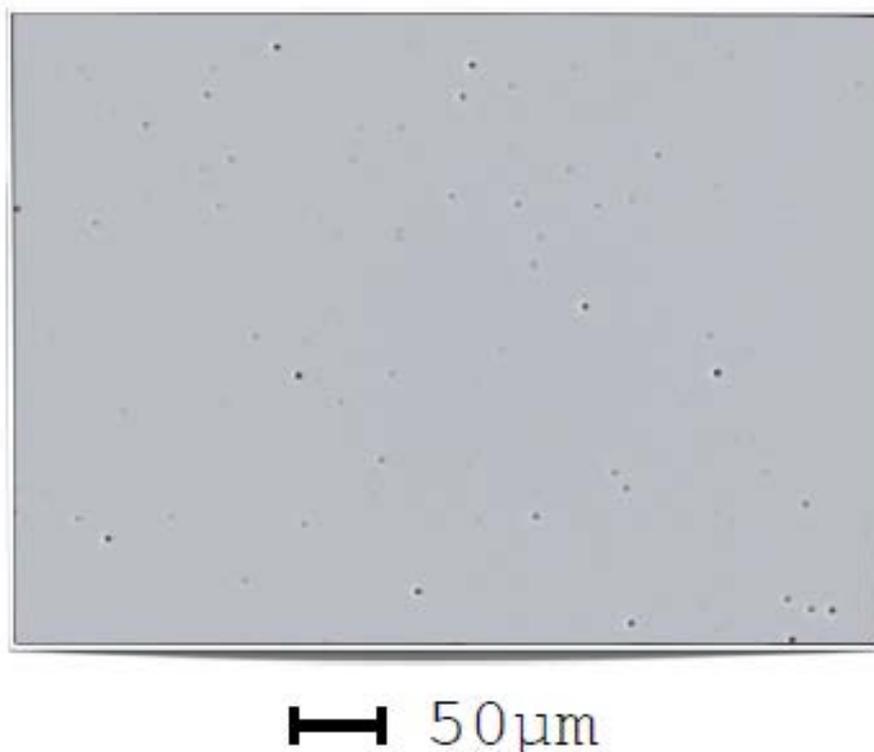


Figura 4.2 Distribuzione di tracce ottenuta con autoradiografia neutronica quantitativa su campioni cellulari (Gadan MA. et al., 2012).

5. BNCT e glioblastoma multiforme (GBM)

5.1 glioblastoma multiforme

Il glioblastoma multiforme (GBM) o glioma di grado IV rappresenta, secondo la classificazione OMS (Organizzazione mondiale della sanità), il tumore cerebrale maligno più comune tra gli adulti. Secondo i dati del National Cancer Institute, approssimativamente 23.820 nuovi casi di cancro al cervello sono stati diagnosticati negli Stati Uniti nel 2019. I gliomi rappresentano il 32% di tutti i tumori primari del SNC, dei quali il 17% sono tumori astrocitari ed il 28% sono glioblastomi. Il glioblastoma è caratterizzato da una prognosi decisamente sfavorevole e per questo è necessario ed urgente migliorare la stratificazione e differenziazione dei pazienti oltre che i trattamenti terapeutici.

Il GBM è un tumore neuro-epiteliale che ha origine da cellule gliali del sistema nervoso centrale. Sono stati individuati numerosi sottotipi istologici dei gliomi: astrocitoma, oligodendroglioma, oligo-astrocitoma misto e tumori glio-neurali misti, che provengono rispettivamente da astrociti, oligodendrociti e cellule neuronali. Sulla base delle caratteristiche istopatologiche (atipia citologica, anaplasia, attività mitotica, proliferazione e necrosi), la classificazione OMS stratifica i gliomi dal grado I al grado IV. Per classificare questa eterogenea neoplasia si fa riferimento anche alle informazioni genetiche e molecolari, le quali possono migliorare le previsioni clinico-patologiche e, di conseguenza, pianificarne e personalizzare al meglio la terapia. L'aspettativa dei pazienti con GBM è di circa 14 mesi anche quando il paziente è sottoposto a chirurgia accostata a radioterapia e somministrazione di Temozolomide (TMZ). La complessità delle strategie terapeutiche contro GBM è da ricondursi al fatto che questa neoplasia mostra una enorme eterogeneità tra i diversi tipi cellulari ed è associata a mutazioni in diversi geni chiave come PDGFRA, IDH1, EGFR, NF1. Mutazioni a carico di questi geni sono considerati dei marker genetici utili a migliorare la classificazione dei glioblastomi.

Oggi l'intervento terapeutico per GBM consiste in un approccio chemioterapico con Temozolomide (TMZ) accostato a radioterapia convenzionale e, laddove possibile, ad un intervento chirurgico. Purtroppo, bisogna ammettere che nell'ultimo decennio non sono stati compiuti significativi passi in avanti in termini di sopravvivenza dei pazienti aventi il glioblastoma multiforme. Ciò esorta fortemente a scoprire e sviluppare nuove strategie terapeutiche come, ad esempio, l'immunoterapia e la BNCT.

5.2 BNCT come terapia per il glioblastoma multiforme: studi clinici

Il precedente paragrafo rende l'idea di come il glioblastoma multiforme sia una delle neoplasie più complesse da trattare, con una sopravvivenza media di circa 14 mesi nonostante resezione massima, radioterapia e chemioterapia adiuvante. Per questo motivo la BNCT è stata proposta come opzione di trattamento per questo tumore in fase iniziale o di recidiva. Inoltre, è stato precedentemente accennato che il boro possiede un'attività tumoricida diretta anche senza l'accostamento a fasci neutronici.

Di seguito verranno esaminati i principali trial clinici BNCT ed i relativi risultati, tuttavia è importante premettere che l'analisi di questi dati risulta essere particolarmente complessa. Ciò è dovuto essenzialmente a due cause principali: i trial clinici BNCT per il glioblastoma multiforme sono pochi, inoltre, ognuno di questi prevede applicazioni BNCT molto differenti tra loro. Diversi protocolli utilizzano il BSH per la distribuzione di ^{10}B , altri utilizzano la BPA; alcuni sfruttano neutroni termici in sedute intra-operatorie, altri prediligono l'utilizzo di neutroni epitermici esterni. Anche l'accostamento della BNCT ad altre terapie è molto variabile: alcuni studi utilizzano solo BNCT, altri la affiancano a terapia a raggi X, altri ancora utilizzano chemioterapia adiuvante. È chiaro che questa enorme variabilità nei protocolli, applicati ad un limitato numero di pazienti, costituisce un problema per costruire un'adeguata statistica dei dati clinici BNCT. Tuttavia, con l'avvento degli acceleratori di particelle per la produzione di fasci neutronici, la comunità scientifica avrà migliori opportunità per standardizzare i protocolli e condurre adeguate analisi dei risultati clinici.

- Il gruppo di Miyatake et al. riporta dati riguardanti il trattamento di 167 casi di tumori cerebrali maligni e meningiomi di alto grado trattati con BNCT dal 2002 al 2014. In questo caso è stata utilizzata la BPA come composto borato. Nello specifico, la BPA è stata somministrata per un periodo di 2 ore alla dose di 200/mg/kg/h prima dell'irraggiamento e 100 mg/kg/h durante l'irraggiamento neutronico con neutroni epitermici. Il tempo di sopravvivenza medio per BNCT con BPA per il glioblastoma recidivo è stato di 10,8 mesi mentre il tempo di sopravvivenza per il glioblastoma di nuova diagnosi, trattato con BPA e BSH è stato di 15,6 mesi senza l'accostamento alla terapia con raggi X. L'aggiunta della terapia con raggi X a questo ultimo protocollo ha prolungato la sopravvivenza media a 23,5 mesi (Miyatake S. et al., 2009).
- Il gruppo di Kawabata et al. ha trattato sette pazienti con BNCT intra-operatoria con una dose di BSH di 5g/peso corporeo. Otto pazienti sono invece stati trattati con BNCT a fascio neutronico esterno utilizzando BPA 250 mg/kg e neutroni epitermici. Il protocollo BNCT a

fascio esterno è stato combinato con la terapia fotonica. Il tempo medio di progressione di tutti i pazienti è stato di 11,9 mesi senza mostrare grandi differenze tra il protocollo che sfrutta il fascio esterno (11,9 mesi) ed il protocollo di irraggiamento intra-operatorio (12,0 mesi). La sopravvivenza complessiva (OS) a 2 anni è stata del 53,3% (Yamamoto T. et al., 2009).

- Trenta pazienti con glioblastoma sono stati trattati tra il 2001 ed il 2003 (era pre-Temozolomide) con BNCT in Svezia. Ai pazienti è stata somministrata BPA coniugata con fruttosio (f-BPA) ad una dose elevata (900 mg/kg) come vettore per il boro. Per l'irraggiamento sono stati utilizzati neutroni epitermici. La OS media è stata di 14,2 mesi (Kawabata S. et al., 2009).
- Chadha e colleghi riportano i dati ottenuti da protocolli clinici BNCT su pazienti trattati presso il Brookhaven National Laboratory (USA) a metà degli anni '90. Il protocollo applicato in questo studio prevede una resezione chirurgica del tumore e, 4 settimane dopo l'intervento, la somministrazione di una dose ripetuta di f^{-10} BPA. La sopravvivenza media, sebbene monitorata in soli 10 pazienti fu di 13,5 mesi. Si consideri che a metà degli anni '90 la sopravvivenza media per questo tipo di pazienti era di circa 9,7 mesi. Lo stesso gruppo successivamente trattò un totale di 38 pazienti con glioblastoma utilizzando BPA-fruttosio ad una dose di 250 mg/kg.

Il tempo medio della progressione tumorale è stato di 31 settimane con una sopravvivenza media di 13,0 mesi (Chadha M. et al., 1995).

- Kageji et al., riportano uno studio condotto su 23 pazienti affetti da GBM di nuova diagnosi trattati con BNCT senza chemioterapia aggiuntiva. Sono stati somministrati 100 mg/kg di BSH senza ricorrere a craniotomia per la somministrazione diretta di neutroni termici al tumore. La sopravvivenza media è stata di 19,5 mesi, con sopravvivenza a 2 e 5 anni rispettivamente del 31,8% e del 9,1% dei pazienti. Questi risultati sono stati molto promettenti: cinque pazienti aventi gliomi di alto grado e trattati con BNCT sono sopravvissuti per più di tre anni (Kageji T. et al., 2011). Uno studio di questo gruppo nel 1994 che comprendeva 120 pazienti trattati con BNCT evidenzia che 9 pazienti sono sopravvissuti per oltre 10 anni (Hatanaka H. et al., 1994).
- Ci sono diverse ricerche in corso che studiano l'uso della BNCT nei gliomi di alto grado. In Giappone, 21 pazienti con glioblastoma di nuova diagnosi sono stati trattati con la combinazione BPA e BSH. Il protocollo 1 ha studiato 10 pazienti trattati solamente con BNCT. Il protocollo 2 ha indagato su 11 pazienti sottoposti a radioterapia a fasci esterni insieme a BNCT. Il tempo di sopravvivenza medio è stato di 15,6 mesi per tutti i pazienti e

di 23,5 mesi per il protocollo 2. La sopravvivenza globale a 2 anni è stata del 25% (Yamamoto T. et al., 2009). Uno studio clinico di fase II (OSAKA-TRIBRAIN0902, NCT00974987) è stato progettato sulla base di tale protocollo e ha raggiunto il completamento nel 2018. Lo studio Tsukuba BNCT è uno studio di fase II che valuta l'irradiazione fotonica combinata con Temozolomide adiuvante insieme a BNCT utilizzando 250 mg / kg di BPA (Yamamoto T. et al., 2011).

- Il 14 luglio 2021 è stato pubblicato il primo trial clinico BNCT basato su acceleratore di protoni accoppiato a target di litio per la produzione dei neutroni. In questo studio sono stati trattati 24 pazienti con glioblastoma multiforme recidivo e 3 pazienti con glioma maligno (WHO III). Tutti i 27 pazienti erano stati precedentemente sottoposti a trattamento con TMZ e radioterapia convenzionale. Il protocollo sperimentale prevede l'utilizzo di un farmaco simile a BPA chiamato SPM-011(4-[10B] borono-l-fenilalanina) e sfrutta un ciclotrone (BNCT-30) come sorgente di neutroni epitermici. SPM-011 è stato somministrato ai pazienti per via endovenosa (200 mg/kg/h). Durante la fase di irraggiamento la somministrazione è stata diminuita a 100 mg/kg/h. I risultati mostrano che il tasso di sopravvivenza dei pazienti dopo un anno è di 79,2%, dopo 18 mesi di 54,2% e dopo 2 anni del 33,3% (Kawabata T. et al., 2021). **La figura 5.1** mostra un caso rappresentativo di questo studio.

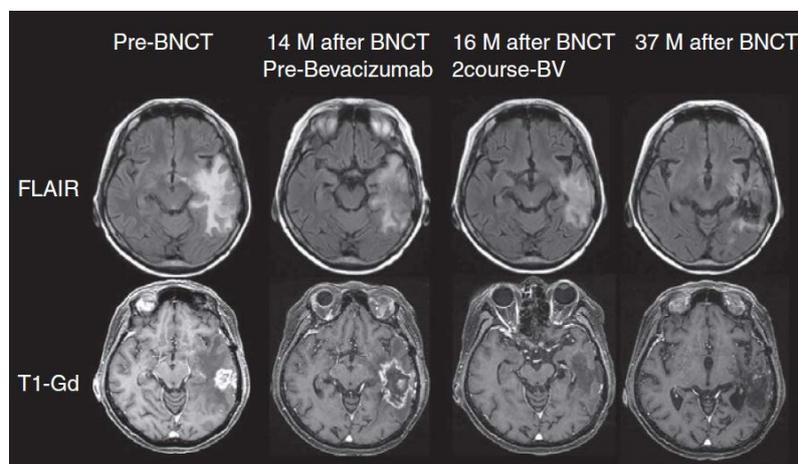


Figura 5.1 Il caso in figura mostra la RM di una paziente di 63 anni con glioblastoma multiforme. Dopo intervento chirurgico la paziente è stata sottoposta a chemioterapia con TMZ e radioterapia convenzionale (XRT). Tuttavia, 14 mesi dopo la craniotomia è stata individuata una recidiva tramite risonanza magnetica. Successivamente la paziente ha partecipato allo studio clinico e ha ricevuto il trattamento BNCT. Le immagini suggeriscono che la BNCT ha permesso di controllare la massa tumorale un anno dopo il trattamento. Il gonfiore cerebrale causato dalle radiazioni è stato successivamente controllato grazie a somministrazione di Bevacizumab (BEV). Oggi la paziente continua a stare bene, con stato neurologico stabilizzato nei 3 anni successivi alla BNCT (Kawabata T. et al., 2021).

6. Dosimetria della BNCT

Come per tutte le metodiche radioterapiche, la sicurezza e l'efficacia del trattamento BNCT sono determinate dalla capacità di calcolare la dose depositata nel tessuto sano e patologico con elevata precisione. Il calcolo della dose in BNCT è complesso a causa dei diversi meccanismi di rilascio di energia da parte del neutrone, che producono un campo di radiazione mista nel tessuto biologico. Ogni componente della radiazione ha differenti caratteristiche (*LET*, energia) e, quindi, diversa efficacia nella produzione di danni biologici.

La BNCT è una terapia che ha il potenziale per somministrare una elevata dose di radiazione al tessuto tumorale, grazie alla concentrazione di ^{10}B , che tipicamente è maggiore rispetto ai tessuti sani. L'atomo di boro possiede una sezione d'urto (σ) decisamente più grande rispetto ad ogni altro elemento che compone i tessuti. Ciò significa che se la concentrazione di boro è sufficientemente alta, la maggior parte della dose di radiazione assorbita dal tessuto dipenderà dalle reazioni di cattura. Tuttavia, va considerato che il neutrone, durante l'irraggiamento, non interagisce solo con il boro ma anche con altre specie atomiche presenti nei tessuti, provocando inevitabilmente la produzione di una dose di fondo. Tale dose non è selettiva, e quindi si cerca di ridurla il più possibile per sfruttare appieno il rapporto di concentrazione di boro tumore:tessuto sano.

La deposizione di energia nel tessuto da parte dei neutroni è principalmente causata dallo scattering sui nuclei di idrogeno dominanti a energia epitermica e fast, e reazioni di cattura neutronica, dominanti a energia termica.

Dose generata da urti elastici di neutroni su atomi di idrogeno (H)

Quando il neutrone colpisce il protone contenuto nell'atomo di idrogeno, interagisce con esso per urto elastico $1\text{H}(n,n)1\text{H}$. In seguito alla collisione, il neutrone diminuisce la propria energia (in media cede la metà della propria energia al protone di rinculo); per contro, il protone acquisterà energia in seguito all'urto. Il deposito di questa energia da parte del protone contribuisce alla dose somministrata ai tessuti. Questa componente della dose viene definita *dose da scattering*.

Dose generata da reazioni di cattura

Qualitativamente, il numero di reazioni di cattura neutronica da parte di un atomo dipende linearmente da tre diversi fattori:

- Flusso di neutroni che colpisce il tessuto (ϕ)
- Sezione d'urto degli atomi che compongono il tessuto (σ)
- Numero delle diverse specie atomiche che compongono il tessuto (N)

Considerando la composizione atomica del tessuto, le reazioni di cattura più rilevanti sono:

- $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{H}$,
- $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$,
- $^{16}\text{O}(n,\gamma)^{17}\text{O}$,
- $^{17}\text{C}(n,\gamma)^{18}\text{C}$,
- $^{14}\text{N}(n,\gamma)^{15}\text{N}$.

A parità di ϕ solo le prime due inducono una deposizione significativa di energia; le altre hanno sezioni d'urto basse o dipendono da isotopi con bassa abbondanza nei tessuti, cioè N è piccolo (White D.R., 2016).

La reazione di cattura da parte dell'idrogeno $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{H}$, produce 2,2 MeV di energia sottoforma di radiazione γ . Una volta generato, il fotone γ sarà in grado di attraversare il tessuto e depositare dose a grande distanza rispetto al suo punto di origine, potenzialmente estendendo gli effetti radiobiologici a diversi tessuti.

La dose prodotta dalle reazioni di cattura da parte dell'idrogeno non è trascurabile: l'atomo idrogeno, pur avendo una sezione d'urto decisamente più piccola rispetto a quella del boro, è estremamente più abbondante all'interno dell'organismo, con una percentuale in peso del 10-15%. Il boro invece, pur avendo una sezione d'urto enorme, è decisamente più scarso in termini di concentrazione (nell'ordine delle decine di μg per g di tessuto).

In seguito alla reazione di cattura da parte dell'azoto $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$, invece, viene prodotto un protone da circa 0.6 MeV che, essendo una particella carica, densamente ionizzante, è in grado di generare danni alla doppia elica di DNA che risultano letali per la cellula. In questo caso il danno biologico causato dal protone avviene a pochi μm di distanza dal suo punto di origine. Anche le reazioni di cattura da parte dell'azoto non sono trascurabili, in quanto l'atomo di azoto è presente nei tessuti con una percentuale del 3% in peso, pur avendo una sezione d'urto più piccola di quella del boro.

Le collisioni di scattering con l'atomo di idrogeno e le reazioni di cattura dei neutroni in H e N producono una somministrazione della dose inevitabile e non selettiva durante il trattamento con BNCT, che colpisce sia il tessuto sano che quello tumorale.

Dose generata da fotoni γ strutturali

Un'altra fonte di inevitabile dose di fondo proviene dalla componente gamma strutturale, presente nel fascio di neutroni, che dovrebbe essere mantenuta bassa quanto possibile utilizzando materiali schermanti adeguati. Per questo, il *Beam Shaping Assembly* nominato sopra deve contenere materiali che siano in grado di filtrare la radiazione gamma che proviene dalle reazioni di produzione dei neutroni nel target dell'acceleratore o dalla fissione nel core del reattore.

Dose selettiva provocata da reazione di cattura da parte dell'atomo di boro

La componente di dose selettiva è rappresentata, invece, dall'energia rilasciata dalla particella alfa e dallo ione litio generato dalla reazione $^{10}\text{B} (n, \alpha) ^7\text{Li}$. Come già detto, queste particelle depositano energia localmente a causa del loro alto LET. Grazie alla elevata sezione d'urto del ^{10}B , la reazione di cattura neutronica sul boro costituisce in genere la componente di dose più rilevante: le concentrazioni tipiche di boro ottenute nei tessuti sono dell'ordine di decine di microgrammi di ^{10}B per grammo di tessuto (ppm).

Dose totale assorbita

La dose totale è la somma di tutti questi contributi, ciascuno da calcolare nel tumore e nei tessuti normali coinvolti nell'irraggiamento.

$$D = D_t + D_f + D_\gamma + D_B$$

Per riassumere, i principali componenti della dose assorbita sono:

- D_F = dose da neutroni veloci, principalmente dovuta al rinculo dei protoni in seguito a scattering. $^1\text{H}(n,n)^1\text{H}$;
- D_T = dose da neutroni termici, principalmente dovuta a protoni generati in seguito alle reazioni $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$;
- D_B = dose derivante dalle reazioni $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ dovute ad alfa e nuclei di litio.
- D_γ = dose da fotoni di fondo e da reazioni di cattura $^1\text{H}(n,\gamma)^2\text{H}$.

La **figura 6.1** mostra le quattro componenti della dose da campo misto della BNCT (Pedrosa M., 2020). Come detto sopra, ogni componente ha un diverso LET, quindi diverso effetto radiobiologico nei tessuti.

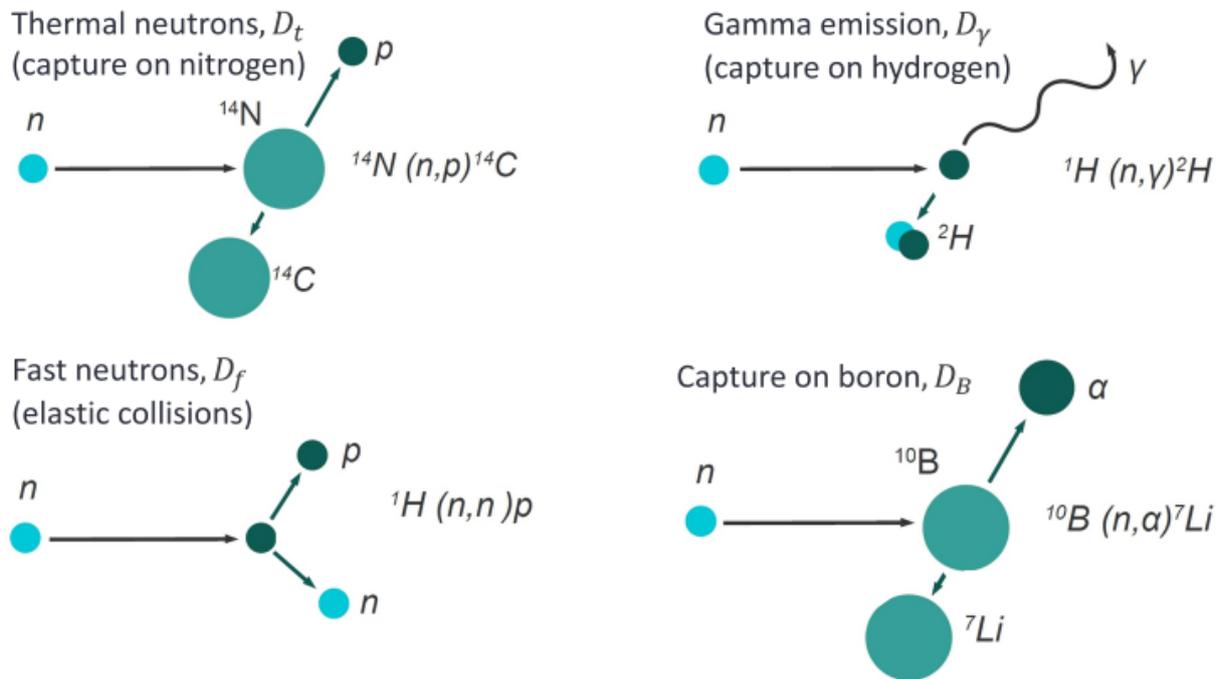


Figura 6.1 Le quattro reazioni responsabili della dose assorbita durante il trattamento BNCT: reazione di cattura da parte dell'azoto, reazione di cattura da parte dell'idrogeno, reazioni di scattering con l'idrogeno, reazioni di cattura da parte del boro (Pedrosa M., 2020).

La radioterapia clinica con fotoni, per cui esiste una grande esperienza e molti studi statisticamente rilevanti, consente l'analisi dell' *outcome* in funzione della dose somministrata. È quindi estremamente importante esprimere la dose di BNCT nel campo misto in unità equivalenti a fotoni, per confrontare il trattamento pianificato con la terapia convenzionale, consentendo previsioni sugli effetti dell'irraggiamento. Questo è necessario perché non c'è altro modo di stabilire le dosi terapeutiche dovute a un campo misto di radiazioni, ciascuna con diversa efficacia biologica, e per valutare gli effetti avversi che tale campo misto può generare nei tessuti normali.

Dose totale biologicamente ponderata

Tradizionalmente, il modo in cui la dose di BNCT è stata espressa in unità fotone-equivalente, per permettere il confronto con l'irraggiamento gamma convenzionale, consiste nel moltiplicare ciascuna delle 4 componenti di dose assorbita (in Gy) per il corrispondente valore di Efficacia Biologica Relativa (*RBE*) o il fattore di efficacia biologica composta (*CBE*). La dose così ottenuta (dose biologicamente ponderata) è espressa in Gray-equivalente (*Gy-Eq*) (Coderre J.A., Morris G.M., 1999). Il fattore *RBE* è definito come descritto sopra (**figura 1.1**). Il fattore *CBE* ha la stessa definizione del fattore *RBE*, ma si riferisce alla componente di dose da boro. La capacità di causare danno della componente di dose da boro, infatti, dipende anche dalla distribuzione del boro a livello subcellulare, ottenuta con il vettore di boro scelto (Coderre J.A., Morris G.M.; 1999). I fattori *RBE* e *CBE* sono considerati costanti, indipendenti dalla dose e dal rate di dose.

La dose totale, biologicamente ponderata D_w è:

$$D_w = RBE_F \cdot D_F + RBE_T \cdot D_T + CBE \cdot D_B \cdot [10B] + D_\gamma$$

L'Efficacia biologica relativa della componente gamma è naturalmente 1, in quanto i fotoni sono la radiazione di riferimento.

Questo metodo per convertire la dose assorbita in dose biologica è tuttavia una semplificazione, soprattutto perché vengono calcolati i fattori *RBE* e *CBE* a endpoint fisso.

Photon isoeffective dose

Nel 2012 González e Santa Cruz hanno dimostrato che la dose ponderata con fattori costanti restituisce dei valori artificialmente alti, che non spiegano il risultato clinico di trattamenti BNCT rispetto alla radioterapia convenzionale con fotoni (González S. J. and Santa Cruz G.A.; 2012). In particolare, porta a sovrastimare la dose assorbita dal tumore. Questo genera una situazione in cui si calcolano dosi molto alte, che tuttavia non portano al controllo del tumore, come ci si aspetterebbe nota la probabilità di controllo del tumore osservata dalla radioterapia con fotoni. Il lavoro citato dimostra come l'utilizzo di fattori costanti non sia una metodologia matematicamente corretta per esprimere la dose in termini fotone-equivalente. Gli autori hanno quindi sviluppato un modello dosimetrico più accurato, che calcola la *photon isoeffective dose*, espressa in Gy (IsoE). Questa è definita come la dose di fotoni che produce lo stesso effetto (come probabilità di controllo del tumore o probabilità di sopravvivenza cellulare) di una data combinazione dei componenti della dose di BNCT (González S.J. and Santa Cruz G.; 2012).

In caso di dati di sopravvivenza cellulare, il modello utilizza l'intera curva di sopravvivenza invece di scegliere un valore arbitrario, facendo un fit della curva dose-risposta. Nel modello proposto, si considerano anche la riparazione di primo ordine dei danni sub-letali (mediante il fattore tempo di Lea-Catcheside) e il sinergismo tra i diversi componenti della radiazione (González SJ. And Santa Cruz G.; 2012). Il sinergismo, infatti, tiene conto che un danno letale può essere causato dalla combinazione di più danni sub-letali causati da eventi diversi, in special modo da interazioni di diverse particelle del campo misto.

Un calcolo della dose più accurato porta a piani di trattamento più efficaci, in grado di massimizzare il danno al tumore limitando il più possibile la dose assorbita dai tessuti sani. I modelli dosimetrici devono ricevere come input dati radiobiologici che riproducano l'effetto che si vuole studiare nel paziente.

Per studiare la probabilità di controllo tumorale in funzione della dose, si possono studiare colture di cellule tumorali per costruire curve di sopravvivenza in funzione della dose. Infatti, la capacità di controllare un tumore è generalmente legata al numero di cellule che si riescono a inattivare con l'irraggiamento. Diverso è il caso del danno ai tessuti sani, che dipende da meccanismi fisiologici più complessi e da interazioni tra diversi tipi di cellule e strutture. È quindi difficile associare la probabilità di causare uno specifico effetto avverso al numero di cellule uccise: per i tessuti sani è più indicato ottenere dati *in vivo*.

Questo lavoro di tesi si occupa di generare dati *in vitro* per calcolare RBE e CBE della linea cellulare di GBM scelta. Inoltre, il fit delle curve dose-risposta permette di ottenere i parametri del modello da utilizzare in futuro come input per calcolare la *photon isoeffective dose*. Il capitolo successivo descrive la procedura sperimentale necessaria per ottenere la curva di sopravvivenza in funzione della dose, e la modalità di analisi dei dati per ottenere i parametri da inserire nel modello.

Scopo del lavoro

Lo studio oggetto di questa tesi si prefigge di verificare e quantificare la radiosensibilità della linea cellulare di glioblastoma umano U87MG (nel testo abbreviato in U87) in seguito all'esposizione a raggi X, neutroni e BNCT, confrontandone le rispettive curve dose-sopravvivenza.

Lo studio è inserito in un progetto di ricerca preclinico più ampio, volto a verificare l'efficacia e l'applicabilità della BNCT per il trattamento del glioblastoma multiforme. La ricerca *in vitro*, pur con forte approssimazione dei sistemi biologici e patologici *in vivo*, risulta essere essenziale per gli studi radiobiologici di dosimetria e soprattutto per le valutazioni di captazione ed accumulo dei composti borati da parte delle cellule tumorali.

I risultati di questa tesi saranno dunque importanti per:

- Stabilire i fattori RBE e CBE per il GBM umano; fino a questo momento, infatti, i fattori utilizzati per riportare la dose assorbita dai pazienti trattati in clinica fanno riferimento a una linea cellulare di gliosarcoma (Coderre J. M. et. al., 1993). Con i nuovi fattori, si può ricalcolare retrospettivamente i valori di dose in letteratura, e analizzare l'efficacia della BNCT con maggiore precisione
- Fornire i dati radiobiologici necessari a un futuro calcolo di dose isoeffettiva per la produzione di piani di trattamento su casi realistici di pazienti affetti da questo tumore. Questi dati saranno quindi il punto di partenza per ri-valutare la dose assorbita da pazienti già trattati in diversi centri di BNCT con un modello dosimetrico più corretto, e per valutare le performance dosimetriche di fasci neutronici in fase di costruzione per il trattamento del GBM.

Materiali e metodi

1. Disegno sperimentale

Il protocollo sperimentale prevede 4 fondamentali fasi di lavoro:

1. Somministrazione di ^{10}BPA alla linea cellulare di glioblastoma multiforme umano (U87) e valutazione della citotossicità del composto. La tossicità viene valutata tramite un test di efficienza di piastramento (EP %) che permette di determinare la sopravvivenza cellulare mediante confronto tra cellule trattate con ^{10}B e cellule di controllo (**figura 1.1-sinistra**).
2. Valutazione e quantificazione dell'assorbimento di ^{10}B da parte della linea cellulare tramite autoradiografia neutronica quantitativa. L'assorbimento di ^{10}BPA viene valutato:
 - su cellule U87 coltivate come monostrato in adesione,
 - su sferoidi cellulari isolati dalle fiasche in adesione e mantenuti in fiasche da sospensione.

Lo scopo di questa analisi è quello di verificare se entrambe le componenti della linea cellulare hanno assorbito la minima concentrazione di boro (**figura 1.1-destra**).

3. Irraggiamento neutronico. Le cellule arricchite in ^{10}BPA e le cellule prive di ^{10}BPA vengono sottoposte ad irraggiamento nella colonna termica del reattore nucleare TRIGA Mark II dell'Università di Pavia a diverse fluenze neutroniche. Per quantificare la sopravvivenza cellulare viene applicato successivamente un test di clonogenicità (**figura 1.2-sinistra**).
4. Irraggiamento con raggi X e valutazione della sopravvivenza cellulare tramite il medesimo test di clonogenicità (**figura 1.2-destra**).

I dati di sopravvivenza ottenuti in seguito ai diversi trattamenti radianti permettono di ottenere le curve dose-sopravvivenza. Un fit simultaneo delle tre curve fornisce sia i valori di *RBE/CBE*, sia i parametri da inserire nel modello di *photon isoeffective dose*.

DISEGNO SPERIMENTALE:

STUDIO DELL'ASSORBIMENTO CELLULARE DI ¹⁰B

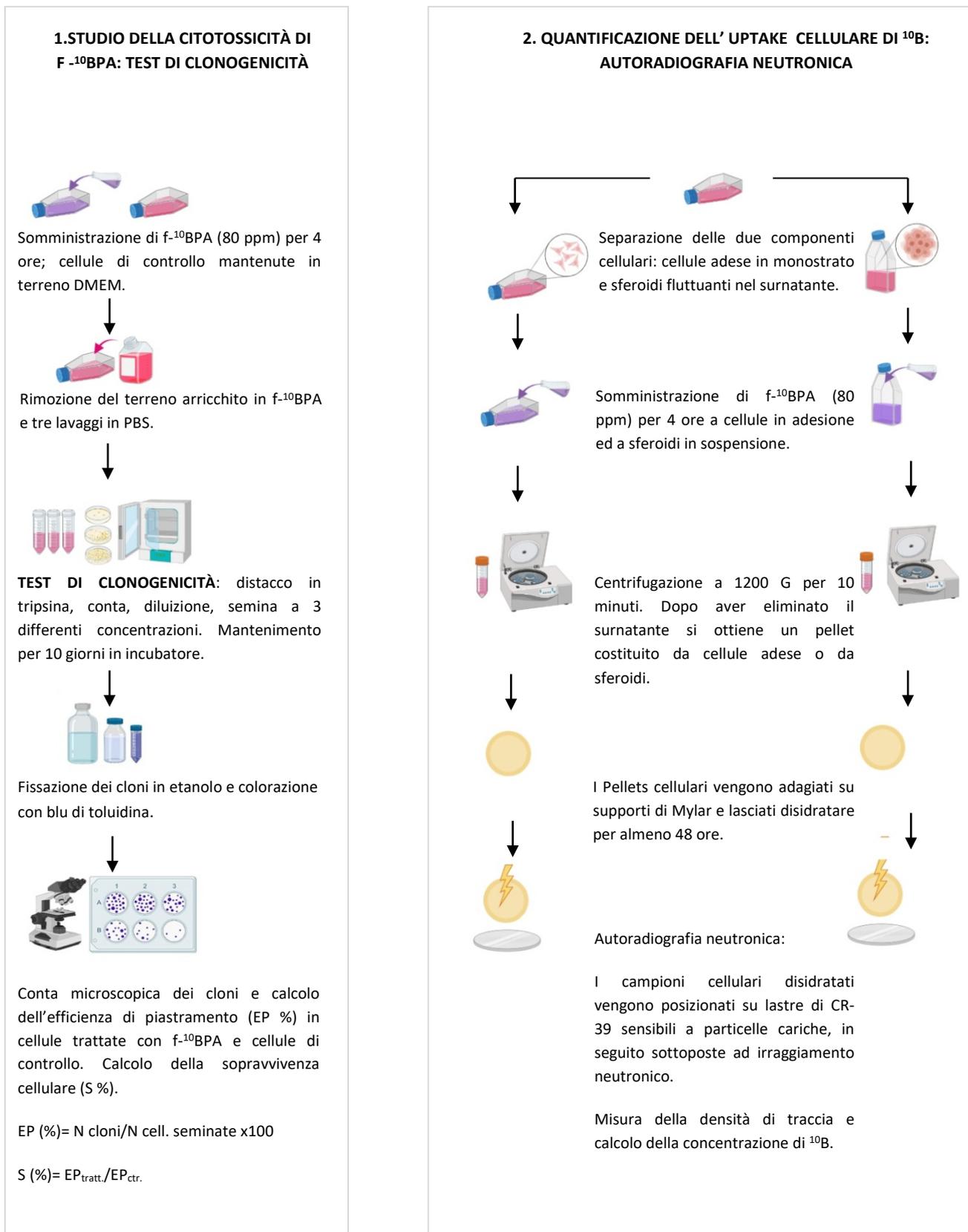


Figura 1.1 Schema del disegno sperimentale 1) studio della tossicità di f-¹⁰BPA; 2) studio dell'uptake cellulare di ¹⁰B.

DISEGNO SPERIMENTALE:

STUDIO DELLA SOPRAVVIVENZA A TRATTAMENTI RADIANTI TRAMITE TEST DI CLONOGENICITÀ

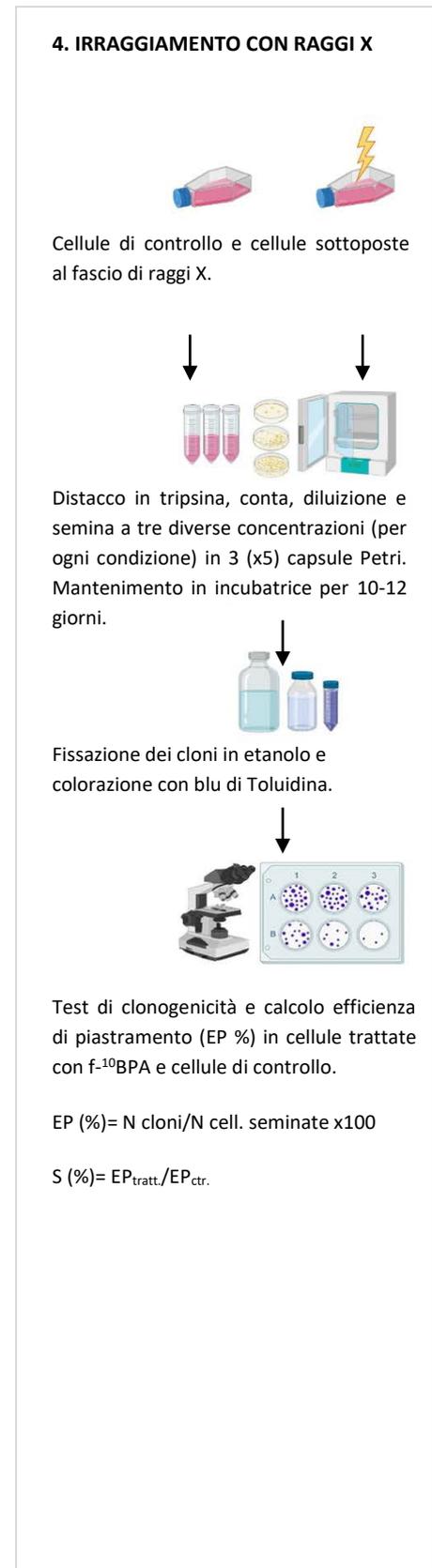
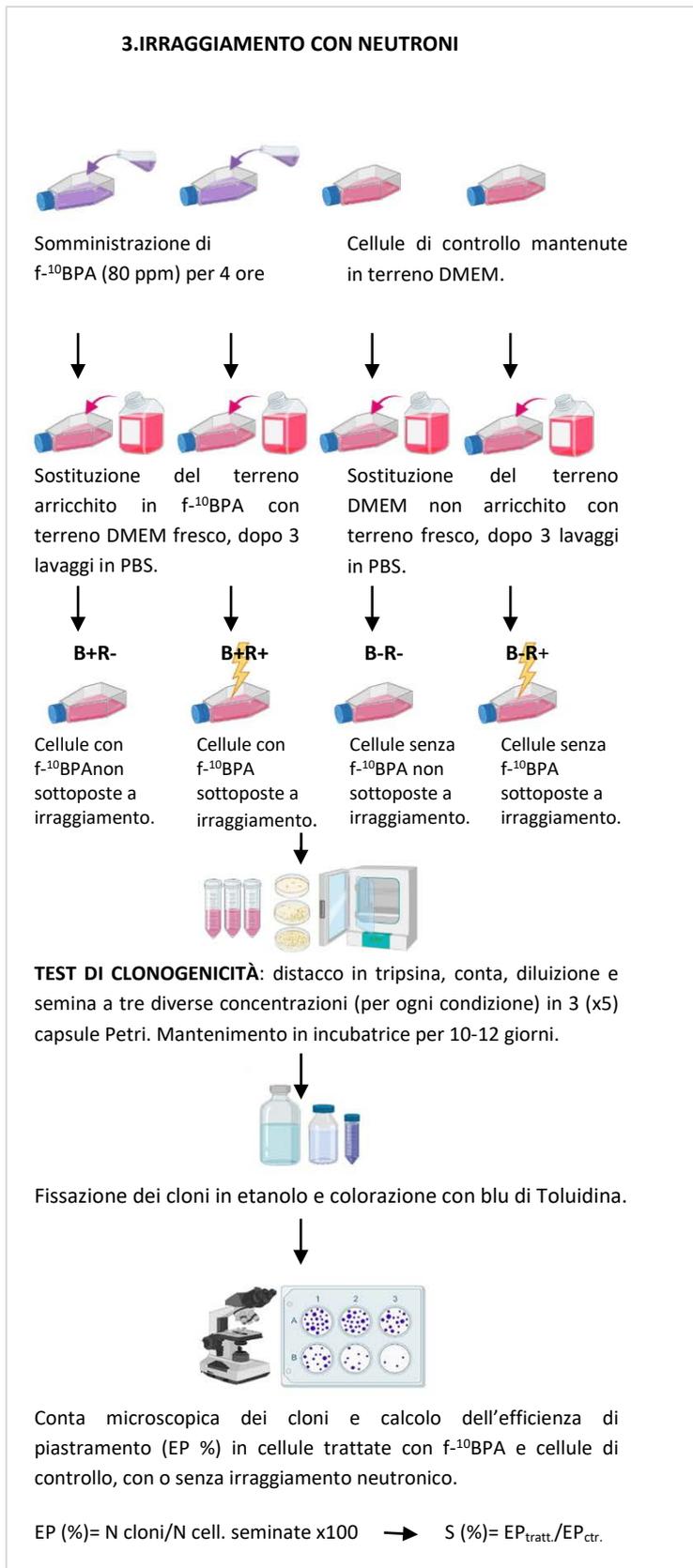


Figura 1.2 Schema del disegno sperimentale: 3) irraggiamento con neutroni; 4) irraggiamento con raggi X.

2. Linea cellulare di glioblastoma multiforme umano: U87MG

La linea cellulare U87MG è stata inizialmente isolata dal glioma cerebrale di un paziente maschio di 44 anni presso l'Università di Uppsala, nel 1996. Oggi questa linea cellulare rappresenta uno dei principali modelli di riferimento per lo studio del glioblastoma *in vitro* (Allen M. et al., 2017).

2.1 Crescita bimodale delle cellule U87MG

La linea cellulare di glioblastoma umano (U87) coltivata in fiasche da adesione presenta una classica crescita in monostrato cellulare, tuttavia, prima di raggiungere la confluenza, procede a creare formazioni sferoidali di grandi dimensioni ($> 200 \mu\text{m}$) che tendono a staccarsi dal monostrato per continuare a crescere e proliferare in sospensione (Yilmazer A.; 2018) (**figura 2.1**). Questa caratteristica intrinseca non è tipica delle sole cellule U87 ma si presenta in numerose linee cellulari di glioblastoma multiforme (Hong X. et al., 2010).

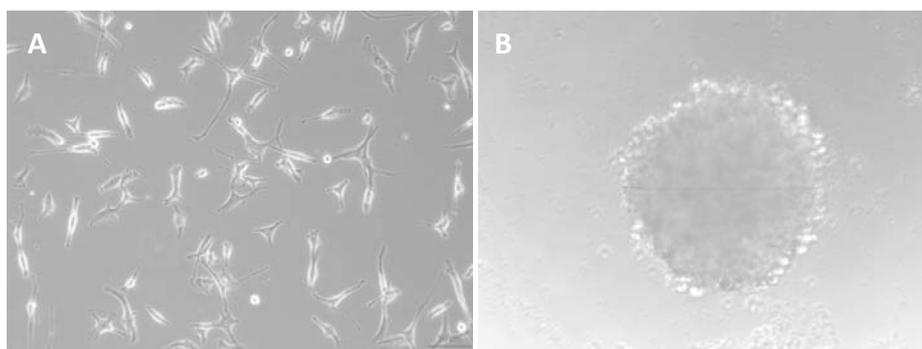


Figura 2.1 Cellule U87 in monostrato cellulare (A) e sferoidi in sospensione (B). Immagine acquisita con microscopio capovolto, ingrandimento 20x (Yilmazer A.; 2018).

2.2 Linea cellulare U87: metodo di coltura e sub-coltura

Per la coltura della linea U87 è stato seguito il protocollo suggerito dalla American Type Culture Collection (ATCC®): le cellule sono state coltivate in adesione in fiasche T-75 a 37°C e 5% di CO₂. È stato utilizzato terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Lonza) arricchito con 10% di siero fetale bovino (Euroclone) ed 1% di gentamicina (Euroclone). Per le subcolture, dopo la rimozione del mezzo di coltura, le cellule sono state lavate con D-PBS (Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ free Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) e di seguito risospese mediante trattamento enzimatico con tripsina-EDTA (Sigma) per 5 minuti a 37 °C. Per isolare gli sferoidi è stato prelevato il terreno derivante dalle fiasche da adesione (5 ml) ed è stato seminato in una fiasca da sospensione insieme a 15 ml di terreno fresco, privo di siero.

3 Assorbimento intracellulare di ^{10}B e sua quantificazione

Per il trattamento BNCT, prima dell'irraggiamento neutronico, le cellule sono state arricchite con ^{10}B tramite la somministrazione del composto borato f- ^{10}BPA .

3.1 Preparazione della soluzione di ^{10}BPA

La ^{10}BPA è una sostanza poco solubile in acqua. Per renderla utilizzabile è necessario che venga complessata con fruttosio: in tal modo si ottiene una soluzione di f- ^{10}BPA .

Il protocollo prevede di:

- pesare L - ^{10}BPA e fruttosio in polvere mediante una bilancia di precisione;
- miscelare le due polveri ed aggiungere il terreno di coltura;
- aggiungere NaOH 5 mol/L fino ad ottenere una soluzione limpida con pH compreso tra 9,5 e 10;
- riportare il pH a valori intorno a 7,4 utilizzando HCl 5 mol/L e mantenere in agitazione per circa 10 minuti;
- aggiungere terreno fino al volume finale desiderato, considerando che per ciascuna fiasca T75 occorrono 10 ml di soluzione arricchita con f- ^{10}BPA 80 ppm.

3.2 Somministrazione di ^{10}BPA alle cellule U87

Le cellule U87 sono state coltivate in fiasche da adesione T-75 con terreno DMEM arricchito (10% siero fetale bovino, 1% gentamicina) per 8-10 giorni e mantenute in incubatore a 37°C con CO_2 al 5%, in modo tale da raggiungere una confluenza di circa l'80%. Dopo aver rimosso il terreno di coltura, le cellule sono state trattate per 4 ore in terreno contenente f- ^{10}BPA , avente una concentrazione di ^{10}B pari a 80 $\mu\text{g/ml}$ (80 ppm). Tali condizioni di trattamento sono state determinate sperimentalmente sulla base di precedenti studi inerenti alla citotossicità e alla citocinetica di captazione intracellulare di ^{10}BPA (Ferrari C. et al., 2009).

Successivamente è stato necessario verificare che il trattamento per 4 ore con 80 $\mu\text{g/ml}$ di ^{10}B non risultasse citotossico e garantisse alla cellula di trattenere una quantità di ^{10}B pari a 25-30 ppm. Come anticipato precedentemente, è fondamentale che la cellula, al momento dell'irraggiamento, disponga di almeno 25-30 ppm di ^{10}B intracellulare perché solo in queste condizioni essa riceverà una dose letale di radiazione in seguito alle reazioni di cattura neutronica (Ferrari C. et al., 2011). Dopo il periodo stabilito, il terreno arricchito viene sostituito con del terreno privo di f- ^{10}BPA perché si intende studiare l'effetto dell'irraggiamento dovuto soltanto al boro effettivamente assorbito dalle cellule, e non da quello in sospensione.

3.3 Valutazione della citotossicità di f- ^{10}BPA

La citotossicità del composto veicolante ^{10}B sulla linea cellulare U87 è stata valutata mediante il test di efficienza di piastramento (EP %) che permette di determinare la sopravvivenza cellulare. Il test si basa sull'assunto che solo le cellule vitali e che conservano una capacità replicativa saranno in grado di dare origine a colonie cellulari: una cellula può considerarsi sopravvissuta al trattamento se da origine ad una colonia costituita da almeno 50 cellule, cioè se è capace di compiere almeno 6 cicli replicativi.

Le cellule sono state incubate per 4 ore a 37°C nel medium arricchito con BPA alla concentrazione di 80 ppm. Alla fine del tempo di trattamento il medium è stato rimosso e le cellule, dopo essere state lavate per tre volte con PBS, sono state risospese con tripsina, contate, diluite e piastrate a tre diverse concentrazioni (50, 100, 250 cellule/ml) in cinque capsule Petri per ciascuna condizione. Si è proceduto nello stesso modo per le cellule di controllo che sono state coltivate in medium privo di BPA. Dopo circa 15 giorni di crescita a 37°C , le colonie sono state fissate in etanolo 70%, colorate con blu di toluidina e contate per la valutazione della sopravvivenza cellulare al trattamento con BPA rispetto ai controlli.

Il valore di efficienza di piastramento (EP %) è dato dal rapporto fra il numero di cloni ottenuti ed il numero delle cellule seminate secondo la formula:

$$EP(\%) = \frac{N^\circ \text{ cloni}}{N^\circ \text{ cellule seminate}} \cdot 100$$

Dal confronto tra $EP_{\text{controllo}}$ ed $EP_{\text{BPA } 80 \text{ ppm, } 4\text{ore}}$ è possibile determinare la sopravvivenza cellulare S (%) e di conseguenza stabilire se la sostanza somministrata risulta tossica, neutra o addirittura trofica.

3.4 Valutazione dell'assorbimento di ^{10}B : autoradiografia neutronica

Dopo aver verificato che la somministrazione di BPA (80 ppm per 4 ore) non risulti tossica per la linea cellulare U87 è importante stabilire se le cellule tumorali siano in grado di assorbire e trattenere ^{10}B per un tempo sufficiente all'irraggiamento neutronico. Nel dettaglio, lo scopo di questa analisi è verificare che la linea cellulare, dopo l'esposizione a ^{10}BPA , abbia assorbito almeno 25-30 ppm di ^{10}B , requisito fondamentale per la riuscita e l'efficacia del trattamento in seguito all'irraggiamento neutronico.

Per valutare l'assorbimento del boro sono necessarie due fasi distinte di lavoro: la preparazione di un campione biologico, contenente cellule trattate con BPA adagiate su supporti di Mylar e l'autoradiografia neutronica che ne quantifica la concentrazione.

3.4.1 Preparazione di campioni biologici su supporti di Mylar

Le cellule adese alle fiasche di coltura sono state trattate con terreno arricchito con BPA 80 ppm per 4 ore. Esse sono state successivamente risospese con trattamento enzimatico in tripsina, contate e centrifugate in modo da ottenere un pellet contenente 4 milioni di cellule, che sono state risospese nel medium di coltura e adagiate su supporti di Mylar (**figura 3.1**).

Lo stesso protocollo è stato applicato a cellule di controllo, coltivate in terreno privo di BPA. In seguito, entrambi i campioni cellulari sono stati sottoposti all'autoradiografia neutronica, necessaria per la valutazione e quantificazione del ^{10}B intracellulare.

Poiché la linea U87 possiede la caratteristica intrinseca di formare sferoidi di circa 200 μm , si è voluto isolare questa componente cellulare per poter valutare la quantità di ^{10}B internalizzata dopo il trattamento (^{10}BPA 80 ppm, 4 ore).

Per creare il campione biologico, gli sferoidi presenti nel medium di coltura sono stati raccolti in una provetta, centrifugati a 1200 g per 10 minuti ed il pellet ottenuto è stato adagiato su supporto di Mylar per poter essere sottoposto allo stesso protocollo di irraggiamento per la autoradiografia neutronica.

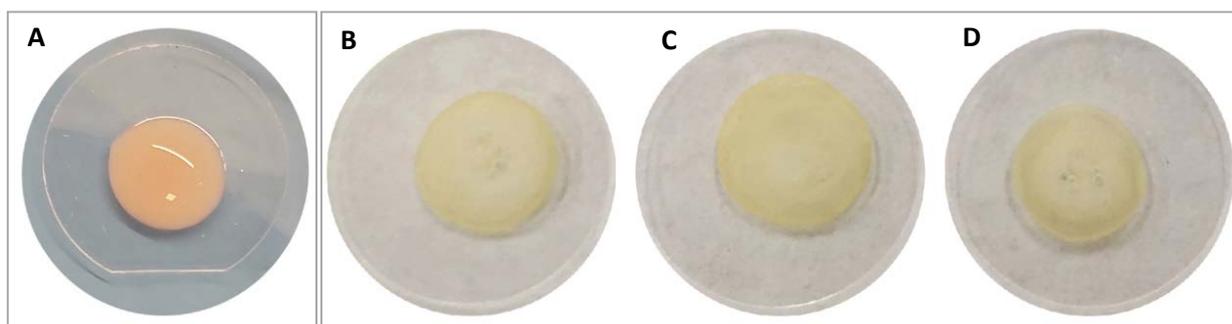


Figura 3.1 (A) Cellule U87 adagiate su supporti di Mylar. Campione non disidratato. (B C) Cellule U87 adagiate su supporti di Mylar. Campioni disidratati (48 ore). (D) sferoidi U87 adagiati su supporti di Mylar. Campioni disidratati.

3.4.2 Protocollo di irraggiamento per l'autoradiografia neutronica

I campioni cellulari (cellule di controllo e cellule trattate con BPA), depositati precedentemente sui supporti di Mylar, sono stati lasciati disidratare completamente per almeno 24 ore per poter poi essere irraggiati. Prima di essere posizionati nella colonna termica del reattore nucleare sono stati messi a contatto con il CR-39 (**figura 3.2**).



Figura 3.2 Campioni cellulari disidratati appoggiati sopra una lastra di CR-39 per successivo irraggiamento neutronico.

Come anticipato nell'introduzione, il CR-39 è un materiale plastico in cui le particelle cariche creano un danno strutturale che può essere visualizzato attraverso un processo di attacco chimico. Il danno prodotto lungo la traiettoria delle particelle cariche nel materiale plastico si manifesta sotto forma di tracce latenti, cioè troppo piccole per essere visibili. In seguito all'irraggiamento si procede quindi allo sviluppo del CR-39 con opportune soluzioni di attacco che ingrandiscono le tracce per la loro visualizzazione al microscopio ottico.

3. Assorbimento intracellulare di ^{10}B e sua quantificazione

Quando i neutroni termici interagiscono con il boro contenuto nel campione avviene la reazione di cattura neutronica e si generano una particella α ed uno ione ^7Li . Tale reazione viene definita *back to back*, ovvero i due prodotti della stessa sono orientati con un angolo di 180° tra loro. Ciò significa che sul rivelatore CR-39 arriverà sempre e solo una delle due particelle generate dalla reazione di cattura. Le particelle prodotte percorrono mediamente $14\ \mu\text{m}$ all'interno del tessuto, tuttavia, essendo il campione disidratato, esse saranno in grado di percorrere una distanza superiore (circa $60\ \mu\text{m}$) (**Figura 3.3**).

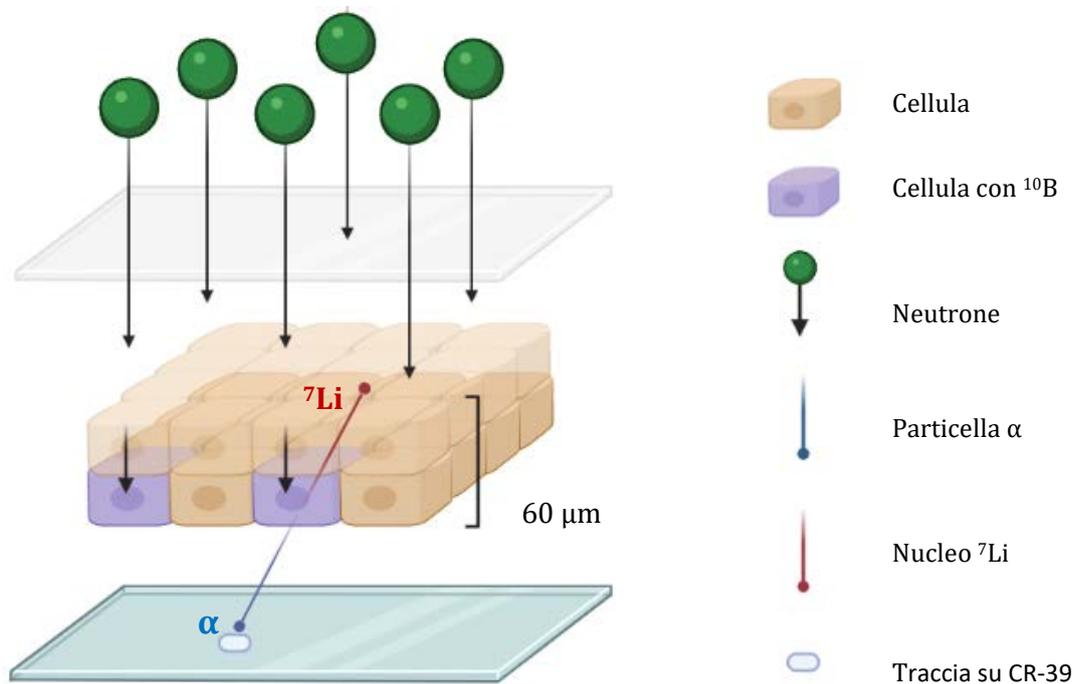


Figura 3.3 Principio fisico dell'autoradiografia neutronica: schema riassuntivo

3. Assorbimento intracellulare di ^{10}B e sua quantificazione

I CR-39, con il campione disidratato a contatto, sono irraggiati nella colonna termica del reattore TRIGA (**figura 3.4**), in una posizione in cui il flusso neutronico è quasi del tutto termico e pari a circa $10^9 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a piena potenza (250 kW).

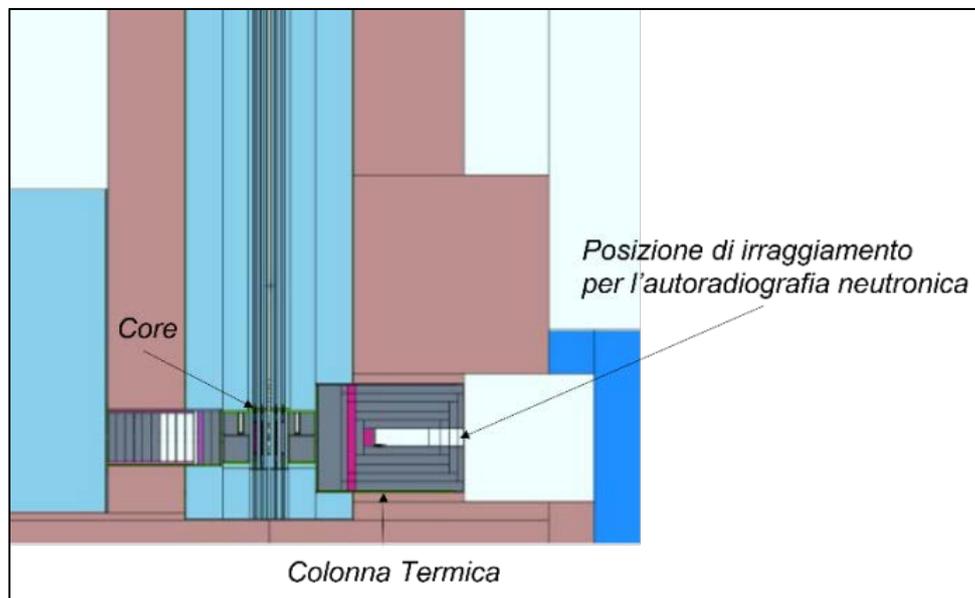


Figura 3.4 Foto del reattore nucleare di ricerca TRIGA Mark II dell'università di Pavia. (a sinistra); schema del reattore: sono indicati il core del reattore (sorgente di neutroni da fissione), la colonna termica (struttura di grafite con canale di irraggiamento) e la posizione in cui vengono irraggiati i CR-39 per la misura della concentrazione del ^{10}B (a destra).

3.4.3 Autoradiografia neutronica qualitativa

L'autoradiografia neutronica qualitativa permette di ottenere immagini sulla distribuzione del boro nel campione (pellet cellulare o sezione di biopsia). Il campione depositato sul CR-39 viene irraggiato per due ore all'interno della colonna termica del reattore TRIGA MARK II (Pavia) alla massima potenza (250 kW) (Bortolussi S. et al., 2011). Le immagini sono sviluppate con una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) ad una temperatura di 70°C per un tempo di 20 minuti. Questo protocollo genera un'alta densità di tracce, una vicina all'altra, che nel processo di sviluppo si ingrandiscono e si sovrappongono. Ciò permette di ottenere un imaging qualitativo della distribuzione del boro, per analizzare l'uniformità dell'assorbimento nelle cellule, e la selettività della captazione nel caso di biopsie di tessuto. In quest'ultimo caso, si può confrontare una sezione di tessuto adiacente a quella utilizzata per l'autoradiografia, montata su vetrino e preparata per analisi istologica. L'imaging del boro permette di verificare se il tumore (visibile nella preparazione istologica) è caratterizzato da una maggiore densità di tracce (visibili nel CR-39).

La **figura 3.5** riporta un esempio di questo tipo di analisi (Altieri S., et al 2008).

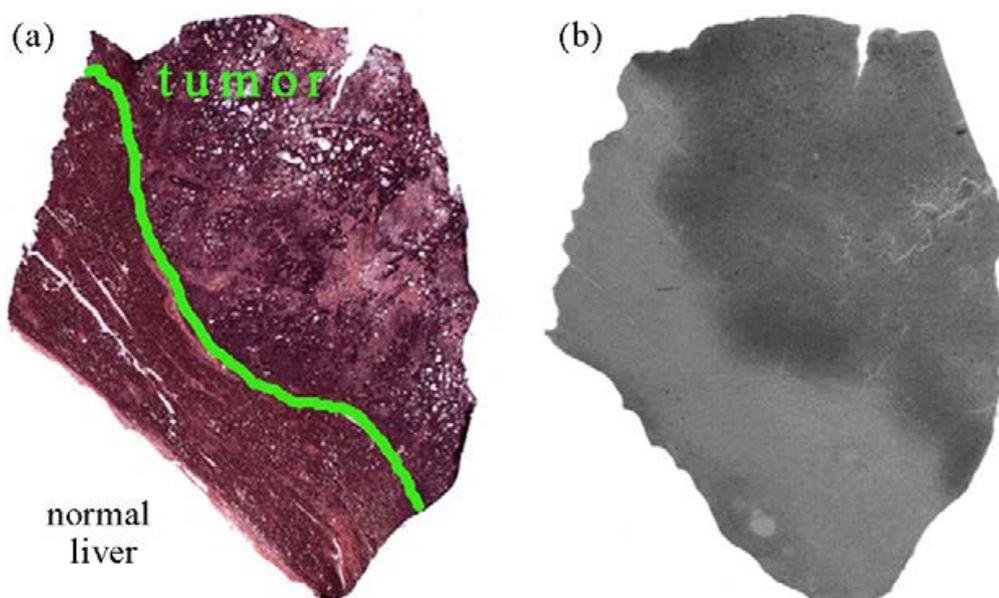


Figura 3.5 A sinistra: preparazione istologica di una sezione di biopsia di tumore al fegato, comprendente una parte tumorale e una di tessuto sano. A destra: autoradiografia neutronica di una sezione di tessuto contigua: si vede la differente densità di traccia tra su tessuto sano e tessuto patologico.

3.4.4 Autoradiografia neutronica quantitativa

Per ottenere la quantificazione della concentrazione di boro nel campione di un tessuto biologico o di un pellet cellulare viene invece utilizzata l'autoradiografia neutronica quantitativa. Questa analisi sfrutta un differente protocollo, sia per quanto riguarda l'irraggiamento neutronico, sia per lo sviluppo chimico delle tracce. Per l'analisi dell'assorbimento del boro, i campioni vengono irraggiati nella stessa posizione in colonna termica, a bassa potenza (2 kW) per 30 minuti, in modo da ricevere una fluena neutronica pari a circa 10^{10} cm^{-2} (Postuma I. et al., 2016).

Per l'analisi quantitativa, lo sviluppo si ottiene con una soluzione basica PEW 40 per circa 10 minuti. La soluzione è mantenuta a temperatura costante (circa 70°C) in un bagno termostato (**Figura 3.6 - sinistra**). Il PEW 40 consuma maggiormente la lastra ove questa è stata precedentemente danneggiata, mentre, il resto della lastra resiste maggiormente all'attacco chimico. Questo processo ha l'effetto di ingrandire il diametro delle tracce fino alla grandezza desiderata. Nel nostro caso, una volta sviluppate, le tracce avranno un diametro compreso tra 1 e $4 \mu\text{m}$.

Dopo aver ottenuto e sviluppato le tracce, il CR-39 è analizzato tramite uno stereomicroscopio Leica dotato di una pedana controllata da software e di fotocamera (**figura 3.6 - destra**). Per ogni campione vengono acquisite 40 immagini rappresentative dell'intera area del campione.

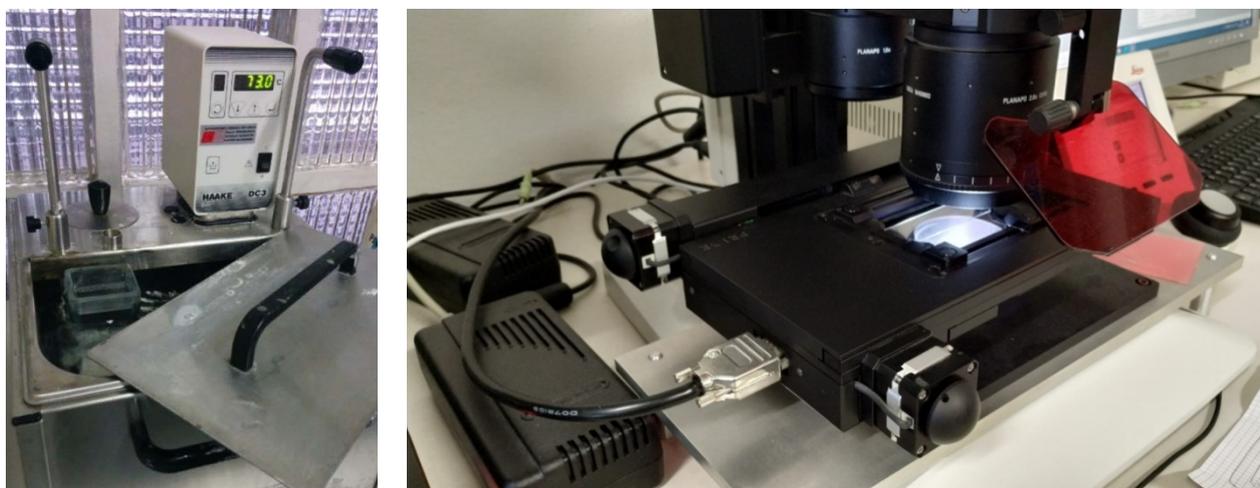


Figura 3.6 Set-up per lo sviluppo dei CR-39 tramite attacco chimico (a sinistra); Pedana motorizzata per l'acquisizione di immagini contigue delle tracce sui CR-39 (a destra)

Le immagini vengono filtrate e un software dedicato viene usato per contare le tracce di ogni immagine (**figura 3.7**). La densità di traccia è quindi il parametro che si usa per poter calcolare la concentrazione del boro. La quantificazione della concentrazione è resa possibile da una curva di taratura precedentemente ottenuta, usando campioni della stessa natura di quelli che si misurano (ad es. pellet cellulari) contenenti una concentrazione nota di ^{10}B . La curva concentrazione-densità di traccia permette di risalire alla concentrazione incognita del campione che si sta misurando attraverso la densità di traccia rilevata (Gadan MA. et al., 2012, Postuma I. et. al.; 2015).

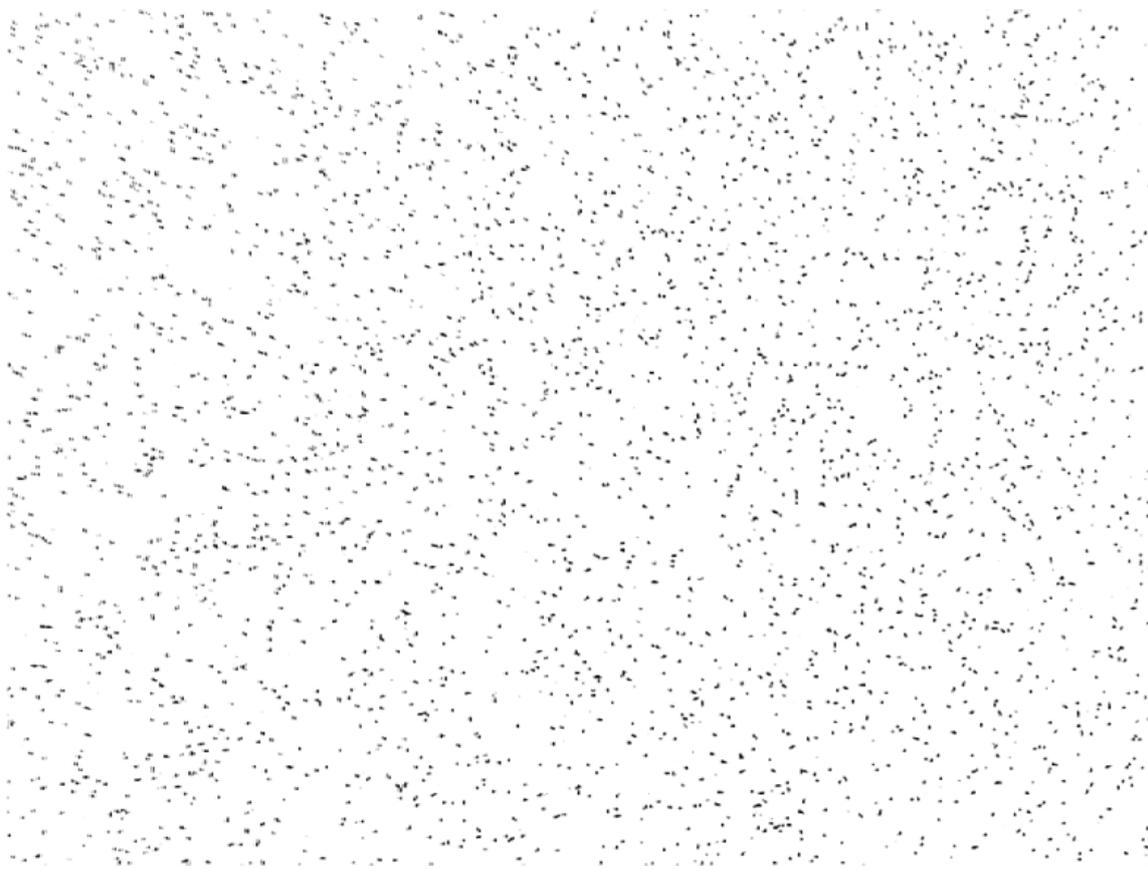


Figura 3.7 Fotografia filtrata per il conteggio delle tracce sul CR-39

4. Irraggiamento neutronico per la misura della sopravvivenza cellulare

4.1 Sorgente di neutroni

Anche l'irraggiamento neutronico per la misura della sopravvivenza cellulare è stato effettuato all'interno della colonna termica del reattore Triga Mark II. In questo caso, la posizione di irraggiamento è più interna, garantendo un flusso termico più alto di un ordine di grandezza rispetto alla posizione di irraggiamento dei CR-39 (**figura 4.1**). La facility garantisce un campo di neutroni termici non collimati con bassa contaminazione di neutroni epitermici e veloci e con una bassa contaminazione gamma (schermata da due strati di bismuto posizionati verso il core del reattore).

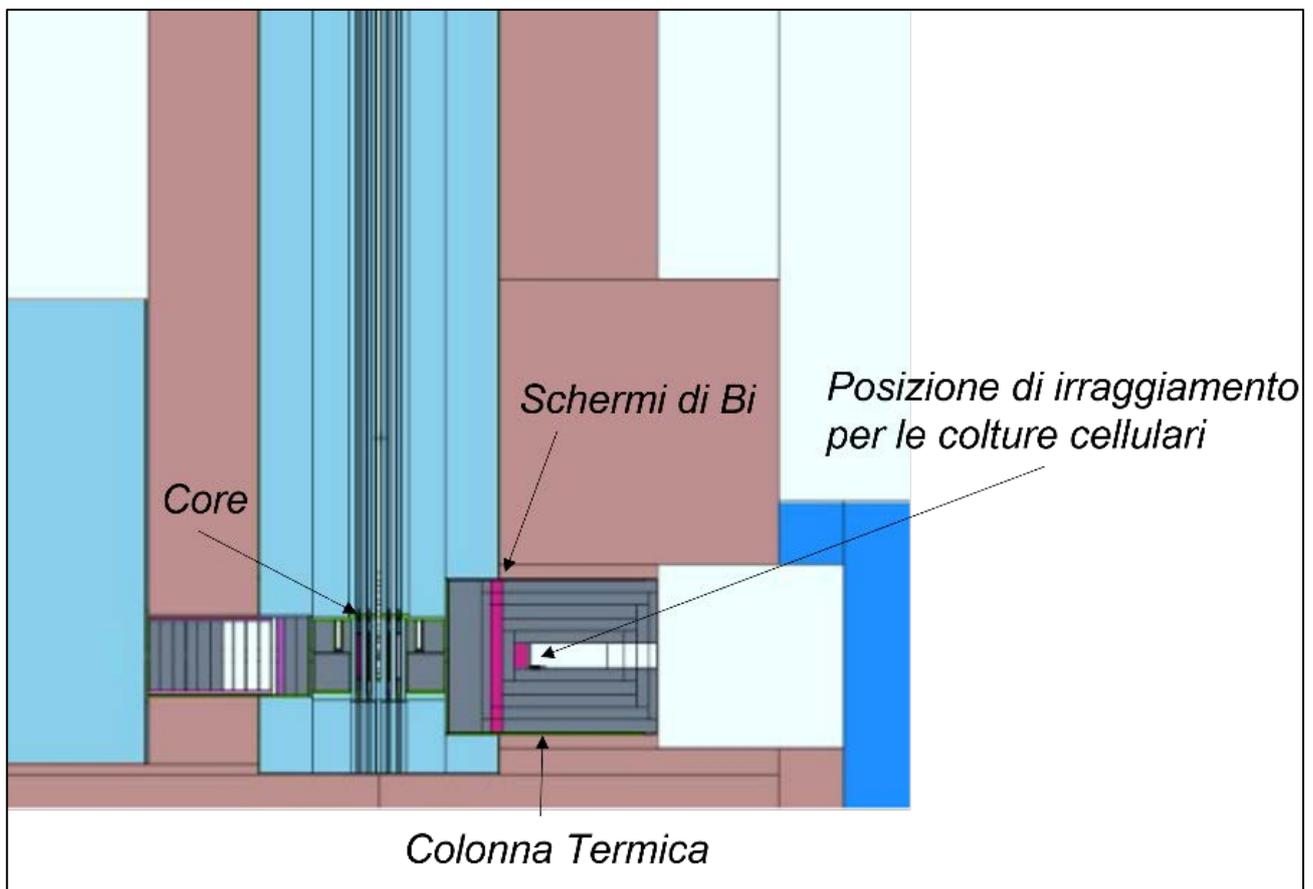


Figura 4.1 Schema del reattore Triga, si evidenzia la posizione di irraggiamento delle cellule

4.2 Protocollo di irraggiamento

Il protocollo prevede il confronto tra fiasche contenenti cellule in quattro diverse condizioni:

- Cellule di controllo non trattate con BPA e non sottoposte ad irraggiamento neutronico (B-R-)
- Cellule trattate con BPA (80 ppm per 4 ore) ma che non subiscono irraggiamento neutronico (B+R-)
- Cellule non trattate con BPA ma sottoposte ad irraggiamento neutronico (B-R+)
- Cellule con trattamento BNCT completo (BPA 80 ppm, 4 ore ed irraggiamento neutronico) (B+R+).

Il confronto tra le diverse condizioni con cui vengono trattate le cellule è fondamentale per dimostrare che l'irraggiamento neutronico, accostato alla somministrazione di un composto borato è letale per le cellule in maniera estremamente più intensa rispetto ai due elementi presi singolarmente. Inoltre, le curve dose-risposta per la BNCT e per l'irraggiamento con soli neutroni permettono di quantificare gli effetti biologici delle diverse componenti della radiazione (prodotti del ^{10}B , protoni da N e da scattering).

Le cellule sono state seminate, 48 ore prima dell'irraggiamento, in fiasche T-75 in 20 ml di terreno, ad una concentrazione tale da permettere il raggiungimento di una confluenza del 70-80%. Prima dell'irraggiamento neutronico il terreno delle fiasche è stato sostituito con 20 ml di terreno fresco. Sia le cellule pretrattate con ^{10}BPA (B+R+), sia le cellule di controllo non trattate (B-R+), sono state esposte al fascio neutronico per 10 minuti, a potenze di irraggiamento crescenti: 7,5 kW, 30 kW, 100 kW, 250 kW. Il tempo di irraggiamento è stato mantenuto costante per evitare che le cellule restino lontano dall'incubatore per troppo tempo. Cambiare la potenza del reattore significa aumentare il flusso neutronico nella posizione di irraggiamento. La fluenza neutronica (flusso moltiplicato per il tempo, che in questi esperimenti è mantenuto costante) aumenta e quindi aumenta il numero di reazioni e la dose depositata nelle cellule. I campioni di controllo pretrattati con boro (B+R-) e i campioni di controllo non trattati (B-R-) sono stati studiati analogamente ai campioni irraggiati. Al termine del prefissato periodo di contatto con ^{10}BPA , immediatamente prima dell'esposizione ai neutroni, è stato rimosso il terreno arricchito in ^{10}B e, dopo tre lavaggi con PBS, è stato sostituito con terreno fresco privo di boro. Anche le fiasche di controllo sottoposte ad irraggiamento hanno subito lo stesso trattamento.

Alla fine dell'irraggiamento il terreno, debolmente radioattivo a causa dell'attivazione neutronica di sodio e cloro, è stato sostituito nuovamente con terreno fresco, per poter trasportare le fiasche all'esterno del LENA, presso il Laboratorio di Chirurgia sperimentale.

5. Irraggiamento con raggi X

Nel protocollo di irraggiamento con fotoni, le cellule vengono sottoposte ad un fascio di raggi X. Pur essendo le cellule prive di terreno arricchito in ^{10}B , anche in questo caso viene effettuato un cambio terreno prima e dopo l'irraggiamento. Le cellule di controllo, che non vengono sottoposte all'irraggiamento, vengono trattate allo stesso modo.

5.1 Sorgente di fotoni

L'irraggiamento con fotoni è avvenuto presso il Policlinico San Matteo di Pavia, sfruttando un irradiatore BestTMTheratronics (Raycell® Mk2 X-ray blood irradiator), comunemente utilizzato per sterilizzare sacche di sangue destinate alle trasfusioni. Questo dispositivo è costituito da una camera schermata con piombo contenente due sorgenti di raggi X opposte da 160 kW (energia media dei raggi X 60-80 keV). Al centro del dispositivo è presente un cassetto rimovibile che ospita un supporto per una sacca da 2 litri, in cui i campioni vengono posizionati ed irraggiati (**figura 5.1**).

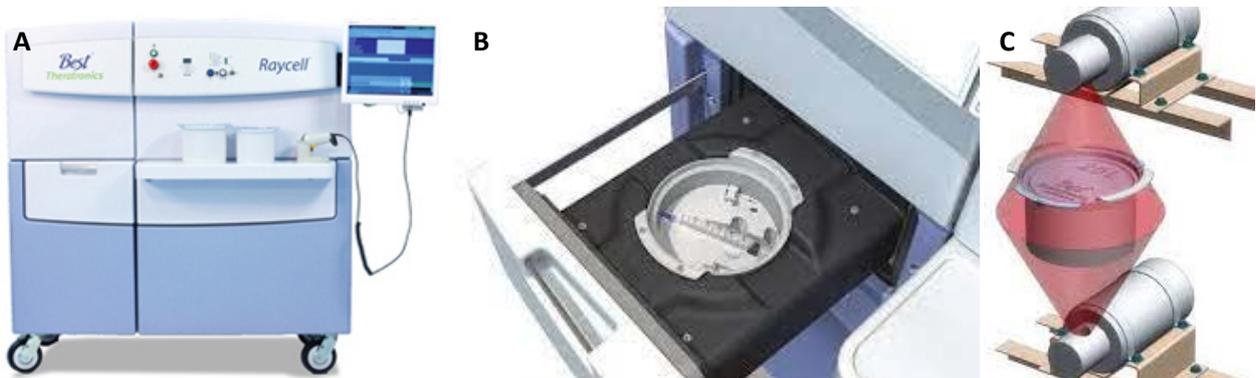


Figura 5.1 Set-up di irraggiamento con i fotoni. BestTMTheratronics (Raycell® Mk2 X-ray blood irradiator) (A). Cassetto rimovibile schermato in piombo (B). Schema di irradiazione a raggi X somministrata al canister (C) (Raycell® Mk2 informative brochure).

I fasci di raggi X hanno un diametro di 20 cm ed erogano ai campioni un rate di dose di radiazione pari a $8.9 \pm 0,4$ Gy/min. Solitamente, i campioni vengono posizionati all'interno del canister in cui è presente un fantoccio tessuto equivalente e, dopo una corretta calibrazione, la dose erogata al campione viene determinata impostando il tempo, considerando il rate di dose prodotta dal flusso di raggi X al centro del campione.

5.2 Protocollo di irraggiamento

Le cellule sono state seminate, 48 ore prima dell'irraggiamento, in fiasche T-25 in 10 ml di terreno, ad una concentrazione tale da permettere il raggiungimento di una confluenza del 70-80%. Prima dell'irraggiamento il terreno delle fiasche è stato sostituito con 10 ml di terreno fresco. Le cellule sono state esposte a diversi valori nominali di dose, modificando il tempo di esposizione al fascio: **0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy**. Terminato l'irraggiamento, tutte le fiasche sono state riportate presso il Laboratorio di Chirurgia Sperimentale e le cellule sono state risospese mediante tripsinizzazione, contaminate in camera di Burker, diluite e seminate in capsule Petri. Anche in questo caso è stato effettuato il test di clonogenicità per verificare la percentuale di cellule sopravvissute alle diverse dosi di radiazione subite.

6. Test per valutare la sopravvivenza ai trattamenti radianti

Per valutare la sopravvivenza cellulare in seguito ai diversi trattamenti radianti è stato utilizzato il test di clonogenicità che permette di calcolare l'efficienza di piastramento (EP %). Tale test risulta essere il metodo più adeguato ed affidabile per valutare la radiosensibilità delle cellule *in vitro*, rispetto ad altre analisi come ad esempio il saggio con bromuro di 3-[4,5dimetiliazol-2il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT), che più comunemente viene utilizzato per valutare la chemio-sensibilità o la tossicità di un farmaco.

Le cellule, al termine dell'irraggiamento neutronico e con radiazioni γ , sono state staccate con trattamento enzimatico in tripsina, contaminate in camera di Burker, opportunamente diluite ed infine, seminate ad almeno tre concentrazioni in 5 capsule Petri per ciascuna condizione. Le concentrazioni cellulari sono state stabilite sulla base della sopravvivenza attesa e comprese nell'intervallo tra 50 e 5000 cellule. Dopo circa 14 giorni, tempo necessario alla formazione di colonie cellulari, queste sono state lavate con tampone Hank, fissate in etanolo (70%), colorate con blu di toluidina e contaminate al microscopio ottico. Il rapporto tra il numero di colonie sopravvissute, ovvero formate da più di 50 cellule, e il numero di cellule originariamente seminate costituisce il valore di efficienza di piastramento (**Figura 6.1**).

$$EP(\%) = \frac{N^\circ \text{ colonie}}{N^\circ \text{ cellule seminate}} \cdot 100$$

La sopravvivenza in seguito ai trattamenti radianti è data dal rapporto tra PE (%) delle cellule trattate e PE (%) dei controlli.

$$S(\%) = \frac{EP_{tr}}{EP_{ctr}}$$

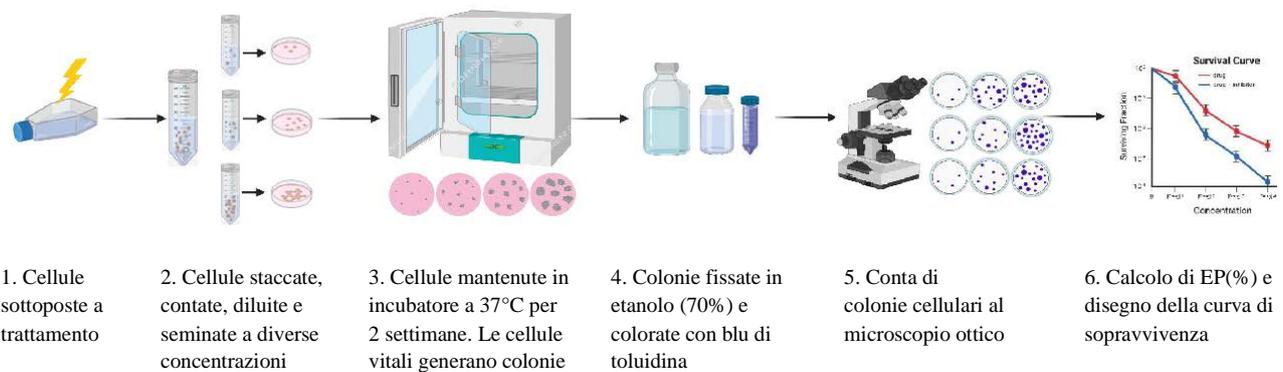


Figura 6.1 Test di clonogenicità e calcolo dell'efficienza di piastramento. Schema riassuntivo.

6. Test per valutare la sopravvivenza ai trattamenti radianti

I dati ottenuti permettono di elaborare una rappresentazione grafica della frazione cellulare sopravvissuta in funzione della dose di radiazione ricevuta. Tale rappresentazione è definita curva di sopravvivenza o curva dose-sopravvivenza.

7. Calcolo della dose somministrata alle cellule

I valori della dose di radiazione assorbita dalle cellule adese, in seguito ad irraggiamento neutronico ed al trattamento BNCT, sono state calcolate mediante una simulazione Monte Carlo (codice di trasporto di particelle nella materia MCNP6). Il modello di reattore costruito con MCNP e validato sia per la componente gamma che per quella neutronica con misure sperimentali, è stato utilizzato per riprodurre gli esperimenti di irraggiamento cellulare (Bortolussi S. et al., 2018). Le fiasche contenenti le cellule sono state simulate come uno strato di tessuto dello spessore di 10 micron (**Figura 7.1**). La dosimetria gamma è stata ottenuta separando la componente dovuta al fondo gamma (proveniente dall'ambiente circostante) dai gamma (2.2 MeV) prodotti nelle cellule e nel terreno dalla cattura neutronica in H. (Ferrari M., 2014). La dosimetria delle particelle cariche è stata ottenuta calcolando inizialmente i rate di cattura nel boro e nell'azoto presenti nelle cellule e, in una simulazione successiva, sono stati trasportati i prodotti di reazione. In quest'ultimo calcolo, è stata creata una sorgente uniforme nello strato cellulare di alfa, litio e protoni nelle corrette proporzioni ed energie. In seguito, è stata calcolata la dose di radiazione depositata da queste ultime nelle cellule per poi sommarla alla dose gamma. La parte dovuta al boro è stata calcolata per concentrazione unitaria e in seguito ri-normalizzata per la concentrazione sperimentale corrispondente ai singoli irraggiamenti: per ogni irraggiamento, la concentrazione di boro è stata misurata con autoradiografia neutronica quantitativa (Marcaccio B., 2020, Postuma I., et al., 2021).

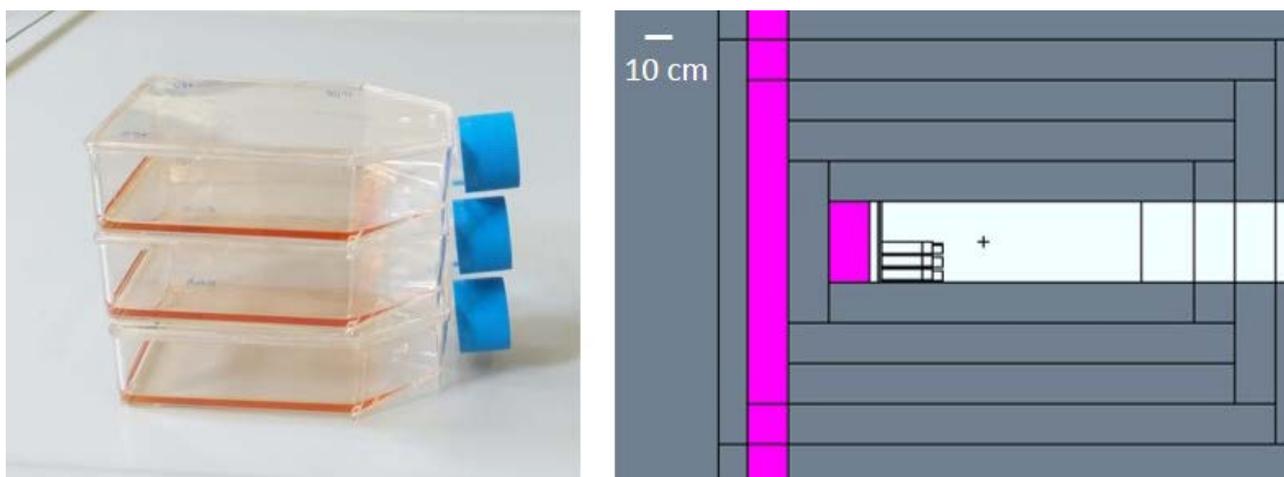


Figura 7.1 Tre fiasche per l'irraggiamento (a sinistra); simulazione delle fiasche nella posizione di irraggiamento alla fine della colonna termica del reattore TRIGA (a destra).

Anche la dose assorbita a causa dell'irraggiamento con i raggi X è stata simulata. Un set-up equivalente all'irradiatore è stato riprodotto con MCNP per valutare la correzione da apportare al valore nominale della dose dovuta alla diversa posizione delle fiasche rispetto al punto in cui è collocato il rivelatore per la calibrazione (**Figura 7.2**).

Fantoccio tessuto-equivalente

Figura 7.2 Simulazione della flask entro il canister dell'irradiatore, adagiata sopra al fantoccio tessuto equivalente.

Risultati e discussione

1. Osservazioni sulla linea cellulare U87

Come anticipato nel capitolo 2.1 dell'introduzione, la linea cellulare U87 si caratterizza per la sua tipologia di crescita bimodale: essa presenta una fase precoce in cui le cellule crescono adese alla fiasca, formando un monostrato cellulare, ed una fase più tardiva in cui le cellule formano sferoidi che si staccano dal monostrato e proseguono la crescita fluttuando nel surnatante. Gli sferoidi con diametro superiore a 200 μm , dopo essersi staccati autonomamente dal monostrato in adesione, sono stati isolati e trasferiti in una fiasca T-75 per crescita in sospensione. Dopo circa 10 giorni tali sferoidi sono stati nuovamente seminati in adesione. Si è osservato che la componente sferoidale è in grado di ripristinare le condizioni di crescita in adesione. L'immagine sottostante (**figura 1.1**) mostra un risultato simile a quello ottenuto da A.Yilmazer (Yilmazer A., 2018, figura 2.1 a pag. XX): le cellule U87 crescono come un normale monostrato cellulare (sinistra) ma generano anche sferoidi fluttuanti nel surnatante (destra) che mantengono capacità di crescita, proliferazione e colonizzazione (**figura 1.2**).

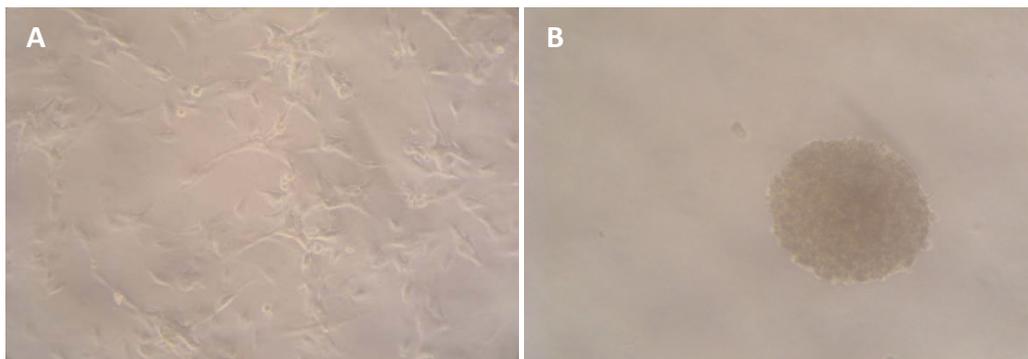


Figura 1.1 Cellule U87 in monostrato cellulare (sinistra) e sferoidi in sospensione (destra). Immagine acquisita con microscopio capovolto, ingrandimento 20x.

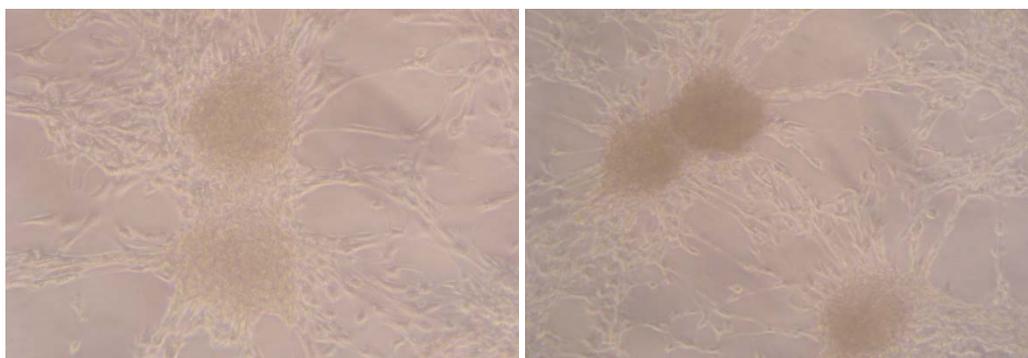


Figura 1.2 Sferoidi (U87) isolati dal monostrato cellulare, coltivati in sospensione con terreno privo di siero e riseminati in fiasche da adesione. Immagini acquisite 10 giorni dopo il trapianto con microscopio capovolto, ingrandimento 20x.

2. Studio dell'assorbimento cellulare del ^{10}B

2.1 Dati sulla citotossicità di $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ (80 ppm, 4 ore): test di clonogenicità

Lo studio della tossicità del composto $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ sulla linea cellulare U87 è stato effettuato preliminarmente, per valutare se la morte cellulare misurata in seguito ad irraggiamento non sia dovuta in parte alla somministrazione della sostanza borata. La figura 2.1 riporta i risultati di sopravvivenza cellulare in seguito al trattamento con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ (80 ppm, 4 ore) ottenuti tramite test di clonogenicità.

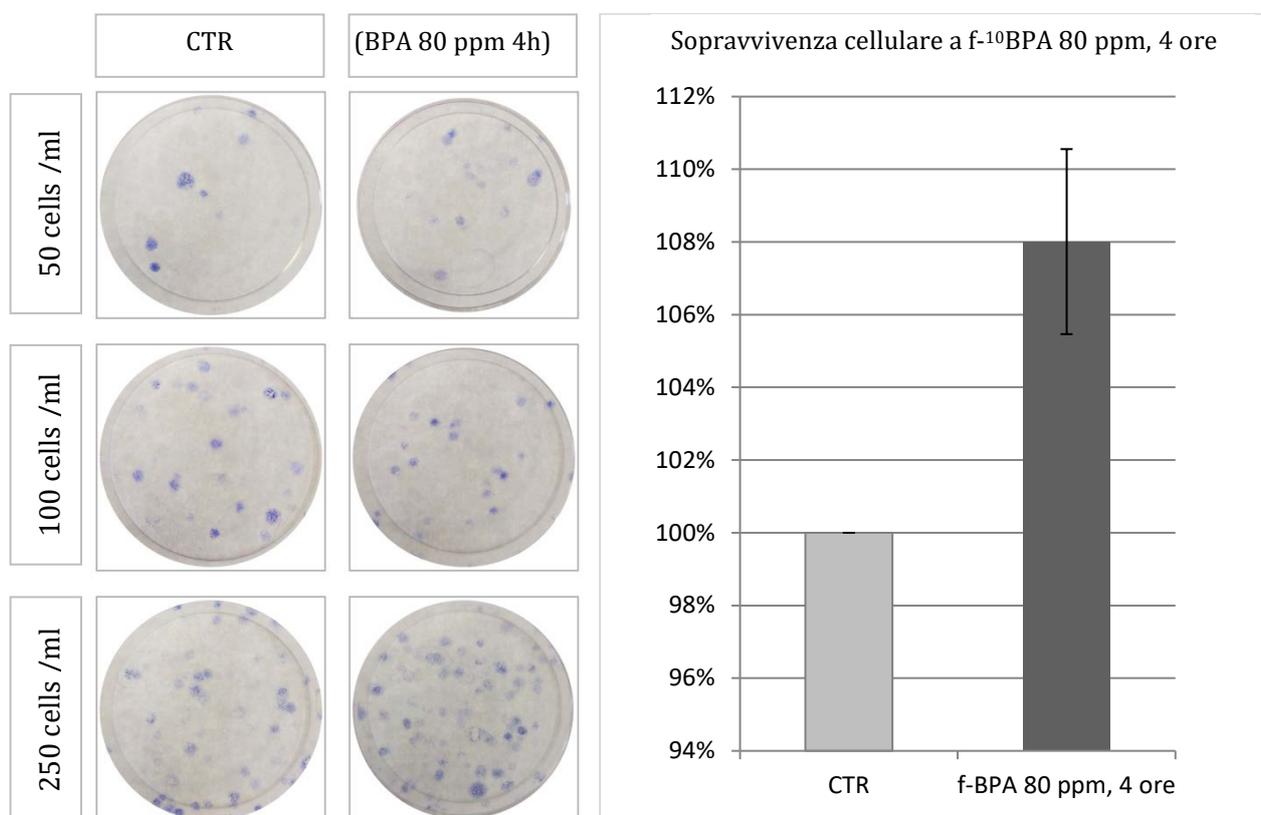


Figura 2.1 Risultati dello studio di citotossicità in cellule trattate con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ (80 ppm per 4 ore) e cellule di controllo. A sinistra: risultati del test di clonogenicità che permettono di calcolare la sopravvivenza cellulare; a destra: sopravvivenza percentuale delle cellule trattate rispetto ai controlli.

La **figura 2.1** raccoglie i risultati di diversi esperimenti di citotossicità. I dati mostrano che l'esposizione delle cellule U87 alla soluzione $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ (80 ppm) per 4 ore non presenta alcun tipo di tossicità. Al contrario, si riscontra un aumento del numero di cellule nelle fiasche sottoposte al trattamento con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$, rispetto alle cellule di controllo. L'esposizione al composto borato, infatti, promuove una crescita cellulare, come si vede dalla sopravvivenza media misurata: $(108.0 \pm 2.5)\%$. Tale fenomeno non è raro ed è stato osservato in numerose altre linee cellulari sottoposte a $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ come linee di osteosarcoma (UMR-106), linee di carcinoma pancreatico (PANC-1) e linee primarie isolate da tumori head-neck (UTSSC-2) (Ferrari C. et al., 2008). Questo comportamento si può spiegare considerando che ^{10}BPA deriva da un amminoacido essenziale, la fenilalanina, fondamentale per il metabolismo cellulare, che non danneggia in alcun modo la cellula, e che, al contrario, ne costituisce un fattore trofico.

2.2 Quantificazione dell'uptake di ^{10}B da parte della linea cellulare

La **figura 2.2** mostra la foto di un pellet cellulare irraggiato (a sinistra) accanto all'imaging della distribuzione del boro ottenuto tramite autoradiografia neutronica qualitativa (a destra). La **figura 2.3** mostra lo stesso confronto per un pellet di sferoidi, con la sovrapposizione dell'imaging del boro alla foto degli sferoidi (riquadro c). L'imaging autoradiografico permette di affermare che, da un punto di vista qualitativo, la distribuzione di ^{10}B è uniforme: ciò significa che, mediamente, tutte le cellule contenute nel pellet hanno assorbito la stessa quantità di ^{10}B . Le fotografie acquisite al microscopio mostrano che l'immagine delle tracce sul CR-39 sono perfettamente sovrapponibili ai campioni cellulari, sia quelli contenenti 4 milioni di cellule adese, sia quelli costituiti da sferoidi.

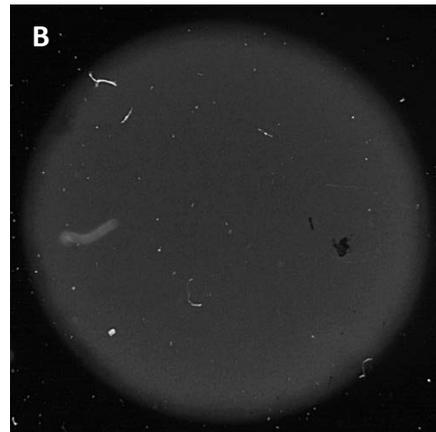


Figura 2.2 Analisi qualitativa (imaging della distribuzione del ^{10}B) di campioni contenenti 4 milioni di cellule adese. pellet cellulare (A), autoradiografia neutronica qualitativa (B)

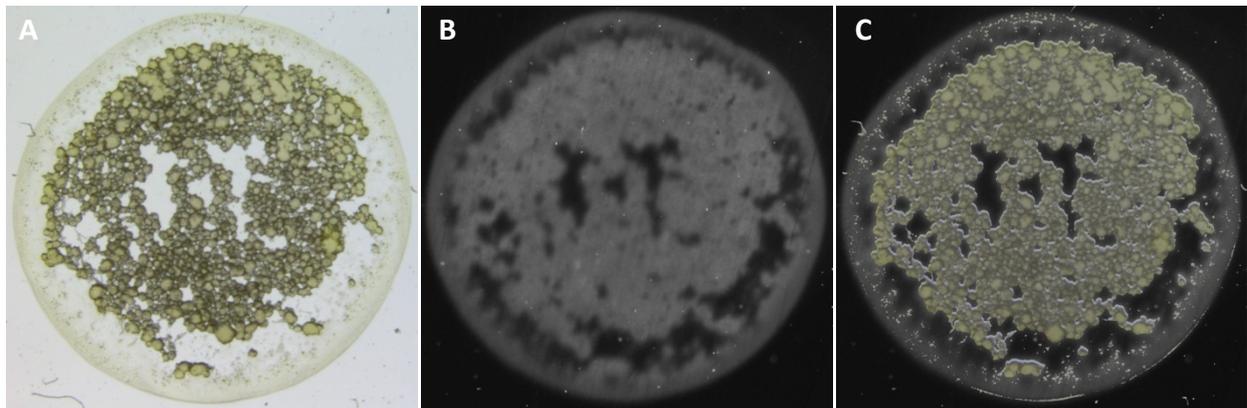


Figura 2.3 Analisi qualitativa (imaging della distribuzione del ^{10}B) di campioni contenenti sferoidi. Pellet cellulare (A), autoradiografia neutronica qualitativa (B) sovrapposizione delle tracce al pellet cellulare (C).

Nella **tabella I** vengono illustrati i risultati della misura della concentrazione del ¹⁰B ottenuti con autoradiografia neutronica quantitativa applicata a campioni di cellule U87 e a campioni di sferoidi.

Linea	trattamento	tipo	tracce (tracks)	Errore (tracks)	¹⁰ B (ppm)	Errore (ppm)
U87	BPA 4h	Adese	49,5	1	23	1
U87	BPA 4h	Sferoidi	46	1	21	1
U87	BPA 4h	Adese	57	1	26	1
U87	BPA 4h	Sferoidi	37	1	17	1
U87	BPA 4h	Sferoidi	25	1	11	1
U87	BPA 4h	Sferoidi	34	1	16	1

Tabella I Analisi quantitativa (misura della concentrazione di ¹⁰B) in campioni cellulari e campioni di sferoidi

Complessivamente la linea U87 presenta un discreto e sufficiente uptake di ¹⁰B in seguito al trattamento per 4 ore con f-¹⁰BPA. Tuttavia, esiste una importante differenza di assorbimento tra i campioni contenenti 4 milioni di cellule adese ed i campioni contenenti sferoidi: le cellule adese hanno assorbito mediamente 25 ± 2 ppm di boro, mentre la componente sferoidale mostra un assorbimento medio pari a 16 ± 13 ppm di boro. Si vede che i risultati ottenuti sugli sferoidi sono decisamente eterogenei rispetto ai risultati costanti ed omogenei delle cellule adese: questo aspetto suggerisce che i più bassi livelli di assorbimento del boro non sono da ricondurre tanto all'incapacità dello sferoide di captare boro quanto alla difficoltà di creare campioni omogenei di sferoidi. In questo caso non è stato infatti possibile creare un campione contenente 4 milioni di cellule dal momento che non si è in grado di determinare con precisione il numero di cellule contenute in uno sferoide. Questa difficoltà si ripercuote inevitabilmente nell'interpretazione dei risultati: i CR-39 su cui sono stati analizzati gli sferoidi presentano numerose lacune, in cui non è presente il campione. Ciò comporta che in queste zone l'autoradiografia misurerà una concentrazione di ¹⁰B pressoché pari a zero; al contrario, le zone della lastra in cui è presente lo sferoide permettono di misurare una certa concentrazione di ¹⁰B assorbito diversa da zero. Nonostante sia possibile eliminare le immagini prive di tracce prima che il software le utilizzi per il calcolo della concentrazione, la disomogeneità nel campione provoca inevitabilmente un abbassamento del valore medio misurato del ¹⁰B assorbito.

3. Studio della sopravvivenza a trattamenti radianti

3.1 sopravvivenza cellulare: irraggiamento neutronico e BNCT

In questa sezione verranno mostrati i risultati di sopravvivenza cellulare (EP %) ottenuti con il test di clonogenicità, in seguito a due diversi protocolli: irraggiamento neutronico senza $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ ed un trattamento BNCT completo ($f\text{-}^{10}\text{BPA}$ e neutroni).

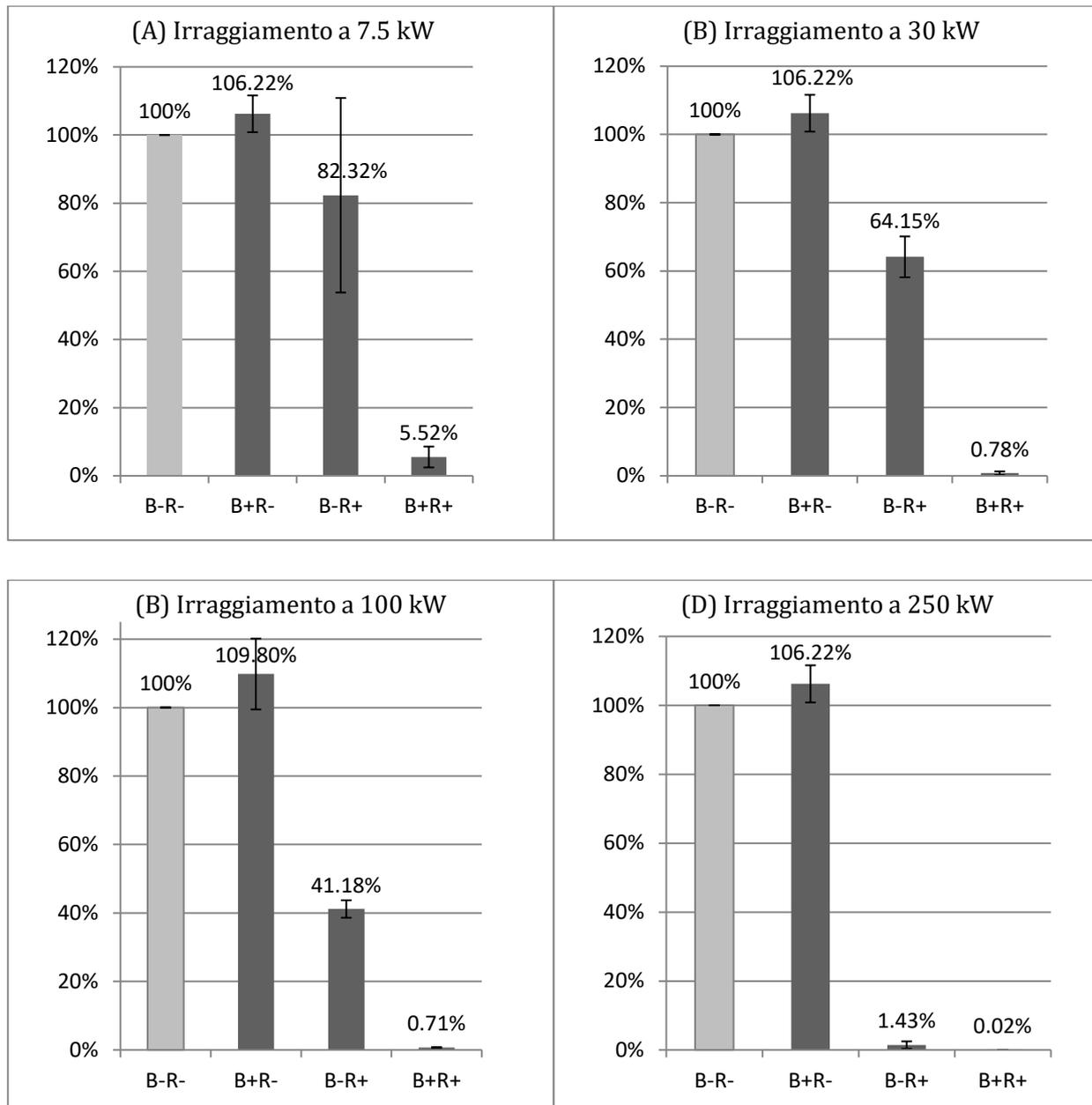


Figura 3.1 Sopravvivenza cellulare in seguito a diverse condizioni di trattamento: controlli (B-R-), trattamento con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ senza irraggiamento neutronico (B+R-), irraggiamento neutronico senza $f\text{-}^{10}\text{BPA}$, (B-R+), irraggiamento neutronico con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ (B+R+). Potenze di irraggiamento: (A) 7,5 kW, (B) 30 kW, (C) 100 kW, (D) 250 kW.

Gli istogrammi in **Figura 3.1** riportano i dati relativi alla sopravvivenza cellulare in seguito ai protocolli di irraggiamento. Ogni grafico considera le quattro differenti condizioni di trattamento a cui vengono sottoposte le cellule: la prima colonna (B-R-) indica la sopravvivenza (%) di riferimento ottenuta su campioni di controllo, ovvero cellule che non vengono sottoposte ad irraggiamento e non vengono trattate con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$; la seconda colonna (B+R-) indica la percentuale di sopravvivenza delle cellule che sono state trattate con la sostanza borata ma che non hanno subito irraggiamento; la terza colonna (B-R+) indica invece la sopravvivenza di cellule che non vengono trattate con $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ ma ricevono un irraggiamento neutronico; La quarta colonna mostra i dati di sopravvivenza in seguito a BNCT (somministrazione di $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ e irraggiamento con neutroni).

Sono riportati quattro istogrammi perché l'esperimento è stato ripetuto per quattro volte: le cellule, a parità di condizioni sono state sottoposte a diverse fluenze neutroniche ottenute aumentando la potenza del reattore (7,5 kW, 30 kW, 100 kW e 250 kW) e mantenendo il tempo di irraggiamento sempre uguale a 10 min. Ulteriori dettagli sono stati riportati nella **tabella II**.

Dagli istogrammi si evince che la sostanza $f\text{-}^{10}\text{BPA}$ non induce alcun tipo di morte cellulare, come già precedentemente dimostrato nel corso degli studi di tossicità sopra descritti. Il solo irraggiamento con neutroni invece determina una certa morte cellulare, dipendente dalla fluenza neutronica, anche in assenza di ^{10}B . Questo è dovuto al fatto che il neutrone è in grado di interagire anche con specie atomiche differenti dal boro, provocando reazioni che danneggiano la cellula: reazioni di scattering con atomi di idrogeno e reazioni di cattura con atomi di idrogeno e atomi di azoto. Infine, il trattamento completo BNCT risulta essere nettamente più efficace nell'uccidere le cellule tumorali. L'aspetto interessante risiede nel fatto che con BNCT si è in grado di uccidere una enorme quantità di cellule tumorali già a basse potenze di irraggiamento. All'aumentare della fluenza neutronica si assiste ad un aumento della dose assorbita da parte delle cellule, tuttavia l'utilizzo del composto borato permette di ottenere una componente di dose specifica, generata dalle reazioni di cattura neutronica da parte del ^{10}B , che è in grado di dominare la dose di radiazione totale. Questo è un aspetto cardine del trattamento BNCT perché permette di ottenere una dose specifica elevata utilizzando potenze di irraggiamento relativamente basse.

Potenza del reattore	Sopravvivenza (%) neutroni	Sopravvivenza (%) BNCT
7,5 kW	82,3% ($\sigma = 28,5$)	5,5 ($\sigma = 3,0$)
30 kW	64,1% ($\sigma = 6,0$)	0,8 ($\sigma = 0,5$)
100 kW	41,2 ($\sigma = 2,5$)	0,7 ($\sigma = 0,13$)
250 kW	1,4 ($\sigma = 1,1$)	0,002 ($\sigma = 0,015$)

Tabella II Dati relativi alla sopravvivenza cellulare in seguito ai trattamenti radianti a diverse potenze di irraggiamento.

Con σ viene indicata la deviazione standard della media ottenuta dai valori di sopravvivenza calcolati su 3 diluizioni

3. Studio della sopravvivenza a trattamenti radianti

preparate per la semina (descrivi bene la cosa delle 3 diluizioni) Per ogni valore di potenza si è condotto un solo irraggiamento.

È fondamentale mettere in evidenza che normalmente non sarebbe significativo rappresentare la sopravvivenza cellulare in funzione della fluenza neutronica, e cioè della potenza del reattore. Infatti, cellule irraggiate in giorni diversi, possono aver assorbito diverse concentrazioni di boro, e quindi la dose assorbita può essere drasticamente diversa. Per questa ragione misurare il boro in colture cellulari trattate allo stesso modo rispetto a quelle irraggiate è di fondamentale importanza: permette infatti di valutare adeguatamente la dose di radiazione a cui associare il valore misurato della sopravvivenza cellulare (Marcaccio B.; 2020, Postuma I.; 2021). In questa serie di esperimenti, tuttavia, la concentrazione di boro assorbita in ogni irraggiamento è stata sempre circa uguale a 20 ppm, quindi a potenze crescenti corrispondono anche dosi crescenti.

Si costruiscono così le curve di dose-sopravvivenza che mostrano l'efficacia del trattamento BNCT rispetto al solo irraggiamento neutronico. Per ottenere le curve dose-sopravvivenza, è necessario calcolare la dose assorbita tramite simulazione Monte Carlo, considerando i complessi meccanismi di interazione radiazione-materia nel campo misto dovuto alla BNCT. In questa tesi, sono stati utilizzati i valori di dose calcolati con il minor numero di approssimazioni possibili, simulando tutte le particelle secondarie generate dai neutroni e dai fotoni presenti nella posizione di irraggiamento del reattore TRIGA. Dettagli sul modello Monte Carlo che rappresenta il reattore e sulle strategie di calcolo si possono trovare (Marcaccio B.; 2020).

3.2 Sopravvivenza cellulare: irraggiamento con raggi X

La curva in **Figura 3.2** e la **tabella III** mostrano i dati di sopravvivenza cellulare in seguito ad irraggiamento con fotoni in funzione della dose assorbita. In questo caso, la dose di radiazione è quella nominale ottenuta da calibrazione dello strumento, corretta per tenere conto della geometria di irraggiamento, sempre attraverso calcoli di Monte Carlo (Guidi C.; 2019).

La curva mostra chiaramente che all'aumentare della dose assorbita dalle cellule (aumentando il tempo di esposizione al fascio radiante) la sopravvivenza cellulare si abbassa, come atteso.

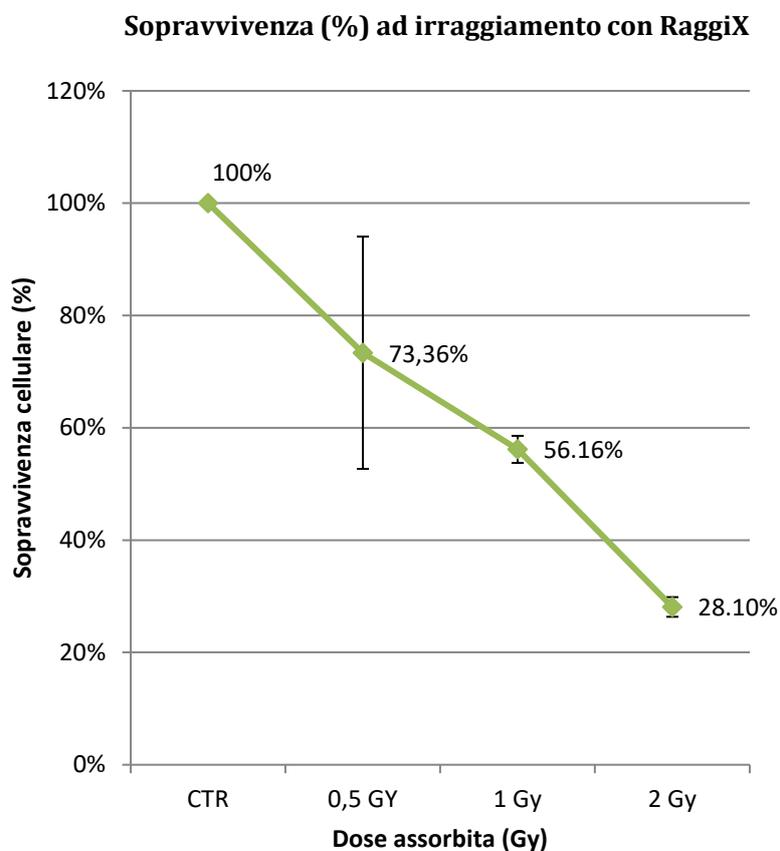


Figura 3.2 Curva dose-sopravvivenza in seguito ad irraggiamento con raggi X.

Dose assorbita (Gy)	Sopravvivenza cellulare (%) ai raggi X
0, 5	73,4 ($\sigma = 22,7$)
1	56,2 ($\sigma = 2,4$)
2	28,1 ($\sigma = 1,7$)

Tabella III Dati relativi alla sopravvivenza cellulare in seguito ad irraggiamento con raggi X.

4. Curve dose-sopravvivenza

La probabilità di sopravvivenza cellulare dopo singole somministrazioni di radiazioni ionizzanti varia in funzione della dose assorbita (misurata in Gy). La caratteristica forma della curva dose-sopravvivenza delle cellule in seguito ad irraggiamento con radiazione a medio-basso LET mostra sempre una regione iniziale, a basse dosi, definita “spalla”, ed una regione decisamente più ripida a dosi più elevate. La presenza della spalla è spiegabile con l’accumulo di danni sub-letali a basse dosi ed una letalità che deriva dall’interazione di due o più lesioni sub-letali.

Un modello semplificato per descrivere la morte cellulare in funzione della dose assorbita da radiazioni ionizzanti presuppone che:

- Il DNA è la molecola bersaglio
- un doppio rottura del filamento nel DNA è necessaria e sufficiente a causare la morte cellulare (definita come perdita di capacità di dividere).
- Una rottura del doppio filamento può essere prodotto da una traccia di una singola particella o dall’interazione di due rotture a filamento singolo che si verificano strettamente nello spazio e nel tempo
- le rotture a singolo filamento possono essere riparate e quindi rappresentano danni sub-letali.

Il modello che si ricava da queste considerazioni è chiamato modello lineare quadratico.

Il modello lineare quadratico (modello LQ) rappresenta un principio cardine della radiobiologia ed è in grado di descrivere la doppia azione di una radiazione sulle cellule: le lesioni letali prodotte al DNA cellulare, in seguito all’esposizione ad una radiazione, derivano sia dall’azione diretta di un singolo evento ma anche dall’azione di due eventi indipendenti che causano un danno di una certa entità e che insieme portano una lesione letale per la cellula. Il primo caso si verifica in maniera proporzionale alla dose assorbita mentre il secondo caso dipende dal quadrato della dose.

Matematicamente, il modello LQ è descritto dalla funzione:

$$S(D) = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

dove:

- S è la sopravvivenza cellulare
- D è la dose assorbita
- α è la costante di proporzionalità che collega la letalità cellulare al danno per singolo evento, (dipendenza lineare)
- β è la costante di proporzionalità che collega la letalità cellulare al danno per somma dei danni subletali (dipendenza quadratica).

Nell'equazione è dunque presente un termine lineare con la dose, rappresentativo di quegli eventi che sono in grado di causare una rottura della doppia elica del DNA, portando alla morte cellulare o all'inattivazione cellulare. Con inattivazione cellulare si intende che la cellula perde la sua naturale capacità di riprodursi: pur non essendo morta, essa finirà per scomparire. L'altro termine è proporzionale al quadrato della dose, e risulta da due eventi indipendenti, ciascuno dei quali proporzionale alla dose. Entrambi gli eventi rompono il filamento di DNA, e solo la loro combinazione causa il danno letale. Essi devono interagire per produrre una lesione letale, ammesso che coesistano nello spazio e nel tempo. Non necessariamente una rottura della doppia elica del DNA corrisponde a un danno letale alle cellule. In generale, se le cellule sono normali, il danno può essere riparato molto facilmente. Tuttavia, nelle cellule tumorali i meccanismi di riparazione del danno sono meno efficaci.

Poiché il danno subletale può essere riparato dopo una dose di radiazioni, le cellule con un rapporto α/β più basso tendono a resistere meglio alle radiazioni rispetto a cellule con un rapporto α/β più grande. Questa è la base teorica per la radioterapia frazionata.

Sono stati messi a punto nel tempo modelli più precisi e specifici per descrivere la sopravvivenza cellulare in funzione della dose. Uno di questi modelli è usato per il calcolo della dose isoeffettiva: è il modello lineare quadratico modificato descritto da González e Santa Cruz nel 2012 (González S.J. Santa Cruz, 2012). Tale modello tiene conto anche del riparo ai danni sub letali durante l'irraggiamento e del sinergismo, cioè della concomitanza di due o più danni sub letali che possono generare un danno letale.

Le curve dose-sopravvivenza relative ai diversi trattamenti radianti sono riportate in **figura 4.1**. I grafici sono stati costruiti riportando in ordinata i dati di sopravvivenza cellulare (%) ricavati con il test di clonogenicità ed in ascissa quelli relativi alle corrispondenti dosi assorbite, calcolate tramite Monte Carlo e tenendo conto dei valori della concentrazione di boro intracellulare per ciascun esperimento di irraggiamento. I punti rappresentano i risultati sperimentali della sopravvivenza cellulare ottenuti come descritto sopra. I tre punti utilizzati per costruire la curva dose sopravvivenza dei fotoni sono stati ottenuti rispettivamente a 0,5, 1 e 2 Gy, mentre i punti sperimentali relativi all'irraggiamento neutronico ed alla BNCT sono stati ottenuti con irraggiamenti a 7,5, 30, 100 e 250 kW di potenza del reattore.

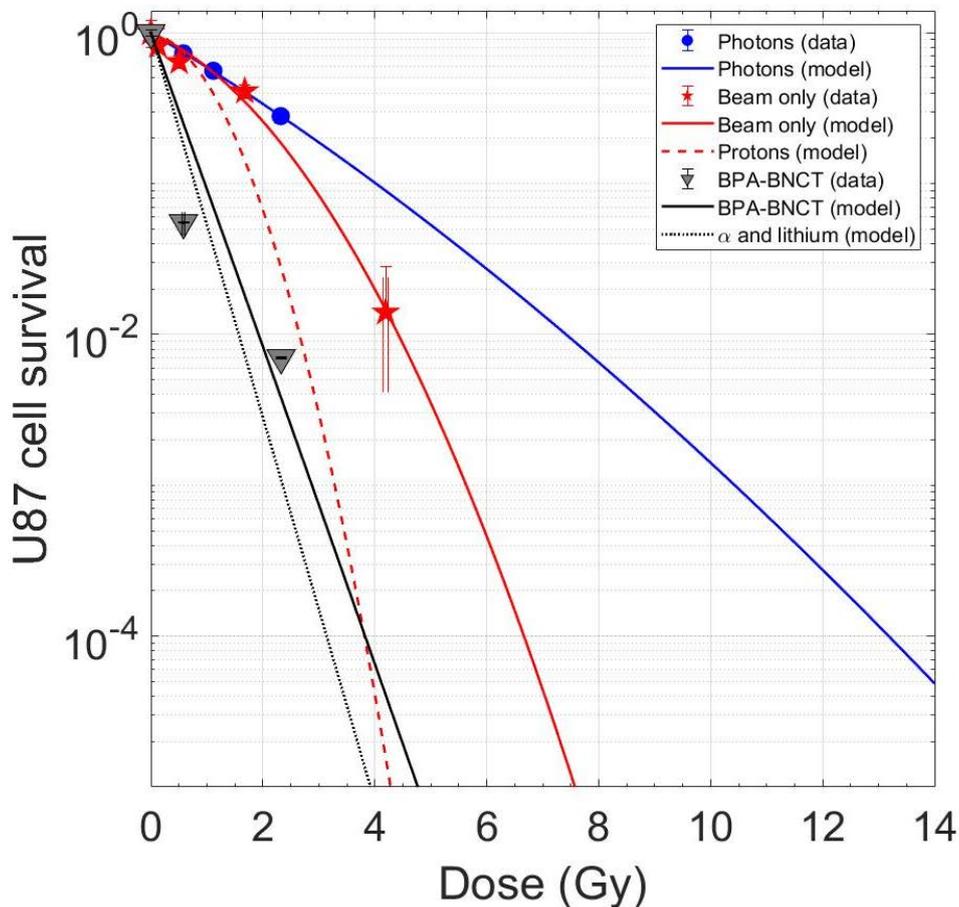


Figura 4.1 Curve di sopravvivenza della linea cellulare U87 in funzione della dose assorbita per irraggiamento con raggi X (blu), con neutroni (rosso) e con neutroni in presenza di boro (nero). I punti sono i dati sperimentali, le linee continue il fit con il modello lineare quadratico modificato e le linee tratteggiate le curve dovute al solo contributo dei neutroni (senza gamma) e al solo contributo del boro (senza neutroni e gamma).

Osservando le curve è possibile concludere immediatamente che, a parità di dose assorbita, il trattamento BNCT risulta essere indubbiamente più efficiente, sia dell'irraggiamento tradizionale con fotoni, sia dell'irraggiamento neutronico senza boro.

Le curve sono state fittate utilizzando il modello lineare quadratico modificato descritto sopra: le curve continue rappresentano la funzione fit. Questa procedura ha permesso di calcolare i parametri α e β per le curve ottenute con i fotoni, con i neutroni e con la BNCT. Una volta noti i parametri, è possibile graficare le curve che, secondo il modello appena calcolato tramite fit, corrisponderebbero alla sopravvivenza dovuta a solo neutroni (senza il contributo dei fotoni) e solo boro (senza neutroni e fotoni). Queste curve teoriche sono rappresentate con le linee tratteggiate, e sono queste che si devono usare per calcolare i valori di RBE e CBE.

I parametri del fit delle tre curve sono riportati in **tabella IV**

Componente di dose	α (Gy ⁻¹)	Intervallo di confidenza (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	Intervallo di confidenza (Gy ⁻²)
Raggi X	0.51	0.49 - 0.53	0.015	0.004 – 0.027
Neutroni	0.18	0 – 0.99	0.88e-4	(0.72 - 1.04)e-4
Boro	2.93	2.34 – 3.53	0	-

Tabella IV: parametri del fit ottenuti per le tre diverse componenti di dose.

Per calcolare RBE e CBE si fissa un endpoint, come descritto nell'Introduzione. Per coerenza con quanto riportato nella letteratura, abbiamo scelto il valore di sopravvivenza pari a 1% e abbiamo calcolato i valori di dose da raggi X, da neutroni e da boro necessari per ottenere questa sopravvivenza. Applicando la definizione di RBE e CBE, abbiamo ottenuto i seguenti valori:

$$\text{RBE}=3.1 - \text{CBE}=4.4$$

Questi valori esprimono l'Efficacia Biologica Relativa della componente di dose dovuta ai neutroni (termici e veloci) rispetto ai raggi X e quella della componente boro rispetto ai raggi X.

I valori di riferimento per il calcolo della dose per i pazienti con tumori cerebrali sono quelli indicati in (Coderre J., 1993), che ha utilizzato il modello di gliosarcoma di ratto 9L.

Questo articolo descrive due tipi di esperimento: *in vitro* e *in vivo-vitro*, utilizzando due composti borati (BPA e BSH). I valori tipicamente utilizzati in BNCT con BPA sono quelli riportati nella tabella 2 dell'articolo, per l'esperimento *in vivo-vitro*, sempre a 1% di sopravvivenza:

$$\text{RBE}=3.2 - \text{CBE}=3.8$$

Si evince quindi, che mentre l'efficacia biologica relativa della componente dei neutroni è confrontabile, quella della componente boro è abbastanza diversa. Questo dimostra che utilizzare fattori di peso calcolati con una sola linea cellulare può introdurre un errore significativo nel calcolo della dose biologicamente ponderata.

Queste considerazioni si inquadrano in una valutazione più generale sulla necessità di studiare adeguatamente i modelli radiobiologici utilizzati per il calcolo della dose fotone-equivalente, per garantire un piano di trattamento preciso e predittivo per quanto riguarda il risultato clinico della BNCT.

Prospettive future

Questa tesi costituisce soltanto il primo elemento di uno studio più approfondito riguardante la BNCT applicata al glioblastoma multiforme. Questa ricerca richiede ulteriori esperimenti, alcuni dei quali già in corso presso l'Università di Pavia.

1. Un protocollo già attivo presso il laboratorio di chirurgia sperimentale prevede la creazione di costrutti 3D di glioblastoma multiforme utilizzando tecnologie di 3D bioprinting. La creazione di tali costrutti, in questo contesto, permetterà di ripetere le analisi quantitative e qualitative dell'assorbimento del boro, consentendo di ottenere la distribuzione tridimensionale di ^{10}B nelle cellule tumorali. L'utilizzo di costrutti 3D costituisce un'innovazione tecnologica importante se si considera che le analisi sulla biodistribuzione di boro in vivo e gli studi di controllo tumorale/sopravvivenza necessitano di un grande numero di animali. Per questo motivo, il 3D Bioprinting rappresenta una valida soluzione, seppur preliminare, a questa limitazione.
2. Un secondo protocollo prevede invece lo studio a lungo termine della frazione cellulare sopravvissuta al trattamento BNCT descritto in questa tesi. Le cellule sopravvissute ai diversi protocolli di irraggiamento sono state conservate e mantenute in coltura. Su queste cellule verranno condotte le seguenti analisi:
 - somministrazione di f-10BPA 80 ppm 4 ore per verificare che la frazione cellulare sopravvissuta mantenga le stesse capacità di captazione del ^{10}B .
 - applicazione di un secondo trattamento BNCT alla frazione sopravvissuta. Questa analisi permetterà di stabilire se tali cellule hanno sviluppato una maggiore radio resistenza ai trattamenti radianti. Sarà possibile determinare se un secondo trattamento BNCT sia sufficiente ad eliminare definitivamente la frazione di cellule sopravvissute in seguito al primo trattamento. Ciò apre la strada alla possibilità di somministrare la BNCT in due sessioni (come già si fa per i tumori del distretto testa-collo, per ottimizzare la penetrazione dei neutroni termici nei grandi volumi tumorali). In questo caso, una seconda somministrazione potrebbe disattivare le cellule sopravvissute, potenziali sorgenti di recidive.
3. Uno studio dettagliato sulla componente sferoidale della linea U87. Ciò che verrà fatto sarà ripetere gli studi presenti in questa tesi, applicandoli unicamente a sferoidi mantenuti in sospensione. Da un punto di vista teorico, gli sferoidi che si staccano dal monostrato cellulare e che proseguono la crescita in sospensione potrebbero costituire un elemento importante nei processi di diffusione e metastatizzazione del tumore in vivo. Per questo motivo si è deciso di ripetere l'esperimento presentato in questa tesi applicandolo alla sola componente sferoidale: dopo aver isolato la frazione, essa verrà sottoposta alle analisi quantitative e qualitative del boro per poi ricevere i protocolli di irraggiamento in sospensione.

Bibliografia

Aldossari S., McMahon G., Lockyer NP. and Moore KL. *Microdistribution and quantification of the boron neutron capture therapy drug BPA in primary cell cultures of human glioblastoma tumour by NanoSIMS†*. Analyst; 144:6214, 2019.

Allen M., Bjerke M., Edlund H., Nelande S. and Westermarck B. *Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news*. Science Translational Medicine; 8:354-355, 2017.

Al-Madhoun AS, Johnsamuel J, Barth RF, Tjarks W, Eriksson S. *Evaluation of human thymidine kinase 1 substrates as new candidates for boron neutron capture therapy*. Cancer Res.; 64(17):6280-6286, 2004.

Altieri S., Bortolussi S., Bruschi P., Chiari P., Fossati F., Stella S., Prati U., Roveda L., Zonta A., Zonta C. *Neutron autoradiography imaging of selective boron uptake in human metastatic tumours*. Applied Radiation and Isotopes, 66(12):1850-1855, 2008.

Altinoz MA., Topcu G. and Elmaci I. *Boron's neurophysiological effects and tumoricidal activity on glioblastoma cells with implications for clinical treatment*. International Journal of Neuroscience, ISSN; 1543-5245, 2019.

Backer MV, Gaynutdinov TI, Patel V, Bandyopadhyaya AK, Thirumamagal BT, Tjarks W., Barth RF, Claffey K. and Backer JM.. *Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature*. Mol. Cancer Ther.; 4:1423-1429

Barth RF. *A critical assessment of boron neutron capture therapy: an overview*. Journal of Neuro-Oncology; 62: 1-5, 2003.

Barth RF., Mi P. and Yang W. *Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer*. Cancer Communication; 38:35, 2018.

Barth RF., Yang W., Rotaru JH., Moeschberger ML., Joel DD., Nawrocky MM., Goodman JH. and Soloway AH. *Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival following intracarotid injection of either sodium borocaptate or boronophenylalanine with or without blood-brain barrier disruption*. Cancer Res.; 57(6): 1129-1136, 1997.

Bendel P., Frantz A., Zilberstein J., Kabalka GW. and Salomon Y. *Boron-11 NMR of borocaptate: relaxation and in vivo detection in melanoma-bearing mice*. Magn. Reson. Med.; 39(3):439-447, 1998.

Bennett BD., Mumford-Zisk J., Coderre JA. and Morrison GH. *Subcellular localization of p-boronophenylalanine-delivered boron-10 in the rat 9L gliosarcoma: cryogenic preparation in vitro and in vivo*. Radiat. Res.; 140(1): 72-78, 1994.

Bortolussi S., Ciani L., Postuma I., Protti N., Reversi L., Bruschi P., Ferrari C., Cansolino L., Panza L., Ristori S. and Altieri S., *Boron concentration measurements by alpha spectrometry and quantitative neutron autoradiography in cells and tissues treated with different boronated formulations and administration protocols*. Appl. Radiat. Isotopes; 88:78-80, 2013.

Bortolussi S., Postuma I., Protti N., Provenzano L., Ferrari C., Cansolino L., Dionigi P., Galasso O., Gasparini G., Altieri S., Miyatake S. and González SJ. *Understanding the potentiality of accelerator based-boron neutron capture therapy for osteosarcoma: dosimetry assessment based on the reported clinical experience*. Radiation Oncology; 12:130, 2017.

Bortolussi S., Protti N., Ferrari M., Postuma I., Fatemi S., Prata M., Ballarini F., Carante MP., Farias R., González, SJ., Marrale M., Gallo S., Bartolotta A., Iacoviello G., Nigg D. and Altieri S. *Neutron flux and gamma dose measurement in the BNCT irradiation facility at the TRIGA reactor of the University of Pavia*. NIMB; 414:113-120, 2018.

Bortolussi S, Stella S., Bruschi P., Dionigi P., Zonta A., Ferrari C., Zonta C. Cansolino L., Clerici AM. Gaspari A. and Altieri S. *Selective uptake of p-boronophenylalanine by osteosarcoma cells for boron neutron capture therapy*. Applied Radiation and Isotopes; 67:S341–S344, 2009.

Chada M., Capala J., Coderre JA., Elowitz EH., Iway J., Joel DD., Liu HB., Wielopolski L. and Chanana AD. *Boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme (GBM) using the epithermal neutron beam at the Brookhaven National Laboratory*. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.; 40:829-834, 1998.

Coderre JA., Chanana AD., Joel DD., Elowitz EH., Micca PL., Nawrocky MM., Chadha M., Gebbers JO., Shady M., Peress NS., Slatkin DN. *Biodistribution of borophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity*. Radiat Res.; 149(2):163-170, 1998.

Coderre JA., Makar MS., Micca PL., Nawrocky M., Liu HB., Joel DD., Slatkin DN. and Amols HI. *Derivations of relative biological effectiveness for the high-LET radiations produced during Boron Neutron Capture irradiations of the 9L rat gliosarcoma in vitro and in vivo*. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.; 27:1121-1129, 1993.

Coderre JA. and Morris GM. *The Radiation Biology of Boron Neutron Capture Therapy*. Radiation Research; 151 (1): 1-18, 1999.

Coderre JA., Morris GM., Micca PL., Fisher CD. and Ross GA. *Comparative Assessment of Single-Dose and Fractionated Boron Neutron Capture Therapy*. Radiation Research; 144 (3): 310-317, 1995.

Coderre JA., Turcotte JC., Riley KJ., Binns PJ., Harling OK. and Kiger WS. *Boron Neutron Capture Therapy: Cellular Targeting of High Linear Energy Transfer Radiation*. Technology in Cancer Research & Treatment, ISSN; 2 (5):1533-0346, 2003.

Dahlström M., Capala J., Lindström P., Wasteson Å. and Lindström A. *Accumulation of boron in human malignant glioma cells in vitro is cell type dependent*. Journal of Neuro-Oncology; 68:199–205, 2004.

Dymova MA., Taskaev SY., Richter VA. and Kuligina EV. *Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives*. Cancer Communication; 40:406–421, 2020.

Ferrari C., Zonta C., Cansolino L., Clerici AM., Gaspari A., Altieri S., Bortolussi S., Stella S., Bruschi P., Dionigi P., Zonta A. *Selective uptake of p-boronophenylalanine by osteosarcoma cells for boron neutron capture therapy*. Applied Radiation and Isotopes; 67:S341–S344, 2009.

Ferrari M. *Characterization of the gamma dose component in the BNCT irradiation facility and dosimetry for in vitro experiments at the Triga reactor in Pavia*. Tesi di Laurea magistrale, Università degli studi di Pavia - Facoltà di scienze MM. FF. NN., 2012/2013.

Gadan M. A., Bortolussi S., Postuma I, Ballarini F., Bruschi P., Protti N., Santoro D., Stella S., Cansolino L., Clerici A., Ferrari C., Zonta A., Zonta C. and Altieri S. et al. *Set-up and calibration of a method to measure ^{10}B concentration in biological samples by neutron autoradiography*. NIM B; 274:51-56, 2012.

Gabel D., Pressue D., Haritz D., Grochulla F., Hasesberger K., Fankhauser H., Ceberg C., Peters HD. and Klotz U. *Pharmacokinetics of $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ (BSH) in patients with malignant brain tumors as prerequisite for a phase I clinical trial of boron neutron capture therapy*. Acta Neurochir. (Wien); 139(7):606-611, 1997.

González SJ. and Santa Cruz G. *The Photon-isoeffective Dose in Boron Neutron Capture Therapy*. Radiation Research; 178:609-621, 2012.

Guidi C. *Irradiation of reconstructed human skin cultivated in-vitro: computational dosimetry and preliminary radiobiological evaluations for BNCT studies.* Tesi di Laurea Magistrale, Università degli studi di Pavia- Facoltà di scienze MM. FF. NN, 2018/2019.

Hatanaka H. and Nakagawa Y. *Clinical results of long-surviving brain tumor patients who underwent boron neutron capture therapy.* Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys; 28:1061-1066, 1994.

Hiramatsu R., Kawabata S., Furuse M., Miyatake SI. and Kuroiwa T. *Identification of early and distinct glioblastoma response patterns treated by boron neutron capture therapy not predicted by standard radiographic assessment using functional diffusion map.* Radiation Oncology; 8:192, 2013.

Imahori Y., Ueda S., Ohmori Y., Sakae K., Kusuki T., Kobayashi T., Takagaki M., Ono K., Ido T. and Fujii R. *Positron emission tomography-based boron neutron capture therapy using boronophenylalanine for high-grade gliomas: part I.* Clin. Cancer. Res.; 4(8):1825-1832, 1998.

Kabalka GW., Yao ML., Marepally SR. and Chandra S. *Biological evaluation of boronated unnatural amino acids as new boron carriers.* Appl Radiat Isot.; 67 (7-8 Suppl):S374-379, 2009.

Kabalka GW., Shaikh AL., Barth RF., Huo T., Yang W., Gordnier PM. and Chandra S. *Boronated unnatural cyclic amino acids as potential delivery agents for neutron capture therapy.* Appl Radiat Isot; 69(12):1778-1781, 2011.

Kageji T., Mizobuchi Y., Nagahiro S., Nakagawa Y., and Kumada H. *Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma.* Applied Radiation and Isotopes; 69: 1823-1825, 2011.

Kageji T., Mizobuchi Y., Nagahiro S., Nakagawa Y., and Kumada H. *Correlation between radiation dose and histopathological findings in patients with glioblastoma treated with boron neutron capture therapy (BNCT).* Applied Radiation and Isotopes; 88: 20-22, 2014.

Kageji T., Nagahiro S., Mizobuchi Y., Matsuzaki K., Nakagawa Y., and Kumada H. *Boron neutron capture therapy (BNCT) for new-diagnosed glioblastoma: Comparison of clinical results obtained with BNCT and conventional treatment.* The Journal of Medical Investigation; 61: 254-263, 2014

Kageji T., Nagahiro S., Uyama S., Mizobuchi. Y, Hiroyuki T, Nakamura M. and Nakagawa Y. *Histopathological findings in autopsied glioblastoma patients treated by mixed neutron beam BNCT.* Journal of Neuro-Oncology; 68:25–32, 2004.

Kang W., Svirskis D., Sarojini V., McGregor AL., Bevitt J. And Wu Z. *Cyclic-RGDyC functionalized liposomes for dual-targeting of tumor vasculature and cancer cells in glioblastoma: An in vitro boron neutron capture therapy study*. *Oncotarget*; 8 (22): 36614-36627, 2017.

Kabalka GW, Smith GT, Dyke JP, Reid WS, Longford CP, Roberts TG, et al. *Evaluation of fluorine-18-BPA-fructose for boron neutron capture treatment planning*. *J. Nucl. Med.*; 38:1762–1767, 1998

Kawabata S., Miyatake S., Kuroiwa T., Yokoyama K., Doi A., Lida K., Miyata S., Nonoguchi N., Michiue H., Takahashi M., Inomata T., Imahori Y., Kirihata M., Sakurai Y., Maruhashi A., Kumada H. and Ono K. *Boron Neutron Capture Therapy for Newly Diagnosed Glioblastoma*. *Journal of Radiation Research*; 50(1): 51-60, 2009.

Kawabata S., Suzuki M., Hirose K., Tanaka H., Kato T., Goto H., Narita Y. and Miyatake S. *Accelerator-based BNCT for patients with recurrent glioblastoma: a multicenter phase II study*. *Neuro-Oncology Advances*; 3(1):1-9, 2021.

Kawabata S., Yang W., Barth R. F., Wu G., Huo T., Binns PJ., Riley KJ., Ongayi O., Gottumukkala V. and Vicente MG. *Convection enhanced delivery of carboranylporphyrins for neutron capture therapy of brain tumors*. *J Neuro-oncol*. 103(2):175-85, 2011.

Kinashi Y., Okumura K., Kubota Y., Kitajima E., Okayasu R., Ono K. and Takahashi S. *Dose-rate effect was observed in T98G glioma cells following BNCT*. *Applied Radiation and Isotopes*; 88: 81-85, 2013.

Koganei H, Ueno M, Tachikawa S, Tasaki L, Ban HS, Suzuki M, Shiraishi K, Kawano K, Yokoyama M, Maitani Y, Ono K and Nakamura H. *Development of high boron content liposomes and their promising antitumor effect for neutron capture therapy of cancers*. *Bioconjug Chem.*; 24(1):124-132, 2012.

Kreiner AJ., Bergueiro J., Cartelli D., Baldo M., Castell W., Asoia JG., Padulo J., Suárez Sandín JC., Igarzabal M., Erhardt J., Mercuri D., Valda AA., Minsky DM., Debray ME., Somacal HR., Capoulat ME., Herrera MS., Del Grosso MF., Gagetti L., Anzorena MS., Canepa N., Real N., Gun M. and Tacca H. *Present status of Accelerator-Based BNCT*. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.*; 2:95-101, 2016

Linz U. *Boron Neutron Capture Therapy for glioblastoma: Is it Worth Pursuing?* *Technology in Cancer Research and Treatment*; 7:83-88, 2008.

Locher GL. *Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons*. Am. J. of Roentgenol. Radium Ther; 36:1-13, 1936

Luderer M.J., Muz B., De la Puente P., Chavalmane S., Kapoor S., Marcelo R., Biswas P., Thotala D., Rogers B. and Azab AK. *A Hypoxia-Targeted Boron Neutron Capture Therapy Agent for the Treatment of Glioma*. Pharm Res; 33(10): 2530–2539, 2016.

Marcaccio B. *From radiobiological experiments to treatment planning in patients: a BNCT dosimetry study*. Tesi di Laurea Magistrale, Università degli studi di Pavia- Facoltà di scienze MM. FF. NN, 2020/2021.

Matsuda M., Yamamoto T., Kumada H., Nakai K., Shirakawa M., Tsurubuchi T. and Matsumura A. *Dose distribution and clinical response of glioblastoma treated with boron neutron capture therapy*. Applied Radiation and Isotopes; 67: 19-21, 2009.

Matsumura A., Yamamoto T., Tsurubuchi T., Matsuda M., Shirakawa M., Nakai K., Endo K., Tokue K. and Tsuboi K. *Current practices and future directions of therapeutic strategy in glioblastoma: Survival benefit and indication of BNCT*. Applied Radiation and Isotopes; 67: 12-14, 2009.

Micheal BD., Adams GE., Hewitt HB., Jones WB. and Watts ME. *A posteffect of oxygen in irradiated bacteria: a submillisecond fast mixing study*. Radiat. Res.; 54(2): 239-51, 1973.

Mishima Y., Ichihashi M., Hatta S., Honda C., Yamamura K. and Nakagawa T. *New thermal neutron capture therapy for malignant melanoma: melanogenesis-seeking 10B molecule-melanoma cell interaction from in vitro to first clinical trial*. Pigment Cell Res.; 2(4):226-34, 1987.

Miyatake S., Wanibuchi M., Hu N. and Ono K., *Boron neutron capture therapy for malignant brain tumors*. Journal of Neuro-Oncology; 149: 1-11, 2020.

Miyatake S., Kawabata S., Hiramatsu R., Kuroiwa T., Suzuki M. and Ono K. *Boron Neutron Capture Therapy of Malignant Gliomas*. Prog Neurol Surg.; 32:48–56, 2018.

Miyatake S., Kawabata S., Yokoyama K., Kuroiwa T., Michiue H., Sakurai Y., Kumada H., Suzuki M., Maruhashi A., Kirihata M. and Ono K. *Survival benefit of boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas*. J. Neurooncol.; 91:199-206, 2009.

Moghaddasi L. and Bezak E., *Development of an integrated Monte Carlo model for glioblastoma multiforme treated with boron neutron capture therapy*. Scientific Reports;7:7069, 2017.

Mostovich LA., Gubanov NV., Kutsenko, OS., Aleinik VI., Kuznetsov AS., Makarov AN., Sorokin IN., Taskaev S. Yu. H., Nepomnyashchikh GI. and Grigor'eva EV. *Effect of Epithermal Neutrons on Viability of Glioblastoma Tumor Cells in vitro*. Translated from *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*; 151 (2): 229-233, 2011.

Nakamura H., Kirihata M., Sauerwein WAG., Wittig A., Moss R., Nakagawa Y. *Boron compounds: new candidates for boron carriers in BNCT*. Neutron capture therapy. Springer-Verlag; 99–110, 2012.

Pedrosa-Rivera M., Praena J., Ruiz-Magaña IMJ. and Porras CR, *A simple approximation for the evaluation of the photon isoeffective dose in boron neutron capture therapy based on dose-independent weighting factors*. *Applied Radiation and Isotopes*; 157:109018, 2020.

Postuma I., Bortolussi S. Protti N., Ballarini F., Bruschia P., Cianic L., Ristori S., Panza L., Ferrari C., Cansolino L. and Altieri S. *An improved neutron autoradiography set-up for ¹⁰B concentration measurements in biological samples*. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*; 21: 123-128, 2015.

Postuma I., Dattoli-Viegas AM., Bortolussi S., Guidi C., Riback J., Provenzano L., Marcaccio B., Rossini A., Ferrari C., Cansolino L., Ferrari M., Portu A. and González S. *Detailed dosimetry calculation for in-vitro experiments and its impact on clinical BNCT*, *Physica Medica*, 2021, 89: 282-292.

Postuma I., González S., Herrera MS., Provenzano L., Ferrarini M., Magni C., Protti N., Fatemi S., Vercesi V., Battistoni G., Anselmi Tamburini U. Liu YH., Kankaanranta L., Koivunoro H., Altieri S. and Bortolussi S. *A Novel Approach to Design and Evaluate BNCT Neutron Beams Combining Physical, Radiobiological, and Dosimetric Figures of Merit*. *Biology (Basel)*; 10 (3):174, 2021.

Saris SC., Solares GR., Wazer DE., Cano G., Kerley SE., Joyce MA., Adelman LS., Harling OK., Madoc-Jones., Zamenhof RG. *Boron Neutron Capture Therapy for Murine Malignant Gliomas*. *Cancer Research*; 52:4672-4677, 1992.

Seiki K., Kinashi Y. and Takahashi S. *Influence of p53 Status on the Effects of Boron Neutron Capture Therapy in Glioblastoma*. *Anticancer Research*; 35:169-174, 2015.

Soloway AH., Barth RF., Gahbauer RA., Blue TE and Goodman JH. *The rationale and requirements for the development of boron neutron capture therapy of brain tumors*. *Journal of Neuro-Oncology*; 33: 09-18, 1997.

Soloway AH., Hatanaka H. and Davis MA. *Penetration of Brain and Brain Tumor. VII. Tumor-Binding Sulphydryl Boron Compounds. J. Med. Chem.*; 10(4): 714–717, 1967.

Sun T., Li Y., Huang Y., Zhang Z., Yang W., Du Z. and Zhou Y. Targeting glioma stem cells enhances anti-tumor effect of boron neutron capture therapy. *Oncotarget* 7(28): 43095-43108, 2016.

Tannock IF., Hill RP., Bristow RG. and Harrington L. *The Basic Science of Oncology*. 4^o ed McGraw-Hill, 2013

Van Rij CM., Wilhelm AJ., Sauerwein WAG. and Van Loenen AC. *Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme*. *Pharm World Sci*; 27: 92–95, 2005.

Wada Y., Hirose K., Harada T., Sato M., Watanabe T., Anbai A., Hashimoto M. and Takai Y. *Impact of oxygen status on 10B-BPA uptake into human glioblastoma cells, referring to significance in boron neutron capture therapy*. *Journal of Radiation Research*; 59 (2): 122-128, 2018.

Wang P., Zhen H., Jiang X., Zhang W., Guo G., Mao X. and Zhang X. *Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax*. *BMC Cancer*; 10:661, 2010.

Wittig A., Michel J., Moss R.L., Stecher-Rasmussen F., Arlinghaus H. F., Bendel P., Mauri PL., Altieri S., Hilger R., Salvadori PA., Menichetti L., Zamenhof R. and Sauerwein WAG., *Boron analysis and boron imaging in biological materials for Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 68: 66–90, 2008.

Wittig A., Saurewein W. A. and Coderre J. A. *Mechanisms of transport of p-borono-phenylalanine through the cell membrane in vitro*. *Radiat. Res.*; 153(2): 173-180, 2000.

Yamamoto T., Nakai K., Kageji T., Kumada H., Endo K., Matsuda M., Shibata Y. and Matsumura A. *Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma*. *Radiother. Oncol.*; 91:80-84, 2009.

Yamamoto T., Nakai K. and Matsumura A. *Boron neutron capture therapy for glioblastoma*. *Cancer Letters* 262: 143–152, 2008.

Yamamoto T., Nakai K., Nariai T., Kumada H., Okumura T., Mizumoto M., Tsuboi K., Zaboronok A., Ishikawa E., Aiyama H., Endo K., Takada T., Yoshida F., Shibata Y. and Matsumura A. *The status of Tsukuba BNCT trial: BPA-based boron neutron capture therapy combined with X-ray irradiation*. *Appl. Radiat. Isot.*; 69(12):1817-1818, 2011

Yang W., Barth RF., Wu G., Tjarks W., Binnis P. and Riley K. *Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as molecular targeting agents.* Appl. Radiat. Isot.; 67:S328-S331, 2009.

Yilmazer Açelya. *Evaluation of cancer stemness in breast cancer and glioblastoma spheroids in vitro.* 3Biotech; 290, 2018.

Zhang H., Wang R., Yu Y., Liu J., Luo T. and Fan F. *Glioblastoma Treatment Modalities besides Surgery.* Journal of Cancer; 10 (20):4793-4806, 2019.

A Clara, con tutto il mio amore!

Ringraziamenti

Grazie al Prof. Marco Peviani per aver accettato di ricoprire il ruolo di relatore e per aver accolto con entusiasmo il mio progetto di tesi. Ringrazio inoltre per la disponibilità che mi ha dimostrato nel correggere il mio lavoro e nel fornirmi importanti consigli e suggerimenti, di cui ho fatto un prezioso tesoro.

Grazie di cuore a Silva per avermi avvicinato ad una materia complessa e meravigliosa come la Fisica e per avermi trasmesso passione e curiosità verso l'affascinante mondo della BNCT. Grazie per l'enorme disponibilità, per i consigli e gli aiuti che non si sono mai fatti attendere. Grazie per l'infinita pazienza e delicatezza nei miei confronti, per le parole sicure e positive che hanno costituito una forte spinta, necessaria a superare periodi di insicurezza e di sconforto. Grazie per essere sempre stata in prima linea con l'intenzione di offrire un aiuto ed una amicizia leale. Infine grazie per aver costituito un solido esempio da seguire, non solo come brillante scienziata, ma soprattutto come persona eccezionale.

Grazie ad Ian per avermi illustrato con estrema chiarezza e preparazione le tecniche di autoradiografia ma soprattutto grazie per avermi permesso di ottenere i dati che ho riportato in questo lavoro. Grazie ad Ian per la genialità, l'inventiva e la prontezza che gli appartengono.

Grazie alla Dott.ssa Cinzia Ferrari che mi ha accolto senza esitazioni nel laboratorio di chirurgia sperimentale, permettendomi di lavorare in un ambiente caratterizzato da grande serenità e tranquillità. Grazie per la serietà con cui, puntualmente, ha soddisfatto ogni mia richiesta e compreso ogni mia necessità. Inoltre ringrazio Cinzia per avermi dedicato del tempo prezioso, a costo di sottrarne a se stessa e al suo lavoro. Infine ringrazio per la sua estrema professionalità e abilità con cui ha organizzato il mio lavoro ed il disegno sperimentale.

Grazie infinitamente a Laura per il suo aiuto, silenzioso ma costante. A Laura devo un grazie veramente speciale per avermi insegnato a lavorare all'interno del laboratorio, per aver risposto a mille domande e risolto mille dubbi. Ringrazio Laura per essersi presa in carico le mie insicurezze e le mie paure, soprattutto nei delicati "giorni dell'irraggiamento". Grazie per aver condiviso, fianco a fianco le preoccupazioni prima degli esperimenti ma soprattutto le soddisfazioni derivanti dai risultati. Grazie per avermi permesso di crescere e per avermi preparato, il più possibile, ad affacciarmi al mondo del lavoro e della ricerca.

Grazie ad Elena che non mi ha mai fatto sentire fuori luogo e che anzi, mi ha sempre teso la mano per spronarmi e incoraggiarmi. Ringrazio Elena per essersi, spesso, fatta carico del lavoro permettendomi di studiare per gli esami e scrivere la tesi; la ringrazio per aver risolto i pasticci che talvolta combinavo in laboratorio e per essersi presa cura delle mie “antipatiche” U87. Grazie per essere stata infinitamente paziente nei miei confronti.

Grazie a tutti i ragazzi del laboratorio di chirurgia sperimentale, miei compagni di viaggio: grazie a Franca, Gaia, Stefano e Greta per le esperienze, le delusioni e le risate che abbiamo affrontato insieme.

Grazie a Claretta per aver aumentato il mio bagaglio di conoscenze ed aver acceso ancor di più la mia curiosità verso discipline a me sconosciute. Grazie per aver affrontato con me interessantissime discussioni sulla fisica, sulla biologia sulla tecnologia e sulla medicina. Grazie per avermi trasmesso una entusiasmante fame di sapere, che, a mio parere, costituisce la vera essenza della ricerca e dello studio.

Grazie a Paul, mio fedele amico, per gli sfoghi, i confronti, i litigi. Grazie per tutte quelle volte in cui mi ha detto “guarda che sei bravo” quando ne avevo tanto bisogno.

Grazie a mia sorella Ilaria che costituisce sempre un sicuro rifugio. Grazie per avermi illuminato tante strade oscure e per avermi sempre tenuto la mano, seppur lontana da me. Grazie ai miei nipoti Viola e Pietro che rappresentano una scintilla di vita e di gioia in questi tempi grigi e cupi.

Grazie a Chiara e Matteo per tutte le volte che mi hanno detto “genio” oppure “piangina”.

Grazie a mia mamma per un sacco di cose. Grazie per i numerosi e pesanti sacrifici a cui si è dovuta sottoporre per permettermi di studiare. Grazie per avermi spinto ad affrontare la laurea magistrale, facendosi carico di ulteriori spese e di una serie infinita di difficoltà, malumori, preoccupazioni, ansie e paure. Grazie a mia mamma per averci creduto, davvero, dal principio alla fine. Grazie per avermi ascoltato, confortato, capito e sostenuto durante le notti di studio. Grazie per avermi preparato il caffè la mattina prima di ogni esame. Grazie per aver trovato ancora, dopo tutto, la forza di lottare e stringere i denti. Grazie per le belle parole e i sorrisi che mi ha sempre regalato, grazie per i silenzi, sempre posizionati al momento giusto. Grazie per avermi sempre garantito i libri, la benzina per andare a lezione ed un camice profumato per andare in laboratorio. Grazie anche per gli “abbondanti” pranzi che mi ha preparato ogni mattina. Grazie a mia mamma perché è forte come un leone e intelligente come una volpe. Grazie a mia mamma per avermi sempre offerto tanto amore, fiducia e comprensione ma soprattutto grazie a mia mamma per avermi insegnato ad affrontare questo viaggio, come ogni viaggio, con tanta umiltà.. A lei sarò sempre debitore.