



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**  
**FACOLTÀ DI SCIENZE E TECNOLOGIE**

Corso di Laurea Triennale in Fisica

**Il ruolo del dose rate nell'effetto FLASH**

Relatore:

**Dr. Salvatore Gallo**

Correlatore:

**Dr. Yunsheng Dong**

Elaborato di:

**Chiara Radice**

Matricola: **949566**

Anno Accademico 2021/2022

*Ai miei nonni.*

# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>3</b>
<b>1 Fondamenti di Radioterapia</b>	<b>6</b>
1.1 Grandezze fisiche . . . . .	6
1.1.1 Dose assorbita . . . . .	6
1.1.2 Dose rate . . . . .	7
1.1.3 Stopping power . . . . .	7
1.1.4 Linear Energy Transfer - LET . . . . .	8
1.2 Acceleratori . . . . .	9
1.2.1 Principio di funzionamento . . . . .	9
1.2.2 LINAC . . . . .	10
1.2.3 Ciclotroni . . . . .	12
1.2.4 Sincrotroni . . . . .	15
1.3 Grandezze radiobiologiche . . . . .	16
1.3.1 Oxygen Enhancement Ratio (OER) . . . . .	17
1.3.2 Relative Biological Effectiveness (RBE) . . . . .	19
1.4 Radioterapia a fasci esterni . . . . .	20
<b>2 Radioterapia FLASH</b>	<b>23</b>
2.1 Effetto FLASH . . . . .	23
2.1.1 L'effetto della radiazione FLASH nei tessuti tumorali . . . . .	28
2.2 Possibili meccanismi alla base dell'effetto FLASH . . . . .	34
2.2.1 Deplezione dell'ossigeno . . . . .	34
2.2.2 Ricombinazione dei radicali perossilici . . . . .	37
2.2.3 Risposta immunitaria . . . . .	39
2.2.4 <i>Intertrack effects</i> . . . . .	39

<b>3 Dose Rate</b>	<b>42</b>
3.1 Struttura microscopica del fascio . . . . .	43
3.2 Definizione di Dose Rate . . . . .	45
3.2.1 Calcolo del dose rate nei piani di trattamento . . . . .	46
3.2.2 Ottimizzazione dei piani di trattamento . . . . .	57
3.2.3 VHEE e ioni carbonio . . . . .	60
<b>Conclusioni e prospettive future</b>	<b>65</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>69</b>

# Introduzione

La cura dei tumori è uno degli ambiti di maggiore interesse della ricerca medico-scientifica. Ad oggi, il cancro è trattato con diverse terapie quali chirurgia, chemioterapia, immunoterapia, terapia ormonale e radioterapia. Quest'ultima si basa sull'uso di radiazioni ionizzanti per rilasciare nel tumore una quantità di dose sufficiente a indurre l'apoptosi cellulare. Nella radioterapia effettuata con sorgente esterna, la radiazione ionizzante incidente sul tumore è solitamente data da fotoni, elettroni, protoni o, talvolta, ioni carbonio. Nonostante l'esteso progresso medico e scientifico riguardo ai macchinari utilizzati e alle tecniche di conformazione della dose al tumore, la comunità scientifica è sempre alla ricerca di nuovi mezzi e metodi per migliorare la qualità dei trattamenti. Una delle criticità principali nell'uso della radioterapia esterna è che anche gli organi sani circostanti il tessuto neoplastico assorbono una dose rilasciata dalla radiazione incidente. Questo può comportare la manifestazione di effetti collaterali che, nei casi più estremi, possono essere dati dall'insorgenza di tumori secondari. Generalmente, la ricerca nel campo della radioterapia ha lo scopo di perfezionare o trovare nuove tecniche per migliorare il compromesso che si ha tra il controllo sulla crescita del tumore e la comparsa di tossicità nei tessuti sani.

A partire dalla seconda metà degli anni '50, diversi esperimenti effettuati *in vitro* ed *in vivo*, hanno dimostrato l'esistenza di un effetto di protezione e di salvaguardia dei tessuti sani in seguito ad un irraggiamento a dose rate ultraelevati oltre i 30-40 Gy/s. In generale, a dose rate molto bassi, una migliore tutela degli organi sani è correlata al fatto che il tessuto ha il tempo di ripararsi grazie a diversi processi biochimici. Invece, il fatto che i tessuti sani vengano preservati in seguito all'esposizione a radiazione prodotta a dose rate ultraelevati è una novità che ha suscitato sin da subito grande curiosità ed interesse nella comunità scientifica. A partire dal 2014, Vincent Favaudon ha denominato la radioresistenza indotta nei tessuti sani dall'irraggiamento a dose rate ultraelevati "effetto FLASH". Altri esperimenti hanno poi dimostrato che

l'irraggiamento a dose rate così elevati non solo comporta la riduzione delle complicazioni indotte nei tessuti sani, ma garantisce anche un'analogia, se non talvolta migliore, risposta da parte del tumore rispetto alla radioterapia convenzionale. Lo stato dell'arte indica che l'effetto FLASH deve essere ancora ampiamente indagato sotto diversi aspetti. Innanzitutto, devono ancora essere definiti in maniera dettagliata i processi radiobiologici che ne stanno alla base e le cause che concorrono alla protezione dei tessuti sani. Inoltre, è fondamentale individuare le condizioni in cui effettivamente si verifica l'effetto FLASH: con che tipo di radiazione, a quale energia e con che tecnica di irraggiamento. Tra i parametri che influiscono sull'induzione dell'effetto FLASH, è riconosciuto che la velocità di erogazione del fascio gioca un ruolo di primo piano. Tuttavia, i risultati sperimentali riguardo il dose rate sono contrastanti tra loro e non si è riusciti a trovare una soglia di dose rate univoca per il manifestarsi dell'effetto FLASH. Per questo motivo sono state definite nuove metriche per il computo del dose rate, cercando di studiare la definizione che è maggiormente correlata alla presenza dell'effetto FLASH.

Lo scopo di questa tesi è quello di esporre i principali risultati riguardanti l'effetto FLASH, approfondendo in particolare il ruolo che il dose rate svolge nella descrizione di tale fenomeno e riportando le definizioni e i risultati dei primi studi conseguiti finora. In particolare, il primo capitolo introduce le grandezze fisiche e radiobiologiche principalmente coinvolte nella radioterapia e gli acceleratori di particelle. Il secondo capitolo riporta i risultati dei principali studi effettuati sull'effetto FLASH e ne indaga le possibili cause. Infine, il terzo capitolo illustra le nuove metriche ideate per la misura del dose rate e ne mostra i risultati ottenuti attraverso studi effettuati con simulazioni Monte Carlo.

# Capitolo 1

## Fondamenti di Radioterapia

La radioterapia si basa sull'utilizzo di diverse forme di radiazione ionizzante per la cura dei tumori. È importante mettere in correlazione l'energia depositata dalle radiazioni con gli effetti biologici osservati, caratterizzando i diversi tipi di radiazione ionizzante. È inoltre fondamentale mettere in luce i diversi effetti che una stessa radiazione può indurre se erogata in modalità differenti. Le grandezze definite di seguito permettono una valutazione oggettiva di tali effetti, sia da un punto di vista fisico che biologico.

### 1.1 Grandezze fisiche

#### 1.1.1 Dose assorbita

La principale grandezza fisica utilizzata per discutere gli effetti di una radiazione ionizzante è la dose assorbita. Essa è definita come l'energia media ( $dE$ ) depositata dalla radiazione ionizzante in un certo volume, e la massa ( $dm$ ) contenuta in tale volume:

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (1.1)$$

L'unità di misura nel SI è il Gray (Gy), definito come  $1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}$ . Nelle applicazioni cliniche della radioterapia convenzionale la dose totale viene somministrata in frazioni successive: tipicamente, viene distribuita una dose di 1.8 Gy o 2.0 Gy (talvolta anche di meno) in 5 frazioni settimanali, per dosi totali e durata del trattamento variabili entro ampi limiti. [1]

La dose assorbita non tiene conto del tipo di radiazione ionizzante utilizzata e del tessuto sui cui essa incide. Per tener conto del fatto che diversi tipi di radiazione inducono effetti biologici differenti si definisce la dose equivalente ( $H_T$ ) come segue:

$$H_T = \sum_R W_R D_{T,R} \quad (1.2)$$

dove  $W_R$  è un fattore di peso adimensionale associato alla radiazione  $R$  che rilascia una dose  $D_{T,R}$  nel tessuto. Nel SI l'unità di misura della dose equivalente è il Sievert(Sv).

Infine, per considerare la radiosensibilità dei diversi tessuti del corpo umano, si introduce la dose effettiva ( $E$ ) come la somma delle dosi equivalenti ( $H_T$ ) nei diversi tessuti moltiplicate per un fattore di peso adimensionale ( $W_T$ ) tipico di ogni tessuto:

$$E = \sum_T W_T H_T = \sum_T W_T \sum_R W_R D_{T,R} \quad (1.3)$$

Così come la dose equivalente, la dose efficace si misura in Sievert (Sv).

### 1.1.2 Dose rate

Ai fini degli argomenti trattati è di fondamentale importanza introdurre anche il rateo di dose. In generale è definito come la dose assorbita ( $D$ ) per unità di tempo ( $dt$ ) e si misura in Gy/s nel SI. Tipicamente nella radioterapia convenzionale si utilizza un dose rate pari a 0.03 Gy/s [2], mentre nella radioterapia FLASH si usano ratei di dose ultralevati ( $>40\text{Gy/s}$  [3]).

### 1.1.3 Stopping power

La radiazione ionizzante si distingue in indirettamente ionizzante, se costituita da particelle neutre (fotoni), e direttamente ionizzante, se costituita da particelle cariche (elettroni, protoni, ioni positivi con  $Z>1$ ). Per quest'ultimo tipo di radiazione è possibile definire lo stopping power ( $S$ ) come la quantità di energia ( $dE$ ) persa dalla particella carica nel mezzo materiale, per unità di lunghezza ( $dx$ ):

$$S = -\frac{dE}{dx} \quad (1.4)$$

L'unità di misura nel SI è J/m, ma è pratica comune esprimerlo in MeVcm<sup>2</sup>/mg, in modo da rimuovere la dipendenza di  $S$  dalla densità del materiale. In particolare, si può distinguere lo stopping power elettronico, legato alla perdita di energia in seguito a collisioni della particella carica incidente con elettroni atomici del mezzo, da quello nucleare, associato all'interazione della particella incidente con i nuclei del materiale; quest'ultimo domina però solo a basse energie, quando il proiettile incidente è quasi fermo.

### 1.1.4 Linear Energy Transfer - LET

È dimostrato che l'entità del danno biologico indotto da una radiazione ionizzante dipende dal tipo di radiazione e dalla sua energia. Infatti, una radiazione costituita da protoni non provoca lo stesso danno biologico di una radiazione di elettroni. Ciò è dovuto al fatto che radiazioni diverse possiedono una densità di ionizzazione differenti. Maggiore è la densità di ionizzazione, maggiore è il danno indotto localmente. Per quantificare l'effetto biologico prodotto da radiazioni con densità di ionizzazione differente, si definisce il trasferimento lineare di energia, o più brevemente LET (Linear Energy Transfer):

$$L = \frac{dE_L}{dl} \quad (1.5)$$

Il LET ( $L$ ) corrisponde alla quantità di energia media ( $dE_L$ ) depositata localmente nel mezzo da una particella carica per unità di lunghezza ( $dl$ ), e si misura tipicamente in keV/ $\mu$ m. Il termine "localmente" impone che nel computo dell'energia  $dE_L$  venga inclusa solo l'energia rilasciata in prossimità della traccia della particella. Perciò, il LET tiene conto solo dell'energia persa per processi collisionali, dato che l'energia persa per irraggiamento viene depositata lontano dal punto di produzione della radiazione elettromagnetica. Solitamente, per escludere l'energia rilasciata nel mezzo da particelle secondarie si definisce una soglia massima di energia  $\Delta$ , detta energia di taglio, in funzione della quale viene ridefinito il LET:

$$L_\Delta = \frac{dE_\Delta}{dl} \quad (1.6)$$

$dE_\Delta$  è l'energia media, minore della soglia  $\Delta$  espressa in eV, persa da una particella carica in seguito a processi collisionali nel materiale in un tratto  $dl$ .

Se non viene definita alcuna energia di taglio, allora il LET corrisponde all'energia totale trasferita dalla radiazione incidente al mezzo materiale, e coincide pertanto con lo stopping power.

A questo punto è possibile distinguere le radiazioni ionizzanti in radiazioni a basso LET e radiazioni ad alto LET. Le prime corrispondono a radiazioni costituite da fotoni o elettroni: rilasciano energia nel tessuto in modo esponenziale decrescente, depositando la maggior parte della dose all'inizio della loro traccia. Al contrario, le radiazioni ad alto LET, identificate come radiazioni di particelle cariche pesanti (protoni e ioni con  $Z > 1$ ) rilasciano poca dose in ingresso e il massimo della dose a fine range in corrispondenza del picco di Bragg. Per le radiazioni a basso LET l'energia viene depositata tramite eventi sporadici e casuali, mentre le radiazioni ad alto LET rilasciano energia in eventi estremamente ravvicinati tra loro e risultano essere densamente ionizzanti.

## 1.2 Acceleratori

Gli acceleratori sono dispositivi nati nell'ambito della fisica nucleare e della fisica delle particelle, che sono stati riadattati nel corso degli anni per un loro utilizzo in ambito ospedaliero. Sono apparati in grado di accelerare e deviare particelle cariche utilizzando un campo elettrico ed un campo magnetico. A seconda del modo in cui viene prodotto il campo accelerante, gli acceleratori vengono distinti in due principali categorie: acceleratori lineari ed acceleratori circolari.

### 1.2.1 Principio di funzionamento

Il fascio di particelle cariche entrante in un acceleratore è accelerato da campi elettrici ed eventualmente deflesso da campi magnetici. L'equazione che definisce la forza  $\vec{F}$  cui è soggetta una particella carica è

$$\vec{F} = m\vec{a} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad (1.7)$$

dove  $m$  è la massa della particella e  $q$  è la carica elettrica,  $\vec{a}$  e  $\vec{v}$  sono rispettivamente la sua accelerazione e la sua velocità,  $\vec{E}$  è il campo elettrico responsabile dell'accelerazione del fascio, e  $\vec{B}$  è il campo magnetico, deputato alla deflessione e

messa a fuoco delle particelle. L'obiettivo, infatti, non è solo quello di aumentare l'energia delle particelle in ingresso, ma anche quello di focalizzare il fascio confinando le particelle lungo un percorso ideale.

I primi acceleratori, come quello elettrostatico di Van Der Graaf, si basavano sull'uso di campi elettrici costanti. Gli acceleratori elettrostatici, con una caduta di potenziale fissata nel tempo, possiedono però una limitazione intrinseca legata al fatto che, al di sopra di una certa intensità massima del campo accelerante, si verificano delle scariche elettriche. Per superare questa limitazione, sono stati sviluppati nel corso degli anni dispositivi basati sull'uso di campi variabili nel tempo (detti a radiofrequenza).

### 1.2.2 LINAC

Un acceleratore lineare è un dispositivo in grado di accelerare particelle cariche lungo una traiettoria rettilinea. È costituito da una serie di tubi metallici, detti tubi di drift, collegati in successione ai terminali alternati di un oscillatore a radiofrequenza (figura 1.1)[4]. La particella entrante è accelerata nei gap tra i tubi di drift.

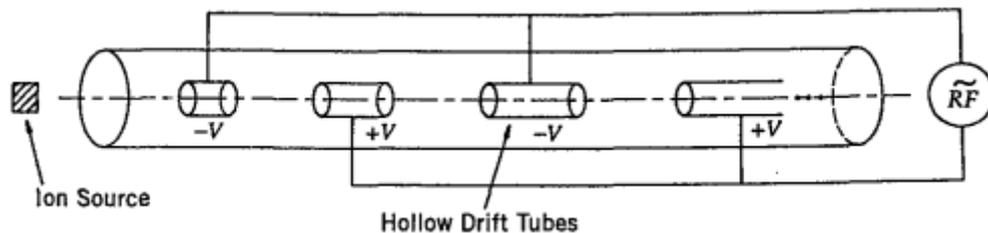


Figura 1.1: Schema di un acceleratore lineare di particelle cariche.[4]

Man mano che le particelle vengono accelerate, la loro velocità aumenta. Se i tubi di drift avessero tutti la stessa lunghezza, la particella uscente da un tubo non sarebbe in fase con il potenziale del tubo successivo e quindi non sarebbe accelerata. Per evitare ciò, i tubi di drift sono costruiti di lunghezza crescente lungo il percorso compiuto dalla particella, in modo tale che quest'ultima possa essere accelerata grazie al principio di risonanza. Data  $L_n$  la lunghezza dell' $n$ -esimo tubo, il tempo di attraversamento della particella di tale tubo dev'essere  $T_{RF}/2$ , dove  $T_{RF}$  è il periodo di oscillazione del campo a radiofrequenza. Pertanto, data  $v_n$  la velocità della particella nell' $n$ -esimo tubo di drift, si ha

$$L_n = \frac{T_{RF}}{2} v_n = \frac{1}{2} \beta_n \lambda_{RF} \quad (1.8)$$

La condizione  $L_n \ll \lambda_{RF}$  implica che  $\beta_n \ll 1$ . Pertanto, i LINAC non sono adatti a trattare particelle a velocità relativistiche.

Gli acceleratori lineari usati in ambito clinico sono in grado di produrre fasci di elettroni con un'energia finale che può assumere valori da 4 fino a 25 MeV ([5]). Inoltre, gli acceleratori lineari per elettroni con un voltaggio elevato (da 6 a 25 MV) sono ampiamente utilizzati nella radioterapia per la produzione di raggi X per *bremstrahlung*. Quest'ultima è l'interazione dominante di particelle cariche leggere ad alta energia con la materia. Gli elettroni accelerati dal LINAC vengono fatti incidere su un target metallico, in modo che interagiscano con i nuclei atomici di quest'ultimo. L'elettrone, risentendo del campo elettrico nucleare, subisce una deviazione e perde energia cinetica, che viene trasferita ad una radiazione elettromagnetica detta radiazione di *bremstrahlung* o di frenamento. Lo spettro dei fotoni emessi è continuo (figura 1.2) e dipende dall'energia cinetica degli elettroni incidenti, dal numero atomico del target e dal suo spessore.

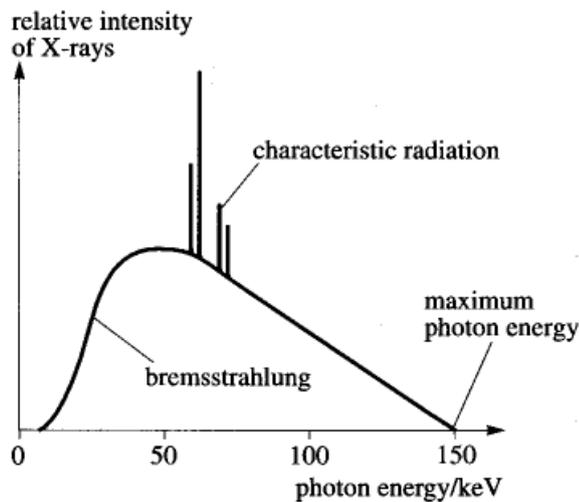


Figura 1.2: Spettro dei fotoni emessi per *bremstrahlung*. Fonte: <https://physicsopenlab.org/2017/08/02/radiazione-di-bremstrahlung/>

Oltre allo spettro continuo, sono presenti singole righe che corrispondono all'emissione di raggi X caratteristici, che vengono prodotti in seguito all'interazione coulomb-

biana tra gli elettroni incidenti e gli elettroni degli orbitali atomici del mezzo. L'elettrone atomico acquista sufficiente energia per lasciare la propria shell, nella quale si genera una lacuna, riempita successivamente da un elettrone di una shell superiore. L'energia persa dall'elettrone più esterno per riempire la lacuna sottostante viene emessa sotto forma di radiazione elettromagnetica, detta radiazione X caratteristica o di fluorescenza.

### 1.2.3 Ciclotroni

Il primo ciclotrone venne costruito da Ernest Lawrence nel 1930 per accelerare ioni fino a qualche MeV [5]. Un ciclotrone è costituito da due camere in metallo semicilindriche (a forma di D) collegate ad un generatore di corrente alternata (figura 1.3) Tutto il sistema è immerso in un campo magnetico perpendicolare alle facce delle camere. Sebbene le due parti semicilindriche siano collegate al generatore, non è presente alcun campo elettrico al loro interno, a causa della schermatura delle pareti metalliche. Dunque, le particelle in ingresso risentono di un campo elettrico solo nello spazio vuoto tra le camere semicilindriche.

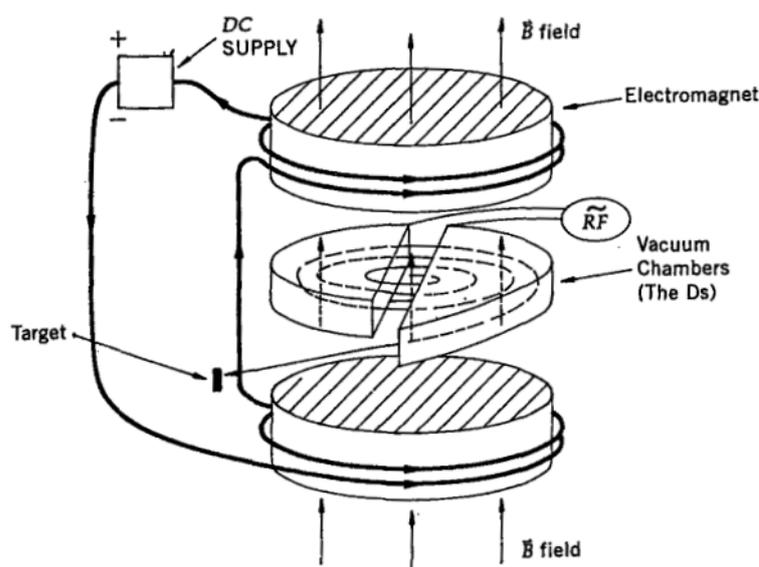


Figura 1.3: Schema di un ciclotrone.[4]

Il fascio di particelle da accelerare è iniettato al centro dello spazio tra le due parti, in modo tale che la velocità delle particelle sia perpendicolare al campo magnetico

statico presente. In questo modo il modulo della forza di Lorentz ( $|\vec{F}_{Lorentz}|$ ) assume valore massimo:

$$|\vec{F}_{Lorentz}| = qvB \quad (1.9)$$

dove  $q$  è la carica elettrica della particella iniettata,  $v$  è il modulo della sua velocità e  $B$  è il modulo del campo magnetico. La forza di Lorentz agisce come una forza centripeta, deflettendo la particella carica di massa  $m$  e facendole percorrere una traiettoria semicircolare di raggio  $r$

$$r = \frac{mv}{qB} \quad (1.10)$$

La particella viene deflessa dal campo magnetico fintanto che rimane all'interno della D metallica, e viene accelerata nello spazio tra le due camere dal campo elettrico. È fondamentale che la particella sia in sincronia con il campo elettrico accelerante, la cui frequenza angolare di oscillazione deve rimanere costantemente pari alla pulsazione  $\omega$  del moto circolare della particella:

$$\omega = \frac{v}{r} \quad (1.11)$$

La frequenza  $\nu$  di risonanza di ciclotrone è definita di conseguenza come

$$\nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{qB}{2\pi mv} \quad (1.12)$$

I ciclotroni vengono distinti in sincrociclotroni e ciclotroni isocroni. Nei primi il modulo del campo magnetico è costante ma la frequenza di ciclotrone diminuisce all'aumentare dell'accelerazione, mentre nei ciclotroni isocroni la frequenza rimane costante e varia il modulo del campo magnetico.

L'equazione 1.12 è valida ad energie non relativistiche. Nel limite relativistico  $|\vec{v}| \sim c$ , un fattore limitante proviene dall'aumento della massa  $m$

$$m = \frac{m_0}{\sqrt{1 - \beta^2}} \quad (1.13)$$

dove  $m_0$  è la massa a riposo e  $\beta$  è il rapporto  $v/c$ . La massa degli elettroni a 10 keV di energia aumenta del 2%, mentre per i protoni lo stesso aumento avviene a 18 MeV. Pertanto, per accelerare una particella ad alte energie, non è possibile trascurare gli effetti relativistici.

Ad energie relativistiche, l'equazione per il moto di una particella di massa  $m$  e carica elettrica  $q$ , immersa in un campo magnetico  $\vec{B}$  è

$$\frac{d\vec{p}}{dt} = q \frac{\vec{v} \times \vec{B}}{c} \quad (1.14)$$

o analogamente, introducendo il fattore di Lorentz  $\gamma = 1/(\sqrt{1 - \beta^2})$

$$m\gamma \frac{d\vec{v}}{dt} = m\gamma \vec{v} \times \vec{\omega} = q \frac{\vec{v} \times \vec{B}}{c} \quad (1.15)$$

dove nell'ultimo passaggio dell'equazione 1.15 si considera la forza di Lorentz come una forza centripeta. Nel limite relativistico  $|\vec{v}| \sim c$ , la frequenza angolare  $\omega$  della particella non rimane costante nel tempo a causa dell'aumento relativistico della massa. Quindi, per far in modo che la particella sia continuamente accelerata, deve variare la frequenza di oscillazione del campo elettrico e il modulo del campo magnetico. Ciò però non avviene nei ciclotroni, che sono limitati quindi ad accelerare particelle ad energie non relativistiche.

Il raggio delle orbite descritte dalla particella all'interno del ciclotrone aumenta all'aumentare della sua velocità fino a che, raggiunte le dimensioni finite del sistema, il fascio di particelle non viene estratto e fatto incidere sul bersaglio di interesse. Nel momento in cui la particella viene estratta, la sua energia cinetica  $E_{max}$  è massima ed è pari a

$$E_{max} = \frac{1}{2}mv_{max}^2 = \frac{1}{2}m\omega^2r^2 = \frac{1}{2} \frac{(qBR)^2}{mv^2} \quad (1.16)$$

dove  $R$  è il raggio delle scatole semicilindriche. L'equazione 1.16 mette in relazione l'intensità  $B$  del campo magnetico con le dimensioni del magnete necessario ad accelerare la particella fino ad una data energia. Tipicamente, in un ciclotrone viene utilizzato un campo di modulo minore o circa uguale a 2 T, un voltaggio alternato di  $\sim 200$  kV ad una frequenza di  $\sim 10-20$  MHz: la massima energia a cui si può estrarre un protone è di circa 20 MeV. In ambito clinico, i ciclotroni vengono utilizzati anche per effettuare vari esami diagnostici, quali PET(Photon Emission Tomography) e CT(Computed Tomography).

### 1.2.4 Sincrotroni

Apparati che utilizzano un campo magnetico variabile nel tempo sono i sincrotroni. Questi ultimi sono acceleratori in cui le particelle compiono una traiettoria approssimativamente circolare (a raggio  $r$  costante dato dall'equazione 1.10) all'interno di una camera toroidale. Le particelle iniettate solitamente provengono da un acceleratore lineare e possiedono un'energia iniziale nell'ordine di qualche decina o qualche centinaia di MeV, e possono raggiungere un'energia finale nell'ordine dei GeV. Una volta iniettate, le particelle vengono deflesse da un campo magnetico variabile nel tempo e perpendicolare alla loro velocità. Tale campo è generato da magneti dipoli (che orientano il fascio) e magneti quadrupoli (che lo focalizzano) posizionati opportunamente lungo la camera circolare. Allo stesso tempo, le particelle vengono accelerate all'interno di apposite cavità, poste lungo il percorso, in cui è presente un campo elettrico a radiofrequenza (figura 1.4 e 1.5).

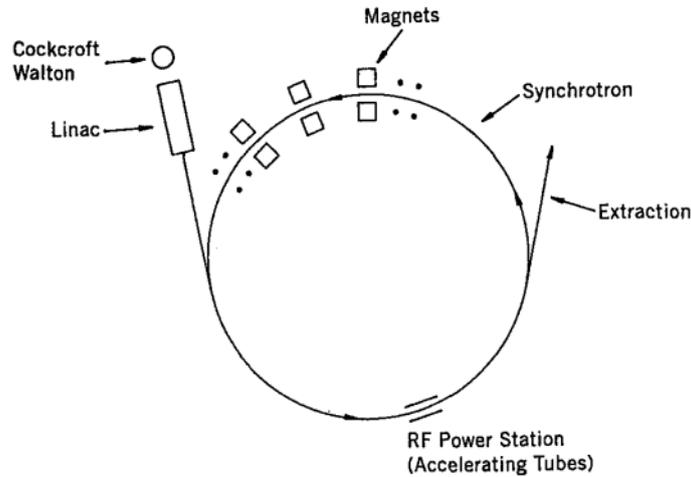


Figura 1.4: Schema di un sincrotrone.[4]

È essenziale che le particelle siano sincrone al campo elettrico, cioè che la frequenza di oscillazione del campo elettrico coincida con la frequenza  $\nu$  del moto delle particelle da accelerare, data dall'equazione 1.12 o da

$$\nu \sim \frac{c}{2\pi r} \quad (1.17)$$

nel limite relativistico  $|\vec{v}| \sim c$ . In un sincrotrone per elettroni, dove la velocità è quasi sempre relativistica, la frequenza del campo elettrico è quasi costante, mentre nei sincrotroni per protoni la frequenza deve variare.

A differenza dei ciclotroni, all'interno dei sincrotroni non si ha un fascio continuo. Le particelle, che possono avere energie iniziali leggermente diverse tra loro, non sono tutte perfettamente in fase, ma oscillano attorno alla fase corretta raggruppandosi longitudinalmente in pacchetti (detti *bunches*). Il pacchetto viene poi correttamente accelerato grazie al principio di stabilità di fase.



Figura 1.5: Sincrotrone utilizzato nel rilascio di adroterapia al CNAO di Pavia. Fonte: <https://fondazionecnao.it/adroterapia/sincrotrone>

### 1.3 Grandezze radiobiologiche

L'obiettivo della radioterapia è quello di indurre l'apoptosi delle cellule tumorali grazie all'uso di radiazioni ionizzanti. Quest'ultime sono in grado di indurre danni più o meno riparabili alla macromolecola del DNA, intaccando il meccanismo di sopravvivenza e di riproduzione delle cellule cancerogene. La radiazione può provocare dei danni in maniera diretta o indiretta (figura 1.6). Nel primo caso la radiazione incidente interagisce direttamente con la molecola di DNA, alla quale trasferisce energia attraverso processi di eccitazione o ionizzazione degli atomi che la compongono. Nel secondo caso la radiazione interagisce con l'acqua presente producendo radicali liberi OH che attaccano la molecola di DNA. Quest'ultimo processo dipende quindi dalle

componenti biochimiche presenti nel tessuto al momento dell'irraggiamento. Le radiazioni ad alto LET tendono ad indurre danni più irreparabili alla molecola di DNA, come la rottura della doppia elica, rispetto a radiazioni a basso LET.

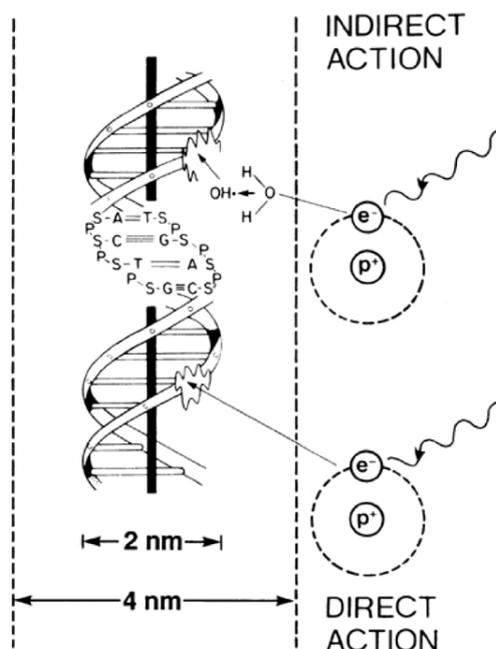


Figura 1.6: Schema illustrativo del danno diretto o indiretto di una radiazione ionizzante sulla molecola di DNA. Fonte: presentazione della Professoressa Mattei per il corso di *Introduzione alla Fisica Medica e Sanitaria* presso l'università degli studi di Milano a.a. 2021/2022

Le quantità fisiche introdotte finora non bastano per tener conto anche degli aspetti biologici dei danni indotti dalle radiazioni ionizzanti, pertanto si definiscono i seguenti parametri.

### 1.3.1 Oxygen Enhancement Ratio (OER)

È dimostrato da studi clinici e radiobiologici [6] che la presenza o l'assenza di ossigeno molecolare in un tessuto neoplastico influisce fortemente sulla radiosensibilità di quest'ultimo. Infatti, risulta che un tessuto ipossico è più radioresistente di un tessuto ricco di ossigeno, in quanto in presenza di ossigeno molecolare la radiazione incidente provoca un danno indiretto sul DNA. La radiazione ionizzante induce la radiolisi

dell'acqua (ossia la scissione di uno o più legami) e la produzione di radicali idrossili. Questi ultimi possono essere incorporati dal DNA, causando un danno riparabile dalla cellula, oppure possono reagire con l'ossigeno molecolare presente generando radicali perossilici, in grado di provocare un danno permanente al DNA. Dunque, un'elevata concentrazione di ossigeno molecolare nel tessuto comporta effettivamente una maggiore radiosensibilità.

Per tener conto di ciò si definisce un ulteriore parametro, l'Oxygen Enhancement Ratio (*OER*):

$$OER = \left(\frac{D_{hyp}}{D_{aer}}\right)_{ISO} \quad (1.18)$$

Tale parametro confronta la dose rilasciata in un tessuto ipossico ( $D_{hyp}$ ), con la dose rilasciata in un tessuto aerobico ( $D_{aer}$ ), a parità di effetto biologico. Come è rappresentato in figura 1.7, radiazioni a basso LET hanno solitamente un OER maggiore di radiazioni ad alto LET.

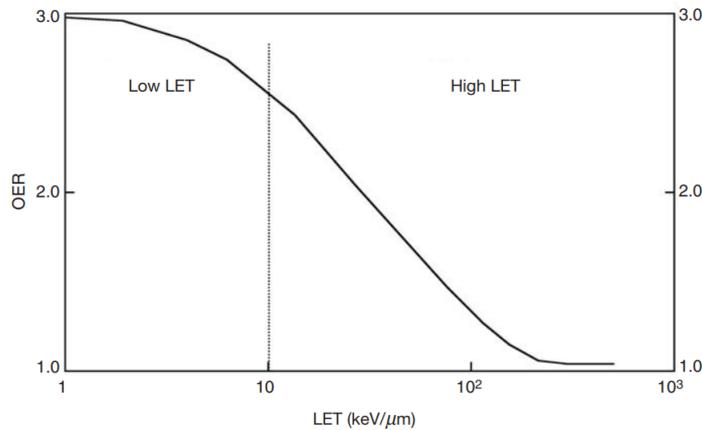


Figura 1.7: OER in funzione del LET [ $\text{keV}/\mu\text{m}$ ]. La linea tratteggiata verticale separa la regione a basso LET, dalla regione ad alto LET.[5]

Un volume tumorale cresce se al suo interno sono presenti vasi sanguigni che ossigenano le cellule tumorali. Le regioni situate in profondità, all'interno della massa tumorale, diventano ipossiche a causa del consumo della maggior parte dell'ossigeno da parte delle cellule vicine ai vasi sanguigni. In questo modo si riduce significativamente la radiosensibilità cellulare del tessuto neoplastico. Pertanto, nei piani di trattamento terapeutici la dose viene rilasciata in più frazioni, in modo che le cellule ipossiche del

tessuto tumorale possano riossigenarsi e che il tumore torni ad essere sensibile alla radiazione incidente.

### 1.3.2 Relative Biological Effectiveness (RBE)

Come anticipato nella sezione 1.1.4, maggiore è il LET di una particella e maggiore è la sua densità di ionizzazione, e quindi l'effetto biologico indotto. Per tener conto di ciò, si definisce la Relative Biological Effectiveness (*RBE*) come

$$RBE = \left(\frac{D_X}{D_T}\right)_{ISO} \quad (1.19)$$

L'*RBE* confronta la dose di una radiazione test ( $D_T$ ) con la dose di una radiazione standard di riferimento ( $D_X$ ) (solitamente raggi  $\gamma$  del  $^{60}\text{Co}$ ), in grado di provocare lo stesso danno biologico. L'*RBE* non dipende solo dal tipo di radiazione incidente ma anche dal tessuto, dall'effetto biologico preso in considerazione, dalla dose assorbita e dal dose rate. Inoltre, varia in funzione del LET della radiazione: maggiore è il LET e maggiore è la concentrazione di molecole ionizzate o eccitate lungo la traccia delle particelle incidenti, e quindi maggiore è il danno biologico indotto localmente. Quindi, l'*RBE* tende ad aumentare con il LET fino a raggiungere un massimo in corrispondenza di  $\sim 200 \text{ keV}/\mu\text{m}$ . In seguito, per valori del LET superiori, l'*RBE* diminuisce a causa dell'effetto *overkill*: per radiazioni così densamente ionizzanti la dose necessaria per indurre il danno biologico considerato è depositata solo da alcune delle particelle incidenti, e non sono necessarie altre ionizzazioni successive. In questo regime, l'*RBE* è inversamente proporzionale al LET. (figura 1.8).[5]

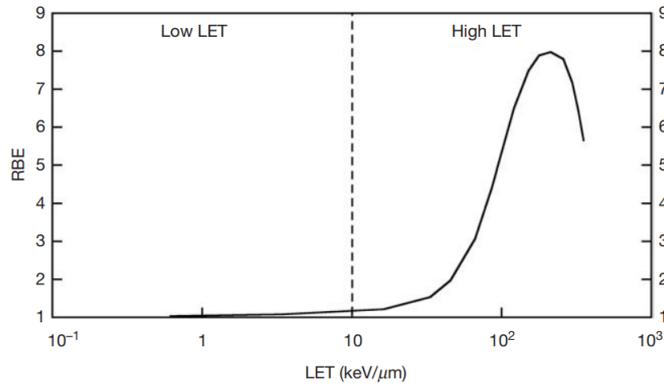


Figura 1.8: RBE in funzione del LET [keV/μm]. La linea tratteggiata verticale separa la regione a basso LET, dove l'RBE è  $\sim 1$ , dalla regione ad alto LET, dove l'RBE raggiunge un valore massimo di  $\sim 8$ . [5]

## 1.4 Radioterapia a fasci esterni

La radioterapia a fasci esterni coinvolge principalmente fotoni ed elettroni prodotti da acceleratori lineari con energie nel range di 1-10 MeV. Queste particelle costituiscono radiazioni ionizzanti a basso LET che hanno un rilascio di energia in funzione della profondità caratterizzato da un massimo vicino alla superficie del materiale attraversato, seguito da un andamento decrescente esponenziale (figura 1.9). Per trattare i tumori, è necessario combinare l'azione di più campi per incrementare la dose rilasciata al target, mantenendo la dose ai tessuti sani circostanti sotto i livelli consentiti dalle prescrizioni mediche. Nel corso degli anni, sono stati molti i progressi e i perfezionamenti apportati a questo tipo di terapia, con l'obiettivo di conformare sempre meglio la dose al tumore e ridurre al minimo le tossicità indotte nei tessuti sani adiacenti. Una tecnica di radioterapia attualmente in uso e di elevata precisione è la *Intensity Modulated Radiation Therapy* (IMRT), ossia la radioterapia ad intensità modulata. Quest'ultima, combinando alla modulazione dell'intensità del fascio la conformazione geometrica sul target, consente una migliore distribuzione della dose anche su volumi concavi con una maggiore salvaguardia dei tessuti sani. Inoltre, consente l'utilizzo della tecnica SMART (*Simultaneous Modulated Accelerated Radiation Therapy*) con la quale si attua la somministrazione simultanea di dosi differenziate su target multipli. Un'evoluzione della IMRT ha portato alla *arc therapy*, che nel caso della terapia

con fotoni è denominata *Volumetric Modulated Arc Therapy* (VMAT). Con questa tecnica, la dose rilasciata al tumore è massimizzata e distribuita con una precisione millimetrica grazie alla rotazione di un gantry attorno al paziente.

Negli ultimi decenni è stata introdotta l'adroterapia, ossia una forma di radioterapia che utilizza protoni o ioni  $^{12}\text{C}$ , prodotti principalmente da ciclotroni o sincrotroni. Queste particelle a più alto LET rilasciano una buona parte della loro energia alla fine della loro traccia, in corrispondenza del picco di Bragg (figura 1.9). La posizione di quest'ultimo, all'interno del materiale irradiato, dipende dall'energia iniziale della particella. Utilizzando fasci a diversa energia ed irraggiando attraverso più campi, è possibile posizionare i picchi di Bragg delle particelle in modo da conformare la dose al tumore e minimizzare quella rilasciata ai tessuti sani adiacenti. In questo modo, l'adroterapia permette di ridurre il numero di campi della radiazione rispetto a quelli utilizzati nella radioterapia a fotoni o elettroni.

La terapia con i protoni, detta anche protonterapia, è stata oggetto di numerosi progressi tecnologici, tra cui la tecnica di elevata precisione del *Pencil Beam Scanning*. Questa prevede che le particelle cariche costituenti il fascio vengano direzionate da campi magnetici esterni, in modo tale da produrre fasci collimati con larghezza dell'ordine di pochi millimetri. Le particelle poi incidono su diversi *spot* che coprono tutto il volume tumorale da irradiare. Nel passaggio dall'irraggiamento di uno *spot* a quello successivo diversi parametri del fascio, come ad esempio la sua energia, la sua direzione o la fluenza delle particelle, possono essere modificati per conformare la dose al tumore. È fondamentale che tali modifiche avvengano nel minor tempo possibile, in modo da ridurre i tempi di trattamento che generalmente sono dell'ordine di decine di minuti. Il sistema di erogazione appena descritto, in cui i parametri del fascio vengono selezionati direttamente sull'acceleratore utilizzato è detto *active delivery*. Una seconda tecnica per erogare il trattamento è quella del *passive delivery*, nella quale il fascio è prodotto ad energia fissata (da un ciclotrone ad esempio) e questa viene poi modulata grazie al posizionamento, tra l'acceleratore ed il paziente, di appositi materiali assorbitori di configurazione opportuna. Nella protonterapia, sono utilizzati entrambi questi metodi di rilascio della dose, mentre nell'adroterapia con ioni  $^{12}\text{C}$  si utilizza solo l'*active delivery* in quanto i materiali passivi portano alla produzione di particelle secondarie che hanno sufficiente energia per rilasciare una quantità di dose non trascurabile nel paziente. Inoltre, alcune delle tecniche più avanzate della radioterapia convenzionale, come la terapia ad intensità modulata o la *arc therapy*, sono state

sfruttate anche nei trattamenti di adroterapia, al fine di conformare maggiormente la dose al volume tumorale.

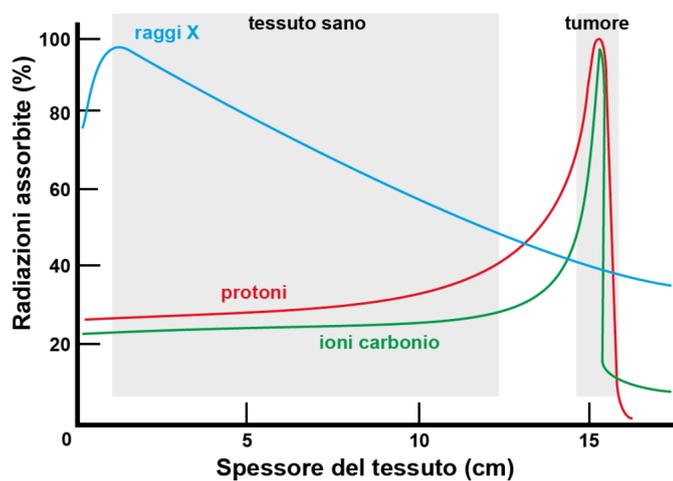


Figura 1.9: Radiazione assorbita in funzione dello spessore di tessuto per diversi tipi di radiazione. Fonte: <https://informa.airicerca.org/it/2016/03/14/adroterapia-nuova-frontiera-radioterapia/>

# Capitolo 2

## Radioterapia FLASH

Nel corso degli anni sono stati molti i perfezionamenti apportati alle tecnologie impiegate nella radioterapia, al fine di conformare sempre meglio la dose rilasciata al tumore e risparmiare i tessuti sani. Oltre all'ottimizzazione della distribuzione della dose, la comunità scientifica si concentra sullo studio della dettagliata risposta biologica dei tessuti alle radiazioni. La ricerca si dirige verso una nuova modalità di irraggiamento che possa stimolare effetti biologici diversi da quelli indotti dalla radioterapia convenzionale, che conduce a tossicità croniche e acute nei tessuti normali circostanti il tumore. Idealmente, si vorrebbe trovare una terapia che garantisce una risposta differenziata per il tessuto tumorale e per il tessuto sano. Già a partire dagli anni '60 del secolo scorso, uno studio aveva dimostrato la maggiore vitalità di cellule mammarie non cancerose irradiate con ratei di dose ultraelevati, rispetto a quelle irradiate a ratei di dose convenzionali [2]. A partire dal 2014, la maggiore salvaguardia dei tessuti sani, a conseguenza di una terapia con dose rate ultraelevati, è stata nuovamente dimostrata e nominata effetto FLASH da Vincent Favaudon et al. [7].

In questo capitolo verranno illustrati l'effetto FLASH e i possibili meccanismi che ne stanno alla base.

### 2.1 Effetto FLASH

Nella ricerca condotta nel 2014, Favaudon et al. hanno confrontato l'insorgenza di effetti secondari nei tessuti sani, in particolare la fibrosi polmonare indotta dal rilascio di una singola frazione di dose di 17 Gy, a dose rate convenzionali (CONV-RT) e a dose

rate ultraelevati (FLASH-RT). Durante l'esperimento 240 topi sono stati sottoposti ad un irraggiamento toracico bilaterale; la terapia convenzionale è stata effettuata con una radiazione di fotoni ( $^{137}\text{Cs}$ , raggi  $\gamma$ ) ed un dose rate di 0.03 Gy/s, mentre la terapia a dose rate ultraelevati (40-60 Gy/s) è stata effettuata con fasci di elettroni a 4.5 MeV prodotti da un acceleratore LINAC. I tessuti irradiati con ratei di dose convenzionale hanno presentato l'insorgenza di lesioni polmonari dopo otto settimane dall'irraggiamento, mentre dopo quello stesso arco di tempo i tessuti irradiati con ratei maggiori ne erano privi (figura 2.1). Per indurre le stesse lesioni con la terapia FLASH la dose totale doveva essere aumentata fino a 30 Gy.

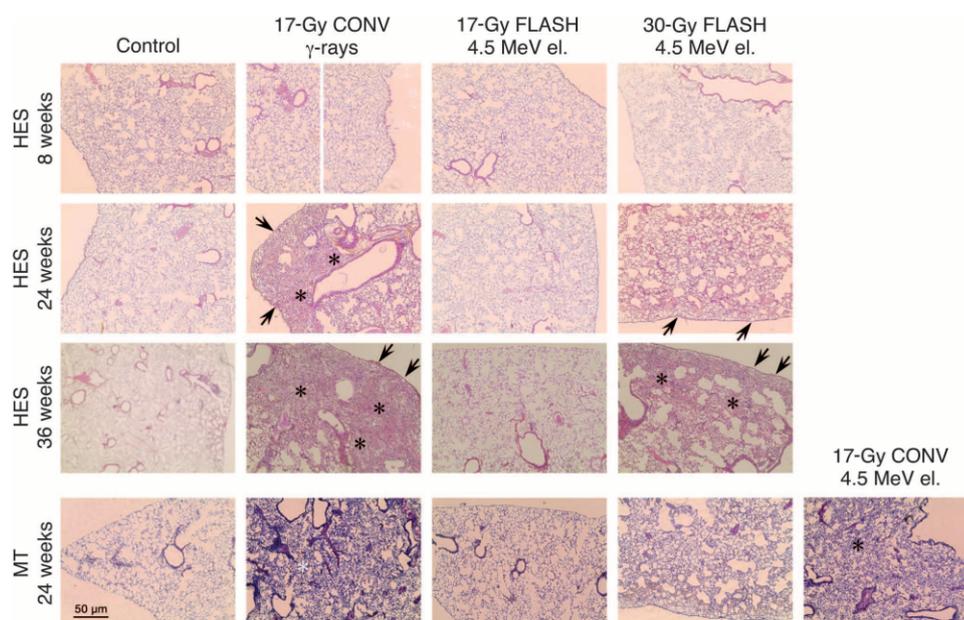


Figura 2.1: Esempi di cellule irradiate con CONV-RT (raggi  $\gamma$  del  $^{137}\text{Cs}$  a 0.03 Gy/s) o con FLASH-RT (elettroni di 4.5 MeV a 40-60 Gy/s). Le lesioni polmonari sono messe in evidenza dalle colorazioni istologiche (è usata la ematosilina eosina o la colorazione tricromica di Masson). Le frecce puntano a macchie di fibrosi subpluerica, gli asterischi indicano la fibrosi intraparenchimale. [7]

Lo stesso gruppo di ricerca ha poi confrontato l'induzione del fattore di crescita trasformante beta ( $\text{TGF}\beta$ ), un marcatore molecolare della fibrosi polmonare indotta da radiazioni. In accordo con i risultati precedenti, la segnalazione del fattore  $\text{TGF}\beta$  è significativamente ridotta nei tessuti irradiati in modalità FLASH rispetto ai tes-

suti irradiati con CONV-RT. Nuovamente, per equiparare la segnalazione del fattore  $TGF\beta$  della terapia convenzionale, la FLASH-RT dovrebbe rilasciare una dose totale di 30 Gy. Si evince, dunque, che la FLASH-RT sia meno fibrogenica rispetto alla radioterapia convenzionale.

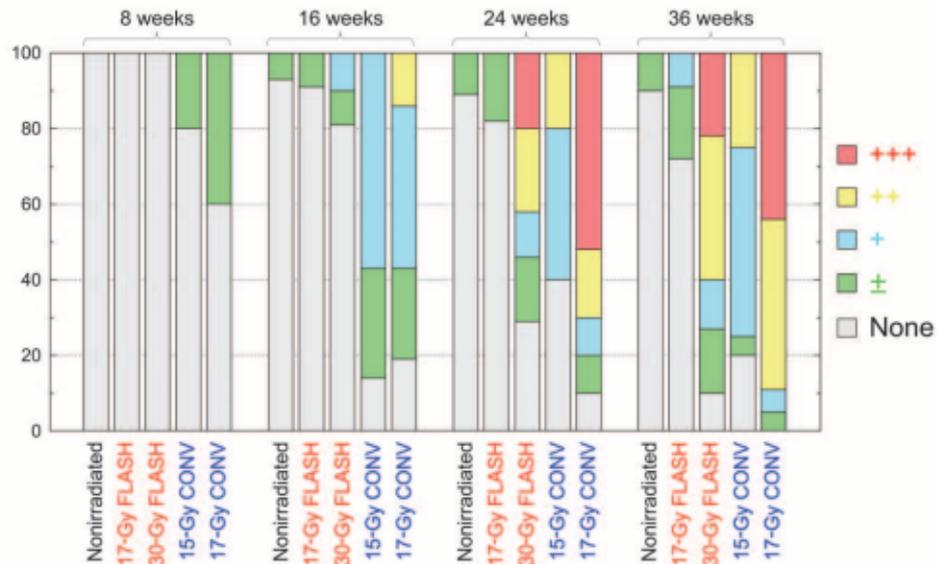


Figura 2.2: Dipendenza dose-tempo della fibrosi polmonare. Scala di punteggio: "none", nessuna fibrosi rilevabile; "±" (minimo), rari focolai di piccole dimensioni, generalmente all'estremità dei lobi polmonari; "+" (lieve), focolai fibrotici disseminati che rappresentano meno del 10% della superficie della sezione polmonare; "++" (moderato), disseminati focolai fibrotici di moderate dimensioni (~500  $\mu\text{m}$  di diametro), rappresentanti tra il 10 ed il 25% della superficie; "+++" (grave), focolai fibrotici coalescenti multipli e disseminati che rappresentano oltre il 25% della superficie. [7]

Numerosi studi condotti sull'irraggiamento del tessuto cerebrale di alcuni topi hanno messo in luce la migliore neuroprotezione della FLASH-RT rispetto alla CONV-RT. In uno di questi studi [8], effettuato dal gruppo di ricerca di Vozenin e Montay-Gruel, i topi sono stati esposti a dose rate variabili, a partire da 0.1 Gy/s fino a  $5.6 \cdot 10^6$  Gy/s. In ogni erogazione una dose di 10 Gy è stata rilasciata da una radiazione di elettroni a 4.5 o a 6 MeV in una singola frazione, e l'insorgenza di tossicità neuronali è stata investigata tramite test di riconoscimento di nuovi oggetti due mesi dopo l'irraggiamento. I risultati di tale studio hanno riportato un significativo miglioramento negli

esiti del test per topi irradiati a dose rate  $\geq 30$  Gy/s, e nessuna differenza nei risultati tra topi irradiati con dose rate maggiori di 100 Gy/s rispetto a topi non sottoposti all'erogazione.

In una ricerca simile [9], il cervello dei topi è stato irradiato con un fascio di elettroni a 4-6 MeV prodotto da un sincrotrone, con un dose rate di 37 Gy/s. In accordo con i risultati precedenti, è emersa la migliore protezione delle capacità neurocognitive della FLASH-RT rispetto all'erogazione in modalità convenzionale.

Sono state effettuate però anche ricerche che non hanno mostrato alcun risparmio dei tessuti sani in seguito ad erogazioni a dose rate ultraelevati. Ad esempio, Smyth et al. [10] hanno effettuato un esperimento irradiando dei topi con un fascio di fotoni prodotti da un sincrotrone con un'energia media di 124 keV e con un dose rate di 37-41 Gy/s. Sono stati confrontati i valori di dose  $TD_{50}$  necessari ad indurre tossicità quali perdita di peso, grave diarrea e comportamento moribondo nel 50% degli animali. Non è stata osservata nessuna differenza tra i risultati ottenuti con dose rate convenzionali e con dose rate ultraelevati. Questa discrepanza rispetto ai risultati ottenuti dallo studio di Montay-Gruel et al. è dovuta al fatto che, nell'erogazione in modalità FLASH effettuata con i sincrotroni, un parametro fondamentale per la caratterizzazione della terapia è il dose rate all'interno del *beam slice*. Infatti, nonostante il dose rate medio sia simile nei due studi appena illustrati, lo spessore del *beam slice* con cui i topi sono stati irradiati differisce almeno di un fattore 20. A ciò corrisponde quindi un dose rate pari a 12000 Gy/s nello studio di Montay Gruel e Vozenin, rispetto ad un dose rate di soli 600 Gy/s per la ricerca di Smyth et al. . Questa differenza di dose rate nella sezione del fascio potrebbe spiegare i diversi risultati ottenuti nei due studi.

Una volta verificata l'ipotesi dell'effetto FLASH nei topi, gli studi di ricerca sono stati estesi a mammiferi più vicini all'uomo, in modo da valutare una potenziale applicazione clinica. Una ricerca di Vozenin et al. [11] ha confrontato gli effetti indotti da radioterapia erogata in modalità FLASH con quelli indotti dalla radioterapia convenzionale su maiali e gatti. In particolare, la cute dei maiali è un modello radiobiologico ben caratterizzato che imita le reazioni della pelle umana alla radioterapia. Per gli esperimenti hanno utilizzato due acceleratori LINAC in grado di produrre fasci di elettroni a 4.5 e 6 MeV. Nella prima parte dello studio è stato irradiato il dorso di un maiale con dosi comprese tra i 22 e i 34 Gy in due modalità differenti: la prima erogando la dose con un rateo tipico della CONV-RT ( $\sim 0.083$  Gy/s) e la seconda erogandola con i dose rate ultraelevati della FLASH-RT ( $\sim 300$  Gy/s). Il gruppo di

ricerca ha monitorato la risposta della cute alle radiazioni tramite esaminazioni visive per 48 settimane e dopo 36 settimane ha effettuato una biopsia. Le zone irradiate con FLASH-RT hanno presentato tossicità acute limitate alla depilazione transitoria per dosi inferiori a 31 Gy. I follicoli piliferi sono stati danneggiati permanentemente nel caso della modalità CONV-RT e nessuna ricrescita di peli è stata osservata per oltre 6 mesi. Al contrario, la FLASH-RT ha conservato i follicoli piliferi senza danneggiarli. Inoltre, l'analisi istologica del tessuto irradiato con FLASH-RT era comparabile con quella di tessuto non esposto a radiazione, mentre sono emerse ulcere, ipercheratosi ed infiammazioni nei tessuti irradiati con dose rate convenzionali. Il fatto che la radioterapia in modalità FLASH limiti significativamente l'insorgenza di tossicità acute è coerente con gli studi precedentemente condotti sui topi, e con l'ipotesi che tale modalità permetta una migliore salvaguardia dei tessuti sani.

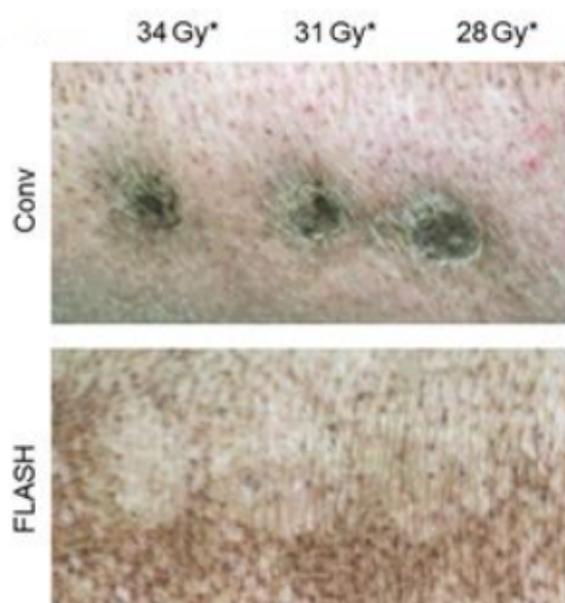


Figura 2.3: Effetti epiteliali 36 settimane dopo l'irraggiamento: la visualizzazione macroscopica mostra gravi lesioni fibronecrotiche negli spot irradiati con CONV-RT e cute priva di lesioni negli spot irradiati con FLASH-RT. [11]

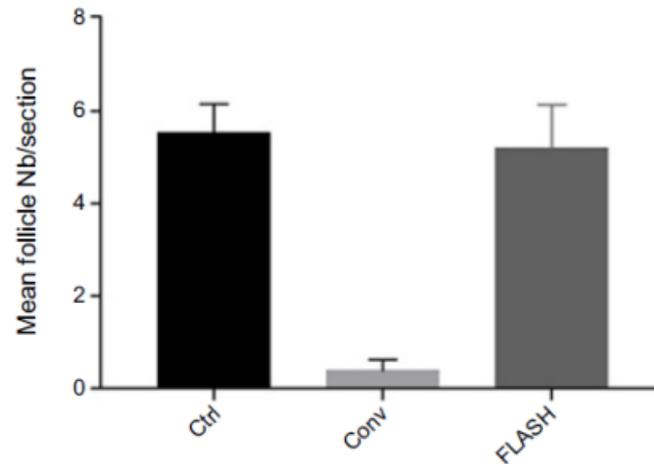


Figura 2.4: Numero di follicoli piliferi a 36 settimane dall'erogazione: controllo (Ctrl), convenzionale (CONV) e FLASH. [11]

### 2.1.1 L'effetto della radiazione FLASH nei tessuti tumorali

Dalle varie ricerche condotte è emerso che la FLASH-RT, oltre a limitare l'insorgenza di tossicità nei tessuti sani, induce una risposta antitumorale del tutto analoga a quella indotta dalla radioterapia convenzionale. Favaudon et al. [7] hanno trattato due tipi di tumore, cancro al seno HBCx-12A e carcinoma HEP-2 della testa e del collo, xenotrapiantati nei topi. I tessuti neoplastici del cancro al seno sono stati esposti ad una dose di 17 Gy, erogata in modalità FLASH con elettroni a 4.5 MeV a 60 Gy/s, o convenzionale con raggi  $\gamma$  del  $^{137}\text{Cs}$  a 0.03 Gy/s. In entrambi i casi la dose totale è stata rilasciata in due frazioni uguali a distanza di 24 ore. Come si può osservare in figura 2.5, è emerso che la radioterapia in modalità FLASH è efficiente tanto quella convenzionale nel controllo della crescita tumorale.

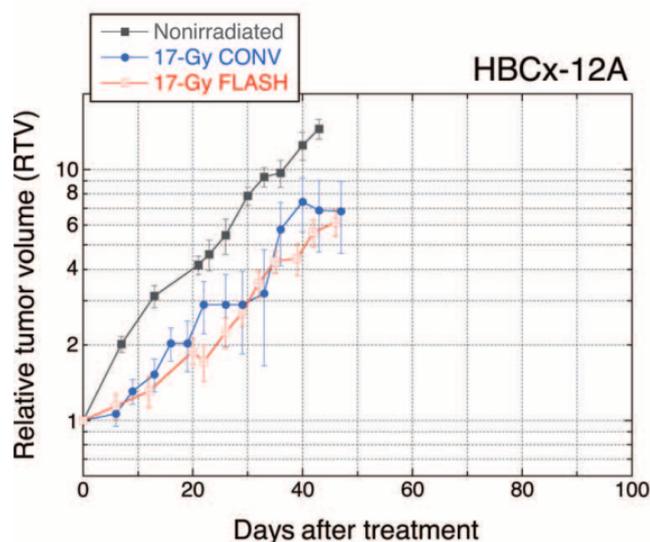


Figura 2.5: Evoluzione dello xenotrapianto tumorale HBCx-12A in seguito ad irraggiamento con FLASH-RT e con CONV-RT.[7]

Per il carcinoma di testa e collo è stata erogata in una singola frazione una dose di 15, 20 o 25 Gy in modalità FLASH da elettroni di 4.5 MeV a 60 Gy/s, o una dose di 19 Gy in modalità convenzionale rilasciata da raggi X prodotti a 200 kV con un dose rate di 0.012 Gy/s. Dopo 40 giorni è stata osservata un'inibizione del tumore indipendente dalla dose in tutti i gruppi irradiati, a prescindere dalla sorgente di radiazione e dal dose rate utilizzato. In particolare, i tessuti irradiati con la dose di 25 Gy in modalità FLASH hanno presentato una remissione completa del tumore senza alcun danno epiteliale alla zona irradiata.

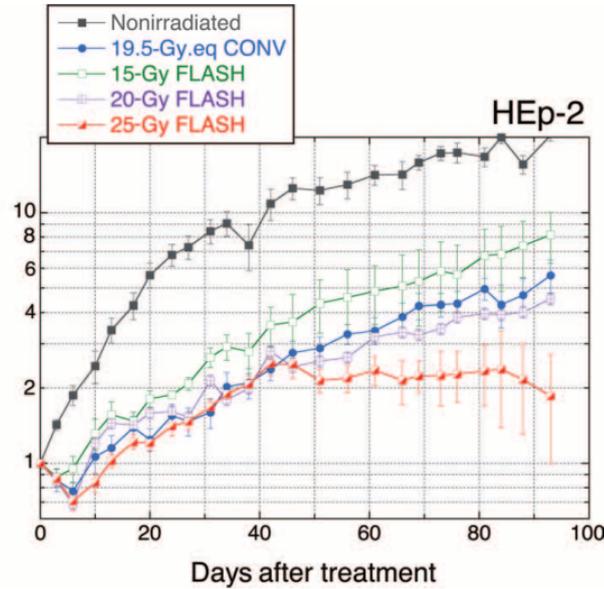


Figura 2.6: Evoluzione dello xenotrapianto tumorale HEP-2 in seguito ad irraggiamento con FLASH-RT e con CONV-RT.[7]

Nello stesso studio, per confrontare la risposta del tessuto sano e tumorale esposti alla massima dose tollerata, cellule TC-1 di carcinoma polmonare di topo sono state iniettate per via transpleurica in un gruppo di topi, al fine di generare un modello di tumore polmonare ortotopico. Utilizzando un'escalation di dosi, parte degli animali è stata irradiata con raggi  $\gamma$  e un dose rate convenzionale di 0.03 Gy/s, mentre un altro gruppo è stato esposto ad una radiazione di elettroni a 4.5 MeV a 60 Gy/s (FLASH). La risposta dei tessuti è stata valutata 9 settimane dopo l'irraggiamento nelle due modalità grazie ad analisi istopatologiche e di bioluminescenza. È emerso che una dose di 15 Gy rilasciata in modalità FLASH è efficiente tanto quanto la stessa identica dose rilasciata in modalità CONV nel controllo della crescita tumorale. Invece, una dose compresa tra i 23 e i 28 Gy erogata in modalità FLASH è risultata più efficace rispetto alla stessa dose rilasciata con radioterapia convenzionale. Lo studio si è concentrato sulle risposte dei tessuti alle dosi di 15 Gy in modalità convenzionale e 28 Gy in modalità FLASH. Entrambe le terapie hanno riportato una repressione del tumore fino a 14 giorni dopo l'attecchimento. Tuttavia, da 28 a 35 giorni dopo l'irraggiamento è stata osservata una progressione del tumore nell'80% dei topi irradiati con CONV-RT. Al contrario l'80% dei topi irradiati con la dose di 28 Gy in FLASH-RT

erano ancora vivi e il 70% di essi era guarito dal tumore dopo 62 giorni. I due topi esposti a 15 Gy in modalità convenzionale sopravvissuti al tumore hanno presentato un rimodellamento infiammatorio e fibrotico, al contrario dei sette topi sopravvissuti irradiati con FLASH-RT che non presentavano alcuna fibrosi. Ad ulteriore prova del fatto che la risposta antitumorale talvolta è perfino migliore con la FLASH-RT che con la CONV-RT, uno studio di Rama et al [2][12] ha valutato la risposta alle radiazioni di cellule del carcinoma polmonare di Lewis (LLC) inoculate nel polmone sinistro di un gruppo di topi. Il tumore è stato esposto ad una sola frazione di 18 Gy rilasciata da una radiazione di protoni erogata come CONV-RT con una corrente di fascio (numero di particelle per unità di tempo) di 0.5 nA o come FLASH-RT con un dose rate di 40 Gy/s. Le dimensioni del tumore sono state valutate grazie ad una TC effettuata una settimana dopo l'irraggiamento ed è emerso che i tumori trattati con FLASH-RT avevano dimensioni minori rispetto a quelli trattati con CONV-RT. Questo conferma la migliore efficienza della FLASH-RT rispetto alla radioterapia convenzionale anche nel caso in cui si usi una radiazione di protoni.

Per studiare la risposta dei tessuti in mammiferi più vicini all'uomo, nella seconda parte dello studio di Vozenin et al. [11] 6 gatti con carcinoma squamoso cutaneo del planum nasale sono stati sottoposti a radioterapia FLASH (dose rate maggiore di 30-40 Gy/s). L'irraggiamento è stato eseguito con un fascio di elettroni a 4.5 o a 6 MeV prodotti da due LINAC. Fissata una dose iniziale di 25 Gy, è stata attuata un'escalation di dose: la dose erogata è stata aumentata se il gatto precedente a quello trattato non ha presentato alcuna tossicità limitante, in particolare se non è stata indotta la teleangectasia, cioè la desquamazione umida della cute e dei capillari che è in grado di guarire solo parzialmente. Coerentemente con quanto ottenuto negli studi sui topi, la FLASH-RT ha permesso una migliore salvaguardia dei tessuti sani, dato che nessun gatto ha presentato tossicità acute. Solo nell'ultimo gatto, irradiato con 41 Gy, è stata rilevata una fibrosi caratterizzata da una desquamazione umida del tessuto irradiato, in grado però di guarire completamente. I gatti sono rimasti in osservazione per una media di 18 mesi ed in tutti è stata rilevata una depilazione permanente limitata alla zona irradiata. Hanno tutti riportato ottimi risultati funzionali, senza alcuna riduzione dell'assunzione del cibo o dell'olfatto. In particolare, tutti i 6 gatti hanno mostrato una remissione completa del tumore a 3 mesi dal trattamento, e solo due gatti, rispettivamente 6 e 21 mesi dopo l'irraggiamento, hanno presentato una recidiva.

Gli esiti positivi delle numerose ricerche sulla FLASH-RT su diversi gruppi di animali hanno incoraggiato l'applicazione clinica sull'uomo. Il primo paziente trattato nello studio di Bourhis et al.[13] con terapia FLASH è stato un uomo di 75 anni con un linfoma cutaneo multiresistente a cellule TCD30+ sull'avambraccio destro. Il paziente era già stato precedentemente sottoposto a radioterapia convenzionale a fotoni, con una dose di 20 Gy frazionata in 10 sedute, ed elettroni, con una dose di 21 Gy in 6 sedute. Ma la scarsa tolleranza della cute anche a dosi non troppo elevate e gli effetti secondari insorti hanno suggerito l'utilizzo della radioterapia FLASH. Una radiazione di elettroni a 5.6 MeV, prodotti da un LINAC progettato appositamente per la FLASH-RT, ha rilasciato al tessuto neoplastico una dose totale di 15 Gy, sufficientemente alta per innescare l'effetto FLASH e per avere un buon controllo del tumore. Basandosi sugli studi *in vivo* condotti fino a quel momento, sono stati selezionati i parametri che permettevano di innescare l'effetto FLASH nei tessuti umani: la dose di 15 Gy è stata erogata in 10 pulsazioni da 1  $\mu$ s ciascuna con una frequenza di ripetizione di 100 Hz. Il tumore ha iniziato a ridursi 10 giorni dopo l'irraggiamento arrivando ad una risposta completa alle radiazioni dopo 36 giorni e duratura per i successivi 5 mesi (figura 2.7). Tra gli effetti secondari osservati si ha rossore sulla cute circostante il tumore, emerso tra il decimo ed il quarantaquattresimo giorno post-trattamento, e una massima reazione cutanea a 3 settimane, con una epitelite lieve asintomatica di grado 1 ed un edema asintomatico di grado 1. Questi effetti collaterali sono comunque da considerare come blandi rispetto a quelli indotti dalla radioterapia convenzionale, tanto che non è stata richiesta alcuna biopsia dell'edema. Pertanto, come era già stato confermato da studi precedentemente condotti sui topi ed altri mammiferi, l'effetto FLASH permette un ottimo controllo del tumore e una maggiore salvaguardia dei tessuti sani, rispetto dalla radioterapia convenzionale.



Figura 2.7: Evoluzione temporale della lesione trattata. **1a**: prima del trattamento. Il PVT (Planned Target Volume) è delimitato dalla linea nera; **1b**: 3 mesi dal trattamento, dove si ha il culmine delle reazioni cutanee; **1c**: 5 mesi dopo il trattamento

Alla luce di quanto visto finora, l'indice benefico dell'effetto FLASH coinvolge la riduzione delle tossicità nei tessuti sani in seguito all'esposizione a radiazione, e un analogo, se non talvolta migliore, controllo sulla repressione del tumore. Il fatto che in regime FLASH più dose sia rilasciata in meno tempo, riduce di molto i tempi di trattamento rispetto a quelli coinvolti nella radioterapia convenzionale. Ciò minimizza le incertezze del piano di trattamento correlate ai movimenti intrafrazionari, dovuti ad un'eventuale instabilità del paziente a causa di una difficile immobilizzazione, di movimenti casuali e involontari durante il tempo di trattamento, o di un diverso riposizionamento del paziente tra una frazione e l'altra. Dunque, ridurre il tempo di trattamento potrebbe permettere una migliore conformazione della dose al tumore, riducendo il volume dei tessuti sani inutilmente irradiati. Tali incertezze potrebbero essere ulteriormente ridotte considerando che la FLASH-RT viene erogata in regime di ipofrazionamento, cioè in un numero minore di frazioni rispetto alla CONV-RT. Tuttavia, la combinazione di tempi di trattamento estremamente brevi e di un numero minore di frazioni, implica che qualsiasi differenza geometrica tra il piano di trattamento e la posizione reale del paziente porti ad un errato rilascio di dose nei

tessuti sani e necrotici non trascurabile. Come in adroterapia, questo potrebbe essere ridotto affiancando alle tecniche di pianificazione della terapia, immagini del paziente effettuate appena prima del trattamento [14].

## 2.2 Possibili meccanismi alla base dell'effetto FLASH

Nonostante i grandi vantaggi correlati all'effetto FLASH, prima di poterlo applicare in ambito clinico, tale effetto dev'essere ancora ampiamente investigato per comprenderne a fondo i processi che lo generano. I meccanismi che stanno alla base dell'effetto FLASH non sono ancora del tutto chiari alla comunità scientifica e sono tuttora oggetto di vari studi. Nel corso degli anni sono state avanzate diverse ipotesi per spiegare il meccanismo biochimico responsabile della riduzione delle tossicità nei tessuti sani in seguito alla FLASH-RT: le più accreditate riguardano il ruolo della quantità di ossigeno presente nel tessuto, la rapida ricombinazione degli idroperossidi organici e dei radicali liberi presenti, la risposta immunitaria, e i cosiddetti *intertrack effects*.

### 2.2.1 Deplezione dell'ossigeno

Diversi gruppi di ricerca [2] hanno suggerito che la differente risposta dei tessuti a FLASH-RT e a CONV-RT possa essere dovuta ad una deplezione radiochimica dell'ossigeno a dose rate ultraelevati. Come descritto nella sezione 1.3.1, un tessuto ipossico è meno sensibile alla radiazione ionizzante incidente di un tessuto ricco di ossigeno. Tramite la radiolisi dell'acqua, la radiazione incidente produce radicali idrossilici che, ricombinandosi con l'ossigeno molecolare presente, costituiscono le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Quest'ultime inducono elevate tossicità nei tessuti poichè sono in grado di indurre danni permanenti al DNA delle cellule.

L'ipotesi di una relazione tra il dose-rate e la deplezione di ossigeno nei tessuti irradiati era stata dimostrata nel 1959 in uno studio di Dewey e Boag [2]. Dai loro esperimenti era emerso che batteri irradiati a dose rate ultraelevati avevano una maggiore sopravvivenza rispetto a quelli irradiati a dose rate convenzionali. L'ipotesi di Dewey et al. è che, se il tempo di irraggiamento è molto minore rispetto al tempo necessario all'ossigeno per diffondersi e ripristinarsi, la radiazione incidente, tramite la produzione di radicali idrossilici, esaurisce significativamente l'ossigeno disponibile.

Si ha così una finestra di ipossia radiobiologicamente indotta nel tessuto irradiato (figura 2.8).

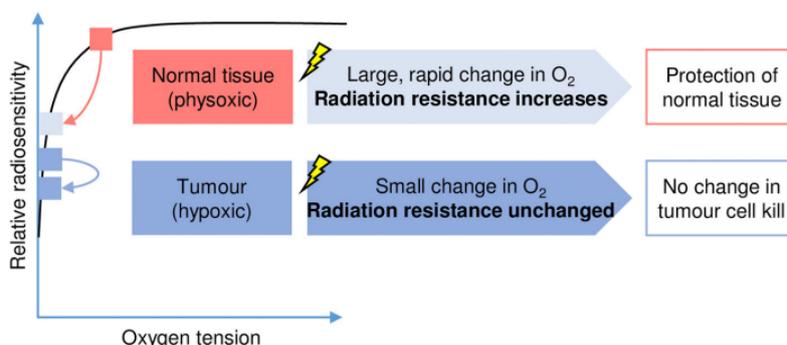


Figura 2.8: Deplezione dell'ossigeno: nei tessuti sani la FLASH-RT genera una finestra transitoria di ipossia, e quindi aumenta la radioresistenza. Nei tessuti tumorali invece, in seguito ad un trattamento con FLASH-RT si ha una variazione di ossigeno non sufficientemente significativa da modificarne la radiosensibilità. [2]

Tutto ciò è stato verificato in successive ricerche *in vitro* e *in vivo* [2]: in uno studio di Adrian et al. [15] dove cellule di un tumore prostatico *in vitro* sono state irradiate con un fascio di elettroni a 10 MeV a dose rate di 600 Gy/s (modalità di FLASH-RT) o di 0.23 Gy/s (modalità di CONV-RT). Per entrambe le modalità di irraggiamento sono state valutate le curve di sopravvivenza cellulare in funzione della concentrazione di ossigeno presente (figura 2.8).

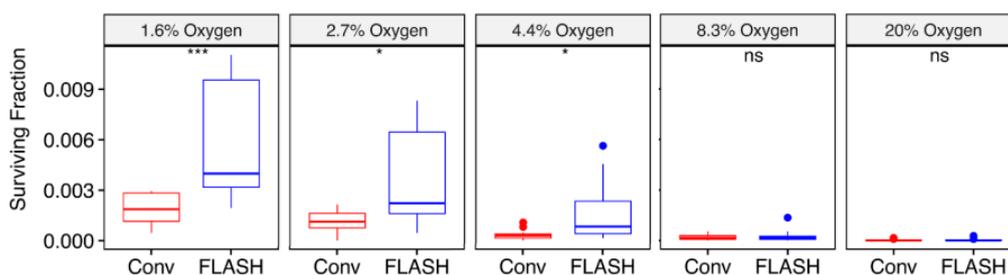


Figura 2.9: Box-plots della sopravvivenza cellulare a diverse % di  $O_2$  per una dose di 18 Gy rilasciata in modalità di CONV-RT o di FLASH-RT. [15]

Emerge che in condizioni normossiche (concentrazioni atmosferiche di ossigeno, 20%) non si ha alcuna differenza tra un irraggiamento di CONV-RT piuttosto che

di FLASH-RT. In condizioni ipossiche (concentrazioni fisiologiche di ossigeno, 3-7%) l'effetto FLASH garantisce una maggiore sopravvivenza cellulare rispetto al trattamento convenzionale, e tale differenza diventa più marcata per una dose maggiore o uguale di 18 Gy. In figura 2.10 è evidente che la frazione di sopravvivenza cellulare aumenta per la FLASH-RT, a parità di dose e al diminuire dell'ossigeno.

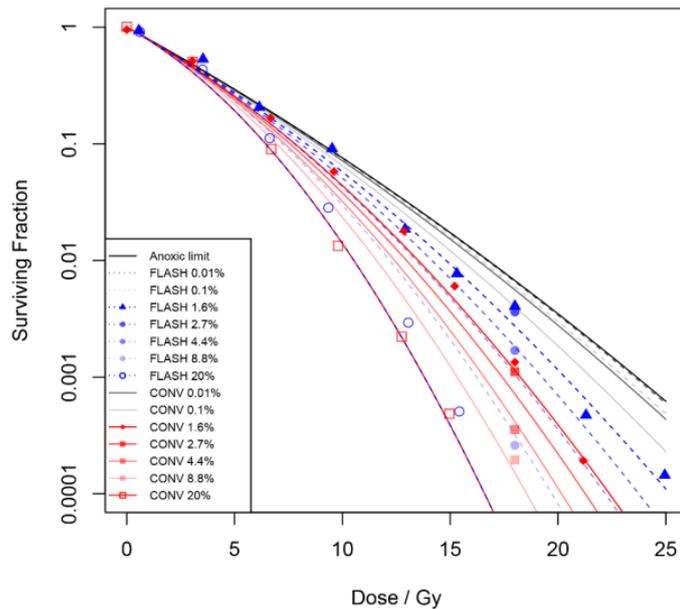


Figura 2.10: Curve della frazione di sopravvivenza cellulare in funzione della dose e della concentrazione di ossigeno, distinte per la FLASH-RT e per la CONV-RT. [15]

Alla luce di tutto ciò, secondo questo modello il risparmio dei tessuti sani tipico dell'effetto FLASH è dovuto ad una finestra di radioresistenza transitoria del tessuto, causata dalla completa deplezione radiochimica dell'ossigeno. Nonostante l'ipotesi della deplezione dell'ossigeno come meccanismo alla base dell'effetto FLASH sia stata accreditata da numerose ricerche scientifiche, tale supposizione non spiega l'analogia tra la risposta tumorale in seguito ad un trattamento di FLASH-RT e ad un trattamento convenzionale. Infatti, i tessuti tumorali sono più ipossici dei tessuti normali, e perciò l'effetto FLASH dovrebbe indurre una finestra di radioresistenza ancora maggiore nei tessuti neoplastici, ma ciò non accade. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che tessuti normali e tessuti tumorali hanno meccanismi cellulari di riparazione del DNA differenti, visto che i tessuti sani riparano danni indotti al DNA in maniera

più efficiente rispetto a quelli tumorali. Quindi, la radioresistenza che dovrebbe essere indotta nel tessuto tumorale in seguito ad un irraggiamento di FLASH-RT, è affiancata da una scarsa efficienza da parte delle cellule tumorali nella riparazione dei danni indotti dalle radiazioni. Ad ogni modo, tale ipotesi deve ancora essere investigata a fondo dalla comunità scientifica, e in verità, studi più recenti hanno dimostrato che l'ipotesi della deplezione dell'ossigeno non è sufficiente a giustificare l'effetto FLASH. In un uno studio di Cao et al. [16], è stato misurato l'ossigeno in popolazioni cellulari *in vitro* e in *in vivo*, in seguito all'esposizione a una dose totale di 20 Gy rilasciata da una radiazione di elettroni a 10 MeV erogata a dose rate ultraelevati (300 Gy/s) o a dose rate convenzionali (0.1 Gy/s). Dalle misure effettuate, è emerso che in seguito all'irraggiamento a dose rate ultraelevati l'ossigeno diminuisce da 1 a 3 mm Hg. Però, tale riduzione è molto minore rispetto a quella richiesta per l'induzione di una finestra di ipossia, e quindi di radioresistenza, nel tessuto sano. Oltretutto, la misurazione della quantità di ossigeno presente in seguito ad un irraggiamento di CONV-RT non può essere effettuata *in vivo*, in quanto a dose rate non elevati l'esaurimento dell'ossigeno dovuto alla radiazione incidente è compensato dalla sua redistribuzione da parte dei vasi sanguigni. Questo dimostra che la deplezione dell'ossigeno possa partecipare all'induzione dell'effetto FLASH, ma che non ne sia la causa principale.

### 2.2.2 Ricombinazione dei radicali perossilici

I radicali perossilici sono radicali liberi prodotti in seguito ad un processo detto perossidazione lipidica, che può essere indotto da una radiazione ionizzante incidente. Sono particolari specie reattive dell'ossigeno che contengono ossigeno molecolare a cui manca un elettrone. In particolare, i radicali perossilici organici  $\text{ROO}^-$  formati dall'aggiunta di ossigeno molecolare  $\text{O}_2$  a radicali primari R centrati sul carbonio, tendono ad acquistare un elettrone dalle molecole adiacenti, coinvolgendo così anche il DNA ossidandolo. La ricombinazione dei radicali perossilici in seguito all'irraggiamento a dose rate ultraelevati potrebbe essere uno dei meccanismi biochimici di base dell'effetto FLASH. A tal proposito, uno studio di Spitz et al. [17] ha suggerito che alla base dell'effetto FLASH ci sia un differente accumulo di radicali perossilici organici ( $\text{ROO}^-$ ) ed idroperossidi ( $\text{ROOH}$ ) nei tessuti sani rispetto che nei tessuti tumorali. Tale assunzione è stata ripresa in una ricerca scientifica di Labarbe et al. [17] nella quale un tessuto è stato irradiato con fascio di radiazione continuo a basso LET

(fotoni o elettroni a 1 MeV) a dose rate variabile tra 0.03 e  $10^7$  Gy/s. Il punto chiave di tale studio è stato quello di stabilire un modello quantitativo per la cinetica delle reazioni coinvolte nei processi radiobiologici e per il catabolismo delle specie reattive dell'ossigeno. È stato ipotizzato che l'esposizione delle cellule ai  $\text{ROO}^-$  fosse correlata al livello del danno cellulare della massa irradiata, descritto dall'area sottostante le curve rappresentate in figura 2.11.

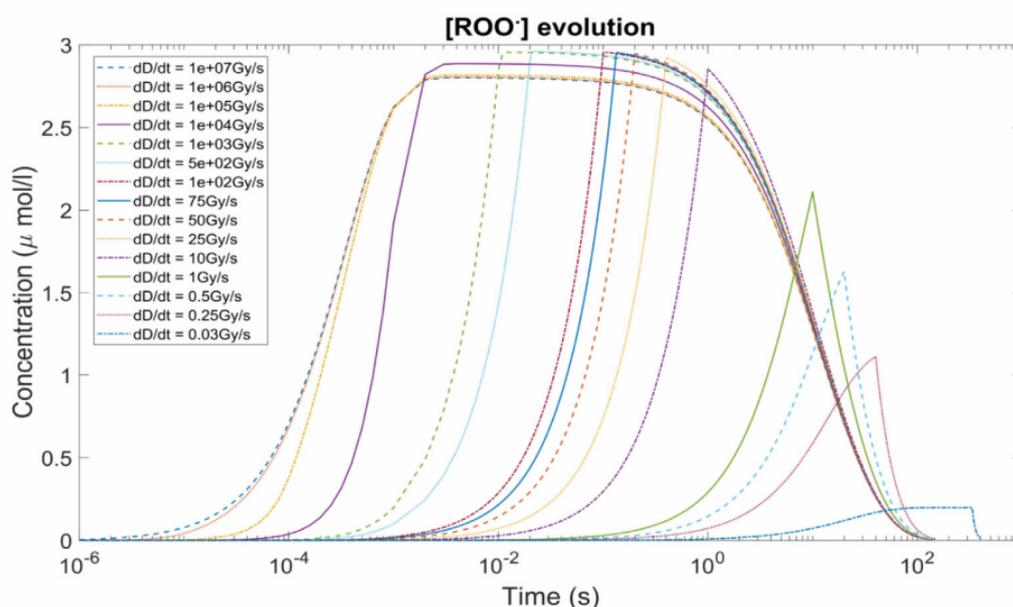


Figura 2.11: Grafico in scala logaritmica-lineare della concentrazione di  $\text{ROO}^-$  in  $\mu\text{mol/l}$  in funzione del tempo per i diversi dose rate utilizzati. [17]

Dallo studio emerge che all'aumentare del dose rate si ha una maggiore ricombinazione dei radicali  $\text{ROO}^-$ , che corrisponde ad un minor danno biologico. Tutto ciò è coerente con quanto visto sull'effetto FLASH, ma questa ipotesi deve essere ancora ampiamente indagata, in quanto finora la maggior parte degli studi a riguardo sono simulazioni Monte Carlo. Infatti, la scala temporale della ricombinazione dei radicali perossidici è molto breve, e questo rende difficile effettuare delle misure sperimentali [18]. Una prima misura sperimentale è stata effettuata da Blain et al. [19], irradiando un volume d'acqua con un fascio di protoni a 68 MeV prodotti da un ciclotrone, a dose rate convenzionali (0.2 Gy/s) o a dose rate ultralevati (dai 40 Gy/s ai 60000 Gy/s). Tale ricerca ha avanzato l'ipotesi che il meccanismo alla base dell'effetto FLASH sia composto da due fasi: una fase iniziale, su scala dei  $\mu\text{s}$ , regolata principalmente dalla

radiolisi eterogenea dell'acqua, ed una seconda fase, più lenta, dominata dalla deplezione dell'ossigeno molecolare  $O_2$  e da altri processi biochimici. Tuttavia, tale ipotesi deve essere ancora convalidata del tutto da ulteriori ricerche ed esperimenti.

### 2.2.3 Risposta immunitaria

Un'ulteriore ipotesi avanzata dalla comunità scientifica assume che alla base dell'effetto FLASH ci sia una risposta immunitaria modificata. Il regime di frazionamento della dose del trattamento convenzionale comporta l'irraggiamento di una percentuale maggiore di linfociti rispetto al caso in cui la dose totale sia erogata in una singola frazione. In un regime standard di 30 frazioni da 2 Gy ciascuna, il 98.8% del pool ematico è esposto a più di 0.5 Gy [2]. In aggiunta a ciò, è stato riportato che l'induzione di aberrazioni cromosomiche dipende dal volume totale del pool sanguigno irradiato. Il breve tempo di irraggiamento della modalità FLASH coinvolge un minor numero di linfociti irradiati, e questo comporta una riduzione delle aberrazioni cromosomiche. Tuttavia, nonostante il numero di linfociti esposti a radiazione sia minore nella FLASH-RT, la dose erogata è maggiore rispetto a quella della radioterapia convenzionale. Sono diverse le ricerche che dimostrano che l'effetto FLASH sia relazionato ad una risposta immunitaria modificata: in uno studio di Girdhani et al. [20] è emerso che l'attivazione e la maturazione del sistema immunitario di un gruppo di topi erano attenuate in seguito ad un trattamento FLASH, rispetto alla CONV-RT. A favore di questa ipotesi, lo studio di Rama et al., precedentemente citato nella sezione 2.1.1, ha dimostrato un miglior reclutamento dei linfociti T nel microambiente tumorale per tumori trattati con FLASH-RT rispetto a quelli sottoposti a trattamento convenzionale. Al momento però, non è ancora del tutto chiaro se la risposta immunitaria modificata sia una conseguenza dell'effetto FLASH o ne sia una causa.

### 2.2.4 *Intertrack effects*

La radioterapia FLASH si basa sul rilascio di dose (nella maggior parte degli esperimenti  $>10$  Gy) a dose rate ultraelevati (solitamente  $>40$  Gy/s). In questa modalità, le tracce delle particelle incidenti sono più ravvicinate sia nel tempo che nello spazio, rispetto a quelle erogate in modalità convenzionale, e questo può portare a differenti reazioni chimiche, dato che i processi biochimici avvengono ad una scala temporale maggiore (figura 2.12). Le reazioni tra le specie chimiche che avvengono durante

una singola pulsazione possono in qualche modo influire sullo stadio chimico eterogeneo della radiolisi dell'acqua. Questo processo stocastico può essere considerato nei modelli radiobiologici utilizzati nello studio dell'effetto FLASH computando delle simulazioni Monte Carlo adeguate. Un recente studio di Ramos et al. [21] ha suggerito che per fasci di protoni gli effetti *intertrack* a dose rate ultraelevati (regime di FLASH-RT) diventano rilevanti solo per un LET della radiazione inferiore ai  $2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ . In tale studio la radiolisi dell'acqua è stata simulata in un dosimetro di Fricke irradiato con raggi  $\gamma$  del  $^{60}\text{Co}$ . Definendo il parametro  $G$  come il numero di molecole reagenti consumate o prodotte per 100 eV di energia assorbita, sono stati studiati i valori  $G$  dipendenti dal LET per fasci di protoni erogati in singoli impulsi da 1 ns, 1  $\mu\text{s}$  e 10  $\mu\text{s}$ . I risultati ottenuti sono stati confrontati con gli esiti delle simulazioni in cui sono stati trascurati gli effetti *intertrack* ed è emerso che, per radiazioni di protoni a LET  $< 2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ , non è corretto trascurare del tutto gli effetti *intertrack* nello studio del danno radiobiologico indotto dalla FLASH-RT. Dunque, si evince che in determinate condizioni (tipo di radiazione e LET specifico) gli effetti *intertrack* possano in qualche modo contribuire ai meccanismi che conducono all'effetto FLASH. Tale supposizione, però, è stata avanzata in seguito a ricerche basate su simulazioni computazionali e non su misure sperimentali. Oltretutto, un recente studio di Thompson et al. [22] ha confutato tale ipotesi. Utilizzando un fascio di protoni con un'energia variabile da 0.5 a 100 MeV, ha dimostrato che, nonostante la piccola separazione temporale, la separazione spaziale tra i protoni incidenti è troppo grande per far sì che le interazioni chimico-fisiche intertraccia svolgano un ruolo significativo nella diversa risposta biologica dei tessuti, in seguito a CONV-RT o a FLASH-RT. Dunque, sono necessarie ulteriori ricerche a riguardo per convalidare o confutare l'ipotesi che gli effetti *intertrack* siano alla base dell'effetto FLASH.

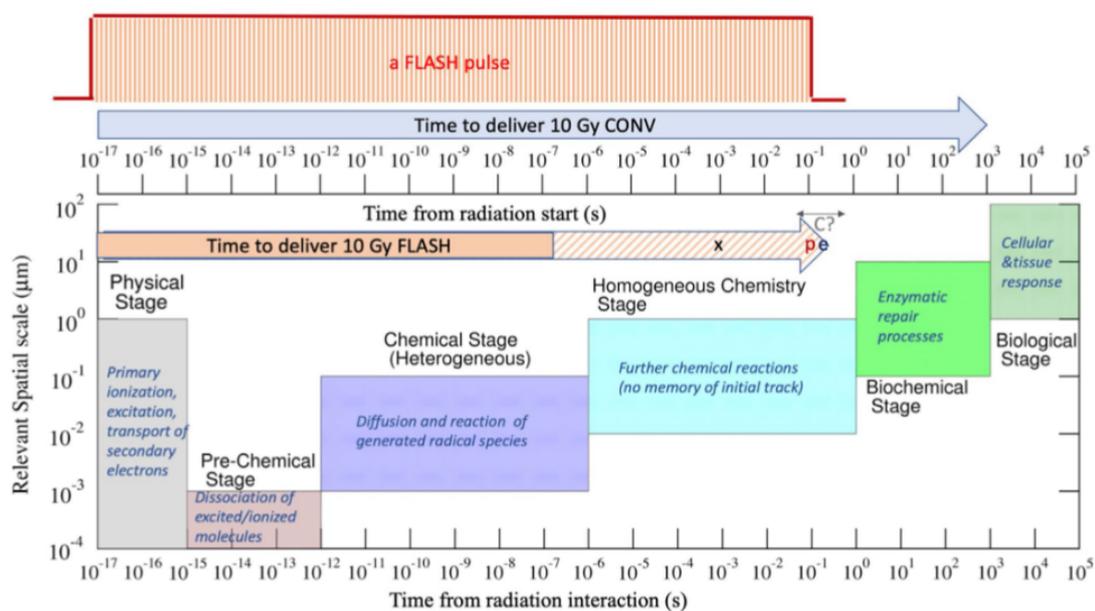


Figura 2.12: Scala temporale e spaziale coinvolta tipicamente nei processi biochimici indotti dall'esposizione a radiazioni ionizzanti. Tale scala è confrontata con la durata tipica di una pulsazione nella FLASH-RT e con il tempo necessario a rilasciare una dose di 10 Gy nella CONV-RT.[23]

# Capitolo 3

## Dose Rate

A dose rate minori rispetto a quelli usati in radioterapia convenzionale ( $\sim 10^{-1} - 10^{-2}$  Gy/s), una maggiore salvaguardia dei tessuti sani è correlata al fatto che il tempo di trattamento è talmente lento, che si dà modo alle cellule irradiate di riparare i danni indotti dalla radiazione tramite processi biochimici.

In base agli studi e alle ricerche discusse finora, è evidente che l'effetto FLASH sia associato a dose rate molto maggiori rispetto a quelli utilizzati nella radioterapia convenzionale. Una questione di estrema rilevanza per l'introduzione della FLASH-RT nella clinica riguarda i fattori che condizionano l'effetto FLASH. Questi, infatti, non sono ancora del tutto chiari alla comunità scientifica, anche se emerge dalle varie ricerche che l'effetto FLASH dipenda principalmente da dose rate, dose totale, tipologia di radiazione, frazionamento e modalità di erogazione del fascio.[2]

In disaccordo con gli studi presentati nella sezione 2.1, uno studio di Venkatesulu et al.[24] su un gruppo topi ha dimostrato che, in seguito ad un irraggiamento con elettroni di 20 MeV a 35 Gy/s (FLASH-RT), sono emerse maggiori tossicità rispetto a quelle indotte dallo stesso trattamento effettuato a 0.1 Gy/s (CONV-RT). Tale ricerca, in particolare, ha confrontato il livello di linfopenia<sup>1</sup> indotta dalla FLASH-RT con quella indotta dalla radioterapia convenzionale. In seguito alla FLASH-RT, è stata osservata una deplezione di linfociti significativa e più grave di quella osservata in seguito alla CONV-RT. Tant'è che 24 giorni dopo l'irraggiamento in modalità di FLASH-RT, la ricostituzione delle cellule CD3 è stata pari solo al 50%, mentre, dopo lo stesso arco di tempo, è stato scoperto un recupero completo del 100% di tali cellule

---

<sup>1</sup>La linfopenia riguarda la riduzione del numero di linfociti nel sangue ed è un effetto collaterale tipico della radioterapia. La sua insorgenza indica un ridotto controllo sulla crescita del tumore.

per i tessuti irradiati con radioterapia convenzionale. Per spiegare questi risultati, è ipotizzato che il dose rate di 35 Gy/s possa non essere sufficiente a indurre il risparmio dei tessuti sani tipico dell'effetto FLASH. Gli esiti della ricerca potrebbero indicare che la definizione del dose rate necessario ad indurre l'effetto FLASH non sia universale, ma possa essere ad esempio specifico per il tessuto o per il dosaggio in questione. In base a ciò, a seguito di vari risultati discordanti per quanto riguarda l'effetto FLASH in funzione del dose rate, la comunità scientifica si è ritrovata a dover definire nuove variabili per quantificare la distribuzione di dose nel tempo. Infatti, nella radioterapia convenzionale il dose rate non svolge alcun ruolo significativo, e pertanto, generalmente, non viene considerato. Nella FLASH-RT, però, la quantificazione del dose rate necessario ad indurre l'effetto FLASH in base a diverse metriche, conduce a diversi effetti biologici attesi nei tessuti tumorali e negli organi a rischio, e perciò acquista una particolare rilevanza. Di seguito viene illustrata la struttura microscopica del fascio di radiazione utilizzato nella FLASH-RT, e sono presentate le principali metriche usate attualmente per il computo del dose rate, e la loro applicazione nei piani di trattamento.

### 3.1 Struttura microscopica del fascio

La radiazione utilizzata nello studio dell'effetto FLASH ha una natura pulsatile. Gli acceleratori attualmente in uso, erogano le particelle in pulsazioni con una larghezza nell'ordine dei  $\mu\text{s}$ , e con un intervallo di tempo tra una pulsazione e l'altra nell'ordine dei ms. Spesso, la singola pulsazione è composta da più *bunches*, cioè pacchetti di particelle, a cui è associata una scala temporale dell'ordine dei ns o ps, e che trasportano una carica di circa 20 nC [25]. Quindi, lo stesso numero di particelle può essere erogato in un numero differente di pulsazioni e *bunches*, come è possibile osservare in figura 3.1. In questo modo, la dose rilasciata in una singola pulsazione cambia a seconda della struttura del fascio prodotta, e il dose rate istantaneo di una singola pulsazione può raggiungere i  $10^{10}$  Gy/s.

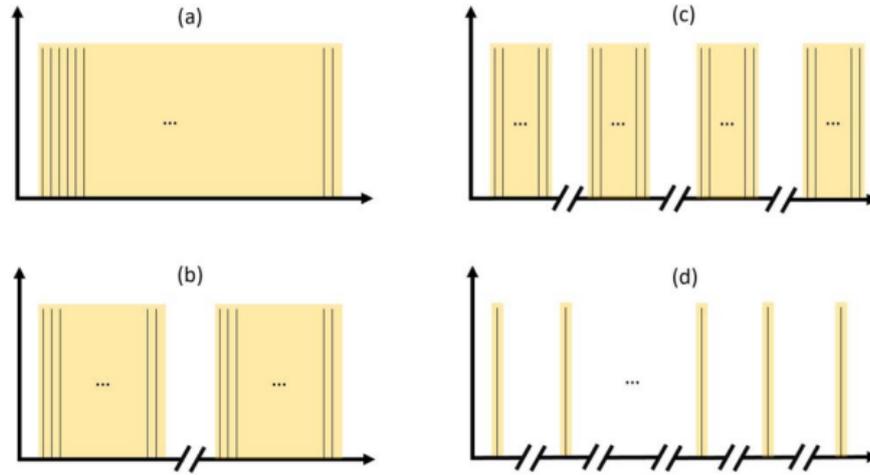


Figura 3.1: Esempio di struttura temporale del fascio. Il numero di particelle erogato è lo stesso, in modalità differenti. Il tempo tra due *bunches* è di 666 ps (1.5 GHz) e il tempo tra due pulsazioni è 1.2 s.: **(a)** una pulsazione da 100 *bunches*, con una carica totale di  $\sim 2$  nC ed una durata di 66 ns per pulsazione **(b)** 2 pulsazioni da 50 *bunches* ciascuna, con una carica totale di  $\sim 2$  nC ed una durata di 33 ns per pulsazione **(c)** 4 pulsazioni da 25 *bunches* ciascuna, con una carica totale di  $\sim 2$  nC ed una durata di 16 ns per pulsazione **(d)** 1 o 2 *bunches* per pulsazione e numerose pulsazioni, con una carica totale di  $\sim 2$  nC ed una durata nell'ordine dei ps per pulsazione. Le linee nere rappresentano i singoli *bunches*, le aree gialle la struttura della pulsazione. [25]

Secondo vari studi, idealmente, il fascio per una FLASH-RT dovrebbe avere una dose rilasciata per pulsazione maggiore o uguale di 1 Gy, una dose totale maggiore o uguale di 10 Gy e una dose rate medio di 100 Gy/s o più. Inoltre, il fascio dovrebbe essere erogato con una frequenza di pulsazione nell'ordine dei 100 Hz, ed il tempo totale di trattamento dovrebbe essere al massimo nell'ordine dei decimi di secondo (figura 3.2) [2].

Dalle numerose ricerche condotte, è emerso che la struttura microscopica del fascio gioca un ruolo importante nello studio dell'effetto FLASH [25]. Infatti, a seconda del tipo di particella utilizzata, della sua energia e della struttura temporale del fascio di radiazione, cambiano le condizioni sotto le quali si realizza l'effetto FLASH. Per di più, la FLASH-RT è focalizzata sull'uso di particelle cariche (come protoni o elettroni), piuttosto che fotoni. Il sistema di produzione dei raggi X per *bremstrahlung* nei LINAC per elettroni (sezione 1.2.2) è inefficiente ed inadatto al raggiungimento di

dose rate ultraelevati. Infatti, i LINAC attualmente in uso erogano fasci di radiazione ad un dose rate massimo di decine di Gy al minuto, e tale ordine di grandezza non è sufficiente alla realizzazione dell'effetto FLASH. Perciò, trovare le apparecchiature e le condizioni ideali per l'utilizzo dei raggi X nella FLASH-RT, e renderle disponibili per la cura dei pazienti, è tuttora una questione irrisolta dalla comunità scientifica. Per quanto riguarda le particelle cariche, per ora, gli elettroni sembrano utilizzabili in regime FLASH solo per la cura dei tumori più superficiali, come è avvenuto infatti per la cura del primo paziente umano trattato con FLASH-RT [13], mentre la cura dei tumori più profondi in questo regime sembra essere rivolta principalmente all'uso dei protoni. Per questo motivo, l'introduzione di diverse metriche per la definizione di dose rate si concentra al momento su piani di trattamento di protonterapia.

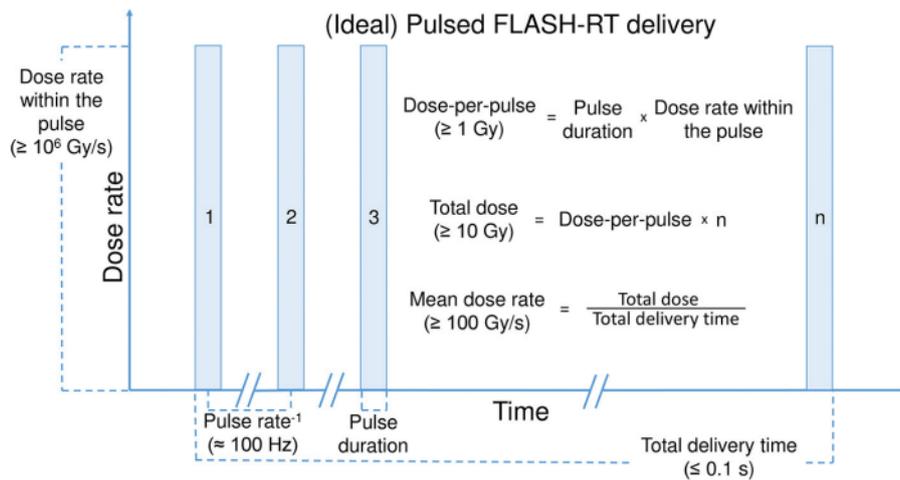


Figura 3.2: Grafico ideale dell'erogazione delle pulsazioni di un fascio di radiazione nella FLASH-RT, con specifiche di alcuni parametri rilevanti per l'effetto FLASH. [2]

## 3.2 Definizione di Dose Rate

In generale, il dose rate è una grandezza fisica che indica la quantità di dose rilasciata in un certo intervallo di tempo. Come mostrato in figura 3.2, data la struttura del fascio possono essere definiti il dose rate istantaneo, ossia il rapporto tra la dose erogata in una singola pulsazione e la durata della pulsazione stessa, ed il dose rate medio, cioè la dose totale divisa per la durata totale dell'erogazione [26]. A partire dall'evidenza empirica dei loro studi, Vozenin et al.[27] affermano che la variabile

predominante per la risposta dei tessuti all'effetto FLASH è la durata del rilascio della dose. Ciò è consistente con le assunzioni di Petersson et al.[28] che, valutando l'ipotesi della deplezione dell'ossigeno come meccanismo alla base dell'effetto FLASH, hanno osservato che il dose rate medio su tutto il tempo di erogazione è maggiormente rilevante rispetto a quello istantaneo nell'indurre la finestra di ipossia e radioresistenza nei tessuti sani, tipica dell'effetto FLASH.

### 3.2.1 Calcolo del dose rate nei piani di trattamento

Diverse metriche sono state introdotte per il calcolo del dose rate per la protontepia con tecnologia PBS (*Pencil Beam Scanning*), una tecnica di elevata precisione basata sull'utilizzo di centinaia di *pencil beam spots* per il rilascio sequenziale della dose al paziente. Nella tecnologia PBS vengono utilizzati fasci ad energia differente in modo tale da generare *spread-out Bragg peaks* (SOBP) che coprono l'intero volume tumorale da irradiare, minimizzando la dose rilasciata ai tessuti sani. Nonostante questa tecnica sia ampiamente utilizzata nell'odierna protonterapia, non sembra essere particolarmente adatta ad un'eventuale radioterapia in modalità FLASH: infatti, con questa tecnica diventa piuttosto complicato mantenere un dose rate medio sufficientemente alto da indurre l'effetto FLASH, a causa dell'inefficienza di trasmissione dei fasci di protoni a basse energie [3]. In particolare, il sistema di erogazione del fascio impiega un tempo che va da 0.5 a 2 s, per cambiare l'energia delle particelle, e quest'ordine di grandezza è incompatibile con il tempo totale di irraggiamento tipico della FLASH-RT, che non deve superare i decimi di secondo.

In uno studio del 2021 di Kang et al.[3] sono state confrontate tre definizioni differenti di dose rate per trattamento con tecnica PBS. In tale studio, sono stati considerati fasci di protoni a 240 MeV ed è stato ottimizzato un piano di trattamento IMPT (*Intensity Modulated Proton Therapy*) in regime FLASH per nove pazienti affetti da cancro ai polmoni, precedentemente trattati con fasci di protoni e trattamento SBRT (*Stereotactic Body Radiation Therapy*). Per il piano di FLASH-RT sono stati considerati due scenari di erogazione della dose per ciascun paziente: il primo ha previsto una dose totale di 45 Gy rilasciata in 3 frazioni, ed il secondo una dose di 34 Gy rilasciata interamente in una singola frazione. Il profilo laterale della dose per un singolo spot è una distribuzione gaussiana: al centro dello spot il dose rate è massimo e diminuisce radialmente allontanandosi dal centro. La dimensione dello spot, dettata

dalla larghezza della distribuzione gaussiana, risulta essere un parametro fondamentale in quanto determina la rapidità con cui il dose rate diminuisce trasversalmente per un dato spot, mentre la velocità di scansione tra uno spot e un altro determina il dose rate medio. Considerando che il volume da irradiare è suddiviso in voxel, ossia volumi infinitesimi e analoghi tridimensionali dei pixel, le metriche per il calcolo del dose rate considerate sono le seguenti:

1. Dose-Averaged Dose Rate (DADR)

Proposta da van de Water et al. [29] per valutare il dose rate da utilizzare in trattamenti di protonterapia PBS per la cura di tumori alla testa e al collo, si calcola come segue:

$$\dot{D}_j^{DADR} = \sum_{i=1}^N \frac{D_{j,i}}{\sum_{i=1}^N D_{j,i}} \dot{D}_{j,i} \quad (3.1)$$

$i$  è l'indice dell' $i$ -esimo spot,  $j$  indicizza i voxel in cui è diviso il target e  $D_{j,i}$  è la dose depositata attraverso l' $i$ -esimo spot nel  $j$ -esimo voxel.  $\dot{D}_{j,i}$  è il dose rate attraverso l' $i$ -esimo spot sul  $j$ -esimo voxel ed è dato dalla combinazione del tasso di fluenza dei protoni (numero di protoni per unità di superficie per unità di tempo) con la dose rilasciata nel  $j$ -esimo voxel. Geometricamente  $\dot{D}_{j,i}$  è determinato da una gaussiana:

$$\dot{D}_{j,i} = \dot{D}_{max} e^{-\frac{(r_j - r_i^c)^2}{\sigma^2}} \quad (3.2)$$

In particolare,  $\dot{D}_{max}$  è il dose rate massimo al centro dello spot,  $r_j$  è la coordinata del  $j$ -esimo voxel,  $r_i^c$  è la coordinata del centro dell' $i$ -esimo spot e  $\sigma^2$  è la varianza della gaussiana. In questo modo, nel calcolo del dose rate su un intero voxel si tiene conto del contributo di tutti gli spot adiacenti a quello stesso voxel durante l'erogazione del fascio. Però, questo metodo di calcolo non tiene conto della separazione temporale tra uno spot e quello successivo, pertanto fornisce sempre la stessa stima del dose rate, indipendentemente dal tempo necessario ad accumulare la dose totale.

2. Averaged Dose Rate (ADR)

L'ADR è stato proposto da Folkerts et al. [26] come metodo per stimare il dose rate nei piani di trattamento PBS. Si calcola come:

$$\dot{D}_j^{ADR} = \frac{D_j - 2d^*}{T_j} \quad (3.3)$$

con

$$d_j(t_0) = d^* \quad (3.4)$$

$$d_j(t_1) = D_j - d^* \quad (3.5)$$

$$T_j = t_1 - t_0 \quad (3.6)$$

Si assume che  $j$  sia l'indice del  $j$ -esimo voxel,  $(D_j - 2d^*)$  sia la dose totale depositata nel  $j$ -esimo voxel nel tempo di irraggiamento  $T_j$ , e  $d^*$  sia la soglia della dose preselezionata che determina l'istante  $t_0$  di inizio e l'istante  $t_1$  di fine dell'irraggiamento. Lo studio di Folkerts et al. suggerisce di impostare la dose di soglia a 0.1 Gy, ma per un'ottimizzazione del piano di trattamento si dovrebbe impostare una dose di soglia specifica per ogni tipo di tessuto.

### 3. Dose-Threshold Dose Rate (DTDR)

Questa metrica [3] si basa sul fatto che il dose rate sia massimo al centro dello spot e diminuisca allontanandosi da esso. Il DTDR è definito selezionando una dose di soglia  $d^*$ , in modo da escludere dal calcolo del dose rate le code della distribuzione gaussiana della dose. Si ha

$$\dot{D}_j^{DTDR} = \min(\dot{D}_{j,i}) \quad \text{se } D_{j,i} > d^*, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (3.7)$$

Cioè il DTDR è il minimo dose rate di tutti gli spot che depositano nel  $j$ -esimo voxel una dose superiore alla dose di soglia  $d^*$  selezionata.

Nella simulazione Monte Carlo effettuata, si impone che 1 MU (*monitor units*) contenga  $\sim 5.17 \cdot 10^6$  protoni a 240 MeV di energia. In questo studio si usano dai

100 ai 400 MU/spot, corrispondenti a due differenti dose rate istantanei di 167 Gy/s e 670 Gy/s.

In figura 3.3.a, è rappresentata la distribuzione della dose per un volume d'acqua irradiato nelle simulazioni, e la mappa 2D degli spot utilizzata come riferimento per costruire le distribuzioni di dose rate. La distribuzione del DTDR (figura 3.3.e) è un pattern regolare, dovuto al fatto che nel computo del dose rate secondo questa definizione, si escludono le code della gaussiana rappresentante la dose, grazie alla selezione di una dose di soglia. Questo pattern è simile alla mappa degli spot (figura 3.3.a), ma si osserva che il dose rate è maggiore tra uno spot e l'altro piuttosto che al centro dello spot, diversamente da quanto accade per l'ADR (figura 3.3.d). Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la distribuzione di dose e dose rate per spot seguano un decadimento gaussiano dal centro dello spot alla zona circostante, e il dose rate minore al centro dello spot provenga dagli spot adiacenti. Ricordando che il DTDR di un voxel è il minimo dose rate dato dal contributo degli spot adiacenti, la distribuzione 2D del DTDR mostra un dose rate minore al centro dello spot.

Normalmente, nei piani di trattamento di radioterapia convenzionale, si costruiscono i *Dose Volume Histograms* (DVH), cioè degli istogrammi che mettono in relazione la dose rilasciata con il volume irradiato secondo il piano. I DVH permettono di confrontare diversi piani di trattamento e di stimare la probabilità di controllo del tumore (TCP). Dal momento che per l'effetto FLASH anche il dose rate gioca un ruolo significativo nel piano di trattamento, sono stati introdotti a fianco dei DVH anche i *Dose Rate Volume Histograms* (DRVH), che mettono in relazione il dose rate della radiazione con il volume irradiato secondo il piano. Tutte e tre le metriche descritte sopra, sono state utilizzate per costruire i DRVH, per valutare il dose rate sul tumore e sugli organi a rischio. Come è possibile osservare in figura 3.3.b, l'ADR, coinvolgendo la posizione dello spot e il tempo tra una scansione e un'altra, rappresenta il dose rate minore possibile; il DTDR, considerando una dose di soglia ma nessun intervallo temporale, fornisce un dose rate intermedio, mentre il DADR stima il dose rate massimo possibile, senza considerare nessuna dose di soglia e tempo di irraggiamento. I tre dose rate, inoltre, diminuiscono lungo la direzione del fascio, a causa del fatto che i protoni vengono gradualmente scatterati quando attraversano il tessuto.

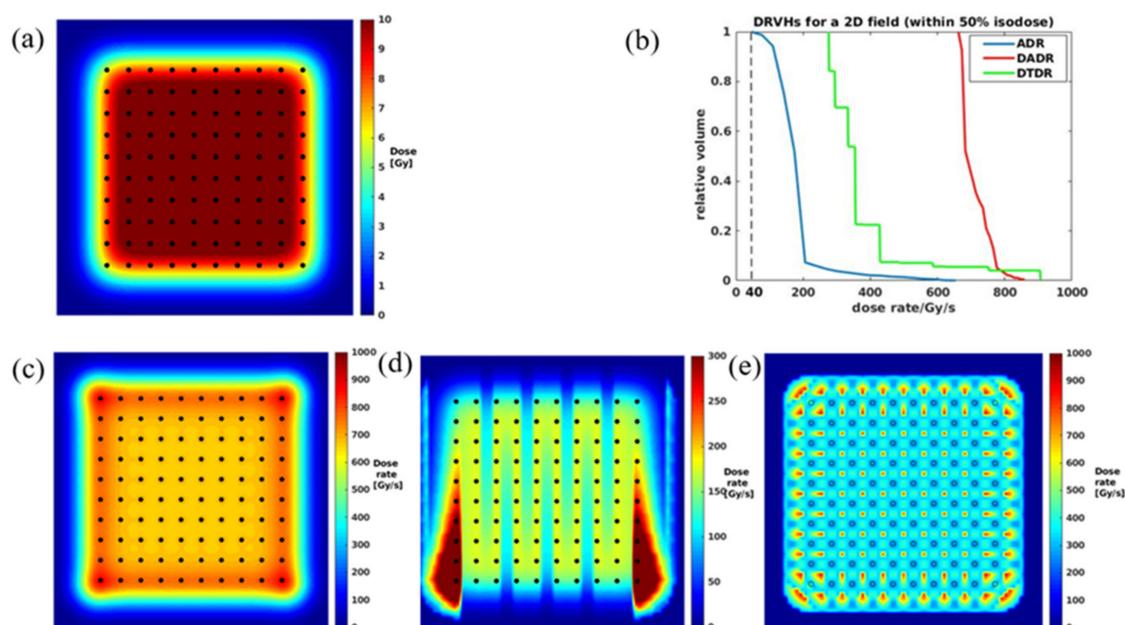


Figura 3.3: (a) Mappa  $5 \times 5 \text{ cm}^2$  della dose sulla superficie del volume d'acqua considerato nelle simulazioni dello studio. I punti contrassegnano gli spot. (b) Confronto dei DRVH ottenuti dalle tre computazioni del dose rate proposte. (c)-(e) Distribuzioni del dose rate rispettivamente definito come DADR, ADR e DTDR. I diversi colori indicano l'intensità del dose rate. [3]

Inoltre, le distribuzioni di dose rate calcolate per ogni campo sono state sovrapposte alle CT dei pazienti a disposizione (figura 3.4). Come è possibile osservare nelle figure 3.4.a-c, il DADR assicura una migliore uniformità del dose rate su tutto il campo. Invece, per il DTDR e l'ADR il dose rate è maggiore nelle regioni a bordo campo.

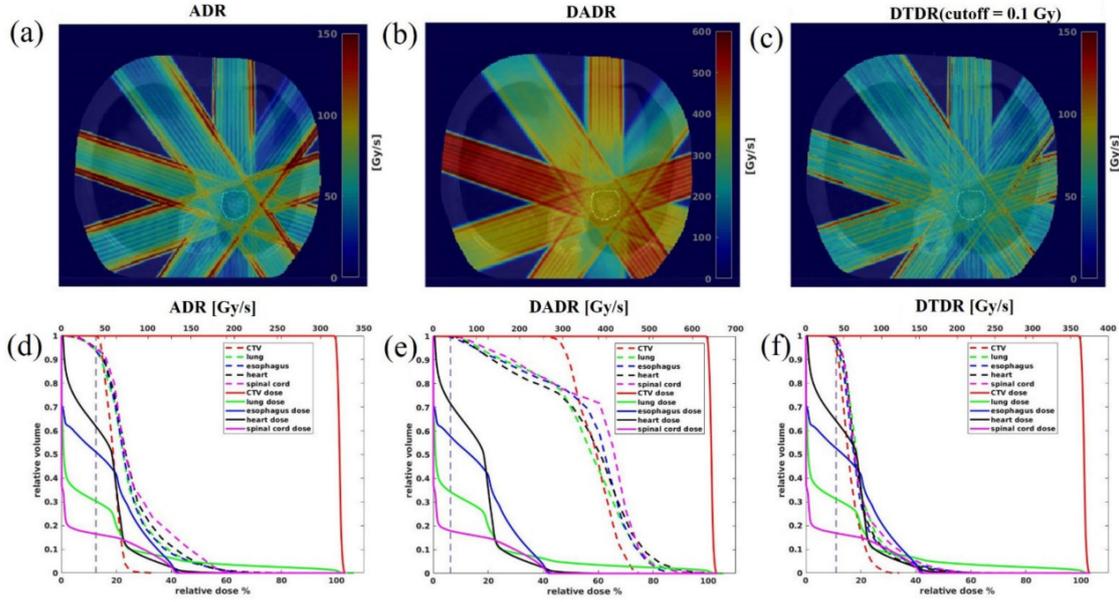


Figura 3.4: (a-c) Distribuzioni del dose rate per ogni metrica da ogni campo sovrapposte all'anatomia del paziente. (d-f) DVH (*Dose Volume Histograms*) (linee continue) e DRVH (linee tratteggiate). La linea tratteggiate verticale indica la soglia di 40 Gy/s per la realizzazione dell'effetto FLASH. [3]

Per valutare se il dose rate minimo necessario alla realizzazione dell'effetto FLASH è raggiunto nel tessuto tumorale e negli organi a rischio, viene impostato un indice  $V_{40Gy/s}$  che quantifica la percentuale di volume irradiato che ha ricevuto un dose rate  $\geq 40$  Gy/s. La figura 3.5 rappresenta il dose rate medio raggiunto negli organi a rischio per ogni scenario di erogazione del fascio. È evidente che l'ADR non garantisce una copertura  $V_{40Gy/s}$  sufficiente usando 100 MU/spot, né per il piano a singola frazione di 34 Gy, né per il piano a 3 frazioni da 15 Gy. La percentuale  $V_{40Gy/s}$  può essere aumentata però fino all'83.6%, per il piano a singola frazione, e al 93.4% per il piano a 3 frazioni, utilizzando 400 MU/spot. Invece, il DADR garantisce un indice  $V_{40Gy/s} > 88.9\%$  per ogni scenario considerato. Infine, il DTDR riporta un indice  $V_{40Gy/s}$  maggiore nei piani in cui vengono utilizzati 400 MU/spot piuttosto che 100 MU/spot, ed è superiore nei piani con frazioni da 15 Gy. Quindi riassumendo, l'ADR ed il DTDR, al contrario del DADR, non permettono a parte degli organi a rischio di raggiungere il dose rate necessario per usufruire dell'indice benefico dell'effetto FLASH. Questo dimostra effettivamente che ci sia una correlazione tra la metrica

utilizzata per il computo del dose rate e gli effetti biologici attesi.

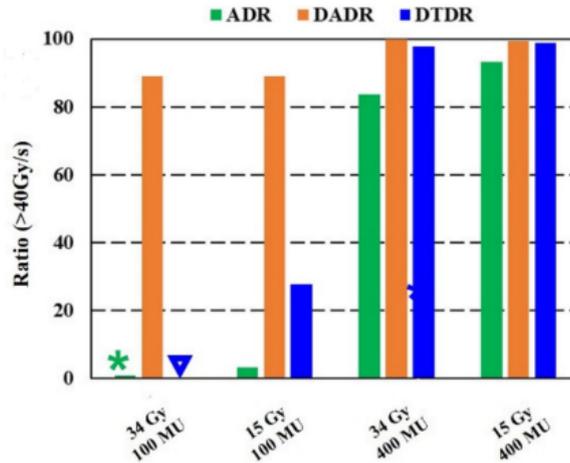


Figura 3.5: Valore di  $V_{40Gy/s}$  medio per tutti gli organi a rischio per i diversi scenari di erogazioni e per ogni metrica utilizzata per il calcolo del dose rate. [3]

La definizione di dose rate come DADR è ripresa in una ricerca di Schwarz et al. [14], nella quale vengono simulati e confrontati tre piani di protonterapia con tecnica PBS basati sull'ipofrazionamento, per la cura di tre tipi di tumore (ai polmoni, al fegato e alla prostata). I piani di trattamento sono costruiti supponendo che si abbia un ciclotrone in grado di erogare una corrente di fascio (numero di particelle per unità di tempo) variabile ed una radiazione praticamente continua, dato che i protoni sono prodotti dall'acceleratore a frequenza elevata in impulsi molto brevi. Oltre al ciclotrone, si considera un LINAC, che possiede una corrente di fascio massima costante e produce un fascio di radiazione pulsato, e non continuo. I piani basati sul ciclotrone sono costruiti considerando tecniche di erogazione della terapia con fasci a singola energia, cioè la tecnica *shoot-through*<sup>2</sup> e la *3D range modulator (3DRM)*<sup>3</sup>, mentre quelli basati sul LINAC prevedono un approccio multienergetico, considerando che l'acceleratore in questione cambia energia del fascio con un tempo morto di 5 ms. Ciascuna di queste tecniche è pianificata per l'anatomia di diversi pazienti e per protocolli dosimetrici diversi, in modo da giungere a conclusioni sufficientemente

<sup>2</sup>Questa tecnica di protonterapia non si basa sulla modulazione dell'energia per il corretto posizionamento del picco di Bragg all'interno del volume tumorale, ma tratta i protoni come se fossero fotoni o elettroni.

<sup>3</sup>Il fascio è emesso ad energia fissata e si fa uso di un modulatore passivo costruito appositamente.

generali sulla FLASH-RT con protoni. Per la tecnica *shoot-through* sono prescritti 20 Gy erogati in 3 frazioni, da un fascio di protoni a 230 MeV, mentre per la 3DRM si considera che un fascio di protoni a 212 MeV rilasci una dose totale di 75 Gy in 3 frazioni. Infine, nel piano di trattamento con il LINAC, la dose totale prescritta di 40 Gy è erogata in 5 frazioni da 8 Gy ciascuna, e l'energia del fascio varia tra 160,1 e 196,6 MeV.

Una volta fissate le dosi di soglia (a 4 Gy e a 8 Gy) e i dose rate di soglia (a 40 Gy/s e a 100 Gy/s) necessari ad indurre l'effetto FLASH, si propongono due metodi per il computo del dose rate. Il primo si basa proprio sulla definizione del DADR proposta da van de Water [29], dalla quale è possibile ricavare le distribuzioni del dose rate per ogni campo e per l'intero piano di trattamento. Valutando in quali voxel viene superato il dose rate di soglia per l'effetto FLASH, si possono poi costruire le distribuzioni 3D della dose in regime FLASH. Il secondo approccio prevede l'introduzione di una *sliding window* (figura 3.6), una finestra temporale la cui ampiezza è data dal prodotto tra la dose di soglia ed il dose rate di soglia impostati. Con questo approccio si tiene conto, non solo del tempo di scansione del singolo spot, ma anche del tempo necessario al sistema PBS di direzionare il fascio da uno spot a quello adiacente e di cambiare l'energia della radiazione (nel caso di trattamenti che prevedono l'utilizzo di fasci ad energie diverse). Si assume che l'effetto FLASH si realizzi ogni qual volta la dose rilasciata nel tempo dato dalla *sliding window*, supera la dose di soglia. Utilizzando questa metrica, si ottengono direttamente come output le distribuzioni 3D della dose in regime FLASH, senza dover prima costruire le distribuzioni del dose rate.

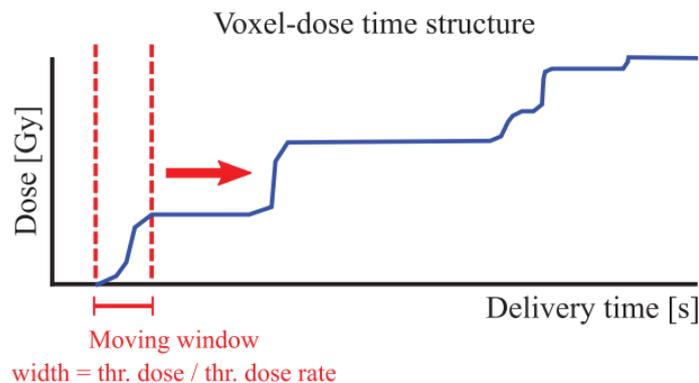


Figura 3.6: Rappresentazione della *sliding window* in un grafico rappresentante la dose rilasciata(Gy) in funzione del tempo(s). [14]

Il *Planning Target Volume* è il volume che viene irradiato durante la terapia, e viene delineato in fase di pianificazione del trattamento considerando un margine di sicurezza di circa 2 mm attorno al tumore, in modo da non sottostimarne e da garantire la riuscita della terapia. Come è possibile osservare nelle figure 3.7, 3.8 e 3.9, tale volume è completamente irradiato in tutti gli scenari di trattamento considerati, ma l'irraggiamento dei tessuti sani adiacenti invece cambia in base alla tecnica di rilascio della dose impostata e alla metrica utilizzata per il calcolo del dose rate. Come è possibile osservare in figura 3.7, le curve della FLASH-RT non distano molto da quelle della radioterapia convenzionale di riferimento, ma la dose rilasciata nei tessuti sani è maggiore nel caso della FLASH-RT. In figura 3.8, l'unica differenza di rilievo tra la FLASH-RT e la IMPT di riferimento risiede nella dose rilasciata al torace, mentre in figura 3.9, è possibile osservare una significativa differenza tra la dose rilasciata all'anca nelle due modalità di irraggiamento. A causa di ciò, la dose rilasciata ai tessuti sani è maggiore in seguito ad un trattamento di FLASH-RT piuttosto che di IMPT.

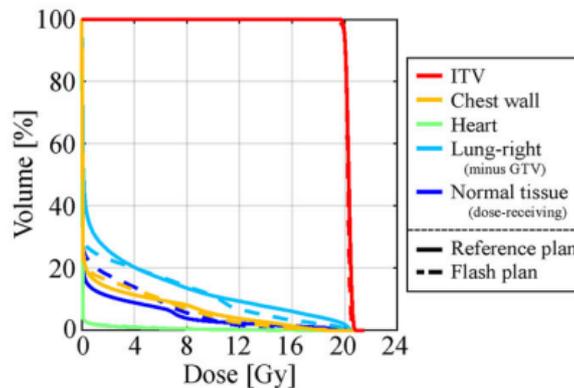


Figura 3.7: *Dose Volume histogram* per il trattamento per la cura del tumore ai polmoni. Le linee tratteggiate si riferiscono al piano con tecnica *shoot-through* erogato in modalità FLASH. La linea continua rappresenta il piano IMPT convenzionale di riferimento. [14]

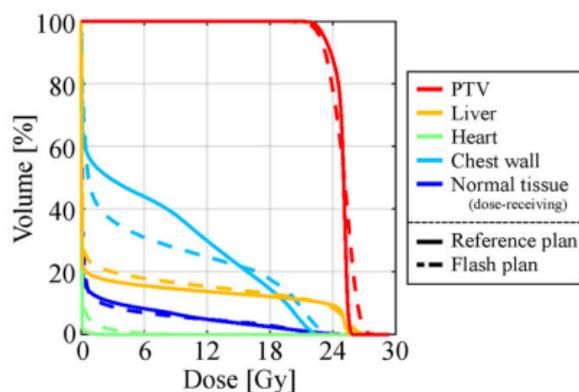


Figura 3.8: *Dose Volume histogram* per il trattamento per la cura del tumore al fegato. Le linee tratteggiate si riferiscono al piano con tecnica 3DRM erogato in modalità FLASH. La linea continua rappresenta il piano IMPT convenzionale di riferimento. [14]

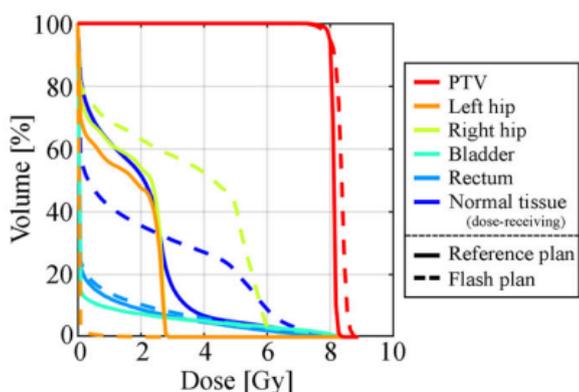


Figura 3.9: Dose Volume histogram per il trattamento per la cura del tumore alla prostata. Le linee tratteggiate si riferiscono al piano con LINAC erogato in modalità FLASH. La linea continua rappresenta il piano IMPT convenzionale di riferimento. [14]

Infine, vengono osservati i dose rate raggiunti, in corrispondenza delle due metriche usate, nel PTV e nell'*Integral Target Volume* (ITV). Quest'ultimo comprende il *Clinical Target Volume* (CTV), cioè il volume da irradiare delineato considerando l'avanzamento della malattia ed incluso anche nel PTV. L'ITV è descritto considerando che il CTV possa variare in posizione, forma e dimensione. Un effetto FLASH partico-

larmente intenso è stato osservato per due dei tre piani considerati in corrispondenza della definizione del DADR, quello con la tecnica 3DRM per la cura del tumore al fegato e quello effettuato con il LINAC per la cura del tumore alla prostata (figure 3.11 e 3.12 a sinistra). Al contrario, l'approccio della *sliding window* ha portato ad un livello di effetto FLASH trascurabile (figure 3.10 e 3.11 a destra) o del tutto inesistente (figura 3.12 a destra). Dunque, emerge nuovamente che in corrispondenza di metriche diverse per il computo del dose rate, si ottengono risposte fisiche e biologiche molto diverse nei volumi considerati.

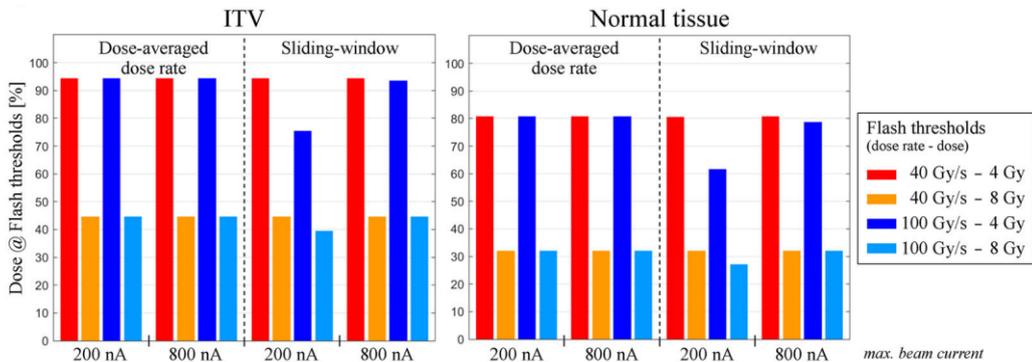


Figura 3.10: Dose totale percentuale rilasciata nell'ITV (*Integral Target Volume*) e nei tessuti normali in regime FLASH, per le diverse combinazioni di intensità del fascio, dose rate e dose di soglia, e definizione di dose rate per la cura del tumore ai polmoni con la tecnica *shoot-through*. [14]

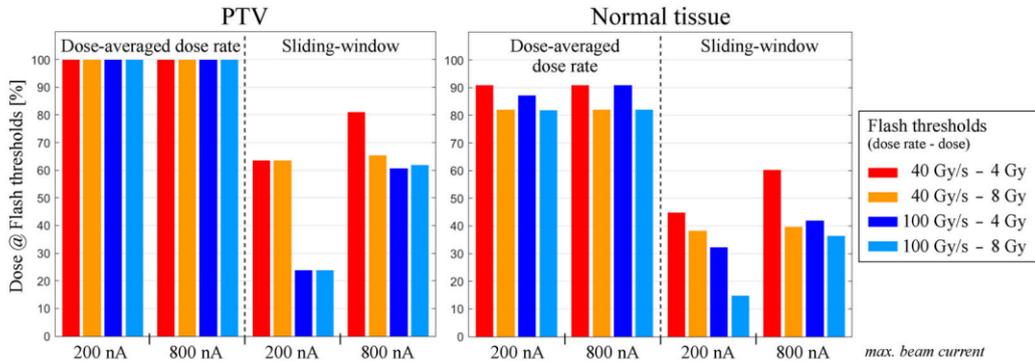


Figura 3.11: Dose totale percentuale rilasciata al PTV (*Planning Target Volume*) e nei tessuti normali in regime FLASH, per le diverse combinazioni di intensità del fascio, dose rate e dose di soglia, e definizione di dose rate per la cura del tumore al fegato con la tecnica 3DRM. [14]

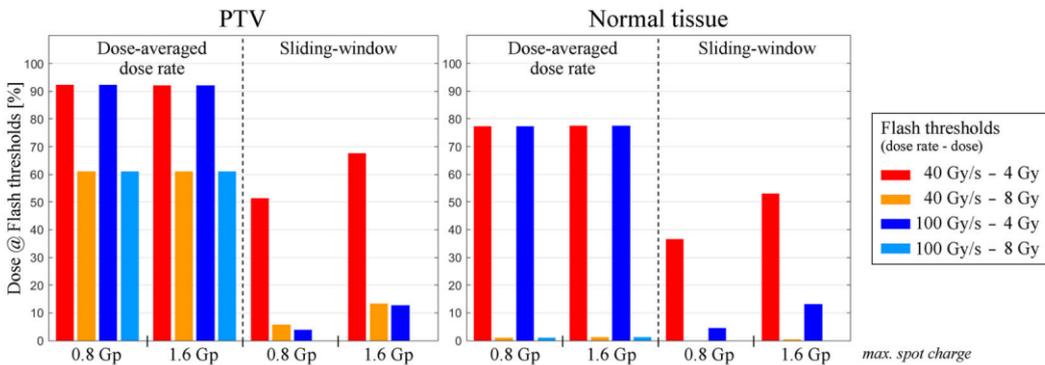


Figura 3.12: Dose totale percentuale rilasciata al PTV(*Planning Target Volume*) e nei tessuti normali in regime FLASH, per le diverse combinazioni di intensità del fascio, dose rate e dose di soglia, e definizione di dose rate per la cura del tumore alla prostata con il LINAC.[14]

### 3.2.2 Ottimizzazione dei piani di trattamento

Idealmente, un piano di trattamento a dose rate ultraelevati efficace, dovrebbe massimizzare l'effetto FLASH attraverso la definizione di una qualche funzione di costo, raggiungendo una conformazione della dose soddisfacente, grazie all'ottimizzazione della distribuzione della dose e del dose rate. Fintanto che le potenzialità dell'effetto

FLASH non erano ancora emerse, nei piani di trattamento di radioterapia convenzionale, l'ottimizzazione del dose rate non era rilevante tanto quanto quella della dose. Dal momento in cui emerge che il dose rate gioca un ruolo significativo nell'induzione dell'effetto FLASH e nella risposta radiobiologica dei tessuti irradiati, si osserva che per ottenere un piano di trattamento di FLASH-RT solido e conformato al tumore, occorre ottimizzare anche le distribuzioni di dose rate. Un primo passo in questa direzione è stato fatto da Gao et al. [30]: nella loro ricerca hanno affiancato all'ottimizzazione delle distribuzioni di dose, l'ottimizzazione delle distribuzioni di dose rate, introducendo così il metodo SDDRO (*Simultaneous Dose and Dose Rate Optimization*). Tale studio si concentra su piani di radioterapia con protoni, in cui i fasci di radiazione possono assumere intensità variabile o costante. La metrica utilizzata per il calcolo del dose rate è quella del DADR, per il quale però si considera solo la struttura temporale del fascio, escludendo il tempo necessario al sistema di passare da uno spot a quello successivo. Il piano ottenuto con l'algoritmo SDDRO è confrontato con quello ottenuto dall'IMPT, in cui viene ottimizzata esclusivamente la distribuzione della dose, per tre casi di tumore al polmone. Per ciascun caso sono stati considerati tre scenari di frazionamento della dose, diretti verso l'ipofrazionamento: 2 Gy per frazione, 6 Gy per frazione e 10 Gy per frazione, rilasciata sempre da protoni con energia di 229 MeV. Per ottimizzare la distribuzione di dose rate sul tessuto, l'algoritmo SDDRO impone un dose rate di soglia a 40 Gy/s. Infatti, in base a studi preliminari, tale soglia sembra essere il dose rate minimo necessario alla realizzazione dell'effetto FLASH. Dal confronto tra IMPT e SDDRO (figura 3.13), si evince che il metodo SDDRO migliora la copertura del dose rate tipico dell'effetto FLASH sulle regioni di interesse (ROI, *Region Of Interest*)<sup>4</sup> e sugli organi a rischio. In particolare, il volume del ROI che riceve un dose rate di almeno 40 Gy/s per l'IMPT è tra il 30 e il 50% del volume totale, mentre arriva fino al 98% con il metodo SDDRO. Inoltre, il volume di polmone che riceve almeno 40 Gy/s è pari al 30-40% del volume totale per l'IMPT, e al 70-90% per il piano basato sull'algoritmo SDDRO.

---

<sup>4</sup>La regione di interesse circonda con un guscio spesso 10 mm il *Clinical Target Volume* (CTV)

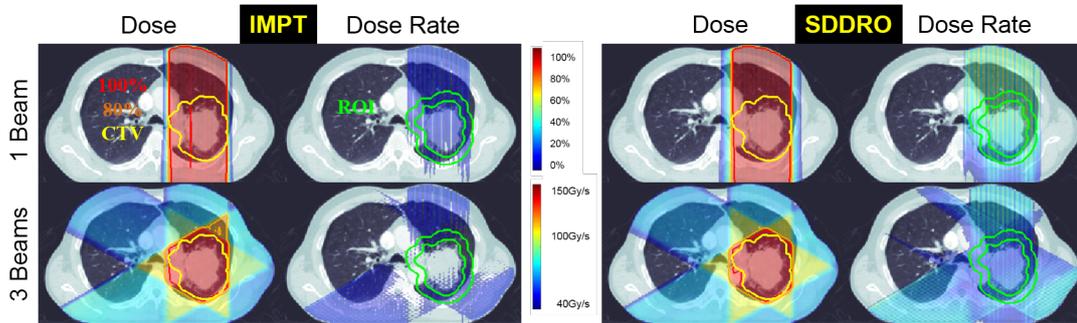


Figura 3.13: Distribuzioni di dose e dose rate, sovrapposte alla CT del paziente, per il terzo caso di tumore al polmone irradiato con 2 Gy per frazione, con IMPT e con SDDRO. Si considera il caso in cui incide un solo fascio, e quello in cui incidono tre fasci da campi diversi. [30]

In termini di distribuzione della dose, la copertura del CTV ottenuta con l'algoritmo SDDRO è paragonabile a quella ottenuta nell'IMPT, ma nel SDDRO viene rilasciata più dose agli organi a rischio. Per sopperire a ciò, l'algoritmo SDDRO dovrebbe combinare ipofrazionamento e utilizzo di fasci multipli, in modo da ottimizzare la distribuzione del dose rate, ma anche la conformazione della dose e la copertura del CTV e degli organi a rischio. Infatti, utilizzare protoni ad energia multipla aumenterebbe il numero di protoni per spot, ma diminuirebbe il peso di ciascun protone, e quindi il dose rate per spot. Solo combinando a fasci di energia multipla l'ipofrazionamento, si può fare fronte a ciò ed ottenere un piano di trattamento ottimizzato sotto diversi aspetti (dose, dose rate, conformazione, protezione degli organi a rischio). Una ricerca di van de Water [29] ha dimostrato che un altro aspetto significativo per il raggiungimento dell'effetto FLASH nei piani di trattamento, è la riduzione del numero di spot utilizzati, rispetto ai piani di trattamento convenzionali. Lo studio è incentrato sulla valutazione del dose rate, definito come DADR, in regime convenzionale ed in regime FLASH ( $>40$  Gy/s) per trattamenti di protonterapia con tecnica IMPT. Sono stati confrontati quattro piani di trattamento per l'irraggiamento della regione testa-collo. I piani considerati sono uno standard di riferimento (4 campi, 36108 spot), e tre a spot ridotti: uno standard (4 campi, energia variabile da 73 a 229 MeV, 811 spot), uno con la tecnica *arc* (120 campi, energia variabile da 73 a 229 MeV, 813 spot) e uno con la tecnica *arc-shoot-through* (120 campi, energia fissata a 229 MeV, 2162 spot). Per ogni caso sono stati attuati diversi scenari di erogazione del trattamento,

considerando ad esempio un'intensità del fascio costante o variabile, e frazioni di 2 Gy (frazionamento convenzionale) o di 6 Gy (ipofrazionamento). Ciò che emerge da tale studio è che il dose rate maggiore possibile (73.2 Gy/s) è stato raggiunto per piani di trattamento IMPT con tecnica *arc-shoot-through*, ipofrazionati e a spot ridotti (figura 3.14), mentre per gli altri scenari di trattamento il DADR medio non ha raggiunto il valore del dose rate di soglia di 40 Gy/s. Questo mette nuovamente in luce che un piano di trattamento ottimizzato provenga dalla combinazione di diversi parametri ideali per il raggiungimento dell'effetto FLASH: ottimizzazione delle distribuzioni di dose e dose rate, ipofrazionamento, fasci di diversa energia, riduzione del numero degli spot, ed utilizzo della tecnica *arc-shoot-through*.

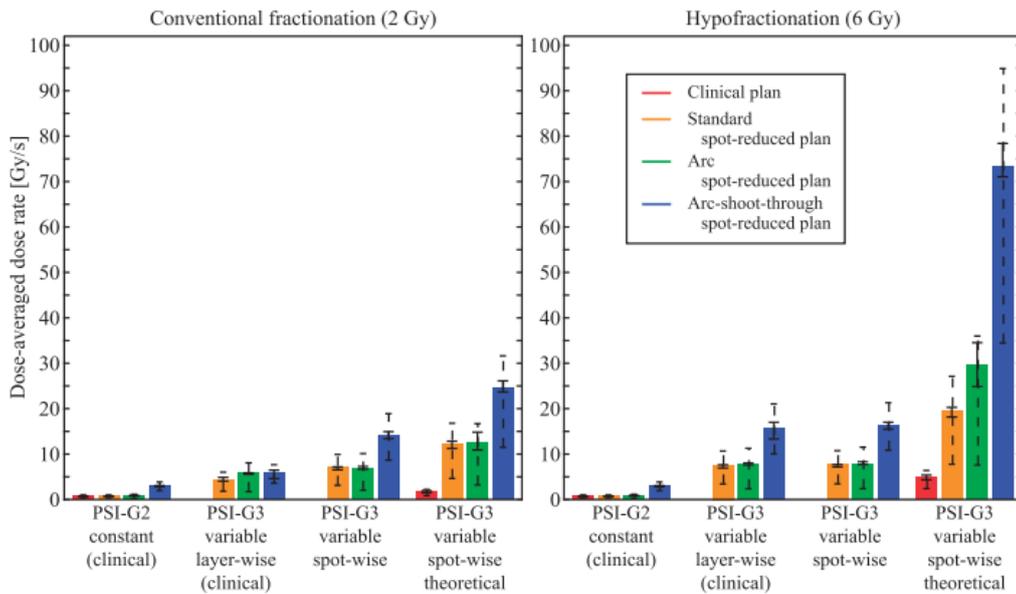


Figura 3.14: DADR medio nei tessuti normali irradiati per i diversi piani di trattamento e scenari di erogazione della terapia. I tratti continui indicano la variazione (min/max) del DADR medio tra i quattro casi. I tratti interrotti indicano i valori del DADR ricevuti dal 25% e dal 75% del volume.[29]

### 3.2.3 VHEE e ioni carbonio

Sebbene numerosi studi incentrati sulla definizione del dose rate necessario al raggiungimento dell'effetto FLASH, coinvolgono solo radioterapia con protoni, i primi studi effettuati sull'effetto FLASH [7][11][15] (compreso quello che ha visto l'applicazione

della FLASH-RT su un essere umano [13]) utilizzavano fasci di elettroni con energia compresa tra i 4 ed i 10 MeV. Questi ultimi però non sono adatti al trattamento di tumori situati in profondità dato che il loro range in acqua è dell'ordine di 2-5 centimetri.

Esiste una forma di radioterapia in cui si utilizzano elettroni da 100-200 MeV che hanno range in acqua di 30-50 centimetri, i cosiddetti *Very High Energy Electrons* (VHEE). Tale tecnica di radioterapia è poco diffusa perché si ottengono risultati simili alla radioterapia convenzionale, a fronte di un maggior costo e di una maggior dimensione degli acceleratori. Inoltre, al momento, i LINAC utilizzati per le terapie convenzionali non consentono una modulazione dell'intensità del fascio lungo il piano trasversale. Per la FLASH-RT con VHEE, non esistono ancora metriche per il calcolo del dose rate dettagliate come quelle proposte per la protonterapia. Questo è dovuto al fatto che, oltre alla regolazione dei sistemi usati per l'erogazione di un fascio a dose rate ultraelevati, c'è il problema di dover modificare gli acceleratori a disposizione per la produzione di particelle ad energia compresa tra i 100 e i 200 MeV, e renderli disponibili nella pratica clinica ed in ambito ospedaliero. Invece, le tecnologie a disposizione per la protonterapia, sembrano adatte al raggiungimento di dose rate ultraelevati [14]. In particolare, rispetto ai sincrociclotroni e ai sincrotroni, i ciclotroni isocroni, sono particolarmente indicati per una loro applicazione nella FLASH-RT con protoni. Tuttavia, studi Monte Carlo hanno mostrato che i trattamenti con fasci VHEE a dose rate compatibili con l'effetto FLASH hanno una miglior conformazione della dose sul tessuto tumorale rispetto alla radioterapia convenzionale [31].

Oltre ai protoni ed ai VHEE, si sta valutando se anche la terapia con ioni carbonio possa essere adatta al raggiungimento dell'effetto FLASH. Oggigiorno, questa tecnica è meno utilizzata rispetto alla radioterapia con fotoni o elettroni e alla protonterapia. Tuttavia, un'applicazione di fasci di ioni in regime FLASH potrebbe rappresentare una svolta nell'utilizzo delle radiazioni densamente ionizzanti per la cura dei tumori. Come per il caso dei VHEE, le principali problematiche legate all'utilizzo della FLASH-RT con gli ioni pesanti riguardano i macchinari a disposizione. Infatti, per il raggiungimento di dose rate ultraelevati ( $>40$  Gy/s), sono maggiormente indicati i ciclotroni usati in protonterapia, mentre tipicamente i fasci di ioni carbonio usati in ambito medico sono prodotti da sincrotroni che hanno un fascio a bunch non facilmente adattabile all'erogazione di dosi a rate ultraelevate. Inoltre, il tempo necessario ad erogare il fascio nella FLASH-RT dovrebbe essere nell'ordine di alcuni

ms, ma le tecniche di scanning multienergetico e le variazioni dell'energia del fascio coinvolgono scale temporali dell'ordine di decine di secondi, quindi troppo lente per poter raggiungere l'effetto FLASH [23]. Da uno studio di Weber et al. [23], è emerso che gli *intertrack effects*, che rappresentano uno degli meccanismi ipotizzati alla base dell'effetto FLASH, non svolgono più un ruolo particolarmente significativo nella risposta radiobiologica del tessuto in presenza di fasci di ioni carbonio. Tuttavia, hanno mostrato come tumori di volume  $<150 \text{ cm}^2$  possano essere trattati con fasci di ioni carbonio in modalità di FLASH-RT con tecnica 3DRM. Da ciò si evince che, eventualmente, la FLASH-RT con ioni carbonio potrebbe essere applicata in un numero ridotto di casi specifici. Il primo esperimento *in vivo* con fasci di ioni carbonio a dose rate ultraelevati, è stato effettuato dal gruppo di ricerca di Tinganelli et al. [32]. In tale studio, cellule dell'osteosarcoma LM8 sono state iniettate per via sottocutanea nell'arto posteriore di 25 topi femmina, e 7 giorni dopo sono state irradiate con fasci di ioni carbonio prodotti da un sincrotrone a 240 MeV, con un dose rate di 120 Gy/s (FLASH-RT) o di 0.3 Gy/s (CONV-RT). Misurando le dimensioni del tumore 28 giorni dopo l'irraggiamento, è emerso che, in entrambi i regimi di dose rate considerati, gli ioni carbonio hanno permesso di avere il controllo sulla crescita del tumore. In particolare, la FLASH-RT ha ridotto le tossicità indotte nei tessuti sani, riducendo le modifiche strutturali nelle cellule muscolari rispetto a quelle indotte dalla CONV-RT. Nonostante la questione sui macchinari a disposizione, questi risultati incoraggiano nuovamente l'introduzione di tecnologie più avanzate per un'eventuale applicazione della FLASH-RT in ambito clinico.

## Conclusioni e prospettive future

Nell'ultimo decennio, la ricerca scientifica nell'ambito della radioterapia ha portato alla scoperta del cosiddetto "effetto FLASH" che può rappresentare una svolta importante per la definizione di un nuovo tipo di radioterapia con fasci esterni. Gli studi di Favaudon e di Vozenin hanno dimostrato che utilizzando fasci di elettroni con dose rate superiori a 40 Gy/s si ha un controllo sulla crescita del tumore simile a quanto ottenuto nella radioterapia convenzionale effettuata con i fotoni, ma con una migliore salvaguardia dei tessuti sani irradiati. Dopo numerose ricerche sia *in vitro* che *in vivo* con esiti positivi, la radioterapia FLASH è stata applicata con successo su un uomo di 75 anni per la cura di un linfoma cutaneo.

Al momento, non c'è ancora una teoria esaustiva e completa che possa spiegare le cause ed i meccanismi biochimici alla base della salvaguardia dei tessuti sani irraggiati con dose rate ultraelevati. I dati sperimentali mostrano che ci sono molteplici fattori che concorrono alla realizzazione e alla attivazione dell'effetto FLASH, ma le condizioni necessarie per innescare il meccanismo di protezione dei tessuti sani è ancora sotto studio. Nella radioterapia convenzionale, non c'è necessità di porre particolari condizioni al dose rate con cui viene erogato il fascio, ma tale parametro ha un ruolo centrale nella radioterapia FLASH. Ciò che emerge dagli studi è che l'effetto del dose rate non è universale, ma è specifico per il tipo di tessuto irradiato e per il tipo di particella utilizzata. Tuttavia, si è visto che gli esiti delle sperimentazioni sono strettamente legate alle proprietà del macchinario utilizzato per l'erogazione del fascio. La semplice definizione di dose rate utilizzata finora nella radioterapia convenzionale non è sufficiente per descrivere esaustivamente la struttura temporale dei diversi modi di erogazione del fascio. Questo fa sì che confrontare risultati di ricerche scientifiche svolte in centri di ricerca differenti possa portare a risultati non coerenti tra loro ed a conclusioni errate. Per questo motivo, sono state introdotte nuove metriche per il calcolo del dose rate e si sta cercando di trovare la migliore variabile che

possa valutare l'attivazione dell'effetto FLASH nei tessuti sani. Inoltre, visto che la distribuzione temporale del fascio gioca un ruolo così significativo nell'effetto FLASH, i piani di trattamento, che fino a questo momento si concentravano principalmente sulla conformazione della dose totale al tumore, devono coinvolgere anche l'ottimizzazione della metrica di dose rate utilizza. A tal fine, sono stati introdotti i *Dose Rate Volume Histograms*, che mettono in relazione il dose rate in questione con il volume irradiato. Buona parte degli studi riguardo le nuove metriche si riferiscono alla protonterapia, in quanto coinvolge l'uso di acceleratori che sono più facilmente adattabili all'erogazione di fasci a dose rate ultra-elevati e possono essere sfruttati anche per trattare tumori situati in profondità. Al momento, le metriche più studiate sono il *Dose-Averaged Dose Rate* (DADR) definito senza impostare alcuna dose di soglia e senza tener conto né della struttura temporale del fascio, né del tempo di irraggiamento, l'*Averaged Dose Rate* (ADR) che considera sia soglie di dose che il tempo di irraggiamento e *Dose Thresold Dose Rate* (DTDR) che descrive un dose rate intermedio e tiene conto di una dose di soglia, ma senza includere nella definizione alcuna variabile temporale. Studi più recenti effettuati con simulazioni Monte Carlo hanno mostrato che, per un dato piano di trattamento, metriche di dose rate differenti possono portare a stime di effetti biologici completamente differenti. In particolare, si è visto che DADR, proposta per la prima volta da van der Water ed utilizzata in altri studi per valutare il dose rate necessario all'induzione dell'effetto FLASH, stima un dose rate medio maggiore rispetto alle altre metriche e stima quasi sempre una buona uniformità del dose rate su tutto il campo irraggiato. Tuttavia, rischia di condurre ad una sovrastima del dose rate ed una erronea valutazione dell'attivazione dell'effetto FLASH. I risultati riguardo ADR e DTDR mostrano una stima del dose rate totale minore rispetto a DADR. A volte tale differenza è significativa e conduce a conclusioni completamente differenti riguardo la possibilità di attivazione dell'effetto FLASH. Inoltre, sia ADR che DTDR mostrano una distribuzione di dose rate molto meno uniforme rispetto a DADR. Tutti i risultati riguardo le metriche di dose rate sono state ottenute attraverso simulazioni Monte Carlo. Per poter avere un riscontro sui dati sperimentale, si dovranno effettuare varie misure sperimentali per capire qual è la metrica più adatta a descrivere l'attivazione dell'effetto FLASH. La comunità scientifica si sta muovendo in tal senso sia realizzando nuove macchine acceleratrici capaci di fornire dose rate ultraelevati, che effettuando misure sperimentali con gli acceleratori preesistenti adattati alla radioterapia FLASH.

# Bibliografia

- [1] Biagini Carissimo. *Radiobiologia e radioprotezione*. Piccin, 2021.
- [2] Joseph D. Wilson, Ester M. Hammond, Geoff S.Higgins, and Kristoffer Petersson. Ultra-high dose rate (flash) radiotherapy: Silver bullet or fool's gold? *Frontiers in Oncology*, page 127720, 2020.
- [3] Minglei Kang, Shoouyi Wei, J. Isabelle Choi, Charles B. Simone II, and Hai-bo Lin. Quantitative assessment of 3d dose rate for proton pencil beam scanning flash radiotherapy and its application for lung hypofractionation treatment planning. *cancers*, 2021.
- [4] A. Das and T.Ferbel. *Introduction to Nuclear and Particle Physics*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2003.
- [5] E.B. Podgorsak. *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Technical Editor, 2005.
- [6] Tatiana Wenzl and Jan J Wilnkens. Theoretical analysis of the dose dependence of the oxygen enhancement ratio and its relevance for clinical applications. *Radiation Oncology*, 6, 2011.
- [7] Vincent Favaudon, Laura Caplier, Virginie Monceau, Frédéric Pouzoulet, Mano Sayarath, Charles Fouillade, Marie-France Poupon, Isabel Brito, Philippe Hupé, Jean Bourhis, Janet Hall, Jean Jacques Fontaine, and Marie-Catherine Vozenin. Ultra-high dose rate flash irradiation increases the differential response between normal and tumour tissue in mice. *Science Translational Medicine*, 6, 2014.
- [8] Pierre Montay-Gruel, Kristoffer Petersson, Maud Jaccard, Gaël Boivin, Jean-François Germond, Benoit Petit, Raphaël Doenlen, Vincent Favaudon, François

- Bochud, Claude Bailat, Jean Bourhis, and Marie-Catherine Vozenin. Irradiation in a flash: Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100 gy/s. *Radiotherapy and Oncology*, 2017.
- [9] Pierre Montay-Gruel, Audrey Bouchet, Maud Jaccard, David Patin, Raphael Serduc, Warren Aim, Kristoffer Petersson, Benoit Petit, Claude Bailat, Jean Bourhis, Elke Bräuer-Krisch, and Marie-Catherine Vozenin. X-rays can trigger the flash effect: Ultra-high dose-rate synchrotron light source prevents normal brain injury after whole brain irradiation in mice. *Radiotherapy and Oncology*, 2018.
- [10] Lloyd M. L. Smyth, Jacqueline, Donoghue, Jessica A. Ventura, Jayde Livingstone, Tracy Bailey, Liam R. J. Day, Jeffrey C. Crosbie, and Peter A. W. Rogers. Comparative toxicity of synchrotron and conventional radiation therapy based on total and partial body irradiation in a murine model. *Scientific reports*, 2018.
- [11] Marie Catherine Vozenin, Pauline De Fornel, Kristoffer Petersson Vincent Favaudon, Maud Jaccard, Jean-François Germond, Benoit Petit, Marco Burki, Gisèle Ferrand, David Patin, Hanan Bouchaab, Mahmut Ozsahin, François Bochud, Claude Bailat, Patrick Devauchelle, and Jean Bourhis. The advantage of flash radiotherapy confirmed in mini-pig and cat-cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 2019.
- [12] N. Rama, T. Saha, S. Shukla, C. Goda, D. Milewski, A.E. Mascia, R.E. Vatner, D. Sengupta, A. Katsis, E. Abel, S. Girdhani, M. Miyazaki, A. Rodriguez, A. Ku, R. Dua, R. Parry, and T.V. Kalin. Improved tumor control through t-cell infiltration modulated by ultra-high dose rate proton flash using a clinical pencil beam scanning proton system. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2019.
- [13] Jean Bourhis, Wendy Jeanneret Sozzi, Patrik Gonçalves Jorge, Olivier Gaide, Claude Bailat, Frédéric Duclos, David Patin, Mahmut Ozsahin, François Bochud, Jean-François Germond, Raphaël Moeckli, and Marie-Catherine Vozenin. Treatment of a first patient with flash-radiotherapy. *Clinical Cancer Research*, 2019.

- [14] Marco Schwarz, Erik Traneus, Sairos Safai, Anna Kolano, and Steven van de Water. Treatment planning for flash radiotherapy: General aspects and applications to proton beams. *Medical Physics*, 2022.
- [15] Gabriel Adrian, Elise Konradsson, Michael Lempart, Sven Bäck, Crister Ceberg, and Kristoffer Petersson. The flash effect depends on oxygen concentration. *The british journal of radiology*, 2020.
- [16] Xu Cao, Rongxiao Zhang, Tatiana V. Esipova, Srinivasa Rao Allu, Ramish Ashraf, Mahbubur Rahman, Jason R. Gunn, Petr Bruza, David J. Gladstone, Benjamin B. Williams, Harold M. Swartz, P. Jack Hoopes, Sergei A. Vinogradov, and Brian W. Pogue. Quantification of oxygen depletion during flash irradiation in vitro and in vivo. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2021.
- [17] Rudi Labarbe, Lucian Hotoiu, Julie Barbier, and Vincent Favaudon. A physicochemical model of reaction kinetics supports peroxy radical recombination as the main determinant of the flash effect. *Radiotherapy and Oncology*, 2020.
- [18] Youfang Lai, Xun Jia, and Yujie Chi. Modeling the effect of oxygen on the chemical stage of water radiolysis using gpu-based microscopic monte carlo simulations, with an application in flash radiotherapy. *Physics in Medicine & Biology*, 66, 2021.
- [19] Guillaume Blain, Johan Vandenborre, Daphnée Villoing, Vincent Fiegel, Giovanna Rosa Fois, Ferid Haddad, Charbel Koumeir, Lydia Maigne, Vincent Métivier, Freddy Poirier, Vincent Potiron, Stéphane Supiot, Noël Servagent, Grégory Delpon, and Sophie Chiavassa. Proton irradiations at ultra-high dose rate vs. conventional dose rate: Strong impact on hydrogen peroxide yield. *Radiation Research*, 2022.
- [20] Swati Girdhani, Eric Abel, Alexander Katsis and Andrew Rodriguez, Shilpa Senapati, Angel KuVillanueva, Isabel L. Jackson, John Eley, Zeljko Vujaskovic, and Renate Parry. Abstract lb-280: Flash: a novel paradigm changing tumor irradiation platform that enhances therapeutic ratio by reducing normal tissue toxicity and activating immune pathways. *American Association for cancer research*, 2019.

- [21] J. Ramos-Méndez, N. Domínguez-Kondo, J. Schuemann, A. McNamara, E. Moreno-Barbosa, and Bruce Faddegon. Let-dependent intertrack yields in proton irradiation at ultra-high dose rates relevant for flash therapy. *Rad. Res.*, 2020.
- [22] Shannon J. Thompson, Kevin M. Prise, and Stephen J. McMahon. Investigating the potential contribution of intertrack interactions within ultra-high dose-rate proton therapy. *Physics in Medicine & Biology*, 68, 2023.
- [23] Uli Andreas Weber, Emanuele Scifoni, and Marco Durante. Flash radiotherapy with carbon ion beams. *Medical Physics*, 2022.
- [24] Bhanu Prasad Venkatesulu, Amrish Sharma, Julianne M. Pollard-Larkin, Ramaswamy Sadagopan, Jessica Symons, Shinya Neri<sup>1</sup>, Pankaj K. Singh, Ramesh Tailor, Steven H. Lin, and Sunil Krishnan. Ultra high dose rate (35gy/sec) radiation does not spare the normal tissue in cardiac and splenic models of lymphopenia and gastrointestinal syndrome. *Scientific reports*, 2019.
- [25] Daniela Poppinga, Rafael Kranzer, Wilfrid Farabolini, Antonio Gilardi, Roberto Corsini, Vanessa Wyrwoll, Hui Khee Looe, Björn Delfs, Lukas Gabrisch, and Björn Poppe. Vhee beam dosimetry at cern linear electron accelerator for research under ultra-high dose rate conditions. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 2020.
- [26] Michael M. Folkerts, Eric Abel, Simon Busold, Jessica Rika Perez, Vidhya Krishnamurthi, and C. Clifton Ling. A framework for defining flash dose rate for pencil beam scanning. *Wiley Periodicals*, 2022.
- [27] J.H. Hendry M.C. Vozenin and and C.L. Limoli. Biological benefits of ultra-high dose rate flash radiotherapy: Sleeping beauty awoken. *Clinical oncology*, 2019.
- [28] Kristoffer Petersson, Gabriel Adrian, Karl Butterworth, and Stephen J. McMahon. A quantitative analysis of the role of oxygen tension in flash radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2020.
- [29] Steven van de Water, Sairos Safai, Jacobus M. Schippers, Damien C. Weber, and Antony J. Lomax. Towards flash proton therapy: the impact of treatment

- planning and machine characteristics on achievable dose rates. *Acta Oncologica*, 2019.
- [30] Hao Gao, Bowen Lin, Yuting Lin, Shujun Fu, Katja Langen, Tian Liu, and Jeffery Bradley. Simultaneous dose and dose rate optimization (sddro) for flash proton therapy. *Medical Physics*, 2020.
- [31] Alessio Sarti, Patrizia De Maria, Giuseppe Battistoni, Micol De Simoni, Cinzia Di Felice, Yunsheng Dong, Marta Fischetti, Gaia Franciosini, Michela Marafini, Francesco Marampon, Ilaria Mattei, Riccardo Mirabelli, Silvia Muraro, Massimiliano Pacilio, Luigi Palumbo, Loredana Rocca, Damiana Rubeca, Angelo Schiavi, Adalberto Sciubba, Vincezìno Tombolini, Marco Frascati Toppi, Giacomo Traini adn Antonio Trigilio, and Vincenzo Patera. Deep seated tumour treatments with electrons of high energy delivered at flash rates: The example of prostate cancer. *Frontiers in Oncology*, 2021.
- [32] Walter Tinganelli, Uli Weber, Anggraeini Puspitasari, Palma Simoniello, Amir Abdollahi, Julius Oppermann, Christoph Schuy, Felix Horst, Alexander Helm, Claudia Fournier, and Marco Durante. Flash with carbon ions: Tumor control, normal tissue sparing, and distal metastasis in a mouse osteosarcoma model. *Radiotherapy and Oncology*, 2022.