



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI SCIENZE E TECNOLOGIE

Corso di Laurea in Fisica

Il Ruolo dell'Ossigeno nell'Effetto FLASH

Relatore:

Prof. Ivan Veronese

Relatore Esterno:

Prof.ssa Ilaria Mattei

Tesi di Laurea di:

Giulia Federica Bianca Coppi

Matricola 11823A

Anno Accademico 2024/2025

*A te Ale,
ogni parola di queste pagine
porta con sé un pensiero per la tua battaglia
e per la forza con cui la affronti ogni giorno.*

Indice

1	Introduzione	1
1.1	La Radioterapia Convenzionale	1
1.1.1	Linear Energy Transfer	3
1.1.2	Il Danno Biologico	3
1.1.3	Relative Biological Effectiveness	4
1.1.4	Oxygen Enhancement Ratio	5
1.2	La Nascita della Radioterapia FLASH	5
1.2.1	Ipotesi sui Meccanismi Responsabili dell'Effetto FLASH	9
2	I Modelli Teorici e Computazionali	12
2.1	L'Ipotesi ROD Spiegata Attraverso la Formazione di Reactive Oxygen Species e Non-Reactive Oxygen Species	12
2.2	La ROD come Fattore Modificante dell'OER	15
2.3	Chemical Track-Structure Monte Carlo: la Critica di Boscolo et al. all'Ipotesi ROD	19
2.4	ROD e Radiosensibilità Cellulare: il Modello di Zhu et al.	22
2.5	Il Contrasto con il Modello di Pratz e Kapp	26
2.6	Riepilogo e Confronto tra i Modelli	30
3	Le Evidenze Sperimentali	32
3.1	Prime Evidenze Sperimentali della ROD con Elettroni FLASH	32
3.2	Il Legame Sperimentale tra ROD, LET e Dose Rate	35
3.3	Il Ruolo del Dose Rate nel Consumo di Ossigeno e nella Produzione di H_2O_2	38
3.4	Elio, Carbonio e Ossigeno: Nuove Evidenze sul Consumo di Ossigeno	40
4	Conclusioni e Prospettive	44

Capitolo 1

Introduzione

1.1 La Radioterapia Convenzionale

La radioterapia convenzionale rappresenta una delle strategie fondamentali nel trattamento dei tumori solidi: si sfruttano radiazioni ionizzanti come fotoni (raggi X), elettroni, protoni, ioni leggeri per controllare la crescita cellulare neoplastica tumorale, indurre la morte cellulare delle cellule tumorali e, nei casi in cui la malattia non sia curabile, per migliorare la qualità della vita del paziente attraverso un'azione palliativa.

Nel contesto fisico-dosimetrico, la grandezza fisica fondamentale che si tiene in considerazione quando si pianifica un piano radioterapico è la dose assorbita dal paziente, definita come la quantità di energia assorbita da un mezzo a seguito dell'esposizione a radiazioni per unità di massa:

$$D = \frac{dE_{ab}}{dm} \text{ [Gy]} \quad (1.1)$$

Nel contesto clinico, le dosi somministrate ai tumori solidi variano tipicamente tra 60 Gy e 80 Gy, con valori che dipendono dalla localizzazione del tumore, dalla sua radiosensibilità e dalla tolleranza dei tessuti sani circostanti.

Il principio fisico alla base della radioterapia consiste nella conformità della dose, ovvero la somministrazione di una dose elevata di radiazioni ionizzanti alla massa tumorale, ricercando il massimo effetto citotossico sul DNA delle cellule cancerose e minimizzando l'esposizione dei tessuti sani adiacenti per prevenire il più possibile complicanze tardive.

L'equilibrio di questi due obiettivi permette di definire la finestra terapeutica (gaussiana in grigio in Figura 1.1), ovvero l'intervallo di dose ottimale: la curva dose-risposta illustra il compromesso necessario fra efficacia terapeutica (tumor control probability) e danni ai tessuti sani (complication probability).

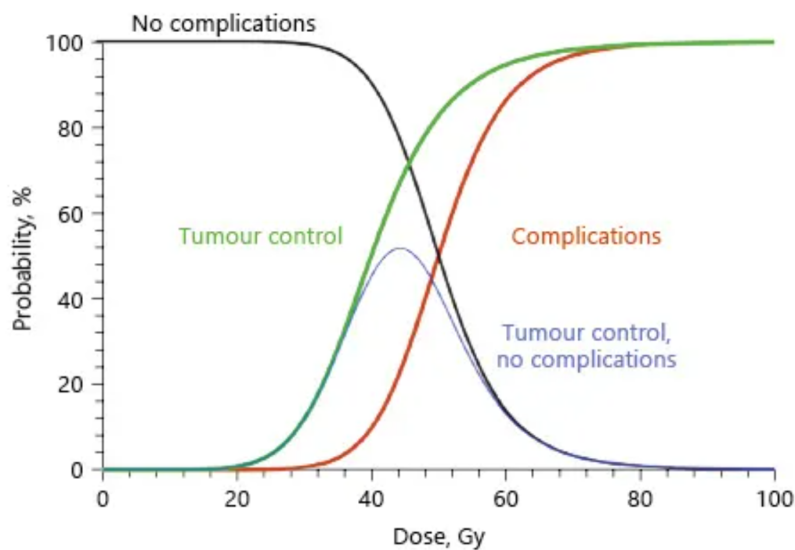


Figura 1.1: Finestra terapeutica.

In ambito clinico la radioterapia può essere somministrata in diverse modalità, ad esempio con fasci esterni o brachiterapia.

Ciascuna particella presenta un proprio profilo di distribuzione della dose in funzione della profondità raggiunta nel mezzo e dell'energia inizialmente posseduta (Figura 1.2).

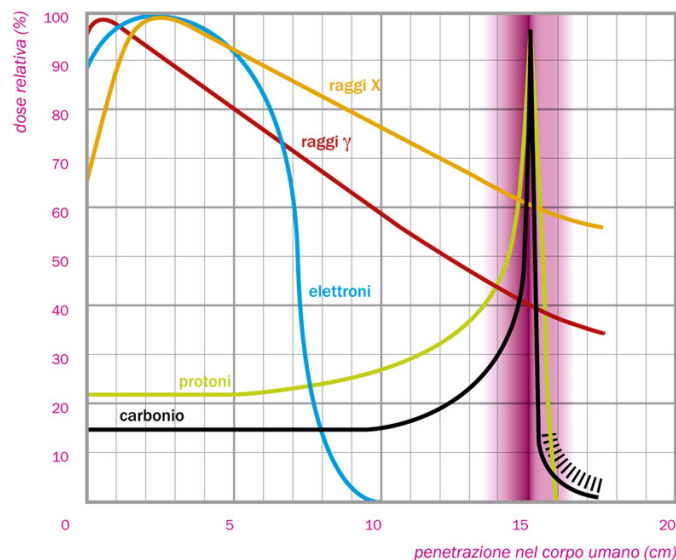


Figura 1.2: Energia assorbita dai tessuti in funzione della profondità di penetrazione della radiazione.

I fotoni, pur essendo radiazioni indirettamente ionizzanti, vengono spesso classificati come a basso LET, poiché il trasferimento di energia nel mezzo è mediato dagli elettroni secondari prodotti, i quali presentano valori di LET bassi. Gli elettroni rilasciano gran parte della loro energia in prossimità della superficie, successivamente

te la loro energia decresce bruscamente in relazione alla profondità raggiunta nel mezzo rendendoli ideali per il trattamento di lesioni superficiali. Le particelle cariche pesanti presentano un profilo di rilascio energetico noto come picco di Bragg: le particelle iniziano a penetrare il mezzo rilasciando poca energia e, arrivate alla distanza prestabilita dall'energia iniziale del fascio, depositano la dose massima nella sede del tumore, con un rapido calo oltre la lesione, offrendo un eccellente risparmio tissutale.

1.1.1 Linear Energy Transfer

Le radiazioni ionizzanti come fotoni, elettroni e ioni leggeri si distinguono in base al LET, ovvero il Linear Energy Transfer. Il LET è la grandezza fisica definita come l'energia persa per unità lunghezza da una particella ionizzante in un mezzo condensato:

$$LET = \frac{dE_L}{dl} \left[\frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right] \quad (1.2)$$

Il valore del LET dipende dalla natura della particella e dalla sua energia cinetica. In generale, si distinguono particelle a basso LET, come raggi X, raggi γ ed elettroni, e particelle ad alto LET, come protoni e ioni pesanti.

Le radiazioni fotoniche, attraverso gli elettroni secondari che producono, presentano valori di LET mediamente inferiori a $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$; i protoni mostrano valori intermedi, compresi tra circa 0.5 e $30 \text{ keV}/\mu\text{m}$ lungo il percorso, con un aumento progressivo fino al picco di Bragg; mentre gli ioni pesanti, come il Carbonio-12, raggiungono valori compresi tra 50 e $200 \text{ keV}/\mu\text{m}$, determinando una densità di ionizzazione più elevata e un danno biologico più complesso.

Maggiore è il LET, maggiore è la densità di ionizzazione lungo la traccia: ad esempio, alla profondità del picco di Bragg la distanza media tra ionizzazioni è di circa 4 nm per i protoni e 0.3 nm per gli ioni Carbonio-12, a fronte di una distanza di 2 nm tra i filamenti della doppia elica del DNA. Ciò rende evidente come il Carbonio-12 possa indurre più facilmente rotture di doppio filamento.

1.1.2 Il Danno Biologico

Il danno cellulare causato dalla radiazione ionizzante è dovuto ai processi di ionizzazione ed eccitazione delle molecole all'interno delle cellule. Il danno può manifestarsi in due modalità principali

- danno diretto: la radiazione interagisce direttamente con il DNA, causando la sua ionizzazione e potenziali rotture della doppia elica.
- danno indiretto: la radiazione ionizza le molecole di acqua presenti nel tessuto, generando radicali liberi che successivamente danneggiano il DNA.

L'effetto biologico che si vuole ottenere con la radioterapia è il danneggiamento del DNA cellulare tumorale, inducendo necrosi o apoptosi, riuscendo a far diminuire il

volume maligno.

I danni riportati al DNA possono essere riparabili o non riparabili: le cellule sane possiedono meccanismi efficienti di riparazione, mentre le cellule tumorali hanno una capacità riparativa fortemente ridotta. Le rotture di doppia elica sono quasi impossibili da riparare, soprattutto per le cellule cancerose, e dunque è il tipo di danno che si vuole indurre nel tumore: la probabilità di generare danni irreparabili dipende dalla densità di ionizzazione, ovvero dal LET.

1.1.3 Relative Biological Effectiveness

In radioterapia non è sufficiente considerare la sola dose fisica depositata nel tessuto, perché l'effetto biologico della radiazione dipende in modo significativo dalla natura della particella e dal suo LET. Per tenerne conto si introduce il parametro Relative Biological Effectiveness (RBE), che esprime l'efficacia relativa di una radiazione rispetto a una radiazione di riferimento (tipicamente fotoni X o γ) a parità di danno biologico, definito come:

$$RBE = \frac{D_X}{D_T} \Big|_{iso} \quad (1.3)$$

dove D_X è la dose di radiazione X di riferimento e D_T è la dose della radiazione in esame necessaria a produrre lo stesso effetto biologico.

La stima dell'RBE si basa sulle curve di sopravvivenza cellulare, che descrivono la frazione (SF) di cellule capaci di mantenere l'integrità riproduttiva dopo differenti dosi di radiazione. La forma della curva è descritta dal modello lineare-quadratico, in cui il parametro α rappresenta danni letali indotti da un singolo evento, mentre β descrive danni dovuti alla combinazione di due eventi sub-letali:

$$SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2) \quad (1.4)$$

Il rapporto α/β indica la sensibilità del tessuto al frazionamento: valori elevati (10 Gy) caratterizzano i cosiddetti early responding tissues (tumori in crescita, mucosa, pelle), che manifestano reazioni acute e sono meno influenzati dalla dose per frazione, valori bassi (< 4 Gy) descrivono invece i late responding tissues (midollo spinale, polmone, rene), molto più sensibili al frazionamento e suscettibili a complicanze tardive.

Quindi l'RBE rappresenta un parametro fondamentale per tradurre la dose fisica in dose biologicamente efficace, integrando le caratteristiche intrinseche della radiazione (LET, tipo di particella) con la risposta dei diversi tessuti. Questo concetto è cruciale per ottimizzare i protocolli di frazionamento e per bilanciare efficacia antitumorale e tossicità nei tessuti sani.

1.1.4 Oxygen Enhancement Ratio

La presenza di ossigeno nei tessuti è fondamentale per la loro vita e crescita: un tumore cresce se è vascolarizzato e riceve ossigeno, mentre regioni ipossiche, che si sviluppano spesso nelle zone centrali dei tumori solidi, tendono a necrotizzare.

La radiosensibilità dei tessuti è determinata anche dalla percentuale di ossigeno presente: il parametro fisico che quantifica la radiosensibilità in funzione dell'ossigenazione del tessuto è l'Oxygen Enhancement Ratio.

L'OER è definito come:

$$OER = \frac{D_{hypo}}{D_{aer}} \Big|_{iso} \quad (1.5)$$

dove D_{hypo} è la dose di radiazioni necessaria in condizioni ipossiche e D_{aer} la dose necessaria in condizioni normossiche, entrambe valutate all'isoeffetto, cioè per produrre la stessa risposta biologica.

L'ossigeno agisce come radiosensibilizzante perché reagisce con i radicali liberi prodotti dall'irradiazione e stabilizza i danni indotti al DNA. In questo modo, lesioni che in assenza di ossigeno potrebbero essere transitorie o riparabili vengono trasformate in danni permanenti, riducendo la capacità della cellula di sopravvivere.

L'OER varia in funzione del LET della particella considerata: un valore tipico per i fotoni e gli elettroni è intorno a 2.5–3, ovvero sono necessari valori di dose assorbita circa tre volte maggiori in condizioni ipossiche per ottenere lo stesso effetto biologico prodotto in condizioni normossiche. Per particelle ad alto LET, invece, l'OER diminuisce fino ad avvicinarsi a 1, poiché il danno è prevalentemente diretto e meno dipendente dalla presenza di ossigeno.

1.2 La Nascita della Radioterapia FLASH

Le origini della radioterapia FLASH risalgono agli anni '60, quando studi innovativi di Berry et al. [1] dimostrarono che i tessuti sani irradiati con dosi ultra-elevate in tempi dell'ordine dei nanosecondi mostravano una maggiore sopravvivenza rispetto a quelli irradiati convenzionalmente.

Il termine "effetto FLASH" è stato formalmente introdotto da Favaudon et al. [2] nel 2014 in seguito a esperimenti condotti su modelli murini che evidenziarono una significativa riduzione della tossicità per i tessuti sani mantenendo inalterata l'efficacia antitumorale (Figura 1.3).

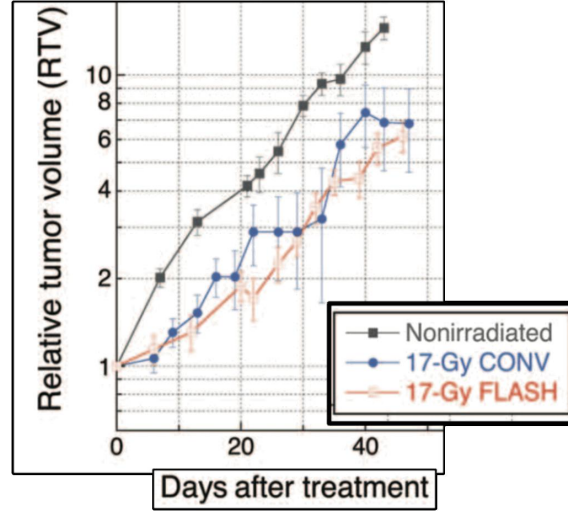


Figura 1.3: Confronto del controllo tumorale tra CONV-RT e FLASH-RT [2].

Questo studio segnò un punto di svolta, seguito da numerose conferme sperimentali su diversi modelli animali [3] [4].

Nel 2019 Bourhis et al. somministrarono la radioterapia FLASH per la prima volta su un paziente umano, aprendo la strada all'applicazione clinica [5].

La Radioterapia FLASH è un tipo di radioterapia a fasci esterni, caratterizzata da una diversa modulazione delle caratteristiche del fascio rispetto alla Radioterapia Convenzionale: il fascio viene somministrato ad Ultra High Dose Rates, ossia usando valori di ratei di dose medi maggiori di 40 Gy/s, e in tempi minori di 200 ms (come illustrato schematicamente in Figura 1.4).

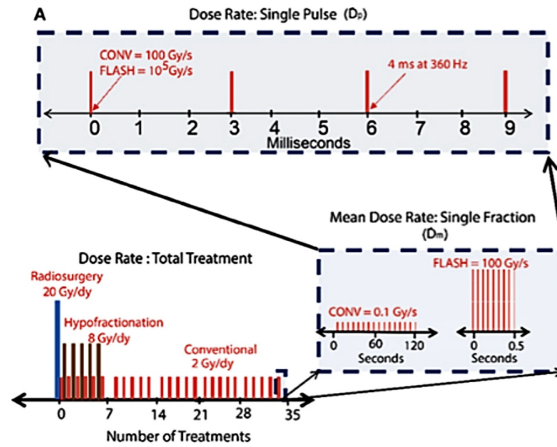


Figura 1.4: Differenze di parametri del fascio tra FLASH-RT e CONV-RT.

Per caratterizzare il fascio che si sta utilizzando, nel caso di fasci impulsati, è utile introdurre altre due grandezze: il dose-rate per impulso, ovvero la dose somministrata in un singolo impulso rispetto alla durata dell'impulso (nel caso dei fasci di elettroni, per dosi per impulso superiori a 1 Gy e impulsi di durata dell'ordine del

microsecondo, si possono raggiungere valori fino al MGy/s [6]):

$$\dot{D} = \frac{D_p}{t_p} \left[\frac{\text{Gy}}{\text{s}} \right] \quad (1.6)$$

e il dose-rate medio, ovvero il rapporto tra la dose totale e il tempo complessivo di irraggiamento. È la grandezza generalmente utilizzata per distinguere i regimi convenzionali da quelli ultra-high dose rate, e assume valori superiori a 40 Gy/s nei fasci in grado di indurre l'effetto FLASH [6]:

$$\dot{D}_m = \frac{D_p}{t_r} \left[\frac{\text{Gy}}{\text{s}} \right] \quad (1.7)$$

In queste condizioni l'efficacia sul controllo tumorale è paragonabile a quella ottenuta con la CONV-RT, mentre i tessuti sani risultano sorprendentemente più protetti. Proprio l'effetto di risparmio tissutale rende questa tecnica innovativa una delle più promettenti per il futuro: lo sparing dei tessuti sani permette di ampliare ulteriormente la finestra terapeutica, riuscendo a somministrare una dose maggiore al tessuto tumorale senza aumentare il danno ai tessuti sani (Figura 1.5).

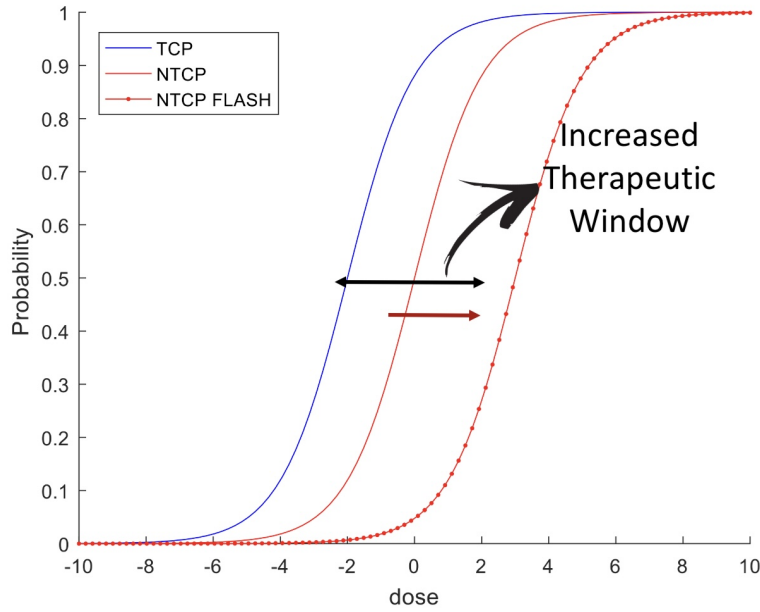


Figura 1.5: Probabilità di controllo tumorale a confronto tra CONV-RT e FLASH-RT.

Per caratterizzare un fascio in modalità FLASH il dose rate non è sufficiente, attualmente nuovi parametri sono in fase di studio per descrivere in modo più accurato la condizione di attivazione dell'effetto FLASH: instant dose rate, dose rate over threshold e sliding window sono solo alcuni. Questi combinano dose assoluta, soglie minime e tempi di esposizione, rendendo più complessa ma più precisa l'analisi delle condizioni necessarie per ottenere l'effetto terapeutico desiderato.

Un'altra sfida aperta riguarda la definizione precisa del dose rate effettivo e, soprattutto, la sua misurazione accurata. È difficile stabilire soglie di dose rate a partire dalle quali l'effetto FLASH si manifesta con certezza. Uno degli approcci proposti consiste nel costruire mappe di dose, che mostrano, nel caso di fasci di elettroni o fotoni, come il dose rate possa essere elevato soprattutto nelle zone superficiali all'ingresso del fascio, rendendo complicata la progettazione di un piano di trattamento efficace e uniforme.

Esiste una finestra terapeutica (Figura 1.6) in cui l'effetto FLASH è attivo, ma questa finestra varia in base al tipo di tessuto. Altri fattori chiave che influenzano l'attivazione dell'effetto includono il dose rate per impulso (Equazione 1.6) e la soglia di dose minima. Di conseguenza, il design del trattamento deve essere altamente personalizzato, considerando la variabilità biologica tra i diversi distretti corporei.

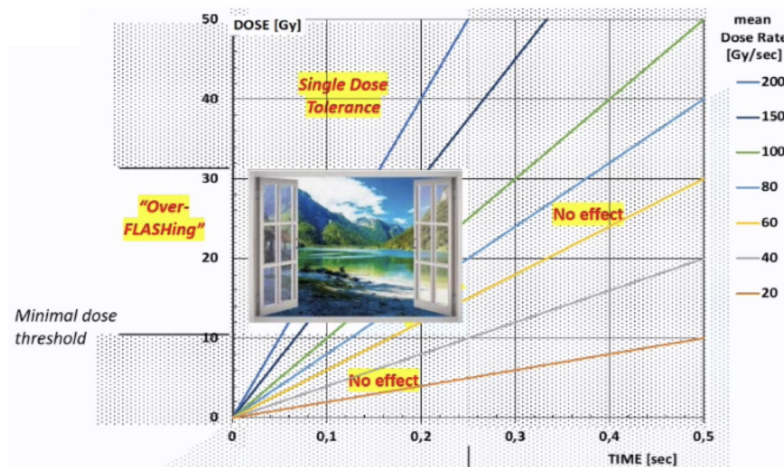


Figura 1.6: Manifestazione della finestra terapeutica.

La radioterapia FLASH può essere realizzata con diverse tipologie di fasci, ciascuna caratterizzata da specifiche proprietà fisiche e tecniche. I più studiati sono i fasci di elettroni, inizialmente utilizzati per le prime dimostrazioni in vitro e in vivo grazie alla loro disponibilità e facilità di modulazione del dose rate [7]. Grande attenzione è rivolta ai fasci di particelle cariche pesanti (protoni e ioni) [8], che combinano la possibilità di operare a ultra-high dose rate con le ben note proprietà di conformità spaziale e vantaggio biologico legato all'alto LET. I fasci di fotoni, invece, rappresentano una sfida tecnologica: la bassa efficienza del processo di bremsstrahlung rende complessa la produzione di radiazioni UHDR con le apparecchiature convenzionali, richiedendo correnti elettroniche molto più elevate o sorgenti alternative, come tubi X modificati o radiazione di sincrotrone [9].

Oggi l'effetto FLASH è considerato una prospettiva promettente per migliorare la radioterapia oncologica, tuttavia i meccanismi sottostanti alla comparsa di questo effetto restano tuttora incerti.

1.2.1 Ipotesi sui Meccanismi Responsabili dell'Effetto FLASH

Nonostante l'evidenza dell'effetto FLASH sia consolidata, i meccanismi alla base della sua manifestazione sono oggetto della ricerca scientifica più recente. Le ipotesi vagliate negli ultimi anni si dividono tra ipotesi fisico-chimiche e ipotesi biologiche. Le due tipologie di ipotesi si differenziano soprattutto da un punto di vista temporale: i processi fisici avvengono in 10^{-15} - 10^{-12} s, mentre ai processi biologici servono 1 - 10^3 s per manifestarsi [10].

La FLASH-RT, essendo caratterizzata da una somministrazione di dose molto più rapida rispetto alla CONV-RT, permette l'insorgenza di fenomeni molto diversi, dovuti proprio alla scala temporale biologica nettamente diversa che viene considerata.

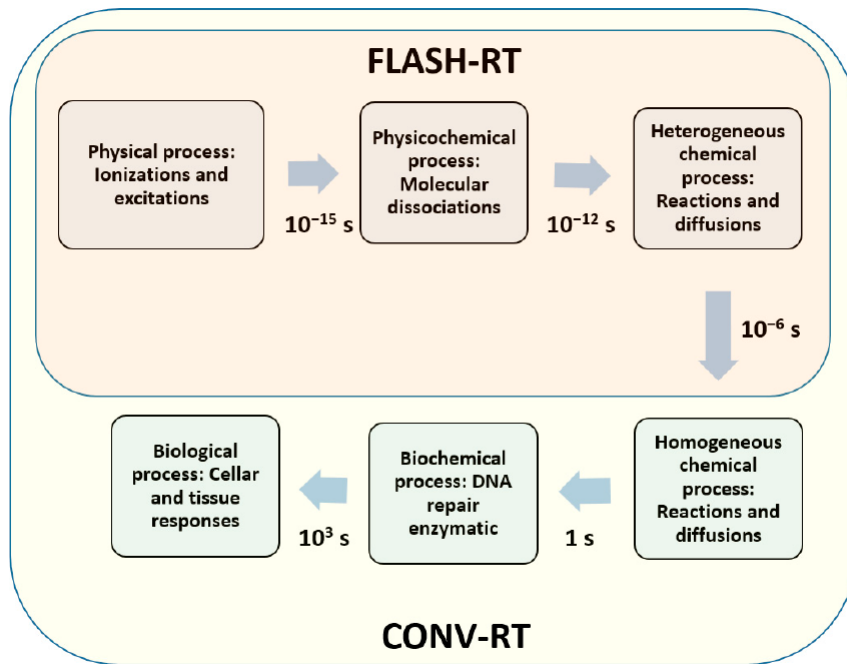


Figura 1.7: Processi indotti dalle radiazioni ionizzanti in modalità FLASH-RT e CONV-RT: effetti fisico-chimici su scala $< 10^{-6}$ s ed effetti biologici su cellule, tessuti e organismi su scala $> 10^3$ s [10].

L'ossigeno gioca un ruolo fondamentale nelle varie ipotesi che sono state formulate, infatti la risposta differenziale che si osserva tra tessuto sano e tessuto tumorale può essere ricondotta alla diversa vascolarizzazione dei tessuti e quindi alla loro ossigenazione e al loro differente OER.

La radiazione, nell'intervallo di tempo governato dai processi fisici, interagisce con le molecole d'acqua causando la radiolisi. Gli elettroni secondari prodotti perdono rapidamente energia e vengono catturati dal reticolo molecolare dell'acqua, dando origine a elettroni idratati. Parallelamente si formano radicali liberi dell'idrogeno, molecole instabili che portano alla creazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). A loro volta, queste molecole attaccano le componenti cellulari, tra cui il DNA, causando stress ossidativo.

I processi di diseccitazione e diffusione molecolare determinano la formazione di ulteriori specie radicaliche: questi meccanismi sono governati dai differenti LET delle particelle responsabili (elettroni e protoni).

Il ruolo dell'ossigeno nell'insorgenza dell'effetto FLASH è stato a lungo considerato cruciale, infatti le ipotesi che lo riguardano sono ancora oggi al centro del dibattito scientifico.

Oxygen Depletion Effect

La rapida somministrazione della dose in regime FLASH induce nei tessuti una condizione di ipossia transitoria, che contribuisce a modulare la risposta cellulare.

Sono state avanzate diverse ipotesi per spiegare questo fenomeno: la natura del danno indotto al DNA determina diversi esiti biologici, i tumori solidi (solitamente ipotossici) sono meno influenzati dall'ulteriore deplezione di ossigeno a differenza dei tessuti sani che beneficiano maggiormente dell'effetto protettivo, oltre al fatto che la diversa capacità riparativa dei due tipi di cellule gioca un ruolo fondamentale.

L'ipossia transitoria renderebbe i tessuti sani più radioresistenti rispetto all'irradiazione convenzionale, senza intaccare in modo significativo la probabilità di controllo tumorale [10].

Le evidenze più recenti indicano che la deplezione di ossigeno non sia sufficiente, da sola, a spiegare l'insorgenza dell'effetto FLASH, suggerendo una visione multifattoriale [10].

ROS e Effetto dei Radicali Liberi

Come verrà approfondito nella Sezione 2.1 e come già anticipato,, le radiazioni UHDR inducono la produzione di ROS e radicali liberi (anione superossido, perossido d'idrogeno, radicale idrossile) a partire dalla radiolisi dell'acqua. Queste molecole possono causare stress ossidativo cellulare, determinando la risposta differenziale dei tessuti: le cellule sane, ricche di agenti antiossidanti, sono capaci di riparare i danni provocati da queste molecole, mentre le cellule tumorali non hanno gli stessi meccanismi di riparazione delle cellule sane, e andranno incontro a danneggiamento e morte cellulare a seguito dell'interazione con i ROS e i radicali liberi.

Inoltre, il dose rate ultra elevato limita la diffusione di ROS, contenendo i danni che possono essere indotti da queste molecole [11].

I limiti e l'applicabilità di questa ipotesi sono ancora oggetto di studio [10], [11].

Reazioni di Fenton e Composti Perossidati

L'irradiazione UHDR può provocare la formazione di perossidi organici all'interno delle cellule attraverso reazioni di tipo Fenton, in cui il ferro labile gioca un ruolo chiave. Questi composti inducono danni ossidativi, ma le cellule sane, caratterizzate da una minore disponibilità di ferro libero rispetto a quelle tumorali, sono più efficienti nell'eliminarli.

La risposta differenziata alla detossificazione può contribuire a spiegare l'efficacia di un irraggiamento in modalità FLASH [10].

L'ipotesi biologica

Oltre alle ipotesi fisico-chimiche, è utile accennare brevemente a una delle ipotesi biologiche più accreditate: l'ipotesi immunitaria.

Durante l'irradiazione convenzionale, a causa del frazionamento, gran parte del sangue del paziente viene esposto alla dose, compromettendo i linfociti e aumentando le aberrazioni cromosomiche.

Nei trattamenti FLASH, la durata ridotta dell'esposizione permette di circoscrivere i linfociti colpiti, riducendo il danno al sistema immunitario del paziente: alcuni studi hanno infatti mostrato come con questa tecnica si riscontrino meno aberrazioni cromosomiche e una migliore preservazione delle cellule immunitarie rispetto alla CONV-RT.

Ulteriori studi hanno evidenziato un maggiore reclutamento dei linfociti T all'interno del tumore, indicando che la risposta differenziale tumorale può contribuire alla salvaguardia del tessuto sano.

La validità e i limiti di questa ipotesi sono ancora da verificare.

Il presente lavoro di tesi si propone di analizzare in modo critico il ruolo dell'ossigeno nell'effetto FLASH, con particolare attenzione all'ipotesi della Radiolytic Oxygen Depletion (ROD) e ai meccanismi legati alla produzione e ricombinazione dei radicali liberi. Nel Capitolo 2 vengono presentati i principali modelli analitici e computazionali che descrivono questi processi, mentre nel Capitolo 3 sono discussi studi sperimentali in vitro e in vivo che mirano a valutare quantitativamente la dinamica dell'ossigeno e a confrontarla con le predizioni teoriche.

Capitolo 2

I Modelli Teorici e Computazionali

Questo lavoro di tesi si propone di presentare alcuni modelli teorici (analitici e computazionali) che sono stati recentemente sviluppati per valutare il ruolo dell'ossigeno nell'insorgenza dell'effetto FLASH.

I modelli presentati riguardano principalmente l'ipotesi di auto-disintossicazione dalle Reactive Oxygen Species, discussa in Sezione 2.1, e l'ipotesi di Transient Oxygen Depletion/Radiolytic Oxygen Depletion, discussa nelle Sezioni 2.2 - 2.5.

2.1 L'Ipotesi ROD Spiegata Attraverso la Formazione di Reactive Oxygen Species e Non-Reactive Oxygen Species

Nel 2020 Abolfath et al. [11] hanno sviluppato una simulazione di dinamica molecolare per indagare la validità dell'ipotesi ROD.

L'assunto di partenza riguarda la formazione di ROS e NROS (Reactive e Non-Reactive Oxygen Species) causata dalla radiolisi dell'acqua: il moto dei ROS, prodotte nei picosecondi successivi all'irradiazione, è governato dall'interazione elettrostatica con le altre molecole presenti nel mezzo e, interagendo con l'ossigeno e l'idrogeno disciolti nel mezzo, si trasformano in NROS.

La simulazione, realizzata con Geant4-DNA, prende luogo in un phantom di acqua contenente molecole di H_2O e O_2 per simulare il danno causato al DNA.

Il modello adottato si basa su equazioni che descrivono l'evoluzione temporale delle due specie radicaliche [11]:

$$\frac{dN_1}{dt} = G - 2D_f N_2 - D_f N_2 N_1 \quad (2.1)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = D_f N_1^2 \quad (2.2)$$

dove N_1 è il numero di molecole di ROS e N_2 il numero di molecole di NROS. $G = \mu_1(N_{O_2}, N_{H_2O})\dot{z}$ è il rate di produzione di ROS, proporzionale al dose rate \dot{z} e

al coefficiente μ_1 : quest'ultimo permette di descrivere la dipendenza di G dalle concentrazioni iniziali di ossigeno e acqua. D_f è il parametro che descrive la diffusione delle ROS.

Queste leggi analitiche permettono di stimare la produzione delle ROS e la loro trasformazione in NROS in dipendenza dell'ossigenazione del mezzo e del dose rate, tuttavia è importante sottolineare che la dose non può essere determinata come la quantità fisica macroscopica che conosciamo: le simulazioni di dinamica molecolare sono volte alla considerazione di soli eventi microscopici.

Le equazioni 2.1, 2.2 ammettono soluzioni analitiche in due regimi limite: tempi brevi e tempi lunghi di somministrazione della dose.

Per tempi brevi, la densità di entrambe le specie è molto ridotta e i termini non lineari nelle equazioni differenziali possono essere trascurati. In questo caso, la popolazione delle specie reattive cresce linearmente con il tempo, secondo la relazione:

$$N_1 \propto Gt \quad (2.3)$$

dove G rappresenta il rendimento radiolitico e t il tempo di irraggiamento. Inserendo questa soluzione nell'equazione per le NROS, si ottiene invece una dipendenza cubica:

$$N_2 \propto G^2 D_f t^3 \quad (2.4)$$

Ne consegue che, nei primi istanti dopo l'irradiazione, la popolazione delle ROS cresce linearmente, mentre quella delle NROS cresce molto più rapidamente, con dipendenza cubica dal tempo. Inoltre, il rapporto tra le due popolazioni risulta proporzionale al rendimento G , ossia $N_2/N_1 \propto G$. A bassi dose rate ($G \ll 1$) si ha quindi $N_2 \ll N_1$, mentre in regime FLASH ($G \gg 1$) vale la relazione opposta, $N_2 \gg N_1$.

A tempi più lunghi, la popolazione delle ROS decresce progressivamente rispetto a quella delle NROS, fino a raggiungere un regime stazionario. In questa condizione si verifica $N_1 N_2 \simeq 1$, da cui, sostituendo nelle equazioni di evoluzione, si ricava [11]:

$$N_2 \propto G^{2/3} D_f^{-1/3} t^{1/3}, \quad N_1 = N_2^{-1} \quad (2.5)$$

Dalle simulazioni condotte per calcolare la produzione di ROS e NROS si evince che, a parità di dose, il numero di ROS disponibili in regime UHDR è inizialmente elevato, ma la loro concentrazione decresce rapidamente per ricombinazione e conversione in specie non reattive (NROS). In condizioni di dose rate convenzionale (CDR), invece, la produzione di ROS è più lenta ma più persistente nel tempo, poiché le reazioni di ricombinazione sono meno frequenti.

Questo comportamento temporale è cruciale: nelle primissime fasi dopo l'irradiazione la concentrazione di ROS può risultare superiore, ma su scale temporali rilevanti per il danno biologico la loro popolazione si riduce drasticamente, lasciando prevalere le NROS, chimicamente stabili e molto meno tossiche. In altre parole, a UHDR le ROS generate non hanno il tempo di interagire efficacemente con il DNA, poiché vengono rapidamente neutralizzate.

I risultati mostrano inoltre l'esistenza di un intervallo ottimale di ossigenazione che massimizza l'effetto protettivo: livelli troppo bassi (ipossia estrema) o troppo alti di ossigeno annullano il beneficio, poiché in entrambi i casi la conversione ROS-NROS risulta meno efficiente. A UHDR, per tempi lunghi la concentrazione di NROS risulta circa doppia rispetto alla CDR, riducendo così la tossicità nei tessuti sani (Figure 2.1, 2.2).

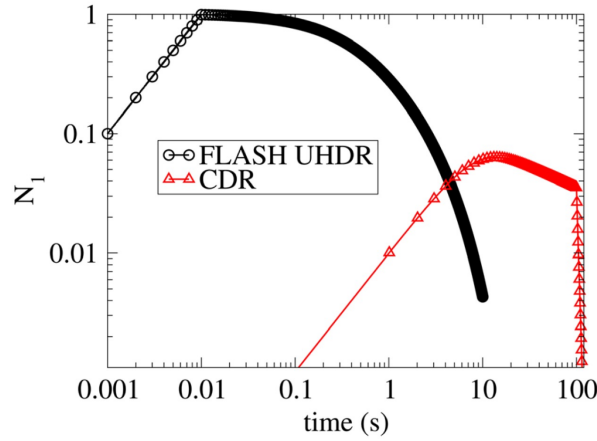


Figura 2.1: Evoluzione dei ROS (N_1) in funzione del tempo e del dose rate: a UHDR la loro concentrazione cala rapidamente per formazione di specie non reattive, mentre a dose rate convenzionali rimane più elevata durante i tempi di riparazione del DNA, aumentando la tossicità nei tessuti [11].

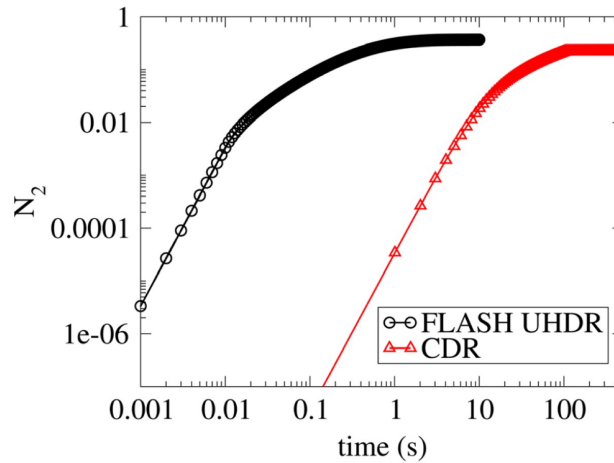


Figura 2.2: Andamento delle NROS (N_2) in funzione del tempo e del dose rate: a tempi lunghi, in regime UHDR la loro concentrazione risulta circa doppia rispetto alla CONV, riducendo così la tossicità nei tessuti sani.[11].

L'effetto non è selettivo per tipo di tessuto: la riduzione di tossicità avviene sia nei tessuti sani sia in quelli tumorali. Tuttavia, nei tessuti normossici la maggiore

disponibilità di ossigeno favorisce la formazione di NROS e quindi una più efficace neutralizzazione dei radicali, determinando un risparmio tissutale più marcato. Nei tumori ipossici, invece, la scarsa disponibilità di ossigeno limita la conversione ROS-NROS e rende meno pronunciato l'effetto protettivo.

In conclusione, gli autori propongono che la competizione tra le due specie radicaliche considerate costituisca uno dei meccanismi alla base dello sparing FLASH: a UHDR, le molecole prodotte hanno una diffusione ridotta e reagiscono tra loro prima di poter danneggiare il DNA, determinando una minore efficacia biologica complessiva. L'effetto non è selettivo per tipo di tessuto, ma risulta più evidente nei tessuti sani, dove la maggiore ossigenazione favorisce la formazione di NROS. Gli autori sottolineano infine che il modello resta confinato a una scala microscopica e non fornisce direttamente grandezze macroscopiche come dose e dose rate, motivo per cui deve essere considerato complementare ad altri approcci teorici e sperimentali.

Ad oggi, l'ipotesi della auto-disintossicazione dei radicali è considerata una componente plausibile del fenomeno [12], ma deve essere validata con altre evidenze teoriche e sperimentali per fornire una spiegazione completa.

2.2 La ROD come Fattore Modificante dell'OER

Lo studio condotto da Pratz e Kapp nel 2019 [13] rappresenta uno dei primi tentativi sistematici di valutare l'ipotesi della Radiolytic Oxygen Depletion (ROD) come meccanismo alla base dell'insorgenza dell'effetto FLASH.

Lo studio è incentrato su un modello analitico, successivamente verificato da simulazioni computazionali, volto a stimare il consumo di ossigeno indotto dalla radiazione in due differenti casi: prima considerando una somministrazione di dose ad UHDR (maggiore di 100 Gy/s) e successivamente a Very High Dose Rate (VHDR, maggiore di 10 Gy/s).

Il modello è volto alla valutazione dell'impatto dei due diversi dose rate sull'OER.

ROD a UHDR

In questo scenario si assume che il rate della ROD superi ampiamente le variazioni nella concentrazione di ossigeno dovute alla diffusione e al metabolismo, effetti che risultano quindi trascurabili [13].

L'OER viene modellizzato secondo la parametrizzazione di Grimes e Partridge [14]:

$$OER(p) = 1 + \frac{\Phi_0}{\Phi_D}(1 - e^{-\varphi p}) \quad (2.6)$$

dove p è la pressione parziale di ossigeno pO_2 (ovvero la misura della concentrazione di ossigeno disciolto nei tessuti), Φ_0 è la frazione di cellule uccise dalla fissazione di radicali, Φ_D è la frazione di cellule senza fissazione di ossigeno e φ è una funzione

della pressione parziale di ossigeno ($\Phi_0/\Phi_D = 1.63$, $\varphi = 0.26$).

La deplezione di ossigeno causata dalla radiolisi dell'acqua, come spiegato in Sezione 1.2.1, può essere espressa tramite il coefficiente $L_{ROD} = 0.42$ mmHg/Gy, che rappresenta la riduzione della pressione parziale di ossigeno per unità di dose assorbita, indipendentemente dalla concentrazione iniziale di ossigeno. La pressione parziale di ossigeno in dipendenza della dose fornita D al tessuto può essere stimata attraverso la relazione seguente [13]:

$$p = p_0 - L_{ROD}D \quad (2.7)$$

L'ossigeno viene gradualmente consumato e il tessuto diventa sempre più radiore-sistente a causa dell'aumento dell'OER. Il modello presentato nelle equazioni 2.6, 2.7 può essere applicato solo su trattamenti in cui la radiazione sia somministrata in tempi maggiori a 1 ms, poiché le reazioni che prendono luogo in questo contesto non sono istantanee.

Per modellizzare l'impatto della ROD sulla sopravvivenza cellulare, si definisce innanzitutto la radiosensibilità del tessuto come funzione della pressione parziale di ossigeno, $\alpha(p)$, assunta con dipendenza lineare. A partire da questa definizione, la sopravvivenza cellulare (espressa in scala logaritmica) può essere stimata rispetto alla CONV-RT attraverso la relazione:

$$\log\left(\frac{N_p}{N_0}\right) = (1 - \delta_{ROD}) \log\left(\frac{N_p}{N_0}\right) \Big|_{L_{ROD}=0} \quad (2.8)$$

dove N_p è il numero di cellule sopravvissute alla dose prescritta, N_0 il numero di cellule iniziali e il parametro δ_{ROD} è funzione dell'OER e descritto dall'equazione:

$$\delta_{ROD} = \frac{OER(p_0)D_p - \int_0^{D_p} OER(p_0 - L_{ROD}D)dD}{OER(p_0)D_p} \quad (2.9)$$

In questo contesto, l'OER è a sua volta definito come $OER(p) = \frac{\alpha(p)}{\alpha(0)}$, ed è necessario per quantificare l'effetto della deplezione di ossigeno sulla sopravvivenza cellulare.

I risultati ottenuti variando le dosi prescritte D_p sono mostrati in Figura 1.1: a $D_p = 1$ Gy l'effetto della ROD è marginale e circoscritto solo a tessuti ipossici, aumentando la dose prescritta a 10 Gy si osserva una diminuzione della radiosensibilità del 30%, anche se limitata a cellule con $pO_2=3-5$ mmHg. A dosi somministrate in un'unica frazione maggiori di 30 Gy, non utilizzate clinicamente, la finestra in cui si manifesta l'effetto radioprotettivo si amplia ulteriormente.

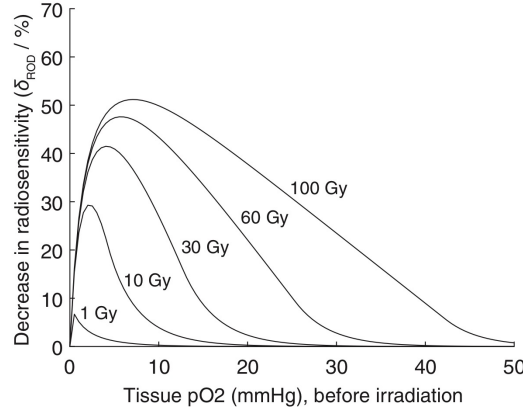


Figura 2.3: Diminuzione della radiosensibilità a causa della ROD per radiazioni UHDR. Le linee nere rappresentano l'isoeffetto per 5 diverse dosi [13].

Nello studio di Prax e Kapp del 2019 [13], viene studiato anche l'impatto della ROD sulla sopravvivenza clonogenica a diversi gradi di ossigenazione dopo la somministrazione di diverse dosi (1 Gy, 10 Gy e dosi superiori a 30 Gy): non viene osservata alcuna differenza tra CONV-RT e FLASH-RT per cellule normossiche (40 mmHg), l'effetto protettivo si manifesta per cellule ipossiche, ovvero con $pO_2=4$ mmHg, come mostrato in Figura 2.4:

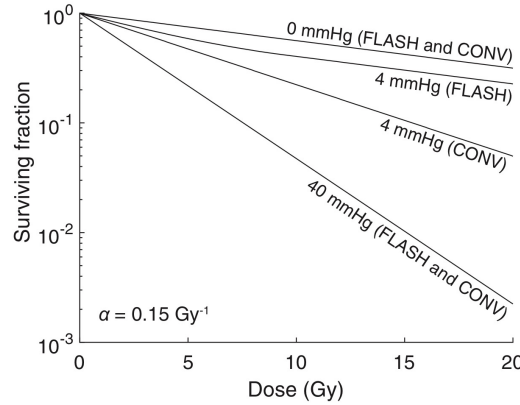


Figura 2.4: Confronto tra FLASH-RT e CONV-RT della frazione di sopravvivenza cellulare in funzione della dose somministrata e della pressione parziale di ossigeno iniziale [13]

ROD a VHDR

Considerando un'irradiazione con rate maggiore di 10 Gy/s il modello deve essere modificato per includere anche la diffusione dell'ossigeno dai capillari ai tessuti. Questo perché, a queste scale temporali, i processi di diffusione e metabolismo dell'ossigeno non sono più trascurabili rispetto al consumo radiolitico e diventano determinanti nel modulare la concentrazione di ossigeno durante l'irraggiamento.

La diffusione e il metabolismo dell'ossigeno sono descritti dalla seguente equazione [13]:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D_{O_2} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial p}{\partial r} \right) - m - \frac{L_{ROD} D_p}{T}, \quad p \geq 0 \quad (2.10)$$

dove r è la distanza dal capillare, $D_{O_2} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ è la costante di diffusione di ossigeno, $m = 3 \text{ mmHg/s}$ è il rate di consumo di ossigeno causato dal metabolismo cellulare e T è la durata dell'impulso della radiazione.

Una volta nota $p(r, t)$, vengono ricalcolati δ_{ROD} e la frazione di sopravvivenza cellulare, che però dipenderanno ora anche dal tempo T secondo le seguenti equazioni:

$$\log \left(\frac{N_p}{N_0} \right) = \frac{-D_p}{T} \int_0^T \alpha(p(r, t)) dt \quad (2.11)$$

$$\delta_{ROD} = \frac{OER(p(t=0, r) - \frac{1}{T} \int_0^T OER(p(r, t)) dt}{OER(p(t=0, r))} \quad (2.12)$$

Viene calcolata la pO_2 in funzione del tempo a diverse dose rate focalizzandosi su un piccolo volume ipossico (2.1 mmHg) a $75 \mu\text{m}$ da un capillare per valutare l'effetto della ROD. Dai risultati ottenuti è emerso che dose rate elevati (10^4 Gy/s) determinano un esaurimento completo dell'ossigeno locale, che viene ripristinato solo in 2-3 s successivi all'irradiazione. Dose rate minori (10 Gy/s) permettono il parziale ripristino dell'ossigeno, impedendo la deplezione totale. Dose rate ancora più bassi diventano comparabili con quelli della CONV-RT e pertanto non si osservano differenze significative dai risultati ottenuti con questa tecnica (Figura 2.5).

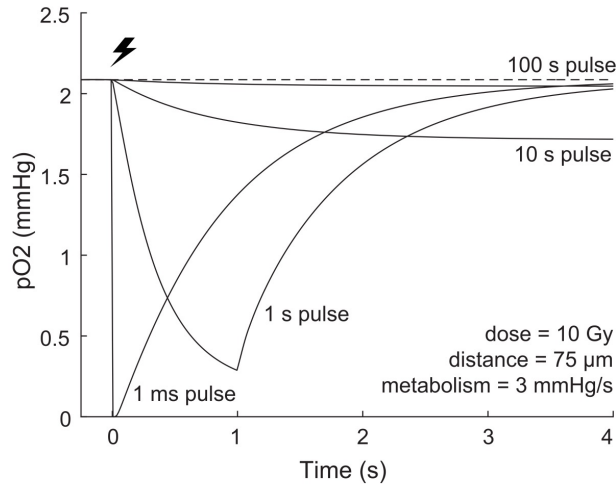


Figura 2.5: Variazione della pressione parziale di ossigeno a seguito dell'esposizione del tessuto a una dose di 10 Gy somministrata a differenti dose rate [13].

L'effetto della ROD sulla radiosensibilità dipende sia dalla distanza dai capillari sia dalla durata dell'impulso. Per impulsi molto brevi (1 ms), i tessuti situati a 60-100 μm dal capillare mostrano la riduzione più marcata, con una diminuzione della

radiosensibilità fino al 25% rispetto all'irradiazione convenzionale. Per impulsi più lunghi (1 s) l'effetto è ancora presente ma attenuato, a causa della parziale riossigenazione durante la somministrazione della dose, mentre diventa trascurabile (<5%) per tempi superiori a 10 s.

La pressione parziale iniziale di ossigeno non modifica l'entità massima della protezione, ma ne sposta la distanza: a concentrazioni più elevate, l'effetto protettivo si manifesta a distanze maggiori dal capillare.

In conclusione, le simulazioni condotte hanno mostrato un buon accordo con dati sperimentali in vitro [1] [15] [16]. Tuttavia, gli autori sottolineano come la ROD non possa da sola spiegare l'effetto di protezione osservato dei tessuti sani [17] [18] [19], poiché la maggior parte di questi si trova in condizioni normossiche. Loro suggeriscono che il meccanismo possa coinvolgere cellule staminali localizzate in nicchie ipossiche, radioprotette durante l'irradiazione FLASH.

La ROD potrebbe inoltre avere un impatto sfavorevole, aumentando la radioresistenza dei tumori cronicamente ipossici e riducendo l'efficacia della FLASH-RT sul controllo tumorale.

In sintesi, lo studio di Pratz e Kapp [13] rappresenta un contributo fondamentale per l'introduzione e la formalizzazione dell'ipotesi ROD, mostrando come la ROD possa effettivamente indurre un effetto radioprotettivo, soprattutto in condizioni ipossiche e in prossimità dei capillari. Tuttavia, i risultati evidenziano anche i limiti intrinseci di questa ipotesi: la protezione è significativa solo in tessuti con basse pO_2 , mentre risulta marginale o assente in condizioni normossiche, che caratterizzano la maggior parte dei tessuti sani. Di conseguenza, pur costituendo un modello teorico di riferimento e un importante punto di partenza, la ROD da sola non è sufficiente a spiegare l'effetto FLASH osservato sperimentalmente, e deve essere integrata con altri meccanismi fisico-chimici per fornire una descrizione completa del fenomeno.

2.3 Chemical Track-Structure Monte Carlo: la Critica di Boscolo et al. all'Ipotesi ROD

Lo studio computazionale condotto da Boscolo et al. [20] si propone di investigare l'ipotesi ROD attraverso una simulazione Monte Carlo di chemical track-structure, ovvero analizzando nel dettaglio i processi molecolari e radicalici indotti dalla radiolisi dell'acqua.

Gli autori considerano un fascio di elettroni con energia di 1 MeV caratterizzato da impulsi della durata di qualche ms, così da poter escludere il ripristino di ossigeno tissutale (come spiegato anche da Pratz e Kapp [13], Sezione 2.2 ROD a UHDR) [20].

La deplezione di ossigeno e la formazione di radicali superossido vengono calcolate in funzione della dose, integrando i rendimenti radiolitici in dipendenza della

pO₂ [20]:

$$[O_2](D) = [O_2]_{\text{ini}} - \int G_{O_2}([O_2](D)) dD \quad (2.13)$$

$$[O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet}](D) = \int G_{O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet}}([O_2](D)) dD \quad (2.14)$$

dove G_{O_2} rappresenta il rendimento radiolitico di consumo dell'ossigeno e $G_{O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet}}$ quello di produzione delle specie radicaliche.

L'OER viene parametrizzato attraverso il modello di Grimes et al. [14] (Equazione 2.6).

La dinamica dell'ossigeno viene inserita nel modello lineare quadratico (Sezione 1.1.3, Equazione 1.4), così da stimare iterativamente la sopravvivenza cellulare. Nel presente modello, α è mantenuto costante, mentre β viene reso dipendente dalla tensione parziale di ossigeno e dal regime di dose rate [20]:

$$\beta_{\text{CONV}} = \beta_0 \left[1 - \left(\frac{pO_{2,\text{ini}}}{20} \right)^{0.4464} \right] + \beta_{20} \left(\frac{pO_{2,\text{ini}}}{20} \right)^{0.4464} \quad (2.15)$$

$$\beta_{\text{FLASH}} = \beta_0 \left[1 - \left(\frac{pO_{2,\text{ini}}}{20} \right)^{0.7162} \right] + \beta_{20} \left(\frac{pO_{2,\text{ini}}}{20} \right)^{0.7162} \quad (2.16)$$

dove $\beta_0 = 0.0025$ e $\beta_{20} = 0.0194$ rappresentano i coefficienti in condizioni anossiche e normossiche, rispettivamente.

Per includere la deplezione dinamica di ossigeno indotta dall'irradiazione, β viene successivamente espresso in funzione della concentrazione istantanea pO₂(D) calcolata secondo l'equazione 2.13 [20]:

$$\beta_{\text{DYN}} = \beta_0 \left[1 - \left(\frac{pO_2(D)}{20} \right)^{0.4464} \right] + \beta_{20} \left(\frac{pO_2(D)}{20} \right)^{0.4464} \quad (2.17)$$

La sopravvivenza cellulare al variare della pO₂ è quindi determinata in modo iterativo, integrando la variazione della funzione di sopravvivenza rispetto alla dose:

$$S = - \int \left(\alpha + 2\beta D + D^2 \frac{d\beta}{dD} \right) e^{-\alpha D - \beta D^2} dD \quad (8)$$

I risultati ottenuti mostrano (Figura 2.6) che nei target normossici la resa di consumo di ossigeno non dipende dalla pO₂ iniziale, mentre sotto il 5% (65 μ M) diventa fortemente condizionata dalle condizioni iniziali, in accordo con la letteratura. In tutti i casi il consumo resta proporzionale alla dose, senza mai portare a un completo esaurimento. L'effetto radioprotettivo dovuto alla ROD emerge solo a dosi non cliniche (>100 Gy) e in condizioni di ipossia estrema.

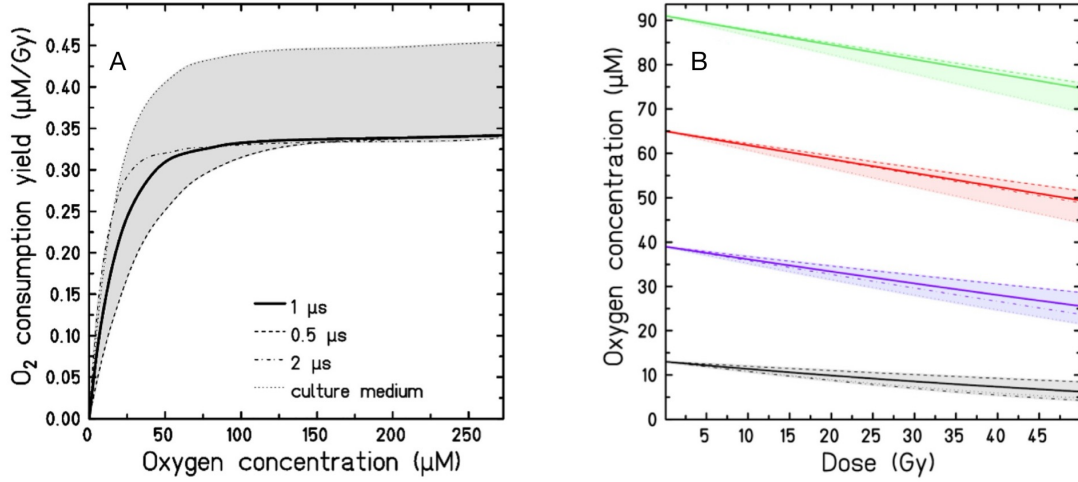


Figura 2.6: (A) Rese radiolitiche calcolate in funzione della concentrazione di ossigeno per diversi istanti temporali (irradiazione con elettroni da 1 MeV). (B) Andamento della concentrazione di ossigeno in funzione della dose assorbita in condizioni di irradiazione FLASH con elettroni da 1 MeV, per differenti ossigenazioni iniziali (1% in nero, 3% in viola, 5% in rosso e 7% in verde) [20].

Similmente, cambiamenti significativi nell'OER vengono osservati a dosi non cliniche, >100 Gy per frazione (Figura 2.7). I risultati ottenuti mostrano che l'effetto di risparmio dovuto alla ROD diventa apprezzabile soltanto in condizioni di ipossia, ovvero per concentrazioni di ossigeno iniziali minori del 5%, incompatibili con le condizioni dei tessuti sani.

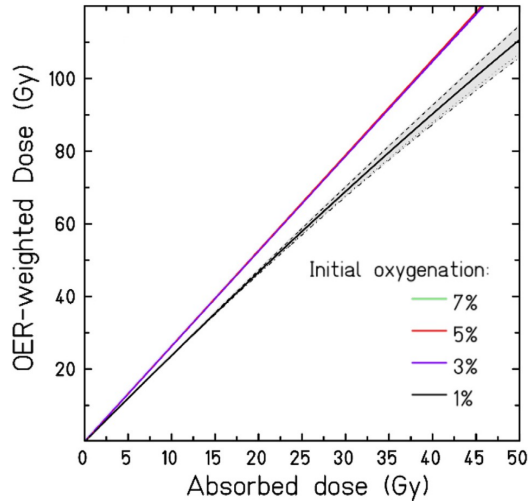


Figura 2.7: Dose pesata sull'OER in funzione della dose assorbita sotto condizioni di irradiazione FLASH con elettroni da 1 MeV, per differenti livelli iniziali di ossigenazione (1–7%) [20].

Gli autori concludono che la Radiolytic Oxygen Depletion (ROD) non può da sola spiegare lo sparing osservato nei tessuti sani durante l'irradiazione FLASH. Pur rappresentando un meccanismo reale e quantificabile, la deplezione di ossigeno risulta troppo limitata alle dosi cliniche e alle condizioni fisiologiche dei tessuti normossici per giustificare le differenze sperimentali osservate. L'applicazione del modello di dose pesata sull'OER mostra che variazioni significative emergono solo a dosi molto elevate (>100 Gy) e in condizioni di ipossia estrema, quindi clinicamente non realistiche.

In accordo con quanto già osservato da Pratz e Kapp [13], Boscolo et al. [20] evidenziano che la ROD presenta importanti limiti concettuali e sperimentali: la deplezione completa di ossigeno non risulta mai raggiunta e l'effetto predetto sarebbe più marcato nei tumori ipossici che nei tessuti normossici, in contrasto con le osservazioni biologiche. Gli autori concludono quindi che la ROD, pur costituendo un contributo rilevante, non è sufficiente a spiegare l'effetto FLASH, che deve coinvolgere anche processi radicalici e biochimici più complessi.

2.4 ROD e Radiosensibilità Cellulare: il Modello di Zhu et al.

Nel 2021 Zhu et al. [21] hanno proseguito gli studi teorico-computazionali inerenti l'ipotesi ROD, sviluppando un modello quantitativo della risposta cellulare all'irradiazione FLASH.

Le simulazioni Monte Carlo sono state condotte con il codice NASIC, opportunamente adattato per considerare la sovrapposizione delle tracce a dose rate ultra elevati e le reazioni radicaliche con l'ossigeno. Particolare attenzione è stata dedicata alla vita media dei radicali liberi prodotti dalla radiolisi dell'acqua in funzione della quantità di ossigeno consumata. Seguendo l'approccio già proposto da Pratz e Kapp [13], gli autori hanno adottato il modello di Grimes et al. [14] per descrivere la distribuzione di ossigeno nei tessuti. Similmente a quanto esposto in Sezione 2.2 (ROD a VHDR), l'ossigeno può essere ripristinato a causa della diffusione dai vasi sanguigni e dal metabolismo (Equazione 2.10).

Rispetto agli studi precedenti, Zhu et al. hanno introdotto un nuovo parametro, il Radiosensitivity Ratio (RSR), definito come il rapporto tra la dose necessaria in FLASH-RT e in CONV-RT per ottenere lo stesso effetto biologico:

$$RSR = \frac{D_{FLASH}}{D_{CONV}} \Big|_{iso} \quad (2.18)$$

Questo parametro quantifica l'aumento della tolleranza alla dose dovuto alla deplezione di ossigeno indotta da FLASH.

Gli autori hanno analizzato in maniera sistematica l'impatto della tensione iniziale di ossigeno, del numero e dell'intervallo tra impulsi, nonché della qualità della

radiazione sui rendimenti di danno al DNA e sulla survival fraction (SF) di cellule di ovaio di criceto cinese (CHO). In particolare, i modelli Monte Carlo utilizzati, tra cui il codice DICOLDD, richiedono l'inserimento di parametri caratteristici della linea cellulare, poiché la SF è calcolata a partire dalla resa di rotture di doppia elica del DNA e dal livello di ossigenazione. La linea cellulare CHO è stata scelta poiché ampiamente utilizzata come riferimento in radiobiologia, e quindi per essa sono disponibili dati sperimentali affidabili e completi [22]. Le simulazioni hanno considerato un fascio di elettroni da 4.5 MeV (tipicamente utilizzato negli esperimenti FLASH) con dose totale di 10 Gy, erogata in 1, 2, 5 o 10 impulsi nell'arco di 1 s, e con intervalli variabili tra 10 e 1000 ms. Inoltre, sono state confrontate diverse qualità di radiazione: elettroni da 4.5 MeV, protoni da 100 MeV, 4.5 MeV e 1 MeV.

La distribuzione di ossigeno nei tessuti evidenzia che le regioni prossimali ai capillari, caratterizzate da valori più elevati di pO_2 , subiscono una diminuzione più rapida in seguito all'irraggiamento in regime FLASH, seguita da un recupero altrettanto veloce, in ogni caso l'ossigeno viene completamente ripristinato entro 1 s (Figura 2.8).

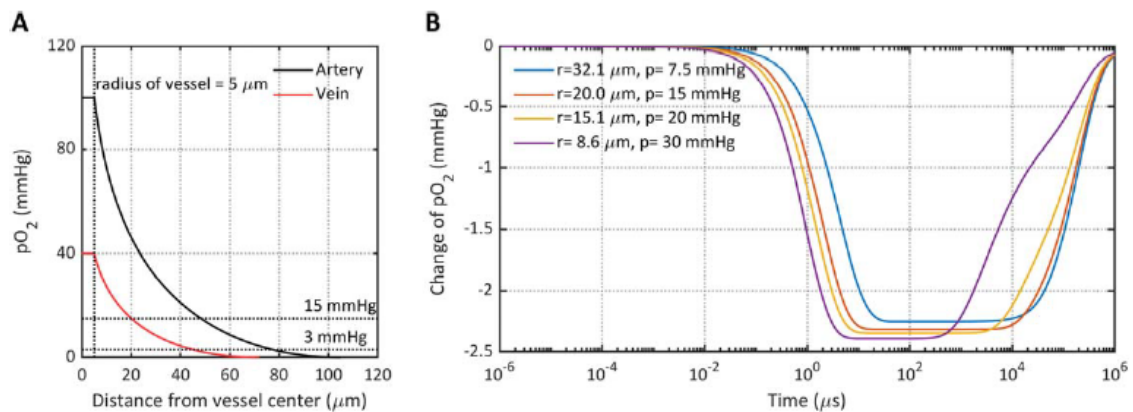


Figura 2.8: (A) Distribuzione della pO_2 nei tessuti circostanti un'arteria e una vena. (B) Andamento temporale della pO_2 nei tessuti adiacenti alla vena in seguito all'esposizione a un singolo impulso FLASH di elettroni da 4.5 MeV, con dose totale di 10 Gy. Le diverse curve rappresentano regioni di tessuto situate a differenti distanze dal centro del vaso [21].

Riconsiderando il fascio di elettroni da 4.5 MeV, si osserva una differenza significativa tra il danno indiretto indotto da CONV-RT e da FLASH-RT nelle cellule con bassa pO_2 iniziale. In condizioni ipossiche, infatti, il danno da rottura di doppia elica indiretto diminuisce sia per la ridotta disponibilità di ossigeno, che conferisce radioresistenza, sia perché l'irraggiamento FLASH continua a consumare l'ossigeno residuo. Questo si traduce in una maggiore frazione di sopravvivenza cellulare rispetto all'irraggiamento con CONV-RT come si può osservare in Figura 2.9:

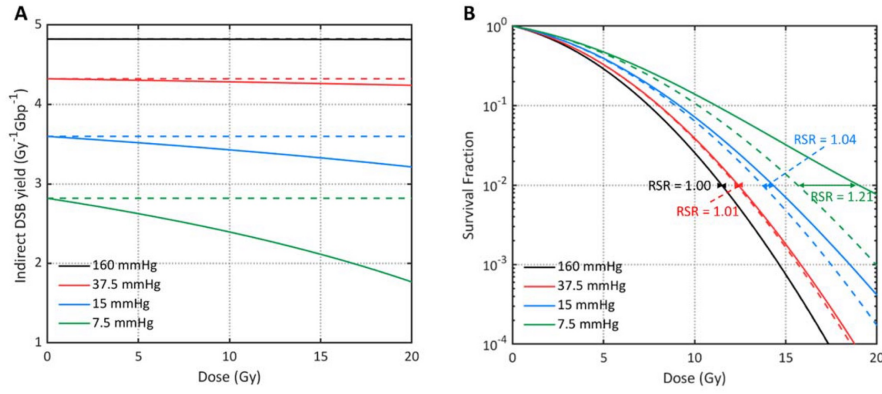


Figura 2.9: Rendimento di Double Strand Break indiretti (A) e frazione di sopravvivenza (B) di cellule di ovaio di criceto cinese a diverse pO₂ iniziali, irradiate con elettroni da 4.5 MeV in modalità CONV (linea tratteggiata) o FLASH (linea continua). L'effetto radioprotettivo di FLASH emerge solo in condizioni ipossiche [21].

I risultati sono coerenti con quanto riportato da Pratz e Kapp [13] e da Boscolo et al. [20].

La struttura del fascio risulta determinante: sia il numero di impulsi che l'intervallo temporale tra essi influenzano l'ossigenazione tissutale e, di conseguenza, la SF. Un singolo impulso da 10 Gy riduce la pO₂ media del 21% in più rispetto a cinque impulsi alla stessa dose, con un incremento della SF del 16% (Figura 2.10 A). Allo stesso modo, intervalli più lunghi tra impulsi consentono un ripristino parziale o completo dell'ossigeno: intervalli di 1000 ms permettono il completo ripristino dell'ossigeno e l'effetto radioprotettivo scompare, con un conseguente calo della SF (Figura 2.10 B).

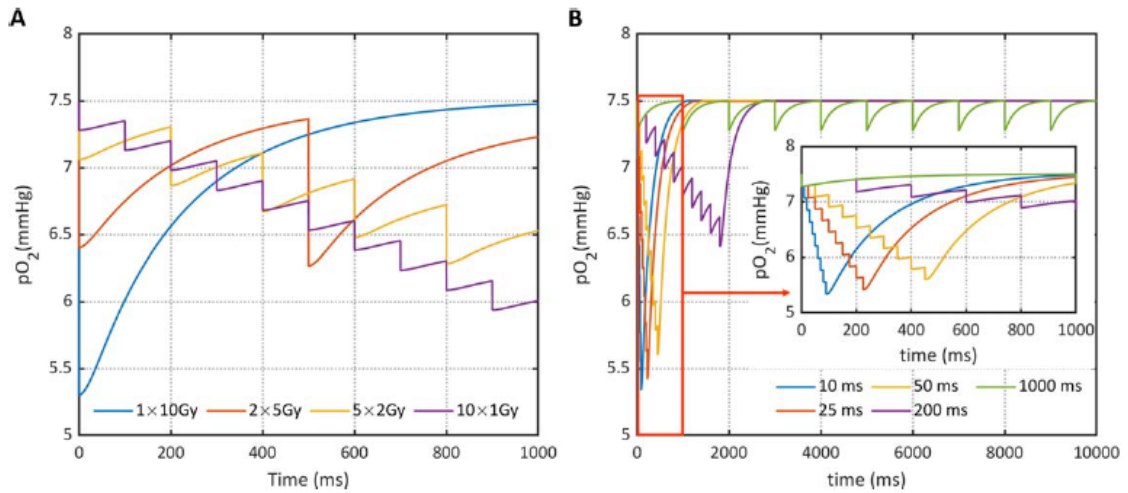


Figura 2.10: Variazione della pO₂ in cellule con pO₂ iniziale di 7,5 mmHg esposte a irradiazione FLASH con elettroni da 4,5 MeV. (A) Dose totale di 10 Gy somministrata in 1, 2, 5 o 10 impulsi nell'arco di 1 s. (B) Dose totale di 10 Gy suddivisa in 10 impulsi separati da intervalli di diversa durata [21].

Anche la qualità della radiazione incide in maniera significativa come si può osservare in Figura 2.11. Il parametro L_{ROD} cresce con la pO_2 , poiché una maggiore disponibilità di ossigeno aumenta la probabilità che i radicali prodotti dalle reazioni radiolitiche interagiscano con le molecole di O_2 , favorendo il consumo radiolitico di ossigeno. Al contrario, L_{ROD} diminuisce all'aumentare del LET, evidenziando che radiazioni a basso LET inducono un effetto protettivo più marcato. Un alto LET, invece, concentra l'energia in volumi molto piccoli, producendo radicali a densità elevata che tendono a reagire tra loro, riducendo le interazioni con l'ossigeno molecolare.

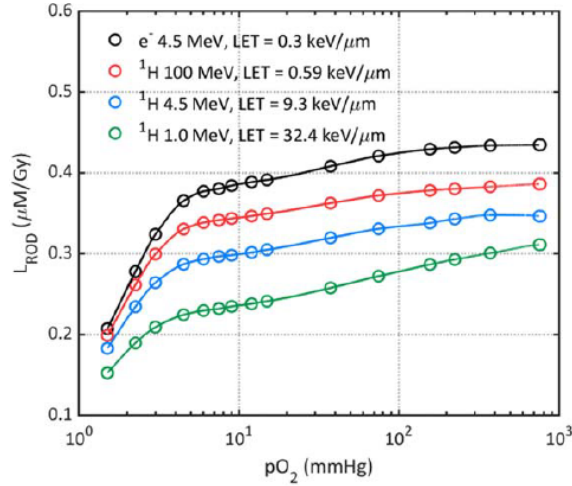


Figura 2.11: Andamento del parametro L_{ROD} alla variazione di pO_2 e LET [21].

Questi risultati confermano quanto riportato da studi precedenti, tra cui Pratz e Kapp [13], secondo i quali l'effetto FLASH si manifesta unicamente in condizioni ipossiche. Coerentemente, Zhu et al. [21] hanno focalizzato l'analisi su tessuti con $pO_2 < 30-40$ mmHg, nei quali la variazione indotta dalla deplezione radiolitica si traduce in una risposta cellulare significativamente modificata.

In conclusione, gli autori affermano che l'effetto radioprotettivo da ROD è osservabile solo in cellule ipossiche. Strategie di somministrazione a singolo impulso o, se non disponibili, a multipli impulsi con intervalli inferiori a 10–50 ms, risultano necessarie per preservare l'ipossia indotta. Infine, le radiazioni a basso LET sono da preferire per massimizzare lo sparing FLASH.

L'introduzione del parametro RSR costituisce un'alternativa innovativa per quantificare l'effetto, ma non risolve la limitazione principale: la ROD, pur essendo un meccanismo plausibile e necessario per spiegare lo sparing in contesti ipossici, non appare sufficiente da sola a giustificare l'entità dell'effetto FLASH osservato in vivo in tessuti normossici.

2.5 Il Contrasto con il Modello di Pratz e Kapp

Hu et al. [23] nel 2021 hanno pubblicato uno studio in aperto contrasto con il modello ROD proposto da Pratz e Kapp [13]. Gli autori sostengono che il modello precedente fosse affetto da due fondamentali limitazioni: innanzitutto le condizioni al contorno definite per risolvere le equazioni proposte non permettevano la definizione di una soluzione unica, inoltre non veniva presa in considerazione la densità di capillari nei tessuti (Sezione 2.2) [23].

Per superare tali criticità, Hu et al. propongono un modello teorico-computazionale capace di descrivere l'andamento temporale della distribuzione di ossigeno, parametrizzandolo su misure sperimentali relative al tessuto cerebrale.

La cinetica del consumo di ossigeno è stata modellizzata attraverso un'equazione di tipo reaction-diffusion dipendente dall'Oxygen Consumption Rate (OCR) in funzione della pressione parziale di ossigeno nel tessuto:

$$OCR(p) = OCR_{max}(1 - e^{-\lambda p}) \quad (2.19)$$

dove p è la concentrazione di ossigeno, OCR_{max} è il massimo rate di consumo di ossigeno e λ è una costante. Avendo preso in considerazione il tessuto cerebrale, questi parametri assumono i seguenti valori: $OCR_{max} = 20 \times 10^{-3} \mu\text{mol/L/ms}$, $\lambda = 0.485 \text{ L}/\mu\text{mol}$.

I capillari vengono modellizzati tramite il modello del cilindro di Krogh [24], assumendo l'uniformità di composizione e OCR del tessuto intorno. Di conseguenza, diffusione e consumo di ossigeno sono descritti dall'equazione [23]:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D\nabla^2 p - OCR(p) \quad (2.20)$$

dove p è la concentrazione molare di ossigeno e D è il coefficiente di diffusione dell'ossigeno.

Dopo aver definito le opportune condizioni al contorno, l'equazione 2.20 viene risolta con il metodo delle differenze finite.

Per includere gli effetti dell'irradiazione FLASH, l'equazione 2.20 è stata modificata in:

$$\frac{\partial p}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 p}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial p}{\partial r} \right) - OCR(p) - kpL(t) \quad (2.21)$$

dove $k = 1 \times 10^9 \text{ L/mol}$ è il rate di reazione ossigeno-radicali e $L(t)$ è la concentrazione molare dei radicali riducenti.

L'equazione è stata risolta con le stesse condizioni al contorno della 2.20 mediante il metodo Crank-Nicolson.

I risultati mostrano che la distribuzione di ossigeno è fortemente influenzata dall'OCR e dalle condizioni al contorno (Figura 2.12).

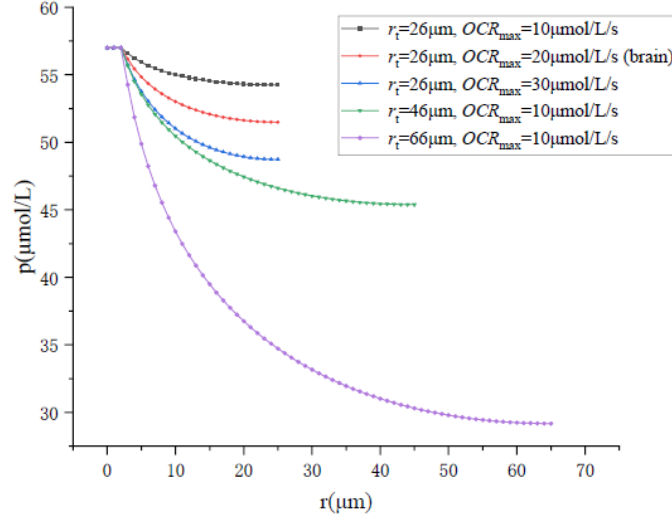


Figura 2.12: Distribuzione di ossigeno per diversi r e OCR_{max} [23].

In particolare, per il tessuto cerebrale la concentrazione di ossigeno alla quale si manifesta l'effetto protettivo è inferiore al livello fisiologico ($< 20 \mu\text{mol/L}$). In simulazioni condotte con una dose di 20 Gy somministrata in impulsi di 50 ms, è stato osservato (Figura 2.13) che, dopo l'impulso di radiazione, la concentrazione di ossigeno si ripristina secondo un andamento esponenziale negativo [23]:

$$p(t) = p_s - \Delta p \cdot e^{-t/\tau} \quad (2.22)$$

dove p_s è la concentrazione di ossigeno all'equilibrio, Δp è la quantità di ossigeno consumata dal singolo impulso di radiazione, t indica il tempo successivo all'irradiazione e τ è la costante di tempo che descrive la velocità con cui l'ossigeno viene ripristinato nel tessuto. Quest'ultima risulta indipendente dall'OCR ma dipende dalla densità capillare, poiché una maggiore vascolarizzazione accelera la diffusione dell'ossigeno e riduce quindi il tempo di recupero.

Inoltre, se la durata dell'impulso di radiazione è molto più breve della costante di tempo τ , la variazione di ossigeno nel tessuto diventa indipendente dal dose rate. Infatti, a parità di dose totale, impulsi più brevi corrispondono a dose rate più elevati, ma quando la durata dell'impulso è trascurabile rispetto ai tempi di diffusione dell'ossigeno, la quantità di ossigeno consumata dipende unicamente dalla dose depositata e non dalla velocità con cui questa viene erogata. In tal caso, impulsi con diversa ampiezza temporale producono la stessa riduzione minima di concentrazione di ossigeno.

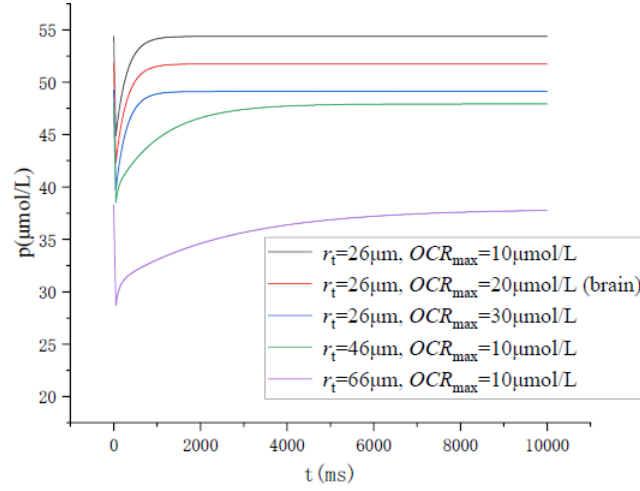


Figura 2.13: Variazione della $p(t)$ al variare dei parametri biologici [23].

Gli autori considerano l'OER un buon parametro per predire gli effetti biologici della radiazione FLASH, pertanto viene calcolato in diverse posizioni del tessuto cerebrale e comparato con il suo parametro allo stato stazionario secondo la seguente equazione [23]:

$$OER = \frac{\int_0^T OER(p(t)) \cdot Rate(t) dt}{\int_0^T OER(p(t)) dt} \quad (2.23)$$

dove T è la durata dell'impulso e

$$OER(p(t)) = \frac{mp + K}{p + K} \quad (2.24)$$

dove $m = 2.9 \mu\text{mol}/L$ e $K = 7.2 \mu\text{mol}/L$. L'OER è calcolato rispetto ad una dose di 20 Gy somministrata in 50 ms.

Le differenze tra CONV-RT e FLASH-RT sono inferiori all'1%, come si può osservare in Figura 2.14.

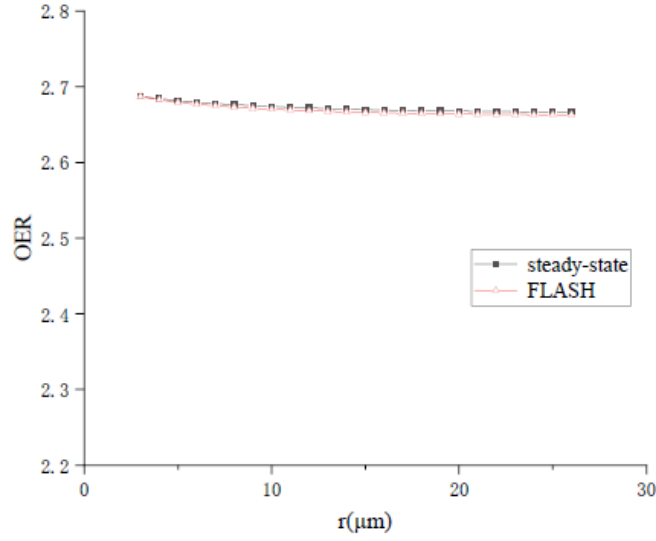


Figura 2.14: Andamento dell'OER in regime FLASH e convenzionale (steady-state) per differenti posizioni nel tessuto cerebrale [23].

Nelle condizioni di irraggiamento considerate, l'andamento dell'OER (Equazione 2.23) riportato in Figura 2.15 mostra l'esistenza di una soglia minima di ossigeno, pari a circa $20 \mu\text{mol/L}$, al di sotto della quale la variazione dell'OER diventa significativa e iniziano a manifestarsi gli effetti radioprotettivi.

Tuttavia, la concentrazione di ossigeno in tutti i punti del tessuto cerebrale considerati è risultata sempre molto maggiore di $25 \mu\text{mol/L}$ (Figura 2.13): l'effetto FLASH è stato osservato in questo tipo di tessuto da Simmons et al. [25] quindi l'analisi quantitativa qui presentata non supporta l'ipotesi ROD.

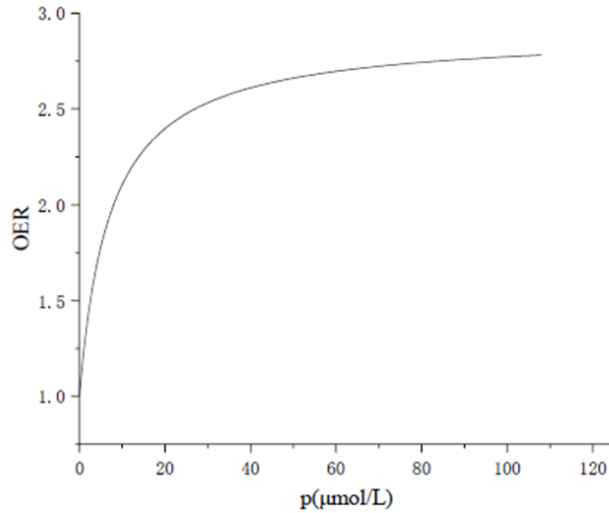


Figura 2.15: Andamento dell'OER in funzione della concentrazione di ossigeno, calcolato con il modello reaction-diffusion [23]. L'OER aumenta bruscamente a basse concentrazioni di ossigeno e, oltre i $20 \mu\text{mol/L}$, la crescita rallenta fino a raggiungere un plateau intorno a 2.5-3.

Hu et al. concludono di essere scettici riguardo all'ipotesi ROD, pur riconoscendo limiti intrinseci del loro modello: l'approssimazione a cilindri di Krogh per i capillari, l'incertezza sulla densità capillare, il consumo di ossigeno e l'assunzione di una distribuzione uniforme di radicali. Poiché la concentrazione di ossigeno nei tessuti è comunque molto maggiore dei 20 $\mu\text{mol/L}$ soglia per l'OER, queste limitazioni avrebbero un impatto marginale sulle conclusioni.

Contribuendo al dibattito scientifico, gli autori propongono una nuova ipotesi di natura biologica, denominata "DNA damage sensor saturation hypothesis": l'effetto FLASH sarebbe indotto dalla saturazione dei sensori di danno al DNA.

Queste proteine (PARP, poly(ADP-ribose) polymerase, ATM e ATR chinasi e la proteina $\gamma\text{-H2AX}$) hanno il compito di rilevare la presenza di rotture nei filamenti di DNA e di avviare le vie di segnalazione intracellulari responsabili della riparazione o dell'apoptosi.

Secondo questa ipotesi, la rapida e massiva induzione di lesioni da parte delle radiazioni FLASH attiverebbe simultaneamente un numero elevato di siti di danno, portando alla saturazione dei sensori: solo una parte dei danni verrebbe quindi effettivamente riconosciuta, causando una trasduzione del segnale incompleta e una risposta cellulare attenuata rispetto a quella indotta dalla CONV-RT a parità di dose.

Di conseguenza, i tessuti irradiati in regime FLASH risponderebbero come se avessero ricevuto una dose inferiore, manifestando una tossicità ridotta — coerentemente con le osservazioni sperimentali sull'inibizione della cascata TGF- β /SMAD in vivo [26].

Questo lavoro segna quindi un punto di svolta critico nel dibattito, suggerendo che la sola chimica dell'ossigeno non può giustificare l'effetto FLASH e aprendo la strada all'esplorazione di altri meccanismi complementari.

2.6 Riepilogo e Confronto tra i Modelli

Per completezza, la Tabella 2.1 riassume i lavori teorici e computazionali discussi, evidenziandone obiettivi, risultati e limiti, oltre alle loro interconnessioni.

Nel complesso, i modelli analizzati convergono sull'idea che la sola deplezione radiolitica dell'ossigeno non sia sufficiente a spiegare l'effetto FLASH, suggerendo la presenza di meccanismi chimici e biologici concorrenti.

Studio	Approccio	Risultati principali	Limiti / Relazioni
Abolfath et al. (2020)	Modello analitico e simulazioni di dinamica molecolare.	A dose rate ultra-alti le ROS si ricombinano rapidamente in NROS, riducendo la tossicità. Esiste un intervallo ottimale di pO_2 che massimizza l'effetto protettivo.	Scala microscopica; non direttamente correlabile a grandezze macroscopiche. Integra l'ipotesi radicalica.
Pratx & Kapp (2019)	Modello analitico supportato da simulazioni computazionali (ROD e diffusione di O_2).	A UHDR, la ROD può ridurre la pO_2 intracellulare fino a livelli ipossici (3-5 mm-Hg), determinando una diminuzione della radiosensibilità fino al 30%. A dose rate elevati (10^4 Gy/s) e impulsi brevi (<1 ms), l'esaurimento locale di O_2 è completo, mentre a dose rate più bassi (10 Gy/s) o tempi lunghi (>10 s) l'effetto diventa trascurabile.	Effetto significativo solo in ipossia; la ROD da sola non spiega lo sparing osservato nei tessuti sani. Base teorica per gli studi successivi (Boscolo 2020, Zhu 2021) e ha contribuito a consolidare l'analisi della dinamica dell' O_2 in regime FLASH.
Boscolo et al. (2021)	Monte Carlo (Chemical Track-Structure).	L'ossigeno consumato cresce linearmente con la dose; la ROD è rilevante solo a dosi >100 Gy e in condizioni ipossiche.	Condizioni cliniche non realistiche. Convalida i limiti del modello di Pratx e Kapp.
Zhu et al. (2021)	Monte Carlo NASIC/DICOLDD.	L'effetto radioprotettivo da ROD è osservabile solo in cellule ipossiche. Strategie di somministrazione a singolo impulso o, se non disponibili, a multipli impulsi con intervalli inferiori a 10-50 ms, risultano necessarie per preservare l'ipossia indotte. Le radiazioni a basso LET massimizzano lo sparing FLASH.	Nessuna protezione in normossia; amplia i risultati di Pratx e Boscolo.
Hu et al. (2021)	Modello teorico-computazionale basato sulla distribuzione temporale di O_2 nel tessuto cerebrale.	Nessuna variazione significativa di OER tra CONV e FLASH; effetto ROD trascurabile sopra 20 μ mol/L.	Approssimazioni geometriche (modello di Krogh). Contrasto con Pratx e Kapp.

Tabella 2.1: Sintesi dei principali modelli teorici e computazionali sul ruolo dell'ossigeno nell'effetto FLASH.

Capitolo 3

Le Evidenze Sperimentali

Gli studi teorici volti ad indagare la validità delle ipotesi presentate nel paragrafo precedente sono stati seguiti e supportati da una serie di esperimenti in vitro e in vivo, in particolare negli ultimi anni, data la necessità di fornire delle misurazioni sperimentali su cui sviluppare i modelli delle simulazioni computazionali.

Di seguito vengono presentati quattro articoli presenti in letteratura che mostrano come sia stata esplorata l'ipotesi ROD in esperimenti in vivo e in vitro, ponendo particolare attenzione anche alla qualità del fascio FLASH in uso e al LET delle particelle coinvolte.

3.1 Prime Evidenze Sperimentali della ROD con Elettroni FLASH

Cao et al. [7] nel 2021 hanno indagato l'ipotesi ROD quantificando la variazione di ossigeno nei tessuti in vitro e in vivo durante e dopo l'irradiazione FLASH.

Nel loro studio, hanno misurato per la prima volta la concentrazione di ossigeno conseguente all'irradiazione di elettroni a 10 MeV in modalità FLASH e convenzionale, quantificandola attraverso il metodo di estinzione della fosforescenza e con una sonda molecolare idrosolubile. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti in modalità CONV-RT.

Esperimenti In Vitro

Gli esperimenti in vitro sono stati condotti su un campione di albumina sierica bovina (BSA) al 5%, utilizzata come captatore di ROS.

Il campione, preparato con due diverse concentrazioni di ossigeno iniziali (circa 8 mmHg e circa 21 mmHg), è stato esposto a una dose totale di ~ 20 Gy prima in modalità convenzionale (dose rate pari a 0.1 Gy/s in un tempo di erogazione di 200 s) e poi in modalità FLASH (dose rate 300 Gy/s in un tempo di erogazione di 74 ms).

La Figura 3.1 mostra l'andamento della tensione parziale di ossigeno durante l'irradiazione in modalità convenzionale e in modalità FLASH, per le due diverse concentrazioni iniziali. Nei grafici relativi alla CONV-RT, la pO_2 diminuisce progressiva-

mente e in modo lineare nel tempo durante l'erogazione della dose, con una velocità di consumo pari a 0.18 mmHg/s per il campione meno ossigenato e 0.20 mmHg/s per quello più ossigenato. Il consumo radiolitico di ossigeno, espresso in termini di G-value, risulta rispettivamente pari a 0.19 mmHg/Gy e 0.21 mmHg/Gy, senza una dipendenza significativa dal valore iniziale di pO₂. Nei campioni irradiati in modalità FLASH, invece, la misura di pO₂ è disponibile soltanto prima e dopo l'impulso, mostrando una riduzione complessiva più limitata, con G-values di 0.16 mmHg/Gy e 0.17 mmHg/Gy rispettivamente per i due livelli iniziali di ossigenazione.

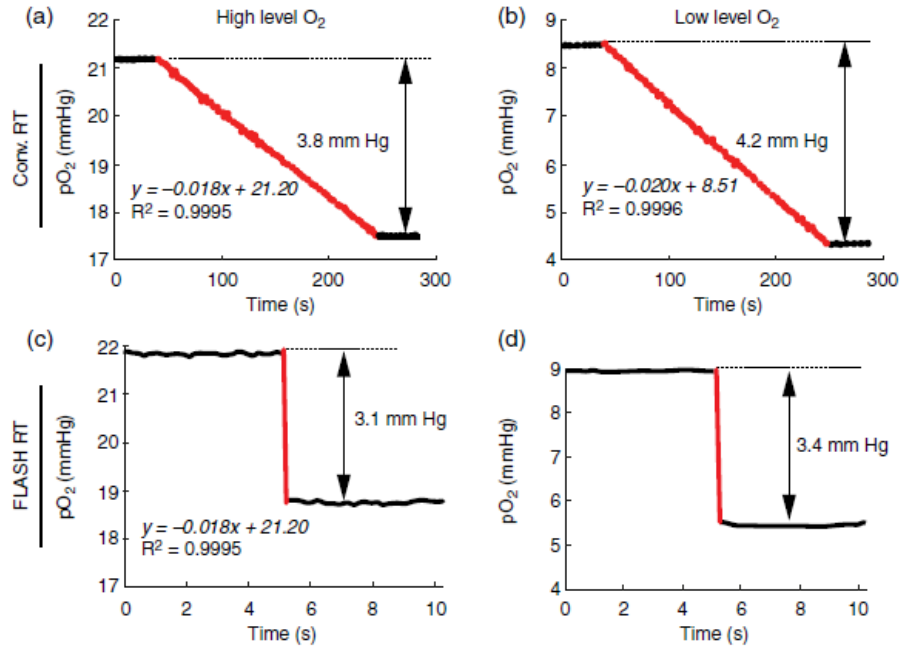


Figura 3.1: Deplezione di ossigeno in soluzioni con BSA (5%) dopo irradiazione convenzionale (a, b) e FLASH (c, d) per differenti pO₂ iniziali. Le linee rosse rappresentano il momento della somministrazione della dose [7].

Inoltre, come si può osservare in Figura 3.2, la deplezione totale ottenuta con la dose somministrata è indipendente dal dose rate nel range 50-300 Gy/s, crescendo linearmente con la dose.

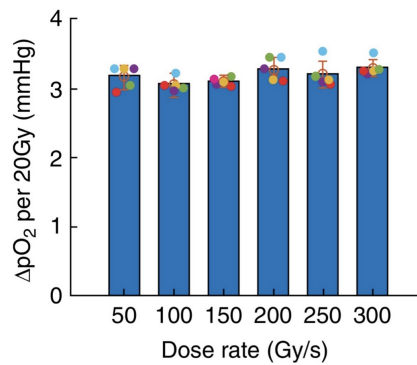


Figura 3.2: Variazione della pO₂ in seguito all'irraggiamento con diversi dose rate per una dose totale di 20 Gy [7].

I risultati ottenuti hanno permesso di concludere che il livello iniziale di ossigeno non influenza in modo significativo la variazione di pO_2 né in regime convenzionale né in regime FLASH. Nella CONV-RT si osserva una decrescita lineare della tensione di ossigeno durante l'irradiazione, mentre in modalità FLASH non è possibile descrivere un andamento temporale dettagliato (poichè la misura è disponibile solo prima e dopo l'impulso). La principale differenza tra le due modalità riguarda i G-values: in regime FLASH questi sono inferiori del $18\% \pm 2\%$ rispetto alla CONV-RT.

Esperimenti In Vivo

Nove modelli murini sono stati sottoposti a induzione tumorale (MDA-MB-231) e successivamente è stata somministrata loro una dose totale di 20 Gy in entrambe le modalità.

Anche in questo caso è stato misurato il livello di pO_2 in funzione del tempo (Figura 3.3). I risultati hanno mostrato che la concentrazione di ossigeno decresce esclusivamente in modalità FLASH e la riduzione misurata risulta comparabile a quella osservata negli esperimenti in vitro. Inoltre, in modalità FLASH l'ossigeno consumato nei tessuti sani è risultato essere il doppio rispetto ai tumori, probabilmente a causa di zone necrotizzate dove i livelli di ossigeno sono tipicamente già prossimi a zero.

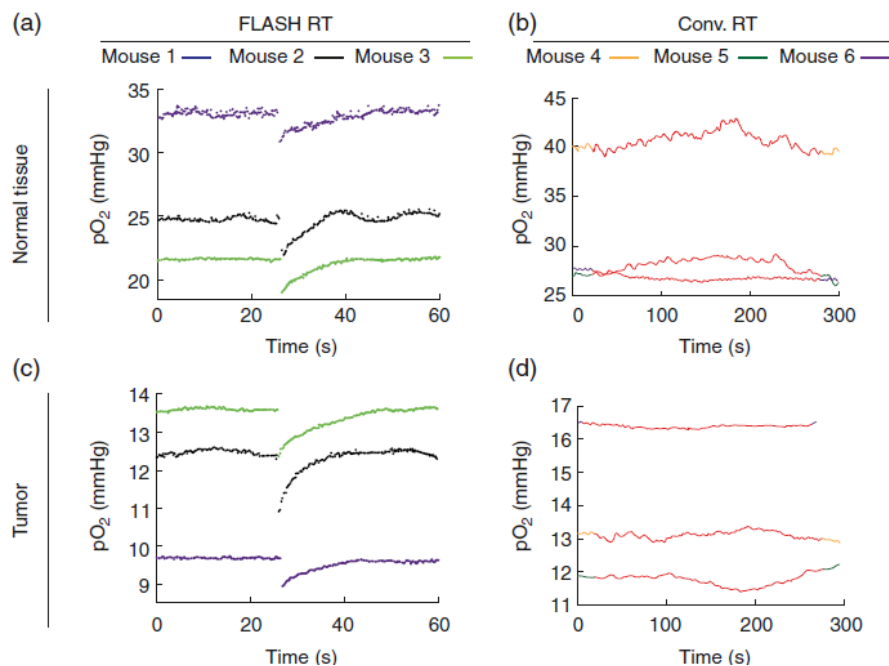


Figura 3.3: Andamento transitorio dell'ossigeno tissutale misurato in vivo in seguito a irradiazione FLASH (a, c) e convenzionale (b, d) in tessuti normali (a, b) e tumorali (c, d) [7].

Sei modelli murini sono stati successivamente sottoposti a diverse dosi totali (10 Gy, 20 Gy, 30 Gy a 270 Gy/s), altri sei sono stati sottoposti a diverse dosi rate (dosi totali di 20 Gy somministrata in 90 Gy/s, 180 Gy/s e 270 Gy/s) per studiare

la dipendenza della deplezione di ossigeno dalla dose totale e dal dose rate: la pO_2 aumenta linearmente con la dose sia per i tessuti sani che per i tumori, la correlazione con il dose rate è stata nascosta dal rumore nelle misure e non si possono trarre conclusioni (Figura 3.4).

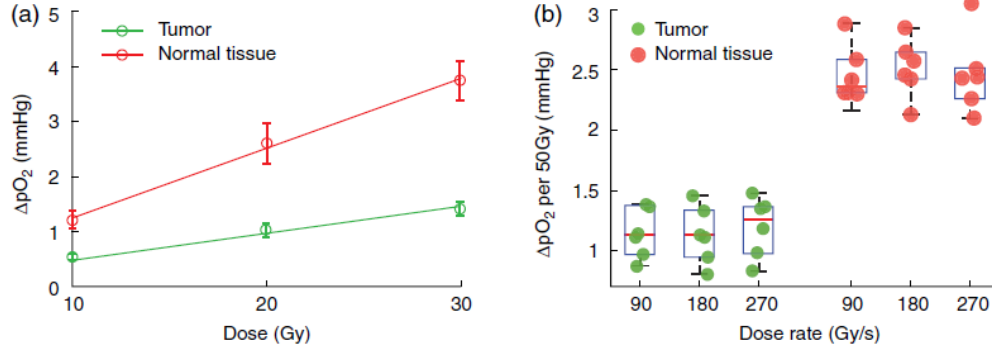


Figura 3.4: Variazione della concentrazione di ossigeno nei tessuti sani e nei tumori durante l'irradiazione FLASH, a diversi livelli di dose totale (a) e di dose rate (b) [7].

Le misure effettuate mostrano che l'irradiazione FLASH con dose totale di 20 Gy porta ad una deplezione di 1-3 mmHg nel tessuto sano, nettamente inferiore a quanto sarebbe necessario per ottenere ipossia transitoria globale nei tessuti sani ben ossigenati (Figura 3.4).

Si conclude quindi che la ROD può spiegare solo marginalmente l'effetto FLASH e contribuisce a spiegare l'effetto radioprotettivo di nicchie cellulari poco ossigenate.

3.2 Il Legame Sperimentale tra ROD, LET e Dose Rate

Sempre nel 2021 Jansen et al. [27] hanno approfondito la correlazione tra ipotesi ROD e tipo di particella utilizzata in modalità FLASH. Il loro studio si è concentrato sull'irradiazione di un fantoccio omogeneo di acqua pura sottoposto a irradiazione FLASH con fotoni da 225 kV in modalità continua, protoni da 224 MeV/u e dose rate fino a 9.5 Gy/s e ioni di carbonio-12 da 400 MeV/u e 150 MeV/u e dose rate fino a 340 Gy/s.

Le misure si sono focalizzate sulla concentrazione di ossigeno nel fantoccio, eseguite con l'utilizzo di un sensore ottico non invasivo.

Gli autori [27], con misure preventive, hanno dimostrato che il rate di consumo di ossigeno era indipendente dal volume irradiato (se irradiato omogeneamente), dunque il fantoccio è stato adattato alla geometria del fascio utilizzato di volta in volta.

I risultati ottenuti mostrano che il consumo di ossigeno in funzione del tempo di esposizione e della dose somministrata è indipendente dalla concentrazione iniziale

di ossigeno, è lineare con la dose e dipende fortemente dal dose rate per tutte e tre le specie (Figura 3.5).

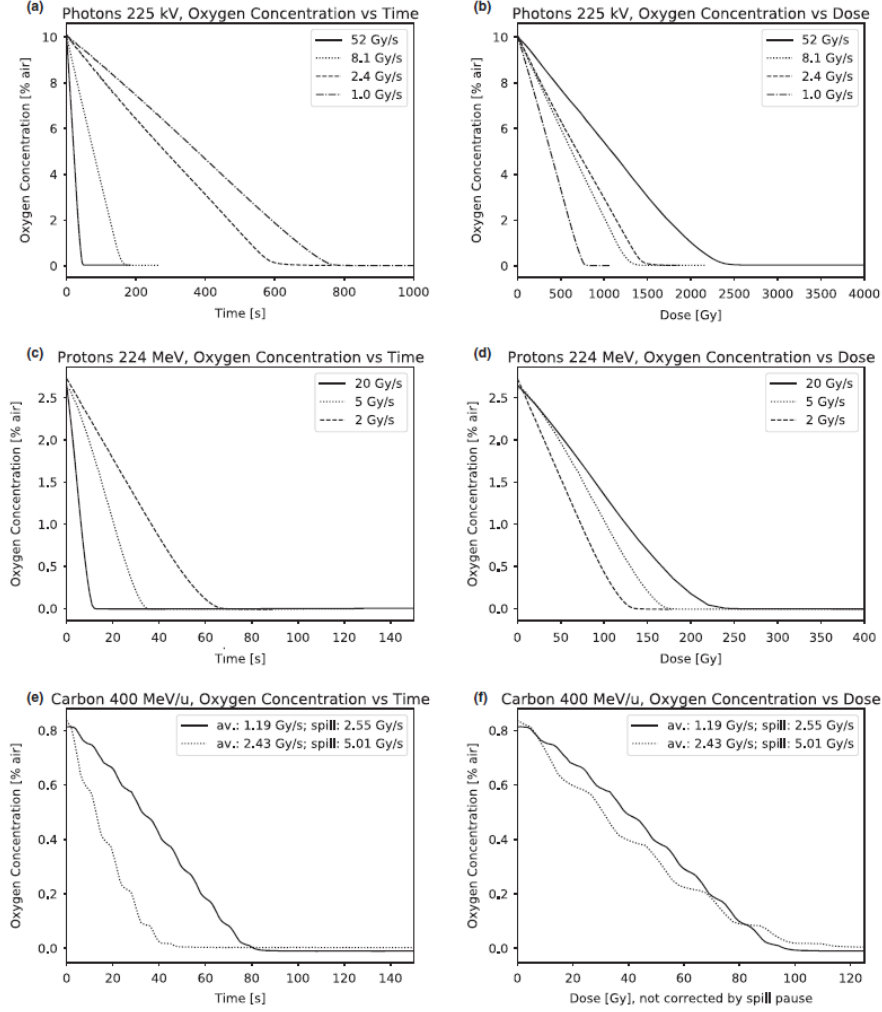


Figura 3.5: Concentrazione di ossigeno durante l'irradiazione con fotoni (alto), protoni (centro) e ioni carbonio (basso), riportata rispetto al tempo (sinistra) e alla dose assorbita (destra), le diverse curve corrispondono a diversi dose rate. Alcune curve sono state allineate temporalmente per partire dallo stesso valore iniziale di O_2 [27].

In particolare, il dose rate ha un impatto significativo sulla dose necessaria per raggiungere la deplezione totale di ossigeno e sulla velocità con cui questo viene consumato.

L'andamento del consumo medio di ossigeno $\frac{dO}{dD}$ in funzione del dose rate $\frac{dD}{dt}$ permette di concludere che un dose rate maggiore porta a un minore consumo di ossigeno, indistintamente dalla particella usata (Figura 3.6). Tale comportamento è attribuito alla maggiore probabilità di ricombinazione tra specie radicaliche (e_{aq}^- e $H\bullet$), che limita le reazioni con l'ossigeno molecolare.

Questo risultato risulta tuttavia in parte inatteso: secondo l'ipotesi ROD, un dose rate più elevato dovrebbe favorire una deplezione di ossigeno più marcata, in

grado di generare una condizione transiente di ipossia associata all'effetto FLASH. L'osservazione di un consumo minore a dose rate crescenti suggerisce quindi che il meccanismo di ROD, da solo, non sia sufficiente a spiegare l'origine dell'effetto FLASH.

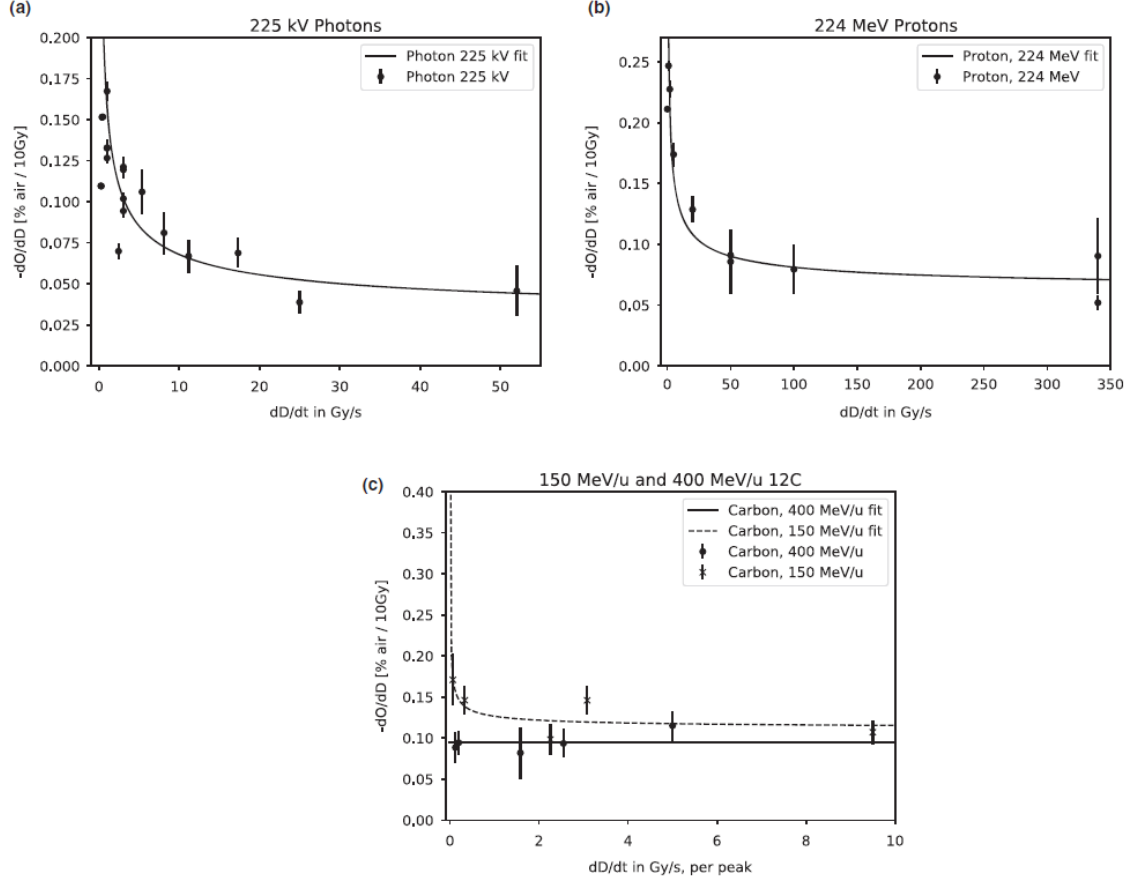


Figura 3.6: Consumo medio di ossigeno per 10 Gy in relazione al dose rate, per ciascun tipo di fascio [27].

In accordo con i dati sperimentali mostrati in Figura 3.6, la diminuzione assoluta della concentrazione di ossigeno nel mezzo per un'irradiazione di 10 Gy, espressa in percentuale della pressione atmosferica, risulta compresa tra 0.04%-0.18% atm per i fotoni, 0.04%-0.25% atm per i protoni e 0.09%-0.17% per gli ioni carbonio, in funzione del dose rate.

Dai risultati ottenuti emerge che, in regime di dose rate FLASH, le ricombinazioni radicaliche all'interno del mezzo riducono il consumo complessivo di ossigeno. Tale consumo risulta inoltre dipendere dal tipo di particella e dal suo LET, sebbene siano necessarie ulteriori verifiche sperimentali. I dati sono in buon accordo con la letteratura, in particolare con le stime riportate da Boscolo et al. [20] e da Prax e Kapp [13] (Sezioni 2.2, 2.3).

Poiché nessuna delle tre particelle testate ha determinato una deplezione completa dell'ossigeno, si conferma che la ROD può contribuire solo marginalmente all'effetto FLASH e che altri meccanismi devono essere coinvolti. I risultati mettono inoltre

in evidenza una dipendenza non lineare dal dose rate del consumo di ossigeno, osservata anche in assenza di molecole organiche, un aspetto trascurato nei modelli disponibili attualmente.

3.3 Il Ruolo del Dose Rate nel Consumo di Ossigeno e nella Produzione di H_2O_2

Nel 2023 Sunnerberg et al. [28] hanno condotto uno studio per indagare l'impatto del dose rate medio e istantaneo sul consumo di ossigeno e sulla produzione di perossido di idrogeno (H_2O_2) durante irradiazione FLASH con elettroni da 10 MeV, confrontata con irradiazione convenzionale mediante elettroni da 9 MeV.

Per valutare l'impatto del dose rate, sono stati analizzati 5 dose rate istantanei e 15 dose rate medi, coprendo un intervallo compreso tra condizioni convenzionali e FLASH. I valori di dose rate istantanei considerati sono compresi in un range tra 10^2 e 10^6 Gy/s, mentre quelli medi tra 0.14 e 1500 Gy/s, con dosi totali comprese tra 13 e 42 Gy. La variazione della concentrazione di ossigeno è stata misurata tramite estinzione della fosforescenza, mentre la produzione di H_2O_2 è stata quantificata con un metodo basato sulla fluorimetria. Gli esperimenti sono stati condotti su soluzioni di BSA al 4%.

La deplezione di ossigeno è stata indagata in due configurazioni: prima valutando l'effetto del dose rate medio e istantaneo, successivamente analizzando il ruolo della pO_2 iniziale.

In Figura 3.7 è riportato l'andamento del consumo di ossigeno in funzione del dose rate. I risultati mostrano che, sia per il dose rate medio sia per quello istantaneo, il consumo di ossigeno per unità di dose diminuisce con l'aumentare del dose rate. In particolare, per il dose rate medio, il consumo per Gy misurato al valore più basso risulta circa 1,4 volte superiore rispetto a quello osservato al dose rate più elevato [28]. Tale comportamento è stato interpretato in altri studi [11] come conseguenza dell'aumento della probabilità di ricombinazione tra specie radicaliche a dose rate elevati, che ridurrebbe l'efficienza complessiva del consumo di O_2 .

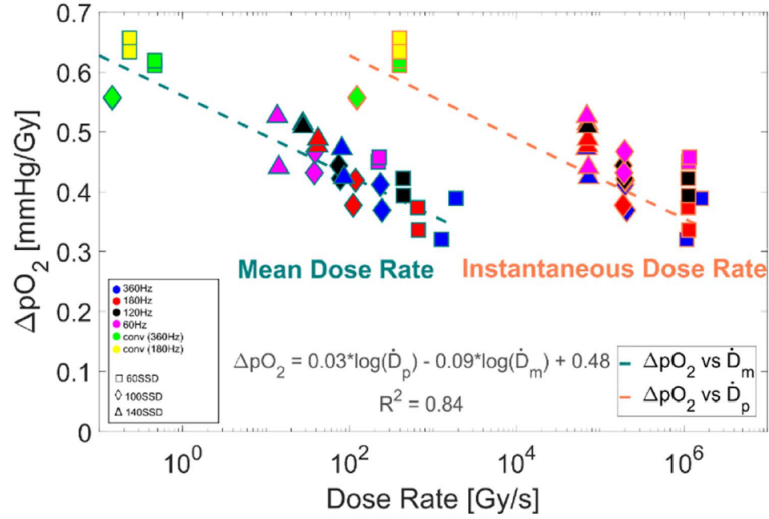


Figura 3.7: Consumo di ossigeno normalizzato per Gy in funzione del dose rate medio (sinistra, in verde acqua) e istantaneo (destra, in arancione). La legenda riporta i parametri di erogazione (frequenza di ripetizione degli impulsi e distanza sorgente-superficie SSD) associati a ciascun punto sperimentale [28].

In Figura 3.8 è mostrato invece il consumo di ossigeno per unità di dose in funzione della pO_2 iniziale in campioni inizialmente ossigenati a livelli differenti, irradiati in step di 19.5 Gy (CONV-RT) o 21.5 Gy (FLASH-RT), con pause non superiori a 30 s fino al completo esaurimento di ossigeno. Dalla figura emerge che, per valori di pO_2 iniziali superiori a 30 mmHg (normossia), l'irradiazione FLASH determina un consumo di ossigeno più contenuto rispetto alla CONV-RT, mentre al di sotto di tale soglia le differenze tra le due modalità risultano trascurabili.

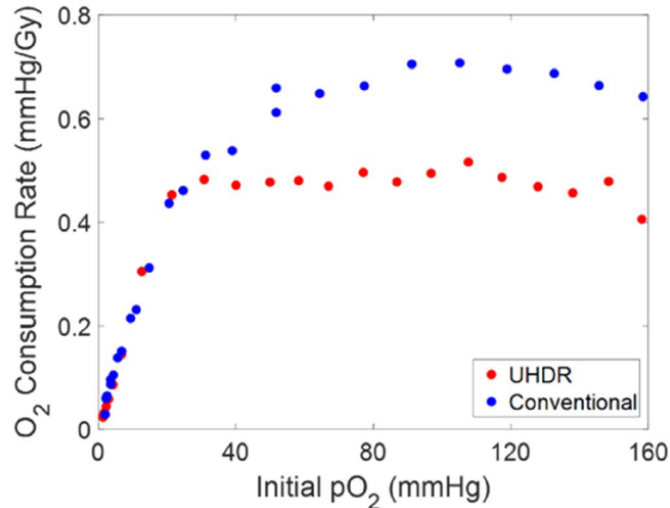


Figura 3.8: Consumo di ossigeno per unità di dose in funzione della pO_2 iniziale: confronto tra UHDR (rosso) e CONV (blu) [28].

La Figura 3.9 riporta infine la produzione di H_2O_2 in funzione del dose rate medio e istantaneo. Il rendimento radiolitico di perossido di idrogeno, valutato su dosi

comprese tra 15 e 33 Gy, mostra una chiara diminuzione all'aumentare del dose rate medio, mentre la dipendenza dal dose rate istantaneo risulta meno marcata. L'analisi statistica multivariata effettuata ha infatti evidenziato che solo il dose rate medio ha un effetto significativo sulla resa di H_2O_2 ($p < 0.001$), mentre l'influenza del dose rate istantaneo non è risultata statisticamente rilevante ($p = 0.145$), pur mostrando un trend coerente con quello osservato per il consumo di ossigeno [28].

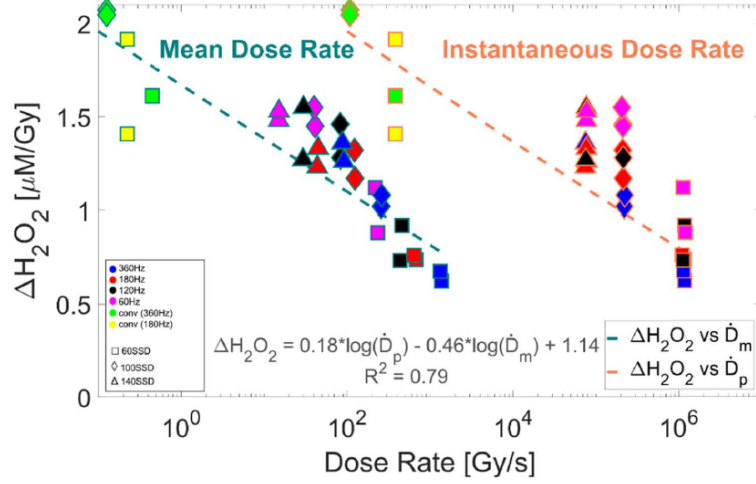


Figura 3.9: Resa di H_2O_2 per unità di dose in funzione del dose rate medio (sinistra, verde acqua) e istantaneo (destra, arancione). La legenda riporta i parametri di erogazione (frequenza di ripetizione degli impulsi e SSD) associati ai singoli punti sperimentali. [28].

In sintesi, i risultati indicano che il dose rate medio è il principale predittore sia del consumo di ossigeno che della resa di H_2O_2 per unità di dose. Sebbene entrambi mostrino un andamento decrescente al crescere del dose rate, solo il dose rate medio ha evidenziato un effetto statisticamente significativo, mentre quello istantaneo non ha mostrato un contributo rilevante.

È stata inoltre evidenziata una correlazione tra ossigeno consumato e quantità di H_2O_2 prodotta per unità di dose: la riduzione simultanea di entrambi all'aumentare del dose rate suggerisce che i due processi condividano meccanismi radicalici comuni. Questo comportamento potrebbe avere implicazioni per l'effetto FLASH, in quanto un consumo di ossigeno meno efficiente a dose rate elevati riflette una maggiore ricombinazione radicalica e quindi una minore disponibilità di ROS reattivi nel microambiente.

Gli autori sottolineano tuttavia la necessità di studi futuri che misurino simultaneamente ossigeno e specie radicaliche per chiarire ulteriormente questi meccanismi.

3.4 Elio, Carbonio e Ossigeno: Nuove Evidenze sul Consumo di Ossigeno

Nel 2025 Karle et al. [8] hanno esteso per la prima volta le indagini sul consumo radiolitico di ossigeno a particelle diverse da elettroni e protoni, includendo ioni di

elio, carbonio e ossigeno. Lo studio ha analizzato in dettaglio la correlazione tra LET mediato sulla dose (LETd, fino a $100.3 \text{ keV}/\mu\text{m}$), dose rate del fascio e consumo di ossigeno, confrontando condizioni convenzionali e UHDR.

Gli esperimenti in vitro sono stati condotti utilizzando soluzioni di BSA al 5%, irradiate con le diverse particelle riportate nelle seguenti tabelle:

TABLE 1 Dosimetry measurements and setting details for electron SDR and UHDR irradiation with the Mobetron (IntraOp) for the planned dose of 15 Gy. The dose values are averages of at least three values and standard deviations are given.

Field diameter (cm)	Source-surface distance (cm)	Extraction energy (MeV)	Mean LETd (keV/ μm)	Mean dose rate (Gy/s)	Pulse repetition frequency (Hz)	Puls length (μs)	Radiation unit	Dose (Gy)
6	40	9	1	0.338 ± 0.003	30	1.2	707 Monitor Units	15.011 ± 0.005
				112.2 ± 0.9	45	4	6 Pulses	15.01 ± 0.18

The electrons LETd was estimated to be $1 \text{ keV}/\mu\text{m}$.²²

Figura 3.10: Caratteristiche del fascio di elettroni usato negli esperimenti di Karle et al. [8].

TABLE 2 Field and irradiation parameter details for SDR and UHDR irradiation at the HIT facility.

Particle	Field size (mm ²)	Spot spacing (mm)	Mean LETd (keV/ μm)	Extraction energy (MeV/u)	Mean dose rate (Gy/s)	Delivery time (s)	Spill time (ms)	Interspill time (s)	Dose (Gy)
p	12	3	5.4 [range 4.9–6.0]	146.56	0.40 ± 0.03	38 ± 3	533 ± 67	3.46 ± 0.03	14.997 ± 0.026
					121 ± 8	0.125 ± 0.008	125 ± 8	–	15.08 ± 0.03
⁴ He	10	2	14.4 [range 12.0–33.0]	145.74	0.4074 ± 0.0015	36.82 ± 0.12	336.0 ± 1.7	3.654 ± 0.004	15.003 ± 0.015
					121 ± 6	0.125 ± 0.006	125 ± 6	–	15.07 ± 0.12
¹² C	10.5	1.5	65 [range 56–153]	275.98	0.341 ± 0.009	44.6 ± 1.2	696 ± 115	4.5 ± 0.8	15.21 ± 0.11
					113 ± 8	0.136 ± 0.009	136 ± 9	–	15.27 ± 0.12
¹⁶ O	9	1.5	100.3 [range 88.0–235.0]	325.98	0.309 ± 0.010	48.5 ± 1.6	876 ± 154	4.39 ± 0.05	15.02 ± 0.04
					108 ± 10	0.138 ± 0.012	137 ± 12	–	14.86 ± 0.16

All values are averaged from at least three samples and are given with their standard deviations. The "Delivery Time" describes the time span from the beginning of the first spill to the end of the last one, while the "Interspill Time" lasts from the end of one spill until the beginning of the following spill. The "Spill Time" refers to the temporal length of a single spill. The "Mean Dose Rate" is calculated by dividing the delivered dose by the delivery time.

Figura 3.11: Caratteristiche dei fasci di protoni e ioni Elio, Carbonio e Ossigeno usati negli esperimenti di Karle et al. [8].

La concentrazione di ossigeno è stata misurata mediante sensori ottici prima e dopo l'irradiazione, così da calcolare il rate di consumo g , definito come [8]:

$$g = \frac{p[O_2]_{pre-irradiation} - p[O_2]_{post-irradiation}}{D} \quad (3.1)$$

dove $p[O_2]_{pre-irradiation}$, $p[O_2]_{post-irradiation}$ sono rispettivamente le concentrazioni di ossigeno prima e dopo l'esposizione alla radiazione e D è la dose totale somministrata.

In Figura 3.12 è riportato l'andamento del rate di consumo di ossigeno in funzione della pO_2 iniziale e del LETd, per differenti tipologie di radiazione e per entrambi i regimi di dose rate (convenzionale e FLASH). Si osserva che, al crescere della concentrazione iniziale di ossigeno, il consumo tende a saturare, raggiungendo un valore massimo g_{max} che varia in funzione del tipo di particella e del suo LETd.

In particolare, il valore di g_{\max} diminuisce all'aumentare del LETd, sia in regime convenzionale che FLASH: gli elettroni mostrano i valori più elevati di consumo, seguiti da protoni, elio e carbonio, fino agli ioni di ossigeno, che presentano i valori più bassi. Questo andamento riflette il fatto che, a LET elevati, la maggiore densità di traccia favorisce le ricombinazioni radicaliche intra-traccia rispetto alle reazioni con l'ossigeno molecolare, riducendo così l'efficienza complessiva del consumo radiolitico, in accordo con quanto descritto da Zhu et al. [21] (Sezione 2.4).

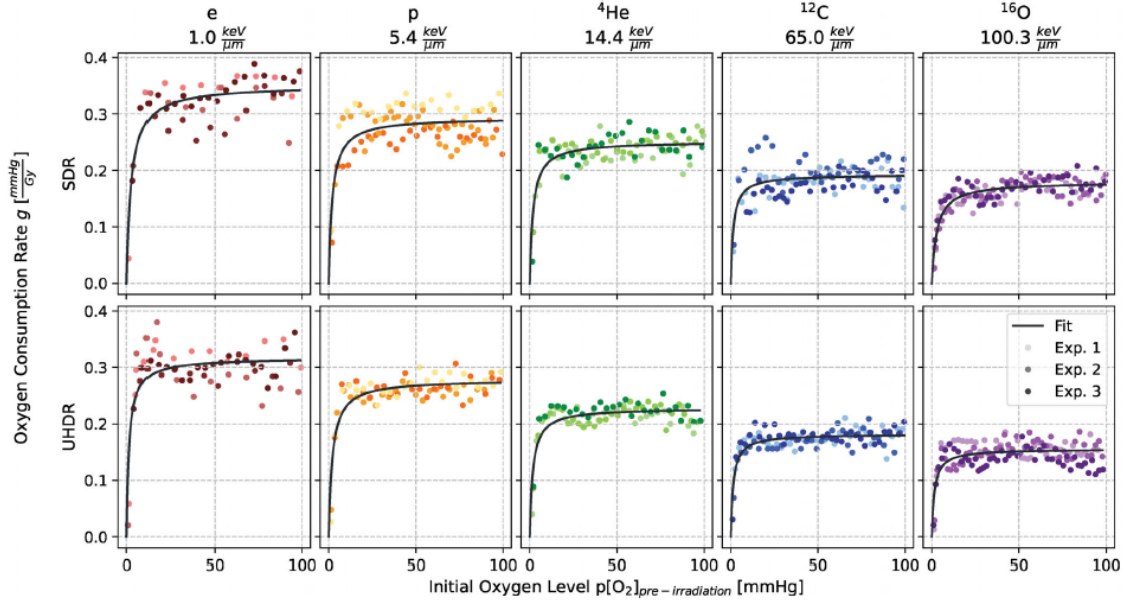


Figura 3.12: Andamento del rate di consumo di ossigeno g in BSA 5% in relazione alla pO_2 iniziale, in seguito a un'irradiazione di 15 Gy con differenti particelle e dose rate. Ogni sfumatura di colore, per una stessa particella, rappresenta una replica sperimentale indipendente. [8].

La riduzione del rate di consumo con LET crescente è attribuibile a modifiche delle reazioni radiochimiche, difficili da osservare sperimentalmente ma riproducibili con simulazioni. Questi dati sono infatti coerenti con alcune previsioni Monte Carlo che avevano evidenziato un calo della resa radiolitica all'aumentare del LET [21] [29].

Un ulteriore risultato riguarda la dipendenza dal dose rate: a UHDR il rate di consumo di ossigeno è inferiore rispetto alla CONV-RT (Figura 3.13), ma in regime FLASH l'ossigeno viene comunque esaurito in millisecondi, senza possibilità di ripristino immediato. Per LET bassi, questa tendenza era stata già osservata da Cao et al. [7] e Jansen et al. [27]. Tale comportamento può essere attribuito a interazioni inter-traccia più frequenti, che riducono la probabilità di reazioni con le molecole di ossigeno.

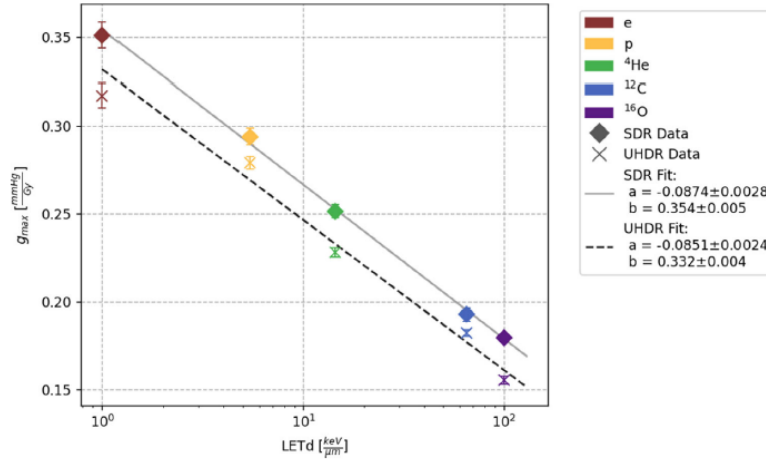


Figura 3.13: Valori di g_{max} con le relative deviazioni standard per ciascun tipo di particella in funzione del LETd. I valori misurati in regime SDR sono indicati con un rombo e interpolati dalla linea continua, mentre quelli in regime UHDR sono rappresentati con una croce e interpolati dalla linea tratteggiata [8].

Nel complesso, i dati mostrano un trend chiaro di diminuzione del consumo radio-litico di ossigeno all'aumentare sia del LETd sia del dose rate. Se la deplezione di ossigeno e l'ipossia transitoria contribuiscono allo sparing tissutale osservato in regime FLASH, tale effetto tende quindi a ridursi per radiazioni ad alto LET. In prospettiva, ciò suggerisce che i tumori irradiati con fasci ad alto LET consumino meno ossigeno rispetto ai tessuti sani, esposti tipicamente a LET più bassi, ampliando la finestra terapeutica. Inoltre, i danni indotti da particelle ad alto LET risultano poco influenzati dalla presenza di ossigeno.

Questo studio, estremamente recente, fornisce nuove evidenze sperimentali sul ruolo del LET e del dose rate, delineando la direzione futura delle ricerche. L'ampliamento dei database sperimentali a diverse particelle e LET rappresenta infatti un passo fondamentale verso la costruzione di modelli biofisici più completi e sofisticati per spiegare l'effetto FLASH.

Capitolo 4

Conclusioni e Prospettive

Le ipotesi, i modelli e gli esperimenti presentati finora hanno permesso di analizzare in profondità il ruolo dell'ossigeno nell'insorgenza dell'effetto FLASH, mettendo a confronto differenti punti di vista ed evidenze sperimentali.

L'obiettivo è stato quello di presentare e descrivere i principali risultati della letteratura degli ultimi anni, oltre a valutarne la coerenza e sottolinearne i limiti, con lo scopo di delineare lo stato dell'arte e la strada della ricerca futura.

I modelli teorici e computazionali rappresentano il primo passo per provare a spiegare la risposta differenziale dei tessuti in regime FLASH. Questi concordano nel considerare la ROD una valida ipotesi per spiegare l'insorgenza dell'effetto FLASH, tuttavia deve essere affiancata da altri meccanismi, ancora da studiare, per giungere ad una spiegazione globale del fenomeno.

Il dibattito scientifico ad oggi tende ad un'interpretazione multifattoriale [10], [12], in cui le interazioni radicaliche, le dinamiche di diffusione molecolari e i parametri del fascio FLASH agiscono congiuntamente.

Le misurazioni sperimentali hanno rappresentato un passo fondamentale per verificare e quantificare le ipotesi formulate. In particolare, gli esperimenti presentati in questo lavoro mostrano come ad oggi la ricerca scientifica sia indirizzata allo studio della correlazione LET-ossigeno e alle caratteristiche generali del fascio utilizzato in modalità FLASH.

Dal confronto delle evidenze presentate in questo lavoro, emerge chiaramente che la sola ipotesi ROD non è sufficiente a spiegare l'effetto FLASH. Pur essendo un meccanismo fondamentale per spiegare il fenomeno, le evidenze mostrano che il consumo di ossigeno nei tessuti normossici è troppo limitato per giustificare l'effetto di sparing osservato.

Un ruolo cruciale sembra essere svolto dal LET: le radiazioni a basso LET sono associate ad un effetto FLASH più marcato, mentre per quelle ad alto LET l'effetto tende a ridursi. Questo suggerisce che anche la distribuzione spaziale della densità di ionizzazione sia determinante nel modulare la risposta cellulare.

La definizione accurata dei parametri del fascio rappresenta un tassello critico ancora da colmare: non è sufficiente considerare quantità medie, ma occorre tenere conto anche della struttura temporale del fascio, del numero, della durata e dell'intervallo

degli impulsi.

I processi radicalici, come la ricombinazione ROS-NROS e le interazioni inter-track, offrono una spiegazione più precisa della ROD, ma devono essere confermati in sistemi biologici complessi che possano riprodurre più fedelmente l'ambiente cellulare. La riproduzione dell'ambiente cellulare è uno dei più grandi limiti da affrontare per riuscire a dare una spiegazione unificata dell'effetto: soluzioni acquose, BSA e fantocci di acqua non riproducono la complessità del tessuto umano. Risulta necessario sviluppare nuove tecniche per misurare simultaneamente la concentrazione di ossigeno, delle specie radicaliche e i parametri biologici in vivo.

Il ruolo dell'ossigeno nell'effetto FLASH, pur risultando centrale, non può essere considerato come unico meccanismo capace di spiegare l'effetto radioprotettivo sui tessuti sani osservato in vivo.

La ricerca sull'effetto FLASH è una delle frontiere della scienza in cui fisica, chimica e biologia devono convergere per riuscire a dare una descrizione globale del fenomeno. Comprendere i meccanismi sottostanti è essenziale per poter applicare la FLASH-RT in ambito clinico efficacemente, potenzialmente migliorando in modo sostanziale il trattamento dei tumori solidi.

Bibliografia

- [1] Roger J. Berry, Eric J. Hall, David W. Forster, Thomas H. Storr, and Michael J. Goodman. Survival of mammalian cells exposed to x rays at ultra-high dose-rates. *The British Journal of Radiology*, 42(494):102–107, 1969.
- [2] Vincent Favaudon, Laura Caplier, Virginie Monceau, Frédéric Pouzoulet, Mano Sayarath, Charles Fouillade, Marie-France Poupon, Isabel Brito, Philippe Hupé, Jean Bourhis, et al. Ultrahigh dose-rate flash irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. *Science Translational Medicine*, 6(245):245ra93, 2014.
- [3] Marie-Catherine Vozenin, Pauline De Fornel, Kristoffer Petersson, Vincent Favaudon, Maud Jaccard, Jean-François Germond, Benoit Petit, Marco Burki, Gisèle Ferrand, David Patin, et al. The advantage of flash radiotherapy confirmed in mini-pig and cat-cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 25(1):35–42, 2019.
- [4] N. Rama, T. Saha, S. Shukla, C. Goda, D. Milewski, A. E. Mascia, R. E. Vatner, D. Sengupta, A. Katsis, E. Abel, et al. 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*, 105(1):S164–S165, 2019.
- [5] Jean Bourhis, Wendy Jeanneret Sozzi, Patrik Gonçalves Jorge, Olivier Gai-de, Claude Bailat, Frédéric Duclos, David Patin, Mahmut Ozsahin, François Bochud, Jean-François Germond, et al. Treatment of a first patient with flash-radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*, 139:18–22, 2019.
- [6] Jonathan Farr, Veljko Grilj, Victor Malka, Srinivasan Sudharsan, and Marco Schippers. Ultra-high dose rate radiation production and delivery systems intended for flash. *Medical Physics*, 49(7):4875–4911, 2022.
- [7] Xiaojian Cao, Rui Zhang, Tatiana V. Esipova, Srinivas R. Allu, Rukhsana Ashraf, Mohammad Rahman, Jason R. Gunn, Peter Bruza, David J. Gladstone, Benjamin B. Williams, et al. Quantification of oxygen depletion during flash irradiation in vitro and in vivo. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 111:240–248, 2021.
- [8] Christoph Karle, Hui Liew, Thomas Tessonier, et al. Oxygen consumption measurements at ultra-high dose rate over a wide let range. *Medical Physics*, 52:1323–1334, 2025.

- [9] J. Atkinson, E. Bezak, H. Le, et al. The current status of flash particle therapy: a systematic review. *Physical and Engineering Sciences in Medicine*, 46(2):529–560, 2023.
- [10] James C. L. Chow and Hanna E. Ruda. Mechanisms of action in flash radiotherapy: A comprehensive review of physicochemical and biological processes on cancerous and normal cells. *Cells*, 13:835, 2024.
- [11] Ramin Abolfath, David Grosshans, and Radhe Mohan. Oxygen depletion in flash ultra-high-dose-rate radiotherapy: A molecular dynamics simulation. *Medical Physics*, 47:6551–6561, 2020.
- [12] Yu Shiraishi, Yu Matsuya, and Hidenobu Fukunaga. Possible mechanisms and simulation modeling of flash radiotherapy. *Radiological Physics and Technology*, 17:11–23, 2024.
- [13] Guillem Pratx and Daniel S. Kapp. A computational model of radiolytic oxygen depletion during flash irradiation and its effect on the oxygen enhancement ratio. *Physics in Medicine & Biology*, 64:185005, 2019.
- [14] David R. Grimes and Mike Partridge. A mechanistic investigation of the oxygen fixation hypothesis and oxygen enhancement ratio. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 1(4):045209, 2015.
- [15] Y. Liu, A.-C. Tsai, X. Yuan, Y. Li, and T. Ma. Biology and engineering of stem cell niches. In *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, pages 273–291. Elsevier, Amsterdam, 2017.
- [16] Ahmed Mohyeldin, Tomas Garzón-Muvdi, and Alfredo Quiñones-Hinojosa. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7:150–161, 2010.
- [17] Munjal M. Acharya, Lori-Ann Christie, Min L. Lan, Peter J. Donovan, Carl W. Cotman, John R. Fike, and Charles L. Limoli. Rescue of radiation-induced cognitive impairment through cranial transplantation of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:19150–19155, 2009.
- [18] Christopher S. Potten, D. Booth, and J. Haley. Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage in vivo. *British Journal of Cancer*, 75:1454–1459, 1997.
- [19] Peter Mauch, Louis Constine, Joel Greenberger, Walter Knospe, James Sullivan, Judith L. Liesveld, and H. Joachim Deeg. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 31:1319–1339, 1995.
- [20] Daria Boscolo, Emanuele Scifoni, Marco Durante, Michael Krämer, and Martina C. Fuss. May oxygen depletion explain the flash effect? a chemical track structure analysis. *Radiotherapy and Oncology*, 162:68–75, 2021.

- [21] Hongyu Zhu, Junli Li, Xiaowu Deng, Rui Qiu, Zhen Wu, and Hui Zhang. Modeling of cellular response after flash irradiation: a quantitative analysis based on the radiolytic oxygen depletion hypothesis. *Physics in Medicine & Biology*, 66(18):185009, 2021.
- [22] Hongyu Zhu, Junli Li, Xiaowu Deng, Rui Qiu, Zhen Wu, and Hui Zhang. Development of a dna damage model that accommodates different cellular oxygen concentrations and radiation qualities. *Medical Physics*, 48:4908–4918, 2021.
- [23] Anlin Hu, Rui Qiu, Zhen Wu, Hui Zhang, Wenbin B. Li, and Junli Li. A computational model for oxygen depletion hypothesis in flash effect. *Radiation Research*, 197:175–183, 2021.
- [24] August Krogh. The number and distribution of the capillaries in the muscles of the frog. *The Journal of Physiology*, 52(5-6):407–415, 1919.
- [25] D. A. Simmons, F. M. Lartey, E. Schöler, et al. Reduced cognitive deficits after flash irradiation of whole mouse brain are associated with less hippocampal dendritic spine loss and neuroinflammation. *Radiotherapy and Oncology*, 139:1–4, 2019.
- [26] Jessica Morales, Liang Li, Fahad J. Fattah, Yue Dong, Edwin A. Bey, Mehul Patel, Jianli Gao, and David A. Boothman. Review of poly (adp-ribose) polymerase (parp) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 24(1):15–28, 2014.
- [27] J. Jansen, J. Knoll, E. Beyreuther, J. Pawelke, R. Skuza, R. Hanley, S. Brons, F. Pagliari, and J. Seco. Does flash deplete oxygen? experimental evaluation for photons, protons, and carbon ions. *Medical Physics*, 48:3982–3990, 2021.
- [28] J. P. Sunnerberg, R. Zhang, D. J. Gladstone, H. M. Swartz, J. Gui, and B. W. Pogue. Mean dose rate in ultra-high dose rate electron irradiation is a significant predictor for o2 consumption and h2o2 yield. *Physics in Medicine & Biology*, 68:165014, 2023.
- [29] Daria Boscolo, Michael Krämer, Martina C. Fuss, Marco Durante, and Emanuele Scifoni. Impact of target oxygenation on the chemical track evolution of ion and electron radiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2):424, 2020.

Ringraziamenti

Questi tre anni sono stati i più formativi, difficili, esasperanti e soddisfacenti della mia vita. Ci tengo quindi a dedicare alcune parole alle persone che mi sono state davvero vicine in questo percorso.

La mia famiglia

Mi avete accompagnata in ogni passo di questo percorso, mi avete supportata e, soprattutto, sopportata per tutto questo tempo...

Grazie soprattutto a mia mamma, per avermi ascoltata ripetere cose incomprensibili e che ha sempre saputo dirmi la cosa giusta al momento giusto.

Citazione d'onore per Schrödi: dopo anni di sovrapposizione, sei uscita viva dalla scatola e direi che la laurea è anche tua.

I miei relatori

Un ringraziamento speciale va al Professor Veronese e alla Professoressa Mattei.

Al Professor Veronese, per la disponibilità, la precisione, la chiarezza e l'attenzione con cui ha seguito il mio lavoro.

A Ilaria, invece, va un grazie sincero e affettuoso. Sei stata una guida costante, gentile e presente in ogni momento. Hai sempre trovato il tempo di rispondere ai miei dubbi con una pazienza e una dolcezza rare. Mi hai fatto sentire valorizzata, incoraggiata e orgogliosa del mio lavoro, e di questo ti sarò sempre grata.

Grazie a entrambi per aver reso questa tesi non solo un progetto accademico, ma anche un'esperienza di crescita personale.

Lucrezia e Leonardo

Mi avete accompagnata nei bellissimi laboratori del nostro corso di studi. Senza di voi, onestamente, non li avrei mai superati. Grazie per le risate, la complicità e la sopravvivenza condivisa tra cavi, reticoli di diffrazione e relazioni da consegnare all'ultimo. Comunque, Leonardo, ti ribadisco che *accelerare* è con una sola *l* - dal latino *celeritas*.

Giorgia

A te va il ringraziamento più grande. Sei stata al mio fianco fin da subito, il mio "nemmeno io" che seguiva ogni mio "io non so nulla" prima degli esami. Abbiamo affrontato insieme ogni sessione e ognuna delle innumerevoli conversazioni con Giacomo, Pietro e Tommaso, fonti inesauribili di risposte su qualsiasi cosa, almeno finché non andavano in shutdown...

Ci siamo sempre sostenute, consapevoli che solo noi due sapevamo davvero quanto fosse difficile ciò che stavamo studiando. Quindi ora posso dirtelo: *siamo state brave, ce l'abbiamo fatta davvero*.

Infine, l'unica che davvero merita un grazie sono io.

**After 3 years of uncertainty
i'm currently in a superposition
of eigenstates: proud and dead inside**

I did it!

