

Effetti radiobiologici dei protoni e dei nanodiamanti in modelli di medulloblastoma: due applicazioni

Daniela Giovannini

5 Novembre, 2024

ENEA-INFN: collaborazioni in essere e sviluppi futuri



1101 0110 1100
0101 0010 1101
0001 0110 1110
1101 0010 1101
1111 1010 0000



Effetti radiobiologici dei protoni e dei nanodiamanti in modelli di medulloblastoma: due applicazioni

Impiego di nanodiamanti come radiosensibilizzanti

**Utilizzo del LINAC TOP
IMPLART per studi di
radiobiologia dei protoni**

**Modelli sperimentali di
Medulloblastoma**

Cos'è il medulloblastoma (MB)

MEDULLOBLASTOMA

- Tumore del sistema nervoso centrale che si sviluppa nel **cervelletto**
- Tumore più diffuso in età pediatrica, sono colpiti circa 7 bambini ogni milione
- Sopravvivenza varia dal 30% a l'80%



Terapie

- asportazione chirurgica del tumore, seguita da **radioterapia** e chemioterapia

Effetti dei trattamenti

- Problemi e/o ritardi cognitivi e di apprendimento, effetti negativi sull'ipofisi con il conseguente squilibrio nella produzione di ormoni, inclusi quelli sessuali e l'ormone della crescita

Rischio/beneficio nel trattamento radioterapico dei tumori

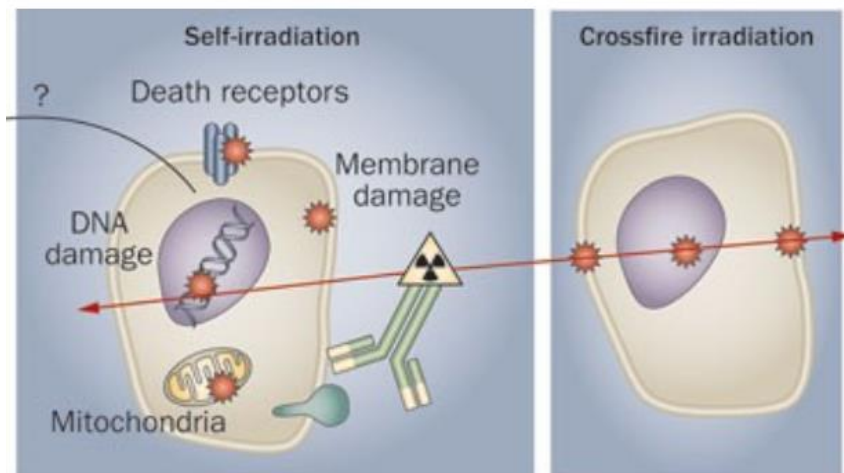
Benefici/rischio

Uno degli scopi della radioterapia è quello di trovare il giusto rapporto fra controllo del tumore e riduzione dei danni ai tessuti sani.



Cellule tumorali

Cellule sane



Danni al DNA non riparati portano a morte cellulare

La radiazione attraversa i tessuti causando

1. **Danni diretti al DNA**, con rotture singole o doppie della catena di DNA
2. **Danni indiretti al DNA**, causati dalla produzione di ROS

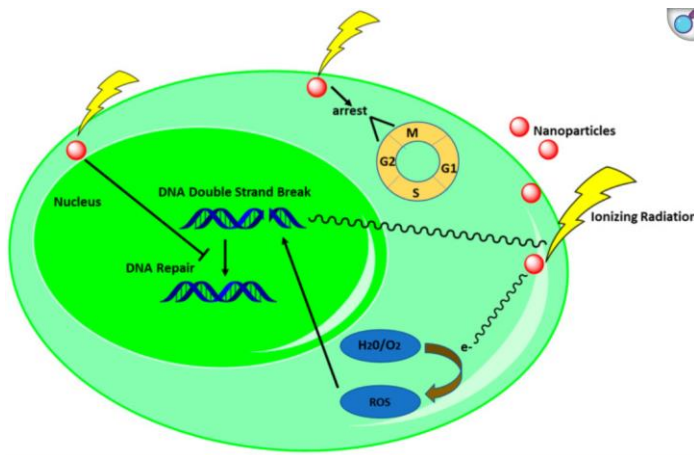
Cellule sane mostrano quasi la stessa sensibilità alla radiazione, quindi si devono adottare **strategie specifiche per mitigare i danni:**

- **RADIOSENSIBILIZZANTI**
- **TERAPIA CON PROTONI**

Nanodiamanti come radiosensibilizzanti

RADIOSENSIBILIZZANTI

Aumentano la suscettibilità delle cellule tumorali alle radiazioni



NANODIAMANTI

- Produzione in larga scala
- Dimensioni che variano 10-300 nm
- Elevato rapporto superficie-volume
- Bassa tossicità
- Superficie funzionalizzabile
- Proprietà fluorescenti che ne permettono la visualizzazione

NANOPARTICELLE: MECCANISMO DI AZIONE

- Produzione specie reattive ossigeno
- inibiscono riparazione del DNA
- Arresto ciclo cellulare

Nanodiamanti come radiosensibilizzanti

Questo studio è frutto di una collaborazione con il dipartimento di Fisica dell'Università di Torino associato alla sezione INFN di Torino (Prof. F. Picollo)

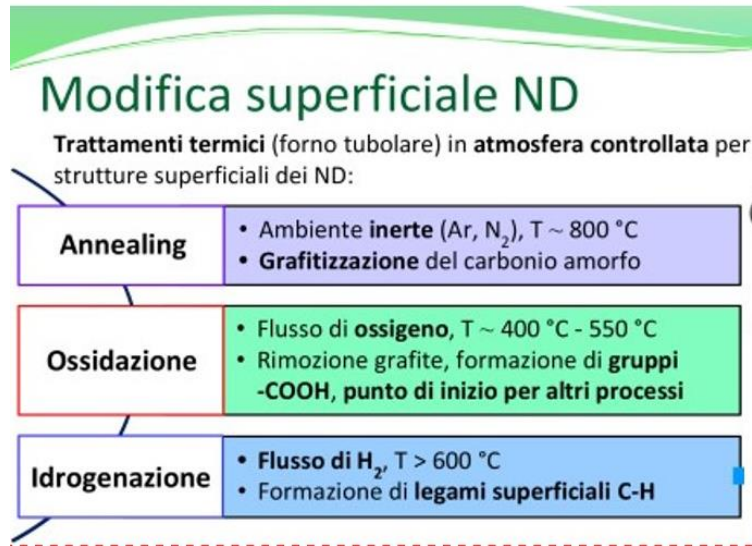
OBIETTIVO

Valutare l'influenza delle caratteristiche chimico/fisiche dei nanodiamanti, combinata a trattamenti con radiazioni a diverse energie, sulla radiosensibilità di un modello cellulare radioresistente di MB umano (DAOY)

- (i) Internalizzazione e localizzazione dei nanodiamanti (ND)
- (ii) Trattamento combinato NDs e radiazione per verificare possibile effetto sinergico

Parametri valutati

Dimensione NDs 18-55-240 nm



Concentrazioni NDs 10-20-40 µg/ml

Fotoni di differenti energie

- X-ray generator operated at 250 kVp
- ⁶⁰Co γ sorgente (1.25 MeV)

Dosi di fotoni diverse 2 Gy, 5 Gy e 8 Gy

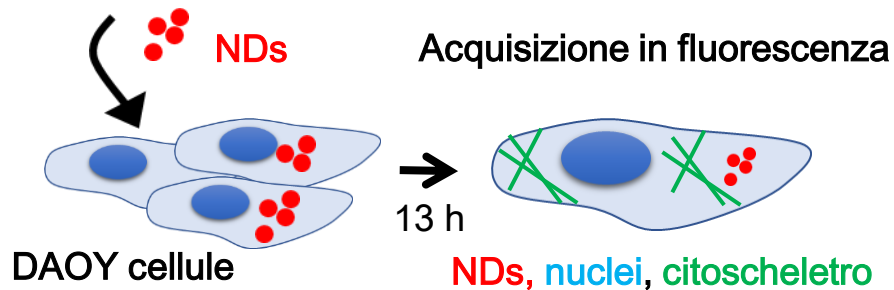
Modello *in vitro* MB radioresistente, cellule Daoy

Tutti questi parametri sono analizzati per trovare le condizioni di sinergia tra NDs e radiazioni

(i) internalizzazione e localizzazione dei nanodimanti

SCOPO: verificare l'internalizzazione dei NDs nel citoplasma

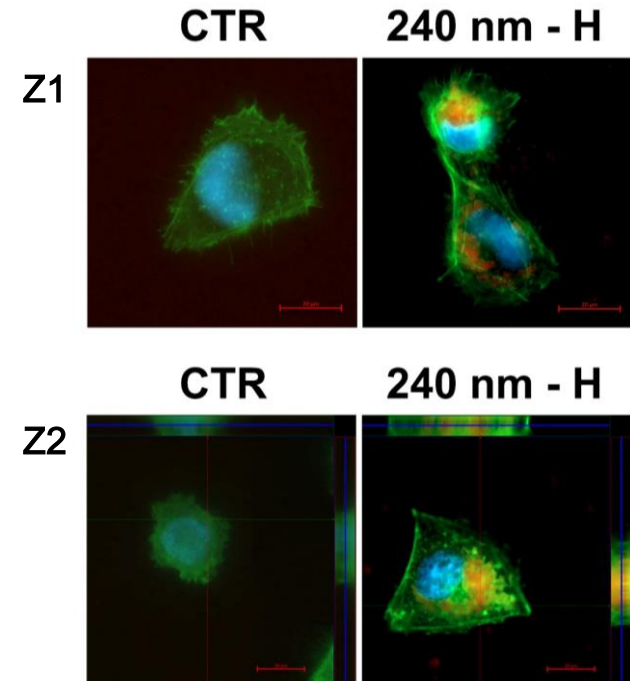
APPROCCIO:



RISULTATI

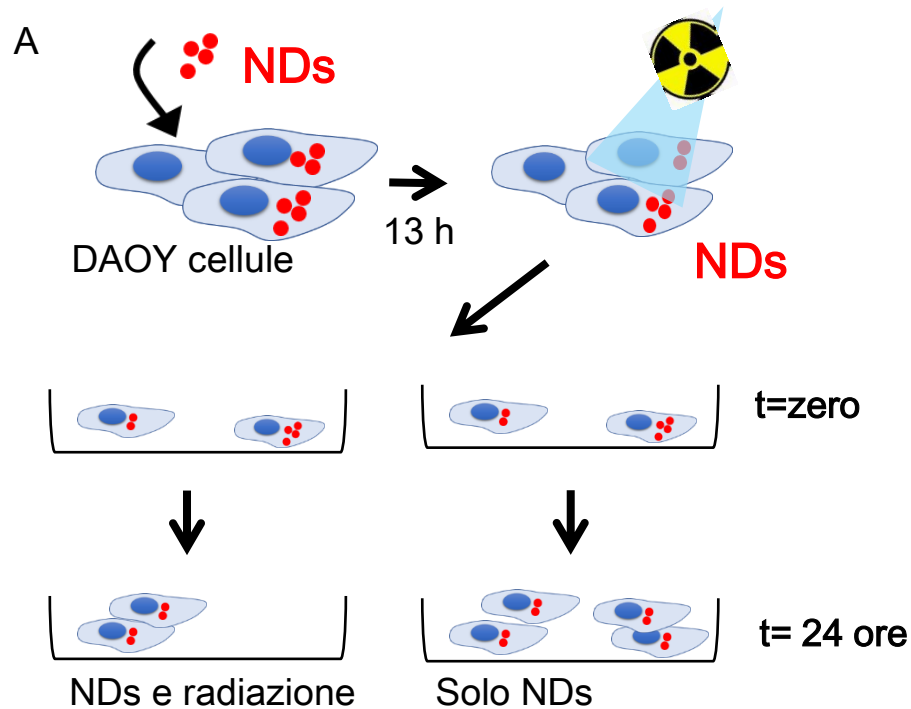
- (i) H-NDs sono intracellulari, il pannello Z-1 e Z-2 mostra lo z-stack
- (ii) H-NDs sono perinucleari
- (iii) H-NDs tendono a formare cluster

La superficie idrofobica dei H-NDs potrebbe spiegare la tendenza a formare clusters

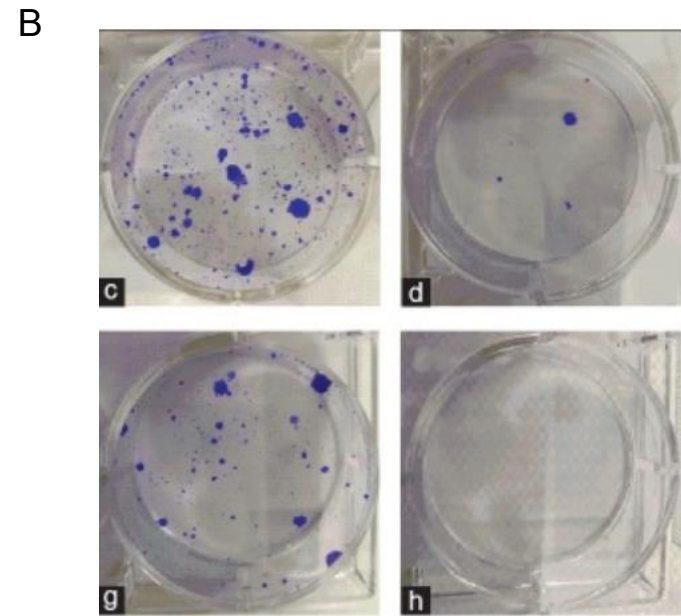


(ii) trattamento combinato di NDs e radiazione

SCOPO: valutare la sinergia fra NDs/radiazione nell'indurre morte cellulare nelle DAOY.
APPROCCIO: è stata misurata la frazione di cellule sopravvissute dopo esposizione a fotoni (alta o bassa energia) in presenza o assenza di NDs



Test clonogenico

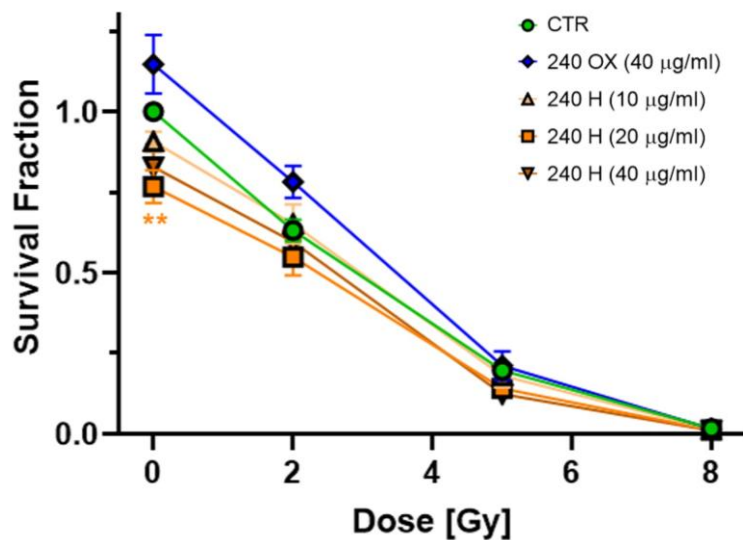


(ii) trattamento combinato di NDs e radiazione

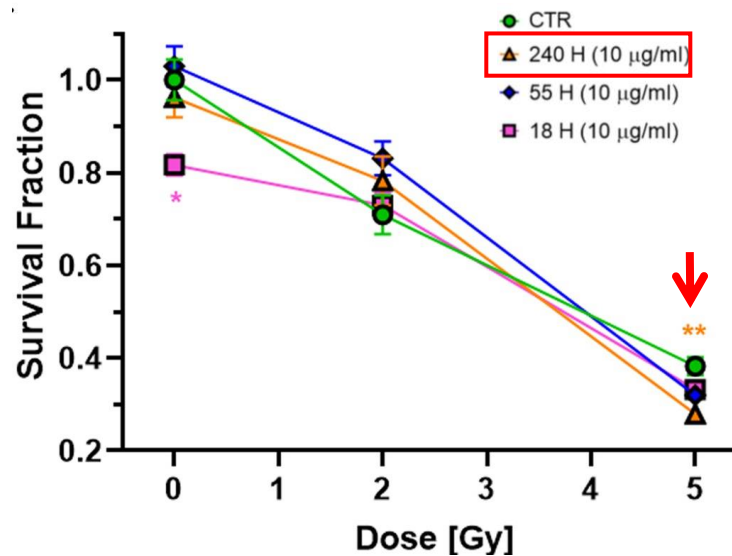
RISULTATI

- (I) I NDs di 240 nm non presentano un effetto sinergico con i fotoni a più bassa energia
(II) La combinazione di H-NDs di 240 nm e fotoni ad elevate energia (5Gy) riduce in maniera significativa la sopravvivenza cellulare

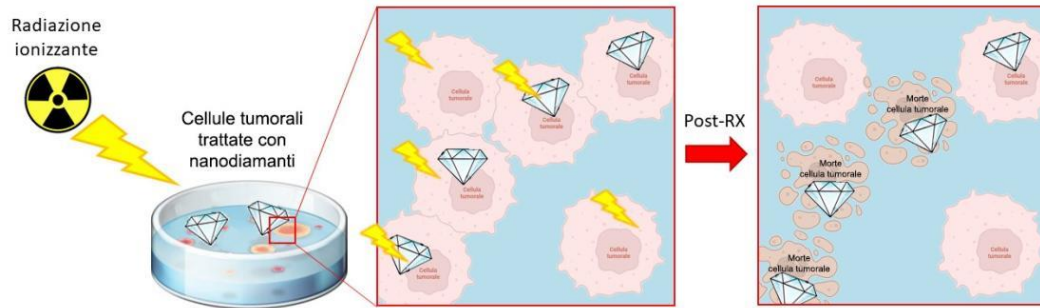
NDs 240nm- fotoni basse energie



NDs 240nm- fotoni alte energie



Conclusioni



- Abbiamo evidenziato la tossicità basale dei NDs di piccolo diametro
- È stata messa in luce una potenziale attività radiosensibilizzante dei NDs, che è però influenzata dall'energia delle radiazioni impiegate e dai parametri fisico/chimici dei NDs stessi
- Sono necessarie ulteriori caratterizzazioni in vitro per comprendere la loro potenzialità come agenti radiosensibilizzanti

► [Int J Mol Sci. 2023 Nov 22;24\(23\):16622. doi: 10.3390/ijms242316622](https://doi.org/10.3390/ijms242316622) [↗](#)

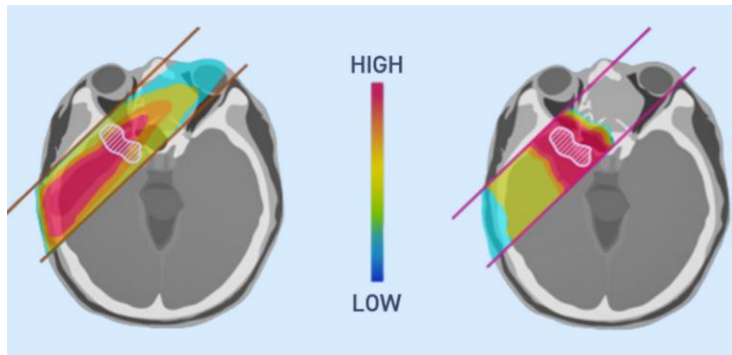
Nanodiamond Effects on Cancer Cell Radiosensitivity: The Interplay between Their Chemical/Physical Characteristics and the Irradiation Energy

[Veronica Varzi](#)^{1,2,3,*}, [Emiliano Fratini](#)^{2,*}, [Mauro Falconieri](#)⁴, [Daniela Giovannini](#)², [Alessia Cemmi](#)⁵, [Jessica Scifo](#)⁵,
[Ilaria Di Sarcina](#)⁵, [Pietro Aprà](#)^{1,3}, [Sofia Sturari](#)^{1,3}, [Lorenzo Mino](#)^{3,6}, [Giulia Tomagra](#)⁷, [Erminia Infusino](#)⁸, [Valeria Landoni](#)⁸,
[Carmela Marino](#)², [Mariateresa Mancuso](#)², [Federico Piccolo](#)^{1,3,*}, [Simonetta Pazzaglia](#)^{2,*}

Terapia con protoni

TERAPIA CON PROTONI (PT)

Ci sono 3 centri di eccellenza in Italia dove vengono trattati principalmente tumori del cervello, testa collo e dell'occhio.



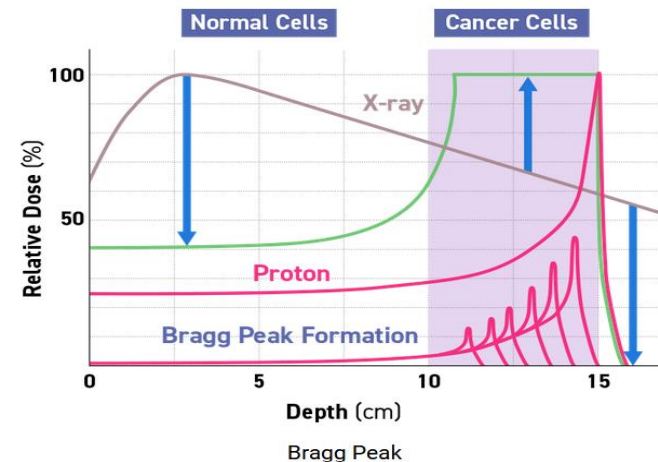
I Protoni raggiungono un'elevata precisione di trattamento, grazie al **picco di Bragg**

MODELLI DI STUDIO

La PT viene già impiegata ma rimangono molte domande radiobiologiche, su:

- Effetto medio lungo termine sui tessuti sani
- RBE effettivo dei protoni

Per realizzare studi radio-biologici adeguati sono necessari **modelli murini adeguati e Facility dedicate**

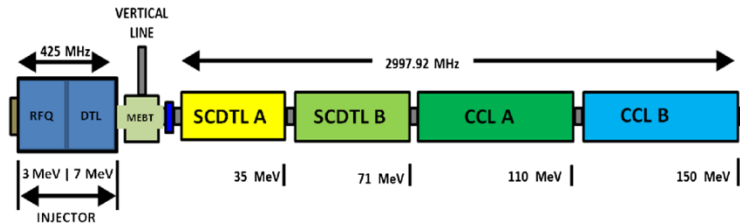


Poiché il picco di Bragg copre un'area limitata, per trattare la massa tumorale si esegue lo SOBP.

Studio radiobiologico con il LINAC TOP-IMPLART

TOP IMPLART

Prototipo di acceleratore lineare di protoni, progettato per raggiungere energia massima di 150 MeV, primo LINAC destinato a trattamenti oncologici umani.



OBIETTIVO

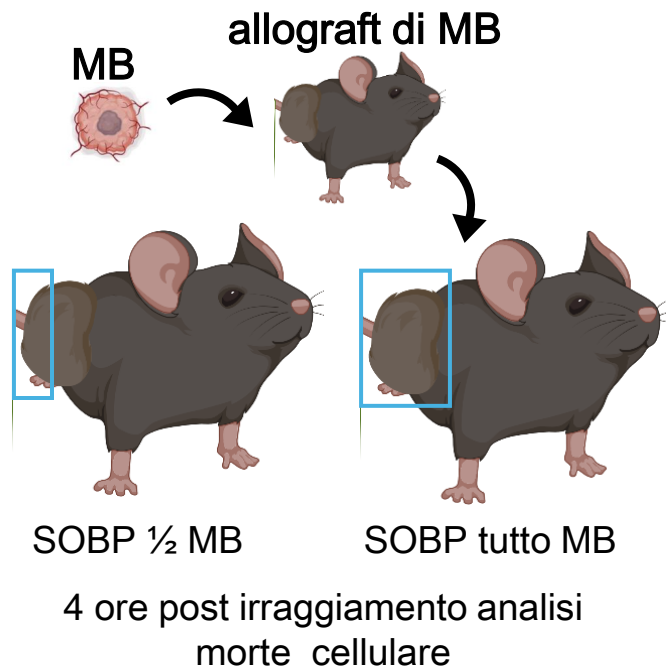
Valutare la possibilità di utilizzare TOP IMPLART come facility per il trattamento di piccoli animali, mettendo a punto:

- (i) set-up di irraggiamento su allograft di MB
- (ii) set-up di irraggiamento su cervello di topi neonati

(I) set-up di irraggiamento su allograft di MB

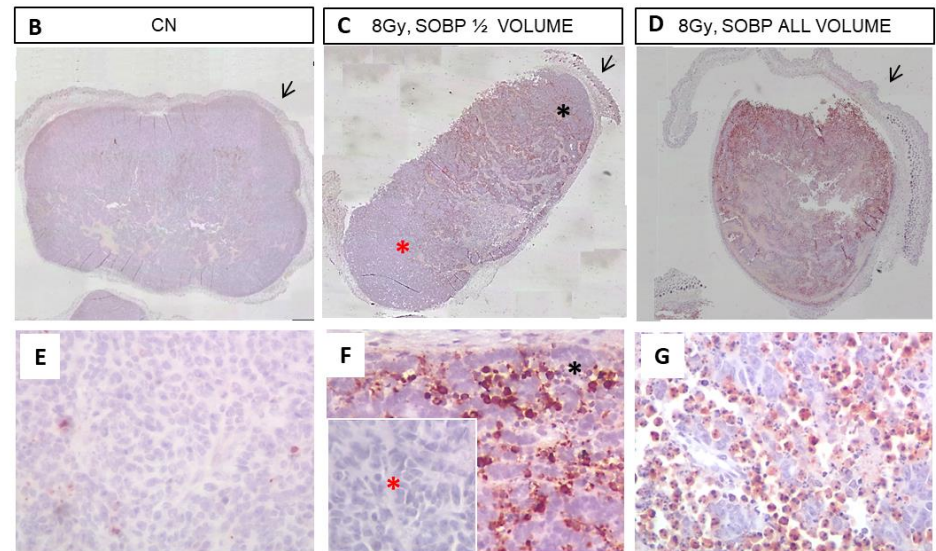
SCOPO: TOP IMPLART non era mai stato precedentemente impiegato su modelli animali. Per realizzare gli irraggiamenti è stato necessario:

- (I) Simulazione SOBP e costruzione range modulator per generare lo SOBP
- (II) Dosimetria con diamante e GAF-EBT3
- (III) Creare una postazione di irraggiamento per gli animali
- (IV) Irraggiamento *in vivo* e verifica della corrispondenza fra l'area di irraggiamento teorica e quella reale



RISULTATI

Area di irraggiamento sperimentale e teorica coincidono

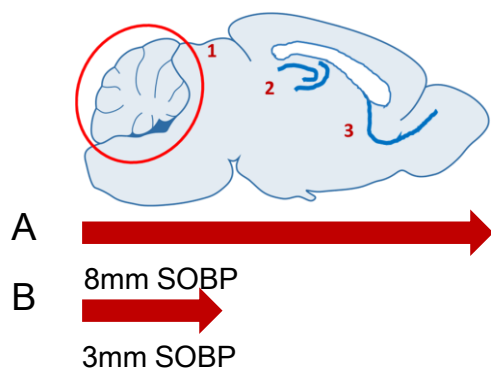


(II) set-up di irraggiamento su cervello di topi neonati

SCOPO: irraggiare un target di dimensione ridotta e struttura complessa

(I) nuova postazione di irraggiamento idonea ad animali neonati

Irraggiamento cervello murino
Di topi neonati

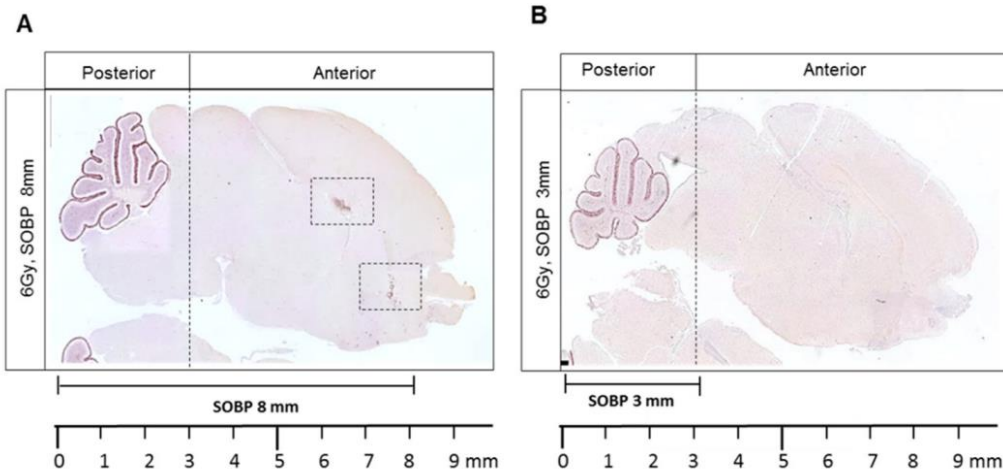


4 ore post irraggiamento analisi
morte cellulare

RISULTATI

(I) Con SOBP di 8mm è marcato cervelletto, ippocampo e RMS

(II) Con SOBP di 3mm è marcato solo il cervelletto



Article

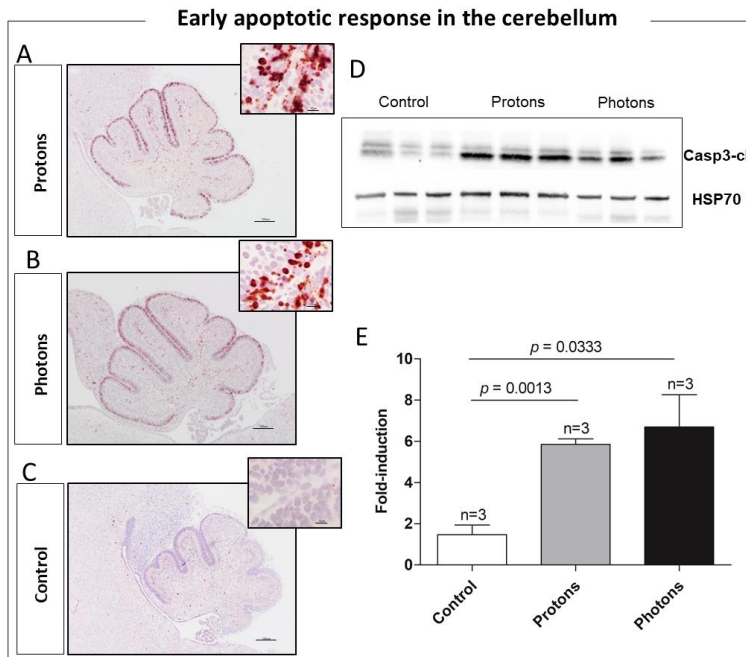
In Vivo Radiobiological Investigations with the TOP-IMPLART Proton Beam on a Medulloblastoma Mouse Model

Daniela Giovannini ¹, Cinzia De Angelis ², Maria Denise Astorino ³, Emiliano Fratini ¹, Evaristo Cisbani ², Giulia Bazzano ³, Alessandro Ampollini ³, Massimo Piccinini ⁴, Enrico Nichelatti ⁵, Emiliano Trinca ³, Paolo Nenzi ³, Mariateresa Mancuso ¹, Luigi Picardi ³, Carmela Marino ¹, Concetta Ronsivalle ³ and Simonetta Pazzaglia ^{1,*}

Studi di oncogenesi con TOP IMPLART

Scopo:

Valutare se i danni al DNA indotti da protoni e fotoni sono ugualmente riparabili misurando la risposta a breve termine (morte cellulare) e a lungo termine (oncogenesi) nel cervelletto



Comparing the effects of irradiation with protons or photons on neonatal mouse brain: Apoptosis, oncogenesis and hippocampal alterations

Daniela Giovannini¹, Francesca Antonelli¹, Arianna Casciati¹, Cinzia De Angelis², Maria Denise Astorino³, Giulia Bazzano³, Emiliano Fratini¹, Alessandro Ampollini³, Monia Vadrucci⁴, Evaristo Cisbani², Paolo Nenzi³, Luigi Picardi³, Anna Saran¹, Carmela Marino¹, Mariateresa Mancuso¹, Concetta Ronsivalle³, Simonetta Pazzaglia⁵

Modello murino neonato
Radiosensibile, Ptch1^{+/-}



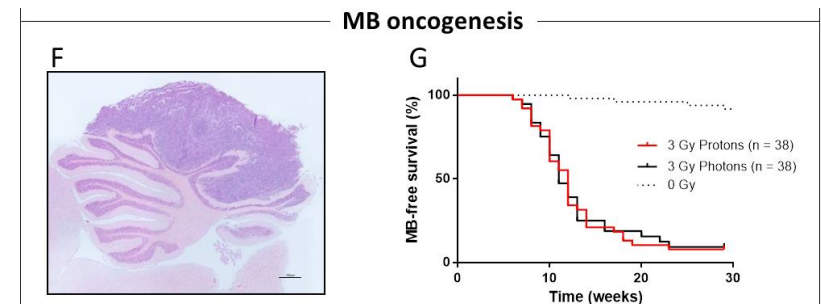
Medulloblastoma

7%

80%

aumento

Risposta a lungo termine: oncogenesi



Conclusioni

- I dati ottenuti hanno dimostrato la possibilità di utilizzare il LINAC TOPIMPLART come facility per l'irraggiamento di modelli murini
 - L'utilizzo di questa facility con modelli murini di MB ha permesso di indagare indirettamente le differenze nell'induzione di danni al DNA fra protoni e fotoni
 - La possibilità di utilizzare TOP IMPLART come facility per l'esposizione di modelli murini è fondamentale per:
 - Condurre studi preclinici sulla radiobiologia dei protoni
 - Valutare differenze biologiche nella risposta fra tessuti sani e tumori
 - Valutare l'RBE
- Progetti futuri:**
Effetto combinato di protoni e ND
Proton Flash Therapy

**ENEA-Dipartimento Sostenibilità,
Circolarità e Adattamento al
Cambiamento Climatico dei Sistemi
Produttivi e Territoriali**

Simonetta Pazzaglia, Mariateresa
Mancuso, Carmela Marino Anna Saran,
Francesca Antonelli, Arianna Casciati,
Emiliano Fratini

Università di Torino
Veronica Varzi, Pietro
Aprà, Sofia Sturari, Lorenzo
Mino, Giulia Tomagra, Federico
Piccolo

Thank you



ENEA-Dipartimento Nucleare

Concetta Ronsivalle, Paolo Nenzi, Luigi
Picardi, Enrico Nichelatti, Massimo
Piccinini, Monia Vadrucci, Maria Denise
Astorino, Giulia Bazzano, Alessandro
Ampollini, Emiliano Trinca, Alessia
Cemmi, Jessica Scifo, Ilaria Di Sarcina,
Mauro Falconieri

**IRCCS Istituto Nazionale Tumori
Regina Elena**
Erminia Infusino, Valeria Landoni

Istituto Superiore di Sanità
Cinzia De Angelis, Evaristo Cisbani