



Il reattore TRIGA Mark II dell'Università di Pavia

Silva Bortolussi^{a,b}, Laura Ciani^c, Saverio Altieri^{a,b},
Sandra Ristori^{c*}, Cinzia Ferrari^d, Aris Zonta^d,
Piero Baglioni^c, Giacomo Martini^c

^aDipartimento di Fisica Nucleare e Teorica
Università di Pavia

^bIstituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN)
Sez. di Pavia

^cDipartimento di Chimica & CSGI
Università di Firenze

^dDipartimento di Chirurgia Sperimentale
Università di Pavia

*ristori@unifi.it

LA BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY:

RICERCA E APPLICAZIONE CLINICA. PARTE 2

Come illustrato nella prima parte di questo articolo, un aspetto fondamentale della BNCT è l'accumulo dell'isotopo ^{10}B nel tumore. Per definire un corretto piano terapeutico, oltre ai nuovi farmaci borurati o a formulazioni più selettive, è necessario mettere a punto metodi efficaci per misurare con precisione la biodistribuzione e la concentrazione del boro nei tessuti sani e tumorali. In questa seconda parte sono descritti i metodi ad oggi disponibili per il trattamento clinico. Questi si basano su analisi effettuate sul paziente alcuni giorni prima dell'intervento e su fattori di concentrazione standard. L'obiettivo è arrivare a conoscere la localizzazione del boro nel paziente in tempo reale.

Misura della concentrazione del boro e imaging

L'aspetto fondamentale dell'accumulo preferenziale del boro nelle cellule tumorali, implica la necessità di misurarne la concentrazione nei tessuti normali e cancerosi. Maggiore è la precisione e la rapidità con cui tali informazioni si riescono ad ottenere, migliore è la qualità del piano di trattamento. Infatti, se si conosce con precisione la distribuzione spaziale e temporale del boro nei tessuti sani e tumorali si possono fissare l'inizio e la durata dell'irraggia-

mento in modo da massimizzare l'effetto terapeutico salvaguardando il tessuto sano. Sono state messe a punto diverse tecniche per la misura del boro, che si dividono in macroscopiche, per ottenere la concentrazione media del boro nei tessuti e nel sangue, e microscopiche, per studiare la distribuzione del boro a livello cellulare e subcellulare. Fra le prime ricordiamo la PGNAA (Prompt Gamma Neutron Activation Analysis). Questo metodo permette di ottenere la concentrazione di boro media in un campione di sangue o tessuto relativamente grande (alcuni grammi).

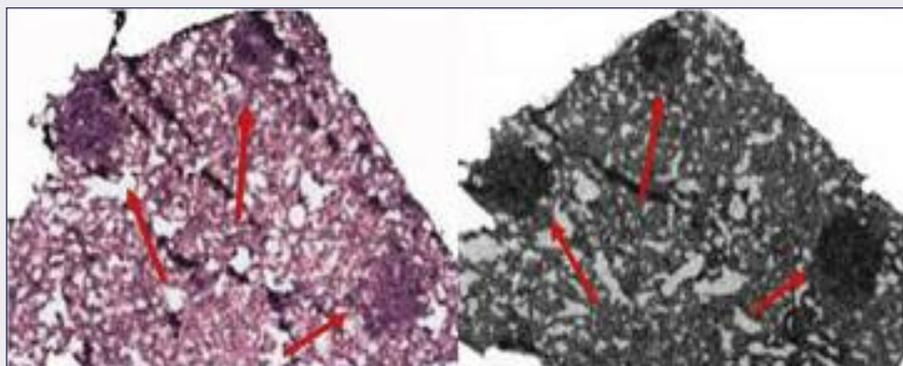


Fig. 1 - Confronto tra la preparazione istologica di una sezione di tessuto polmonare di ratto con metastasi (strutture circolari più scure evidenziate dalle frecce nell'immagine a sinistra) e l'autoradiografia neutronica di una sezione di tessuto contigua (immagine a destra). Nell'autoradiografia si vede che le zone più scure corrispondono alle metastasi, dimostrando l'assorbimento selettivo del boro da parte delle cellule tumorali

Spesso, però, un campione di tessuto prelevato da una zona tumorale è fortemente eterogeneo: può essere composto da tessuto sano infiltrato da cellule tumorali, da zone fibrotiche e necrotiche. Per discriminare le concentrazioni di boro in ciascuna di queste strutture, sono necessarie tecniche più precise, quelle microscopiche, fra cui la SIMS (Secondary Ion Mass Spectroscopy submicrometrica), la spettroscopia alfa e la neutronigrafia. La spettroscopia alfa è un metodo per la misura del boro sviluppato per la prima volta a Pavia [1, 2], e si basa sull'analisi dello spettro dell'energia residua delle particelle cariche generate dall'interazione dei neutroni termici con il boro presente nei campioni che si analizzano. La tecnica consiste nel preparare campioni criogenici da 60 μm di spessore che vengono depositati su supporti di mylar. In seguito vengono irraggiati in una camera a vuoto affacciati a un rivelatore al silicio, che raccoglie le particelle α e i nuclei di litio prodotti dalla reazione con il boro insieme ai protoni prodotti dalla reazione $^{14}\text{N}(n,p)^{14}\text{C}$ con l'azoto presente nei tessuti. Nello spettro risultante si seleziona un'area a cui contribuiscono solo le particelle α , se ne fa l'integrale, e si utilizzano varie informazioni, come la sezione d'urto, lo stopping power nei tessuti e l'efficienza del rivelatore per calcolare la concentrazione di boro nel campione. Se il campione è eterogeneo, lo si confronta con la preparazione istologica di una sezione tagliata immediatamente dopo la sezione irraggiata. La misura dell'area tumorale permette di valutare correttamente la concentrazione del boro nelle cellule tumorali e nelle altre strutture.

Un'altra tecnica usata da molti anni consiste nel costruire immagini della distribuzione del boro in tessuto con l'autoradiografia neutronica [3]. Si depositano campioni criogenici analoghi a quelli descritti prima su supporti di CR-39, un materiale insensibile alla luce ma sensibile alle particelle cariche ad alto LET (Linear Energy Transfer), come α e ^7Li . Le particelle cariche che escono dal campione durante l'irraggiamento lasciano tracce latenti nel CR-39, che sono rese visibili grazie a un etching in soda caustica. I parametri dell'autoradiografia, come il tempo di irraggiamento, il tempo di etching e la concentrazione dell'NaOH

si possono variare a seconda del risultato che si intende ottenere. È infatti possibile usare questo metodo per ottenere immagini della biodistribuzione del boro (imaging) o per misurare la densità di tracce create nella pellicola per ottenere la concentrazione di boro grazie a un'appropriata calibrazione.

A Pavia si usa il metodo come imaging per i tessuti, che serve come verifica dell'accumulo selettivo del boro nel tumore. Dopo l'etching, le zone del campione con maggiore concentrazione di boro, risultano più scure sulla pellicola. Quindi, confrontando un'immagine neutronigrafica e una istologica si possono mettere in relazione le zone

tumorali con le zone a più alta concentrazione di boro (Fig. 1) [4]. Le immagini ottenute irraggiando i campioni con una minore fluenza e sviluppate opportunamente possono essere usate per misure quantitative della concentrazione. A questo scopo è necessario calibrare il metodo usando campioni dello stesso tipo di quelli che vanno misurati con concentrazioni di boro note. Tale tecnica è usata anche nel progetto PHONES, in cui si è messa a punto una tecnica per misurare la concentrazione di boro in tessuti polmonari umani in cui viene infuso il boro *ex-vivo* [5].

La determinazione macroscopica del boro può essere effettuata mediante apparecchi di analisi che hanno una sorgente ICP (Inductively Coupled Plasma) accoppiata con un rivelatore ad emissione atomica, ICP-AES, oppure basato sulla spettrometria di massa, ICP-MS [6, 7]. Entrambe queste varianti del metodo si basano su strumenti non eccessivamente costosi e commerciali. Inoltre, le tecniche ICP sono molto sensibili e consentono di rilevare fino a 0,1 ppm di boro, facendo uso di piccoli volumi (0,5-1 ml), ottenuti solubilizzando per digestione campioni di tessuto o di fluidi biologici. Tuttavia, la determinazione richiede alcune ore e può essere affetta da problemi legati a contaminazione dovuta a contatto con il vetro, o ad effetti "memoria" sul rivelatore.

Un risultato molto utile sarebbe quello di poter avere le informazioni sulla concentrazione del boro nei diversi tessuti *in vivo* e poco prima dell'irraggiamento. Ciò si può ottenere se al farmaco che veicola il boro si lega un tracciante che può essere visto con la risonanza magnetica o con la PET (Positron Emission Tomography).

Presso il CNR di Pisa, si usa la molecola $L\text{-}^{18}\text{F}\text{-BPA}$ insieme alla PET/CT per misurare i valori della concentrazione del boro nel tumore e nei tessuti sani di pazienti [8]. Infatti, visto che la BNCT dipende criticamente dal rapporto di concentrazioni che si riesce ad ottenere tra tumore e tessuto sano, con la PET è possibile studiare caso per caso l'assorbimento selettivo del boro e capire l'eleggibilità o meno di singoli pazienti per questo tipo di terapia, con un metodo semplice e poco invasivo.

Per quanto riguarda l'uso dell'NMR, a Roma presso il CNR e l'U-

niversità La Sapienza si studia la farmacocinetica e la distribuzione spaziale della molecola ^{19}F -BPA, con tecniche di risonanza magnetica NMR che includono anche esperimenti di imaging (MRI) sul nucleo ^{19}F [9]. Studi effettuati su ratti con tumori cerebrali hanno dimostrato che le tecniche di risonanza magnetica nucleare permettono di mappare selettivamente la distribuzione di ^{19}F -BPA per studiarne la farmacocinetica. Su questo fronte è appena iniziato anche a Pavia un progetto di ricerca finanziato da Cariplo per misurare la concentrazione di boro utilizzando l'NMR di opportuni traccianti legati alla BPA.

Dosimetria

Un altro aspetto fondamentale della fisica della BNCT è la dosimetria in campi misti, in quanto si tratta di misurare la dose di radiazione assorbita dai tessuti in campi costituiti da diverse componenti: neutroni, gamma, particelle cariche. In questa situazione la dosimetria tradizionale non è in grado di rendere conto di tutti gli effetti, soprattutto perché gli effetti biologici, a parità di dose assorbita, sono diversi per ciascun tipo di radiazione. Inoltre la dosimetria standard non tiene conto del deposito di energia a livello cellulare, che è il parametro di maggiore interesse in BNCT. Per questo è necessario mettere a punto tecniche microdosimetriche per studiare il campo di radiazione nella posizione di irraggiamento. In Italia le tecniche che si usano e che si stanno sviluppando riguardano la costruzione di un microdosimetro presso i Laboratori Nazionali di Legnaro dell'INFN [10] e l'uso di gel tessuto equivalente per fantocci dosimetrici presso l'Università di Milano [11].

La radiobiologia della BNCT

Un campo fondamentale nella ricerca in BNCT è la radiobiologia, per studiare gli effetti della radiazione sia sul tumore, sia, soprat-

tutto, sui tessuti sani. Esperimenti di radiobiologia per BNCT si possono fare *in vitro* su cellule che vengono coltivate in presenza di borocomposti e poi irraggiate, oppure *in vivo* utilizzando animali. Gli esperimenti *in vitro* sono stati svolti a Pavia all'inizio della ricerca sul fegato per determinare la sopravvivenza cellulare in funzione della dose assorbita utilizzando colture cellulari di adenocarcinoma del colon murino.

Fin dall'inizio della ricerca molti ratti sono stati trattati per valutare la possibilità di irraggiare un organo espantato e di reimpiantarlo nel paziente. In seguito, per la ricerca sul polmone si è programmata una serie di irraggiamenti presso il reattore di ratti con metastasi polmonari opportunamente schermati per preservare i tessuti sani. Questo permetterà di valutare la regressione del tumore e la sopravvivenza degli animali che subiscono l'intera procedura BNCT [12].

Presso l'Università di Padova è attualmente in corso uno studio per l'applicazione di BNCT a melanoma cutaneo e al tumore polmonare. Esperimenti di radiobiologia *in vivo* sono già stati condotti al reattore TAPIRO a Roma [13] e, non appena sarà pronto il fascio neutronico presso i Laboratori Nazionali INFN di Legnaro, potrà essere avviata l'attività clinica su pazienti.

L'applicazione clinica a Pavia

La ricerca ventennale svolta presso l'INFN e l'Università di Pavia è culminata nell'applicazione clinica della BNCT su due pazienti affetti da metastasi epatiche da adenocarcinoma del colon [14, 15]. Il progetto, chiamato TAOrMINA [16], ha proposto l'innovativa tecnica dell'autotrapianto per poter trattare organi espantabili completamente invasi da metastasi e quindi non chirurgicamente trattabili. L'applicazione clinica si è rivolta in particolare alle metastasi epatiche da adenocarcinoma del colon, che sono la causa di prognosi infauste anche in pazienti in cui il carcinoma primario è stato rimosso con successo. Spesso queste metastasi si concentrano solo nel fegato, quindi, curando l'organo si può garantire una maggiore sopravvivenza e una migliore qualità di vita ai pazienti. Il primo paziente è stato trattato nel dicembre 2001, il secondo nel luglio 2003. La procedura prevedeva l'infusione per via sistemica del BPA, l'espanto dell'organo, l'irraggiamento del fegato isolato e mantenuto a bassa temperatura nella colonna termica del reattore TRIGA Mark II di Pavia, e il successivo reimpianto (Fig. 2).

Durante l'operazione per l'espanto, sono state prelevate biopsie per la misura della concentrazione di boro nei tessuti sani e tumorali. Il rapporto fra le concentrazioni nel tessuto tumorale e sano era superiore a 5 nei due casi ed il tempo di irraggiamento è stato di soli 10 minuti circa. Dal punto di vista dell'efficacia della terapia, è stato dimostrato che la BNCT è in grado di trattare selettivamente le metastasi ad alto grado di infiltrazione nel tessuto sano. Infatti, dopo pochi giorni dall'intervento, un'analisi TAC del fegato del primo paziente mostrava tessuto necrotico al posto del



Fig. 2 - Trolley con l'organo espantato prima dell'ingresso nella colonna termica del reattore TRIGA Mark II. L'organo è contenuto in un apposito contenitore per permettere l'irraggiamento, mantenendo sia la sterilità che la bassa temperatura

tessuto tumorale precedentemente diagnosticato. Inoltre erano evidenti tracce di tessuto necrotico e cicatriziale in luoghi dove il tumore non poteva essere riconosciuto prima dell'intervento. Come discusso in precedenza, la selettività della BNCT rende possibile anche trattare micro-metastasi e cellule sparse che sfuggono ai mezzi diagnostici. In entrambi i casi, quindi, le metastasi epatiche sono state distrutte. Il primo paziente ha superato l'intervento e la fase post-operatoria, godendo di una buona qualità della vita per 44 mesi dopo l'intervento. La ricomparsa di metastasi diffuse sia epatiche che extra-epatiche ne hanno infine causato la morte. Studi si stanno compiendo per interpretare la causa di queste recidive, che probabilmente si possono spiegare con la presenza di cellule staminali tumorali che hanno un diverso metabolismo e quindi un diverso accumulo del boro. Il secondo paziente non è riuscito a superare la fase post-operatoria a causa di una cardiomiopia dilatativa progressiva che ne ha causato la morte 33 giorni dopo l'intervento.

Fino ad oggi non sono stati trattati altri pazienti con questo metodo; i gruppi di ricerca coinvolti attendono l'approvazione di un nuovo protocollo per un trial con più pazienti che possa fornire risultati statisticamente rilevanti. Intanto in altri due Paesi, Germania e Argentina, si sta lavorando per mettere a punto questa tecnica e poterla applicare a più pazienti.

In attesa che le condizioni per riprendere la sperimentazione sull'uomo si verifichino, i gruppi di ricerca coinvolti nella BNCT a Pavia proseguono gli studi per applicare questa terapia ai tumori polmonari, in questo caso senza espianto dell'organo. La bassa densità del tessuto polmonare rende infatti possibile l'irraggiamento del torace con fasci di neutroni epitermici esterni [17]. Altre applicazioni cliniche che si perseguono sono il trattamento del melanoma cutaneo [18] e delle sue metastasi al polmone, e i gliomi cerebrali [19].

Conclusioni

La BNCT è un'opzione terapeutica interessante nel caso di tumori oggi considerati incurabili perché non rispondono alla chemioterapia, non si possono trattare con la radioterapia convenzionale oppure non sono asportabili chirurgicamente. Tra questi un caso tipico è rappresentato dalle metastasi che invadono interi organi e che a volte non sono neppure rivelabili con gli attuali sistemi di diagnostica. In tali casi, avendo a disposizione un trasportatore capace di concentrare atomi di boro nel tumore in misura molto maggiore che nelle cellule sane, diviene possibile irraggiare tutto l'organo (espiantato o no) e l'effetto terapeutico è garantito insieme ad un sostanziale risparmio dei tessuti sani. Per arrivare alla BNCT come trattamento di routine negli ospedali è però necessario superare i trials clinici e, per questo, si sta ancora lavorando all'ottimizzazione di tutti gli aspetti della tecnica: sorgenti di neutroni, trasportatori del boro, dosimetria, piani di trattamento e radiobiologia.

Un aspetto fondamentale della BNCT è l'accumulo di boro nel tumore. Affinché l'irraggiamento sia più breve e più efficace, sono auspicabili nuovi farmaci o formulazioni più selettive di quelle attuali; inoltre per poter definire il piano di trattamento bisogna saper misurare con precisione la concentrazione di boro nei tessuti sani e tumorali. Questi due obiettivi richiedono sforzi sia dal punto di vista chimico e farmacologico, sia fisico e biologico. Infatti, oltre alla sintesi di nuovi composti borurati, è necessario mettere a punto vettori efficaci e metodi per visualizzarne la distribuzione nei tessuti a livello cellulare e possibilmente sub-cellulare, nonché metodi quantitativi per determinarne la concentrazione. Fino ad oggi la strada che è stata seguita da molti gruppi di ricerca è stata la seguente: dopo l'infusione del boro nel paziente si prelevano campioni di tessuti e sangue, si misura la concentrazione di boro e si prepara il piano di trattamento. Spesso queste misure vengono effettuate alcuni giorni prima dell'irraggiamento oppure viene misurata soltanto la concentrazione di boro nel sangue e vengono applicati fattori di concentrazione considerati acquisiti in esperimenti precedenti. Senza dubbio, però, sarebbe meglio misurare il boro *in vivo* per ciascun paziente, senza prelevare campioni, ed ottenere i risultati in tempi brevi, poco prima che l'irraggiamento abbia luogo. Bisogna quindi approfondire la ricerca sull'imaging quantitativo del boro con metodi PET ed NMR, in modo che uno scanner del paziente dopo l'infusione della formulazione per veicolare il farmaco fornisca le concentrazioni per stabilire l'inizio e la durata dell'irraggiamento.

Concludendo, possiamo dire che la BNCT è un campo di ricerca medica in espansione: le sue potenzialità per il trattamento di alcuni tipi di tumore sono indubbie. Tuttavia sono ancora necessari trials clinici randomizzati, ovvero prove impegnative, che coinvolgono molte risorse sia umane che economiche. Per questo sarebbe auspicabile un maggior coinvolgimento di industrie farmaceutiche che si facciano promotrici della ricerca e della produzione di nuove sostanze, oltre che di enti pubblici e privati per lo sviluppo della tecnologia connessa a nuove sorgenti neutroniche, più accessibili dei reattori in campo medico. Inoltre, potrebbe essere estremamente utile combinare la BNCT con terapie già in uso, quali la chemioterapia, la radioterapia con fotoni, la radioterapia con neutroni veloci e la fototerapia.

In alcuni Paesi del mondo sono aperti trials clinici per l'applicazione della BNCT al trattamento di glioblastoma multiforme, del melanoma e di tumori recidivi del capo-collo; inoltre sono state trattate le metastasi epatiche da adenocarcinoma del colon e tumori del polmone.

In Italia la multidisciplinarietà della ricerca in BNCT è ben rappresentata da molti gruppi che si dedicano alle varie discipline. La situazione nazionale e internazionale è stata descritta in occasione del 13° International Congress on Neutron Capture Therapy, che si è svolto a Firenze a novembre 2008 [20, 21]. In quella

occasione è stata lanciata l'idea di organizzare i gruppi italiani in una rete con lo scopo di ottimizzare la circolazione dei risultati e la collaborazione tra le diverse competenze sparse sul territorio.

Ringraziamenti: Gli autori ringraziano il prof. A. Beccioli e la dott. M. Balzi (Dip. Fisiopatologia Clinica, Univ. Firenze), il prof. G. Ricciardi (Dip. Chimica, Univ. Basilicata) e il prof. L. Panza (Dip. Farmacia, Univ. Piemonte Orientale) per il contributo fondamentale dato allo sviluppo del progetto di applicazione della BNCT in ambito nazionale e internazionale.

Bibliografia

- [1] D. Chiaraviglio *et al.*, *Strahlentherapie und Onkologie*, 1989, **165**, 170.
- [2] A. Wittig *et al.*, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2008, **68**, 66.
- [3] R.V. Griffith, L. Tommasino, in *Dosimetry of Ionising Radiations*, K. Kase, B.B. Bjargard, F.H. Attix (Eds.), Academic Press, Berkeley, 1991, vol. 3, 323.
- [4] S. Altieri *et al.*, *Applied Radiation and Isotopes*, 2008, **66**, 1850.
- [5] P. Borasio *et al.*, Proc. of 13th International Congress on Neutron Capture Therapy, S. Altieri *et al.* (Eds.), ENEA, Bologna, 2008.
- [6] S.R. Tamat *et al.*, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 2161.
- [7] S. Linko *et al.*, *Scandinavian J. of Clin. and Lab. Invest.*, 2008, **68**, 696.
- [8] L. Menichetti *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S351.
- [9] P. Porcari *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S365.
- [10] D. Moro *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S171.
- [11] E. Vanossi *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S195.
- [12] N. Protti *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S210.
- [13] J. Esposito *et al.*, *Nuclear Instruments and Methods B*, 2008, **266**, 2587.
- [14] A. Zonta *et al.*, *J. of Phys. Conf. Series*, 2006, **41**, 484.
- [15] A. Zonta *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.* 2009, **67**, S67.
- [16] T. Pinelli *et al.*, in *Research and Development in Neutron Capture Therapy*, W. Sauerwein *et al.* (Eds.), Monduzzi Editore, Bologna, 2002, 1065.
- [17] S. Bortolussi *et al.*, in *Advances in Neutron Capture Therapy*, Y. Nakagawa *et al.* (Eds.), Proc. of ICNCT-12, Takamatsu, Japan, 2006, 91.
- [18] C. Ceballos, J. Esposito, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S274.
- [19] S. Capuani *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, 2009, **67**, S34.
- [20] Proc. of 13th International Congress on Neutron Capture Therapy, S. Altieri *et al.* (Eds.), ENEA, Bologna, 2008 (www.pv.infn.it/icnct-13/committees_icnct.html).
- [21] *Applied Radiation and Isotopes - 13th International Congress on Neutron Capture Therapy*. BNCT: a new option against cancer. Guest editors: S. Altieri, R.F. Barth, S. Bortolussi, L. Riveda, A. Zonta, 2009, **67**.

La Società Chimica Italiana su Internet

Sito web della Sci: www.soc.chim.it

È anche attiva una mailing list all'indirizzo: SCI-list@list.cineca.it

Altri siti attivi sono:

Gruppo Giovani: www.scigiovani.it

Sezione Campania: www.scicampania.unina.it/index.htm

Sezione Lazio: www.soc.chim.it/sezioni/lazio

Sezione Liguria: www.chimica.unige.it/sci/

Sezione Lombardia: www.sci-lombardia.org/

Sezione Veneto: www.chimica.unipd.it/sci/pubblica/

Divisione di Chimica Ambientale e dei Beni Culturali:
www.socchimdabc.it/

Divisione di Chimica Analitica:
www.soc.chim.it/divisioni/chimica_analitica

Divisione di Chimica Fisica:
www.soc.chim.it/divisioni/chimica_fisica

Divisione di Chimica Industriale: www.chimind.it/

Divisione di Chimica Inorganica: <http://dci.mfn.unipmn.it/>

Divisione di Chimica Organica:
www.soc.chim.it/divisioni/chimica_organica

Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici:
www.soc.chim.it/divisioni/chimbio

Divisione di Didattica Chimica: www.didichim.org/

Divisione di Elettrochimica: <http://users.unimi.it/scielettrochimica/>

Divisione di Chimica Farmaceutica:
<http://dcf.frm.uniroma1.it/cgi-bin/home.pl>

Divisione di Spettrometria di Massa:
www.soc.chim.it/divisioni/spettrometria_di_massa

Gruppo Interdivisionale Catalisi:
www.soc.chim.it/it/gruppi_interdivisionali/catalisi

Gruppo Interdivisionale Chimica Computazionale:
www.soc.chim.it/it/gruppi_interdivisionali/chimica_computazionale

Gruppo Interdivisionale di Chimica Strutturale:
www.chim.unipr.it/chimica/link.htm