



*Ministero dello Sviluppo Economico*

**Gestione di un Servizio integrato multicentrico di diagnostica e Terapia personalizzata in Oncologia (Ge.Se.T.On.)**

**DM MISE 1 GIUGNO 2016 "GRANDI PROGETTI R&S – PON 2014/2020" – AGENDA DIGITALE E INDUSTRIA SOSTENIBILE**

**Prog n. F/090012/01-02/X36 - CUP: B88117001000008 - COR: 248172**

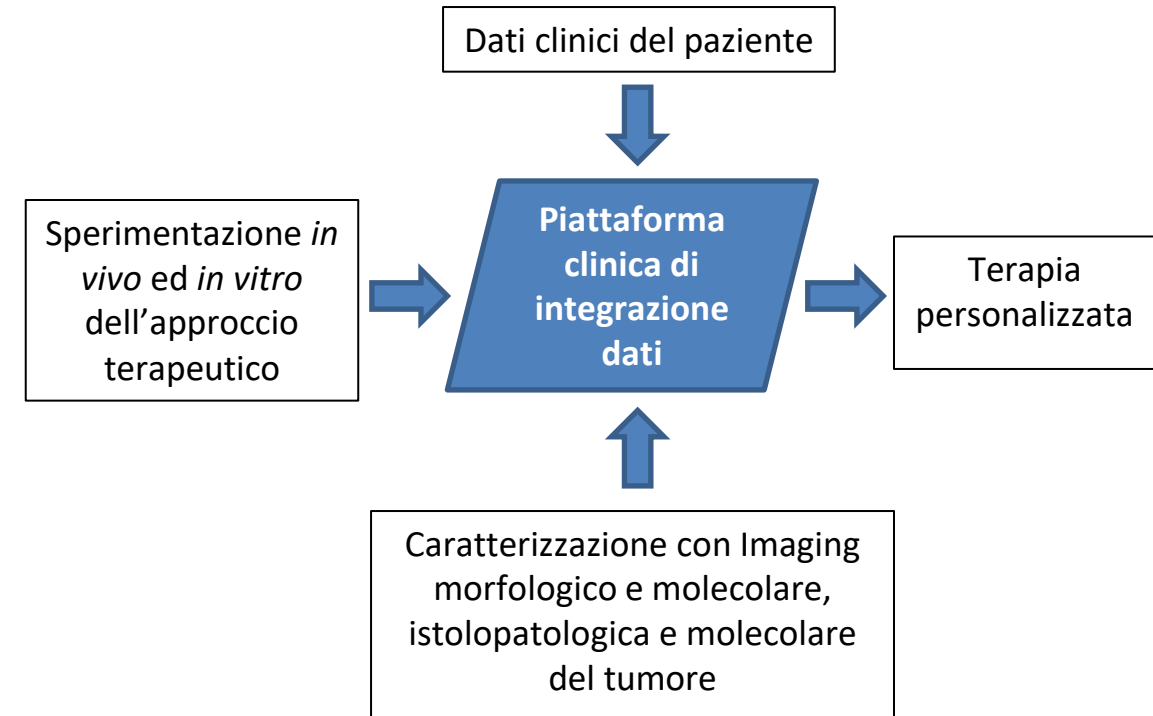
**(Inizio Progetto 01/12/2017 - Fine Progetto 30/11/2021)**



## FINALITÀ:

Realizzazione di un servizio integrato di diagnostica e terapia personalizzata in oncologia, con specifico riguardo al tumore alla prostata ed alla mammella.

- Realizzazione di un servizio diagnostico avanzato (clinica e ricerca), dedicato alla caratterizzazione con Imaging avanzato e con metodi istopatologici e biomolecolari del tumore.
- Utilizzo di frammenti bioptici tumorali del paziente per studi *in vitro* ed *in vivo*, tesi a valutare un approccio terapeutico individualizzato, che tenga conto delle specificità della patologia tumorale del paziente.
- Identificazione di biomarcatori predittivi di risposta al trattamento.
- Produzione del prototipo di kit diagnostico predittivo e di risposta ai trattamenti.





## OUTPUT PROCESSI

**Processo/Servizio:** La realizzare di un “Servizio di diagnostica molecolare e terapie avanzate in oncologia” in provincia di Palermo, che avvicini la ricerca alla clinica, grazie alle prestazioni realizzate in laboratori, che sono stati predisposti per l’accreditamento secondo le norme ISO 15189, presenti presso la struttura ospedaliera coinvolta nel progetto. Il servizio è stato completato da una piattaforma ICT, grazie alla quale i reparti e laboratori condividono in rete le informazioni relative ai pazienti con carcinoma della prostata e della mammella.

*Per questo motivo, la piattaforma tecnologica realizzata si configura come strumento per il miglioramento dei processi e servizi di cura e approfondimento diagnostico in ambito oncologico per i decenni futuri.*

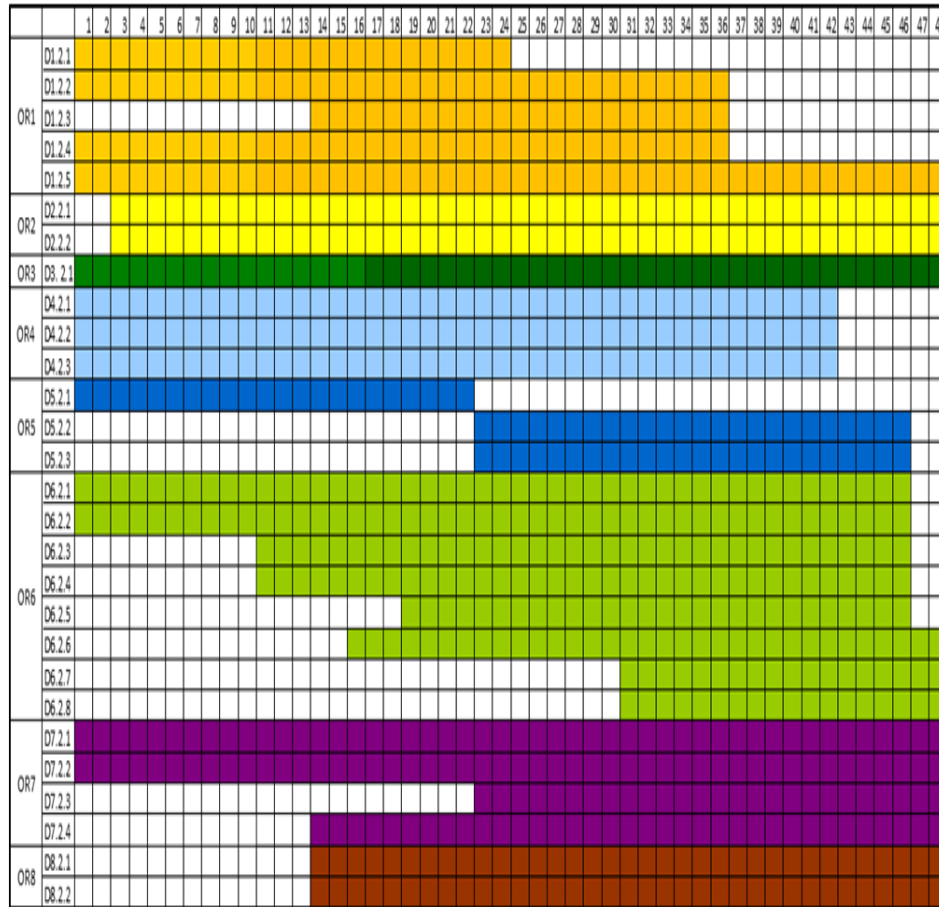
L’obiettivo finale di questo progetto ha sicuramente un valore aggiunto nell’essere realizzato in Sicilia, che come il resto del Sud Italia, ha un costante esodo di pazienti oncologici verso le strutture ospedaliere del Nord Italia, dove percorsi diagnostico-terapeutici avanzati e terapie sperimentali di ultima generazione, sono una realtà più consolidata.



## OUTPUT PRODOTTI

- ✓ **L'infrastruttura tecnologica** costituita da laboratori messi in rete ed accreditabili secondo la norma ISO 15189.
- ✓ **Biomarkers predittivi di prognosi o di risposta al trattamento**, grazie ai dati di approfondimento di Imaging e di biologia molecolare.
- ✓ **Potenziali molecole** con attività radiosensibilizzante.
- ✓ **Nuovi Kit diagnostici**. Realizzazione del prototipo di un kit per la ricerca della Sarcosina, metabolita della glicina, marcatore riconosciuto del grado di invasività del tumore alla prostata.

**Progetto Ge.Se.T.On. diagramma temporale**



OR	Soggetto beneficiario	Titolo OR	Spese sostenute nel periodo di riferimento
1	Gesan Com Srl Fondazione G. Giglio	Progettazione dei Moduli e del Network	Spese di personale
2	Fondazione G. Giglio	Realizzazione dei Moduli e del Network	Spese di personale e apparecchiature
3	Fondazione G. Giglio	Pianificazione dei laboratori secondo la norma ISO 15189 (RI)	Spese di personale e consulenza
4	Fondazione G. Giglio	Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetica-molecolare del campione tissutale (RI)	Spese di personale, attrezzature e consumabili
5	Fondazione G. Giglio	Creazione di un modello animale del tumore alla prostata ed alla mammella (AVATAR) per lo studio della terapia personalizzata (RI)	Spese di personale e consulenza
6	Fondazione G. Giglio	Radiobiologia in vitro ed in vivo (RI)	Spese di personale e consulenza
7	Fondazione G. Giglio	Analisi dei dati	Spese di personale e consulenza
8	Gesan Com Srl	Creazione dei kit diagnostici	Spese di personale e consumabili



**OR2: Realizzazione dei Moduli e del Network (SS).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 90%

**Descrizione:**

Realizzazione dei laboratori diagnostici e di ricerca da destinare ai nuovi laboratori di Anatomia Patologica, di Diagnostica Molecolare, laboratori di ricerca di Colture Cellulari e Genomica.

**Attività svolte:**

- In merito alle scelte, obbligate anche dall'emergenza pandemica, si è deciso di abbandonare il progetto di realizzazione di un nuovo spazio per i Laboratori e di ampliare, implementandoli i Laboratori già presenti: sia quello di Biologia Molecolare presente al 1° Piano, sia il Laboratorio di Anatomia Patologica presente al Piano -2.
- E' stato acquisito a noleggio nel 2019 il sistema PACS per la gestione, archiviazione e trasmissione di immagini provenienti dal reparto di Diagnostica per Immagini, unito ad alcune workstation di refertazione.
- In merito al Sistema Ospedaliero Integrato si è proceduto al suo sviluppo come da cronoprogramma. Ecco la situazione aggiornata al momento attuale:

<b>Moduli installati</b>	<b>Moduli da installare</b>
•Area Ambulatoriale (Cup, Accettazione ticket, FLUSSO C)	•ADT accettazione, dimissione e trasferimento:
•Verticali/Sistemi dipartimentali:	•Accettazione amministrativa
•Ris-PACS	•Assegnazione letto
•LIS (weblab)	•Gestione trasferimenti reparti
•Verticale di Endoscopia (Edox)	•SDO
•Anatomia patologica (Pathox)	•Lettera di dimissione
•PACS VNA – Respository Clinico	•Cartella Clinica Ricoveri:
•Portale referti on line	•Anamnesi
•Sistema di Prenotazioni e pagamenti on line	•Esame obiettivo
•Modulo di Pronto Soccorso	

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
OR2	D2.2.1																																																
	D2.2.2																																																

**OR3: PIANIFICAZIONE DEI LABORATORI SECONDO LA NORMA ISO 15189 (RI).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 100%

## Descrizione: Studio di Pianificazione dei laboratori secondo la norma **ISO 15189**.



**Attività svolta:** La Fondazione G. Giglio si è avvalsa della consulenza dell'Istituto Zooprofilattico della Sicilia (IZSSI) per la predisposizione e progettazione dei nuovi laboratori pianificati nell'OR1, in rispondenza alla norma ISO 15189. A tal fine, l'IZSSI ha coinvolto il proprio personale contrattualizzato *ad hoc*, per supportare la fase di realizzazione del progetto di massima con incontri dedicati e materiale informativo, al fine di soddisfare tutti i requisiti di sicurezza e qualità previsti dalla norma.

Si è provveduto alla prima stesura del manuale di qualità, contenente i seguenti capitoli:

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE
2. RIFERIMENTI NORMATIVI
3. TERMINI E DEFINIZIONI
4. REQUISITI DI GESTIONE
5. REQUISITI TECNICI

In atto il Manuale di Qualità è in fase di composizione/integrazione rispetto alla bozza fornita dall'IZSSI in relazione alle normative già presenti nell'Istituto G. Giglio di Cefalù.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
OR3	D3. 2.1																																																



**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).**

Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

**Descrizione:**

L'OR4 ha previsto l'arruolamento dei pazienti con carcinoma alla prostata ed alla mammella da destinare agli approfondimenti di Imaging avanzato, istopatologici e molecolari e al reperimento delle colture primarie da utilizzare per le successive prove *in vitro* ed *in vivo*.

**Sono stati approvati i Protocolli Clinici e Osservazionali dal Comitato Etico di Palermo 1**

**Responsabile è il Dott. Massimiliano Spada.**

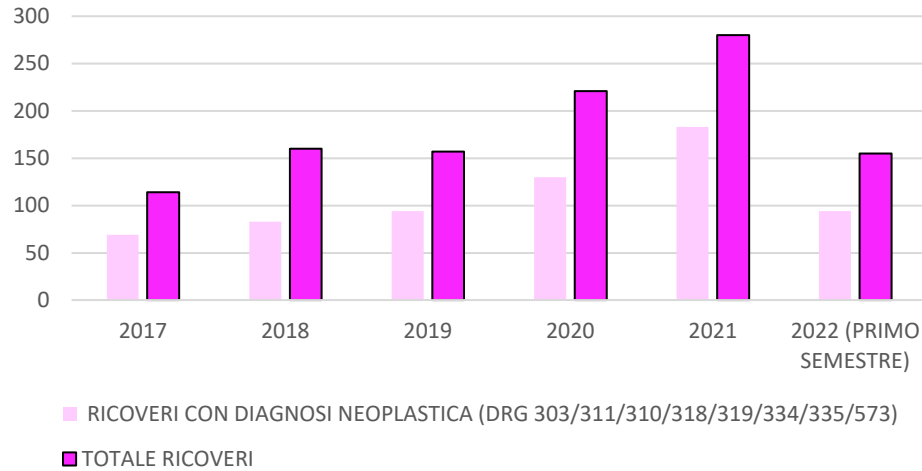
**4.1 Selezione Pazienti affetti da adenocarcinoma prostatico:**

- **Reclutamento pazienti** (età > 18 anni) affetti da ca prostata; 6 (3+3) < GS > 10 (5+5), qualsiasi T ed N, M0), PSA significativamente aumentato
- **Accertamenti richiesti:**
  - Valutazione Imaging RM ad alto campo o PET con colina
  - PSA libero e totale
  - Prelievo campione tissutale con biopsia Fusion TRUS-MR
  - Esame istologico e molecolare
  - Gleason
- **Prelievo chirurgico di tessuto tumorale da trasferire ad OR5-6**

**4.2 Selezione Pazienti affetti da adenocarcinoma mammario:**

- **Reclutamento pazienti** (età > 18 anni) affetti da ca mammella (T2-T3, qualsiasi N, M0)
- **Accertamenti richiesti:**
  - Valutazione ecografica e di Imaging RM ad alto campo o PET con FDG
  - Prelievo campione bioptico a guida ecografica o RM
  - Esame istologico e molecolare
- **Prelievo chirurgico di tessuto tumorale da trasferire ad OR5-6**

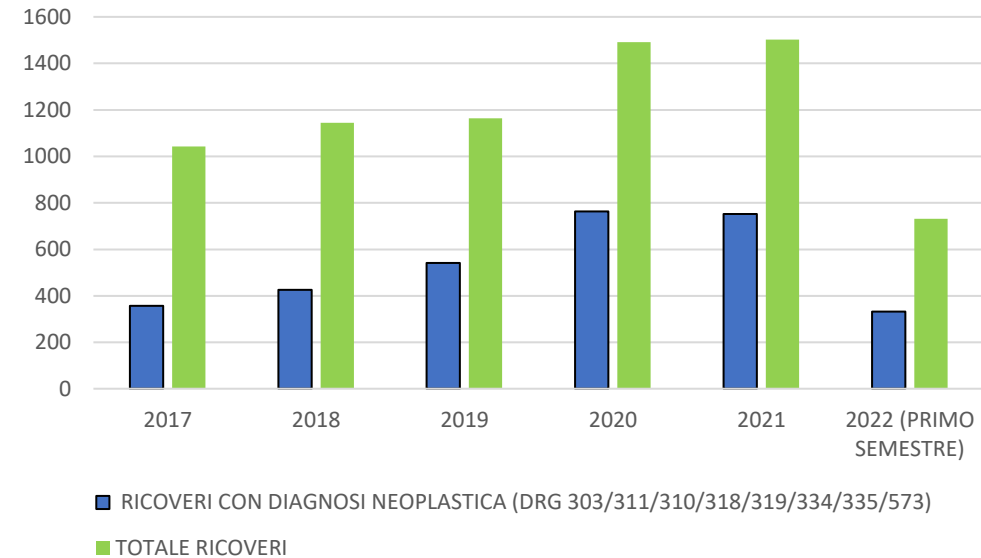
**RICOVERI U.O. BREAST UNIT**



RICOVERI BREAST UNIT	RICOVERI CON DIAGNOSI NEOPLASTICA (DRG 257/258/259/260)	TOTALE RICOVERI	%
<b>ANNO</b>			
2017	69	<b>114</b>	60,53
2018	83	<b>160</b>	51,88
2019	94	<b>157</b>	59,87
2020	130	<b>221</b>	58,82
2021	183	<b>280</b>	65,36
2022 (PRIMO SEMESTRE)	94	<b>155</b>	60,65

RICOVERI UROLOGIA	RICOVERI CON DIAGNOSI NEOPLASTICA (DRG 303/311/310/318/319/334/335/573)	TOTALE RICOVERI	%
<b>ANNO</b>			
2017	357	<b>1042</b>	34,26
2018	426	<b>1144</b>	37,24
2019	542	<b>1164</b>	46,56
2020	763	<b>1491</b>	51,17
2021	752	<b>1502</b>	50,07
2022 (PRIMO SEMESTRE)	332	<b>732</b>	45,36

**RICOVERI U.O. UROLOGIA**



AMBULATORIO GENERALE –  
AMBULATORI DEDICATI



SELEZIONE PZ PER PATOLOGIA  
1500 DONNE MAMMELLA  
700 UOMINI PROSTATA



SELEZIONE PER  
PATOLOGIA E  
STADIAZIONE DI  
MALATTIA

UOMINI K PROSTATA  
METASTATICI



UOMINI PSA+  
K PROSTATA  
ARRUOLABILI



DONNE K  
MAMMELLA  
< T2 O M+

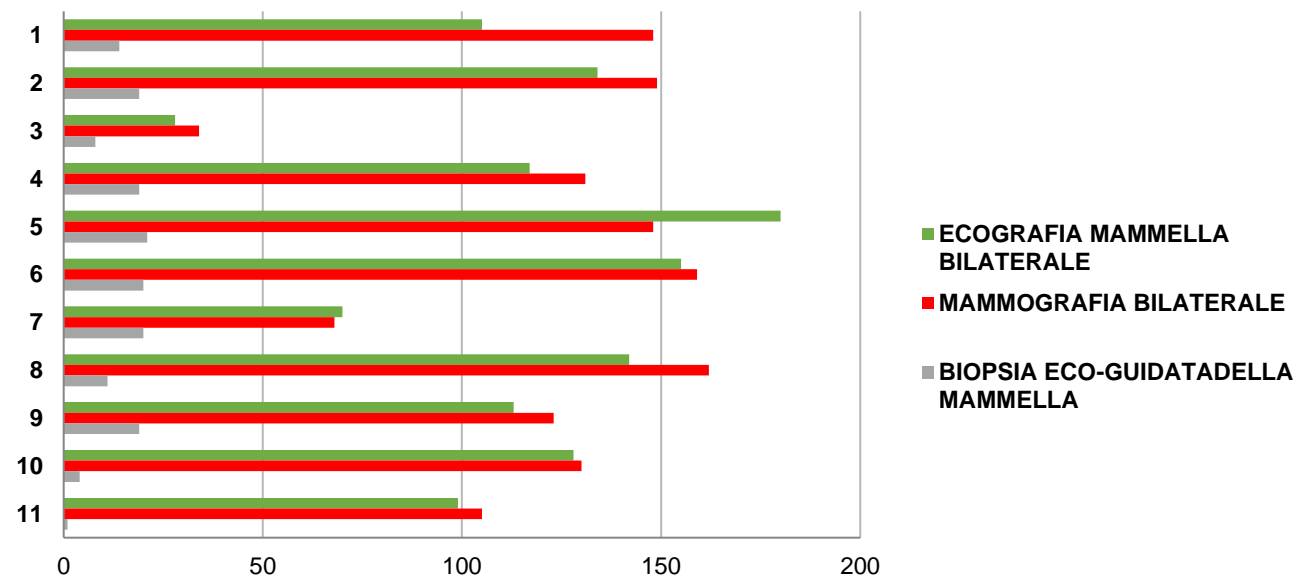


DONNE K  
MAMMELLA  
> T2  
ARRUOLABILI



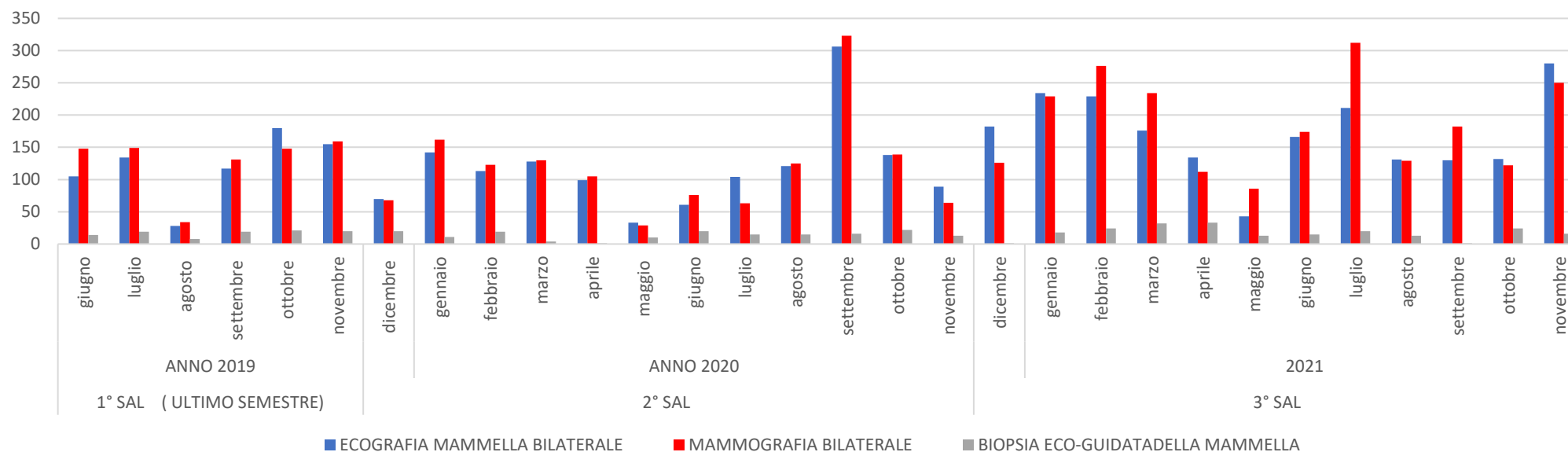
## DATI AMBULATORIALI\_SENOLOGIA

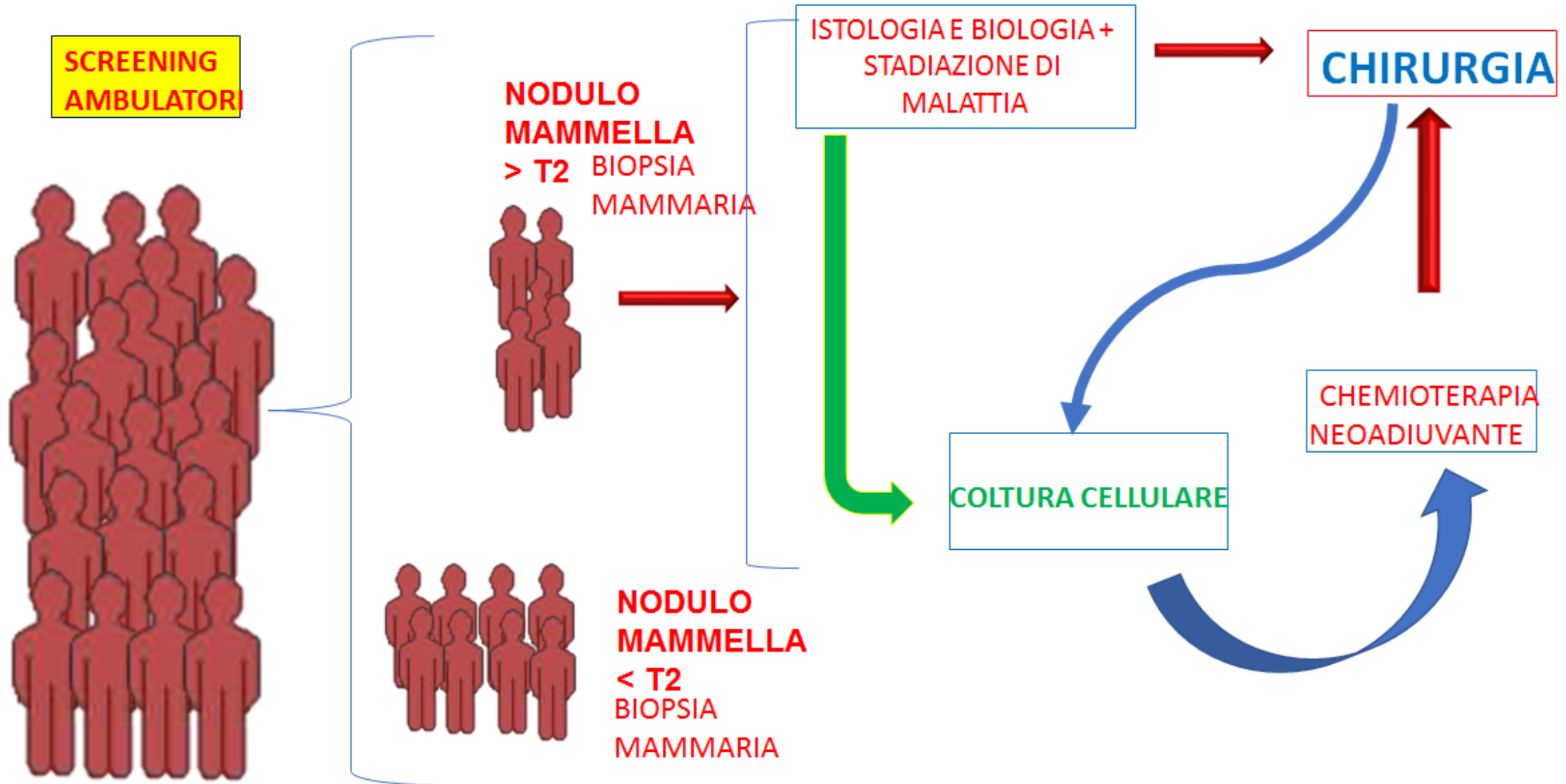
SENOLOGIA	ANNO 2019							ANNO 2020				TOTALE
	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre	gennaio	febbraio	marzo	aprile	
ECOGRAFIA MAMMELLA BILATERALE	105	134	28	117	180	155	70	142	113	128	99	1271
MAMMOGRAFIA BILATERALE	148	149	34	131	148	159	68	162	123	130	105	1357
BIOPSIA ECO-GUIDATA DELLA MAMMELLA	14	19	8	19	21	20	20	11	19	4	1	156
<b>TOTALE</b>	<b>267</b>	<b>302</b>	<b>70</b>	<b>267</b>	<b>349</b>	<b>334</b>	<b>158</b>	<b>315</b>	<b>255</b>	<b>262</b>	<b>205</b>	<b>2784</b>



## DATI AMBULATORIALI - SENOLOGIA ISTITUTO G.GIGLIO CEFALU'

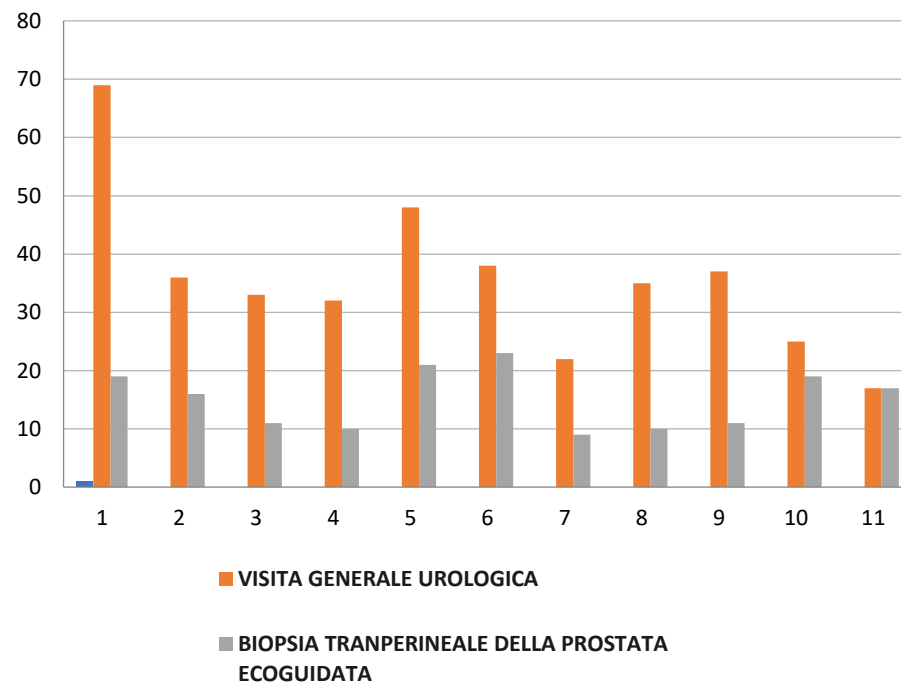
SENOLOGIA	1° SAL (ULTIMO SEMESTRE)							2° SAL												3° SAL											
	ANNO 2019							ANNO 2020												2021											
	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	
ECOGRAFIA MAMMELLA BILATERALE	105	134	28	117	180	155	70	142	113	128	99	33	61	104	121	306	138	89	182	234	229	176	134	43	166	211	131	130	132	280	
MAMMOGRAFIA BILATERALE	148	149	34	131	148	159	68	162	123	130	105	29	76	63	125	323	139	64	126	229	276	234	112	86	174	312	129	182	122	250	
BIOPSIA ECO-GUIDATA DELLA MAMMELLA	14	19	8	19	21	20	20	11	19	4	1	10	20	15	15	16	22	13	1	18	24	32	33	13	15	20	13	1	24	16	
<b>TOTALE</b>	<b>267</b>	<b>302</b>	<b>70</b>	<b>267</b>	<b>349</b>	<b>334</b>	<b>158</b>	<b>315</b>	<b>255</b>	<b>262</b>	<b>205</b>	<b>72</b>	<b>157</b>	<b>182</b>	<b>261</b>	<b>645</b>	<b>299</b>	<b>166</b>	<b>309</b>	<b>481</b>	<b>529</b>	<b>442</b>	<b>279</b>	<b>142</b>	<b>355</b>	<b>543</b>	<b>273</b>	<b>313</b>	<b>278</b>	<b>546</b>	





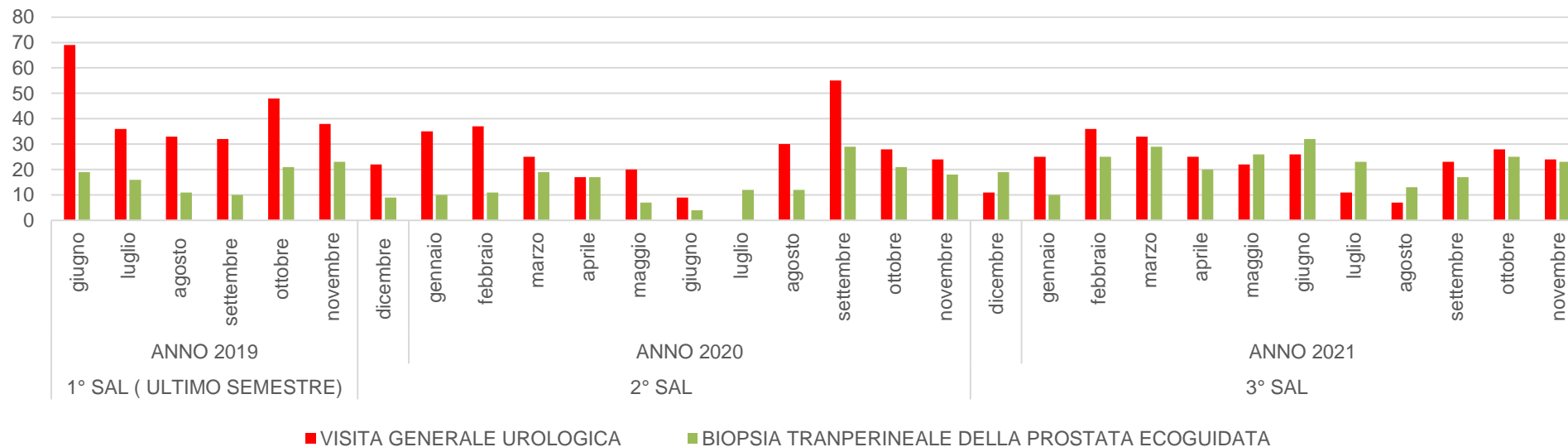
## DATI AMBULATORIALI U.O. UROLOGIA

UROLOGIA	ANNO 2019							ANNO 2020				TOTALE
	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre	gennaio	febbraio	marzo	aprile	
VISITA GENERALE UROLOGICA	69	36	33	32	48	38	22	35	37	25	17	392
BIOPSIA TRANPERINEALE DELLA PROSTATA ECOGUIDATA	19	16	11	10	21	23	9	10	11	19	17	166
<b>TOTALE</b>	<b>88</b>	<b>52</b>	<b>44</b>	<b>42</b>	<b>69</b>	<b>61</b>	<b>31</b>	<b>45</b>	<b>48</b>	<b>44</b>	<b>34</b>	<b>558</b>

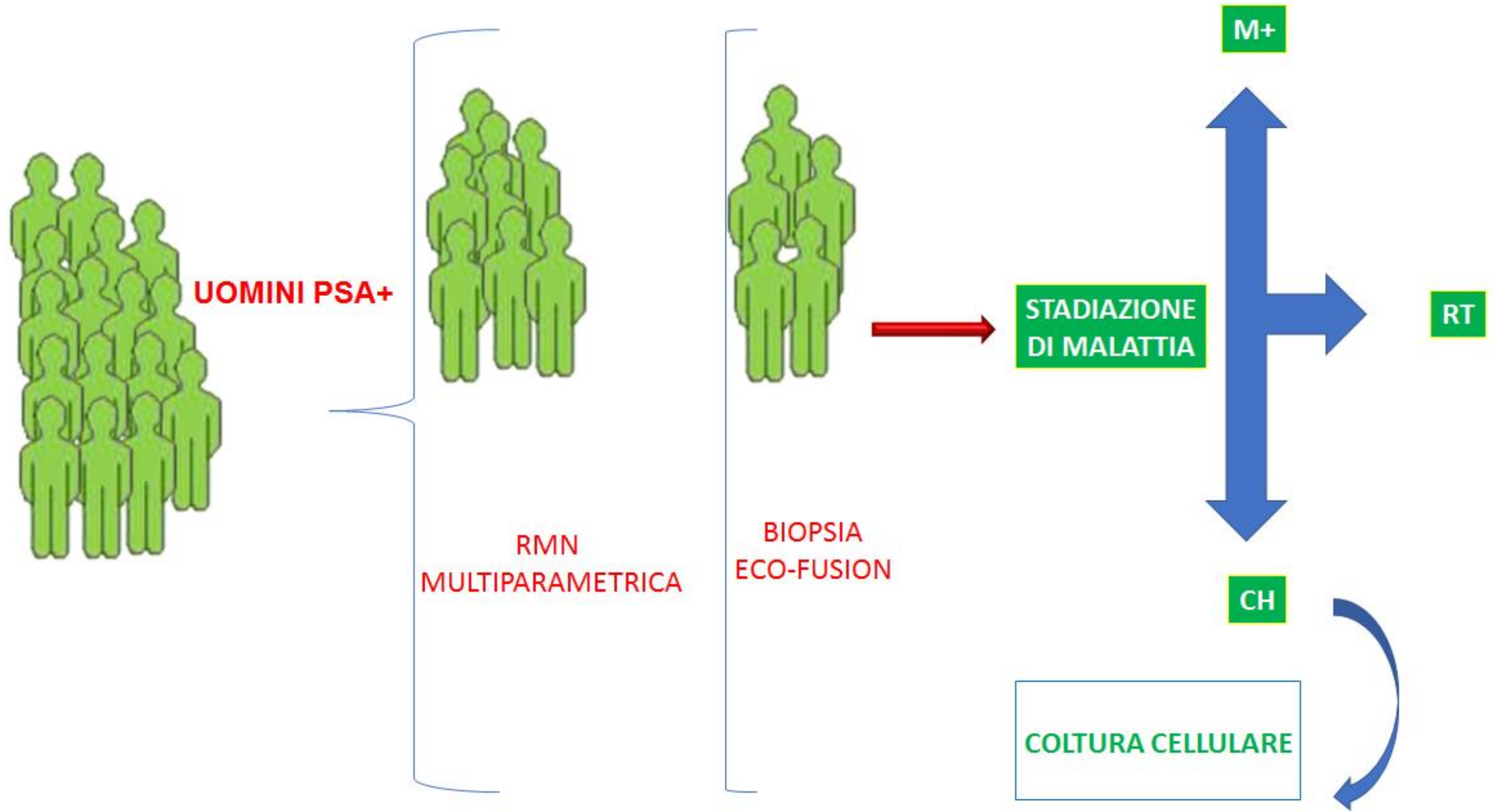


## DATI AMBULATORIALI \_ UROLOGIA ISTITUTO G.GIGLIO DI CEFALU'

UROLOGIA	1° SAL ( ULTIMO SEMESTRE)							2° SAL												3° SAL										
	ANNO 2019							ANNO 2020												ANNO 2021										
	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre	dicembre	gennaio	febbraio	marzo	aprile	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre	novembre
VISITA GENERALE UROLOGICA	69	36	33	32	48	38	22	35	37	25	17	20	9	0	30	55	28	24	11	25	36	33	25	22	26	11	7	23	28	24
BIOPSIA TRANPERINEALE DELLA PROSTATA ECOGUIDATA	19	16	11	10	21	23	9	10	11	19	17	7	4	12	12	29	21	18	19	10	25	29	20	26	32	23	13	17	25	23
<b>TOTALE</b>	<b>88</b>	<b>52</b>	<b>44</b>	<b>42</b>	<b>69</b>	<b>61</b>	<b>31</b>	<b>45</b>	<b>48</b>	<b>44</b>	<b>34</b>	<b>27</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>42</b>	<b>84</b>	<b>49</b>	<b>42</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>45</b>	<b>48</b>	<b>58</b>	<b>34</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>53</b>	<b>47</b>



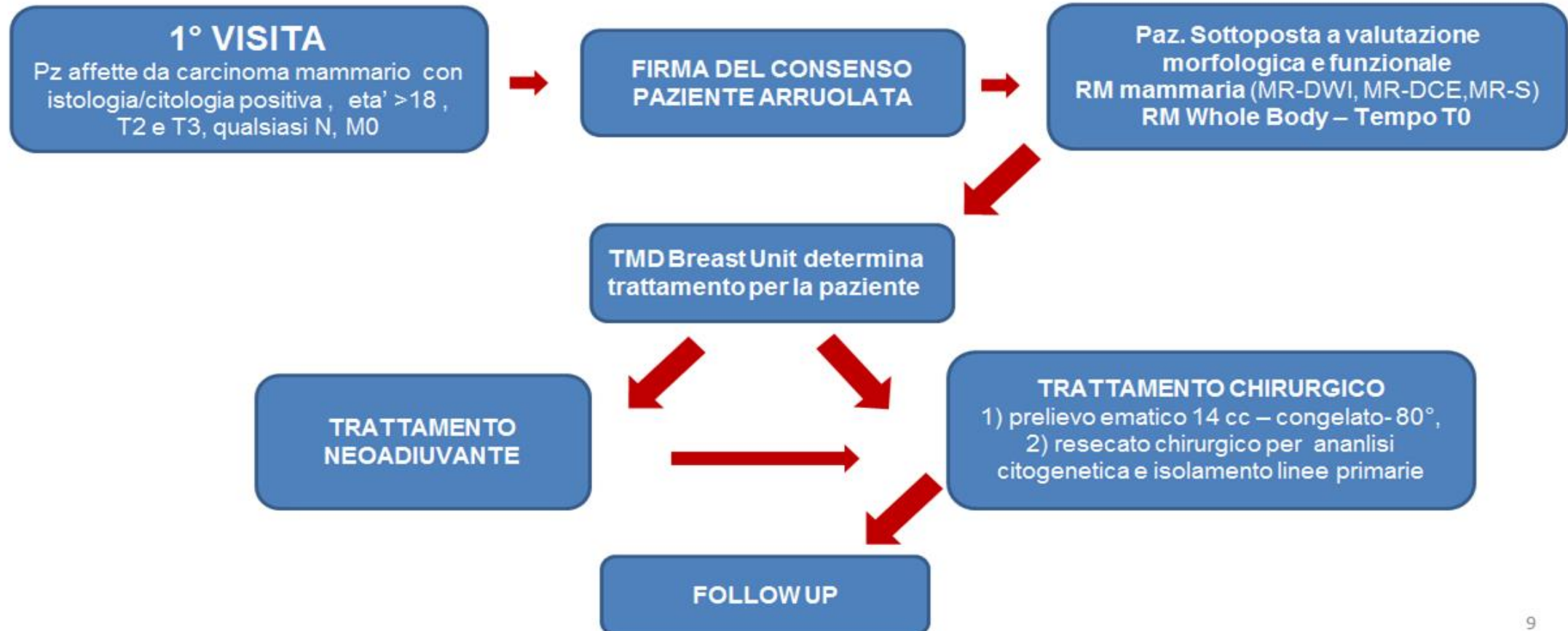




**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).**

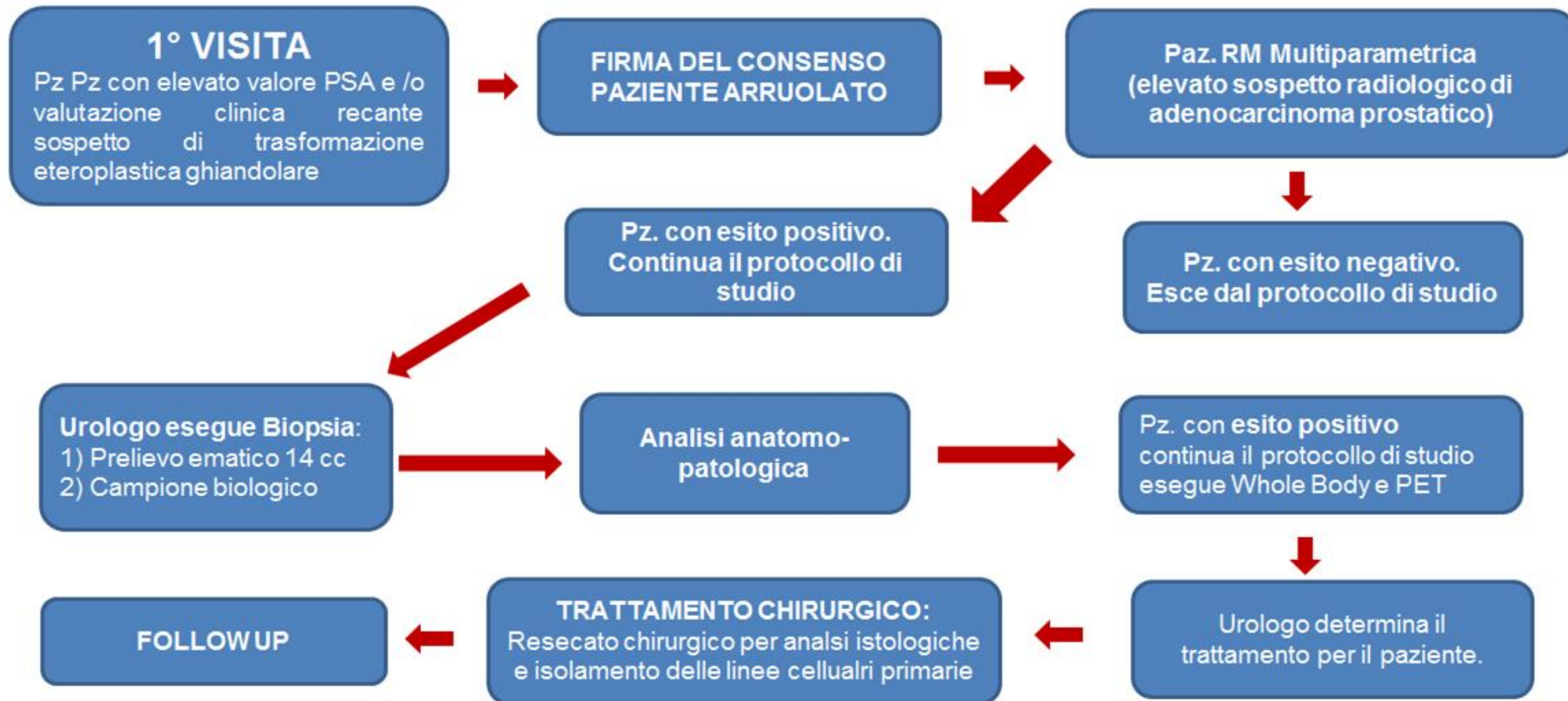
Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

### Workflow per le pazienti con K mammella

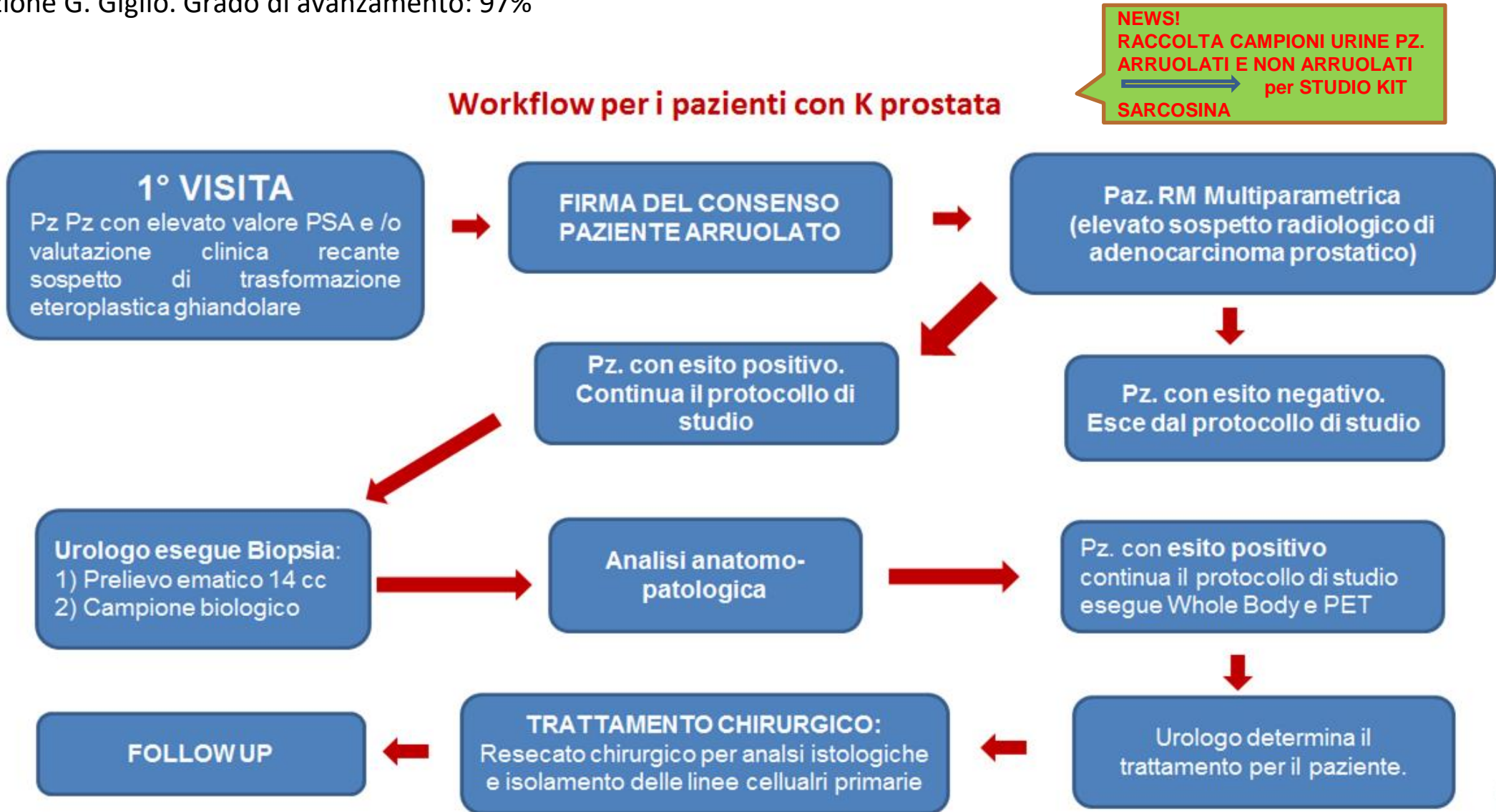


**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

### Workflow per i pazienti con K prostata



**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%



**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

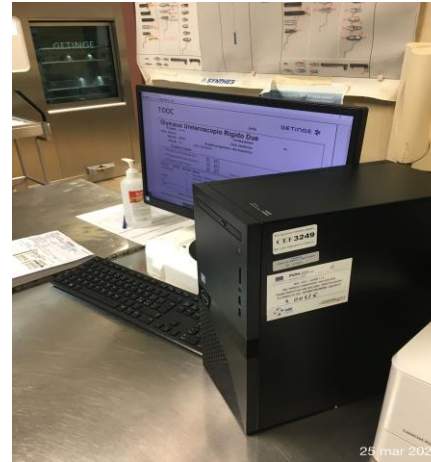
**La Fondazione G. Giglio ha, inoltre, avviato diverse procedure di adeguamento delle attrezzature in propria dotazione al fine di migliorare il parco infrastrutturale sotteso al protocollo clinico. Il capitolato tecnico viene di seguito elencato:**

- SISTEMA PER ANESTESIA (ANGIOMEDICA SAS )
- CISTOSCOPI FLESSIBILI (C.BUA SRL)
- ECOGRAFO MULTIDISCIPLINARE (WEMED SRL)
- TAVOLI OPERATORI (SIFEM MEDICAL SRL)
- SISTEMA LAMPADA SCIALITICA (ULTRAMED)
- CENTRALE DI STERILIZZAZIONE (GETINGE GE SPA)
- SISTEMA DI WORKSTATION DI REFERTAZIONE (EBIT SRL)
- DISPOSITIVI PER ESAMI DI IMMUNOISTOCHEMICA (LEICA MICROSYSTEMS SRL)
- SISTEMA DI VIDEOENDOSCOPIA PER ENDOUROLOGIA E LAPAROSCOPIA ( OLYMPUS ITALIA SRL)
- SISTEMA CHIRURGICO ROBOTICO DA VINCI X MODELLO IS4200 (GIOVANNI SCIBILIA E FIGLIO SPA)
- APPARECCHIATURA E COGRAFICA BK 5000 SPECIFICA PER UROLOGIA/CHIRURGIA +SONDA ECOGRAFICA INTROOPERATORIA (BK MEDICAL ITALIA SRL)
- STRUMENTARIO ISTOLOGICO (A.MENARINI DIAGNOSTIC) + STAMPANTE DI BIOCASSETTE E STAMPANTE VETRINI (DIAPATH SPA)
- ISOLATORE SCHERMATO A FLUSSO LAMINARE CON DISPENSATOR INTEGRATO PER SIRINGHE (ELSE SOLUTION SRL) + ULTARCONGELATORE -86 ( SINTAK SRL)
- SISTEMA STEREOTASSICO PER BIOPSIA MAMMARIA (TECNOLOGIC SRL)
- CITOFLUORIMETRO + DISSOCIATORE PER LABORATORIO ANALISI (MILTENYI BIOETIC SRL) + FORNITURA ATTREZZATURE DA LABORATORIO (ORIZON SRL) + FRIGORIFERO +4 ( NUOVA CRIOTECNICA AMCOA )
- ESTRATTORE DNA/RNA (PERKIN ELMER SPA) + MODULO DI SINETSI ( RADIUS SRL ) + RADIO HPLC (GAMMA SERVIZI SRL)
- SISTEMA OSPEDALIERO INTEGRATO ( TESI ELETTRONICA E SISTEMI INFORMATIVI SPA )+ (OLOMEDIA SRL) + (EBIT SRL) + (MEDSITE MI)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48			
OR4	D4.2.1																																																			
	D4.2.2																																																			
	D4.2.3																																																			



AGGIORNAMENTO SAL  
AOPERATORIA



IMPIANTO LAVAGGIO E  
STERILLIZZAZIONE



AGGIORNAMENTO COLONNA  
LAPAROSCOPICA



DISPOSITIVI PER ESAMI  
IMMUNOSTOCHEMICA



ROBOT DA VINCI



APPARECCHIATURA PER ANESTESIA

APPARECCHIATURE  
SALA OPERATORIA



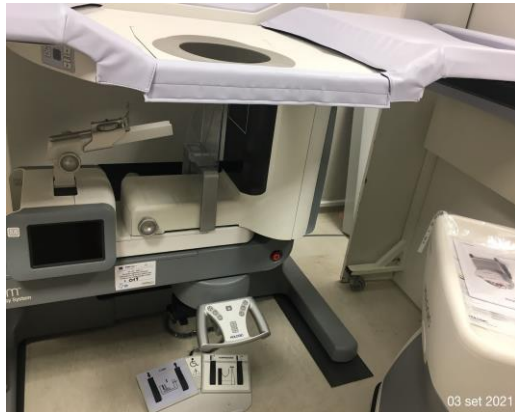
SISTEMA PER  
ECOTOMOGRAFIA



AGGIORNAMENTO RM



ECOGRFO EQUIPAGGIATO DI FUSION IMAGING  
E DI NAVIGAZIONE REAL TIME



SISTEMA BIOPSIA  
PRONO



MODULO SINTESI



ISOLATORE SCHERMATO



RADIO HPLC



DISPOSITIVI PER ESAMI DI IMMUNOISTOCHEMICA

PROCESSATORE

Elenco attrezzature acquisite da installare ( in attesa di completamento locali)

DESCRIZIONE	N.	AZIENDA FORNITRICE
armadio di sicurezza aspirato	2	BIO OPTICA
sistema automatico di colorazione con montavetrini	1	BIO OPTICA
stazione di lavoro composta da: centralina di inclusione, microtomo semiautomatica piastra di raffreddamento	1	DIAPATH
bagno stendifette e stufa per istologia	1	BIO OPTICA
microscopio da laboratorio	1	LEICA
banco aspirato per istologia	1	BIO OPTICA
stazione di lavoro per campionamento	2	MENARINI



STAMPANTE DI BIOCASSETTE E STAMPANTE VETRINI

U.O. ANATOMIA  
PATOLOGICA

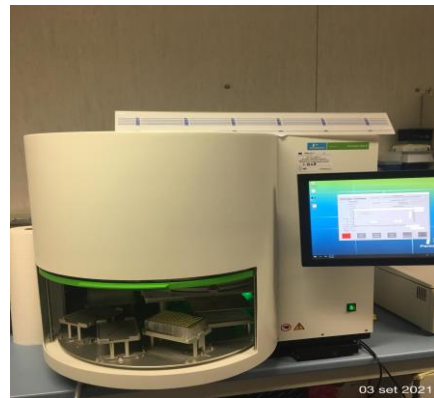




ULTRACONGELATORE



CITOFUORIMETRO



ESTRATTORE  
RNA/DNA



FRIGORIFERO +4

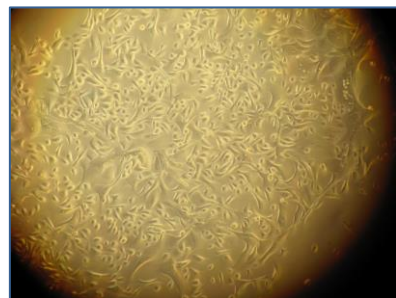
LABORATORIO  
ANALISI

**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).**

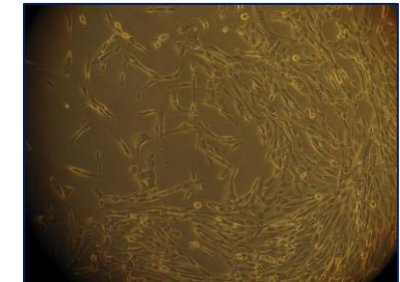
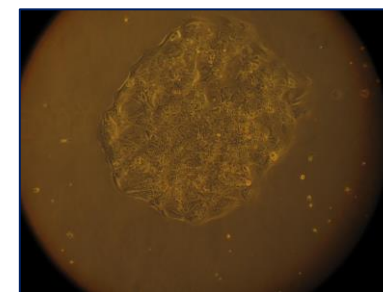
Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

ID Paziente	Data	Peso gr	Congelato (SI/NO)	Coltura primaria (SI/NO)	ER	PR	HER2	Ki-67	Diagnosi	Note
$\alpha 1$	02/08/2019	0,01	SI	NO						Frustolo Bioptico (ca. 1 cm); Paziente in chemio neoadiuvante, non più idonea
$\alpha 2$	02/08/2019	0,24	SI	NO	100%	80%	Negativo (SCORE +1 Lieve)	<10%	Carcinoma duttale infiltrante di grado III	2 frammenti
$\alpha 3$	12/11/2019	1,2	no	SI	70%	100%	Negativo (SCORE 0)	<5%	Carcinoma lobulare infiltrante multicentrico di grado III	1 pezzo chirurgico da mastectomia
$\alpha 4$	04/12/2019	0,5636	NO	SI	80%	30%	Dubbio (SCORE 2+)	<10%	Carcinoma duttale infiltrante di grado III con focali aree di carcinoma intraduttale	1 pezzo chirurgico da quadrantectomia
$\alpha 5$	17/12/2019	1,6	NO	Si (+ pellet)	90%	90%	Negativo (SCORE 0)	5%	Carcinoma lobulare infiltrante multicentrico di grado II	1 pezzo chirurgico da quadrantectomia
$\alpha 6$										Percorso non completato
$\alpha 7$	17/01/2019	0,01	NO	SI (+pellet)	80%	100%	Positivo (SCORE 3+)	10%	Carcinoma duttale infiltrante di grado III con focali aree di carcinoma intraduttale di alto	1 frammento chirurgico da quadrantectomia destra
$\alpha 8$										Percorso non completato
$\alpha 9$	05/02/2020	0,97	NO	Si						1 frammento chirurgico da quadrantectomia sinistra

$\alpha 3$



$\alpha 7$



**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).**

Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

**4.2.3 STUDI DI CARATTERIZZAZIONE CON IMAGING FUNZIONALE E MOLECOLARE**



- Attività:** Studio radiomico su dataset MR di pazienti con lesioni Breast; **Finalità:** realizzazione di un modello predittivo in grado di classificare i campioni in ingresso (i.e. malignità vs benignità): *Militello C et al. Academic Radiology, 2021; Militello C. et al. Biomedical Signal Processing and Control, 2022*
- Attività:** Studio radiomico con approccio machine-learning su Imaging PET con colina di pazienti con lesioni di K prostata; **Finalità:** Estrazione di features predittive di progressione clinica: *Alongi, P. et al. Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2020; Alongi P. et al. Eur Radiol. 2021*

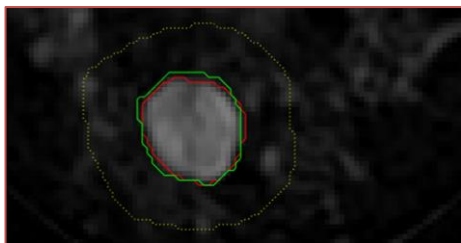
**4.2.3 CARATTERIZZAZIONE CITOLOGICA E MOLECOLARE**

Messa a punto dei seguenti metodi da applicare a prelievi ematici e linee primarie dei pazienti arruolati:

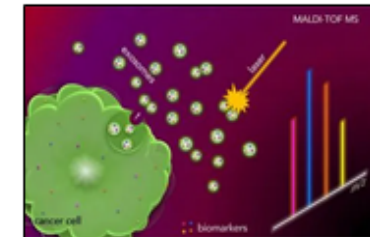
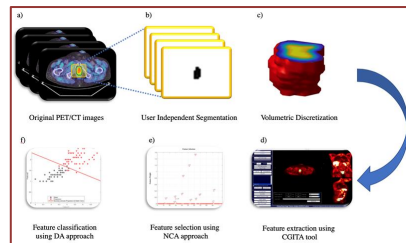
- Immunoistochimica su preparati citologici e istologici
- Caratterizzazione citofluometrica su biopsia liquida
- Valutazione dell'espressione genica con Real time PCR Caratterizzazione tramite immunoistochimica ed immunofluorescenza delle linee cellulari
- Estrazione di vescicole extracellulari dai mezzi di coltura
- Caratterizzazione tramite microscopia elettronica e spettrometria di massa delle vescicole isolate.



1



2



**OR4:** Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI). Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

*Militello C et al. "Semi-automated and interactive segmentation of contrast-enhancing masses on breast DCE-MRI using spatial fuzzy clustering". Academic Radiology, 2021*

**Study's contributions:**

- ✓ **medical image analysis:** the availability of an accurate segmentation procedure reduces the radiologists' time-consuming labor, as well as the operator dependence, thus increasing result repeatability
- ✓ **precision oncology:** automated and accurate segmentation methods are beneficial to the downstream quantitative imaging analyses for developing reliable diagnostic and prognostic biomarkers

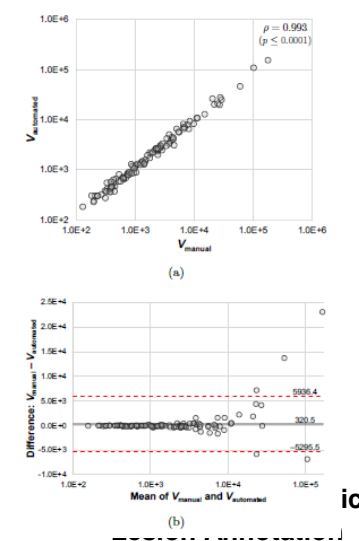
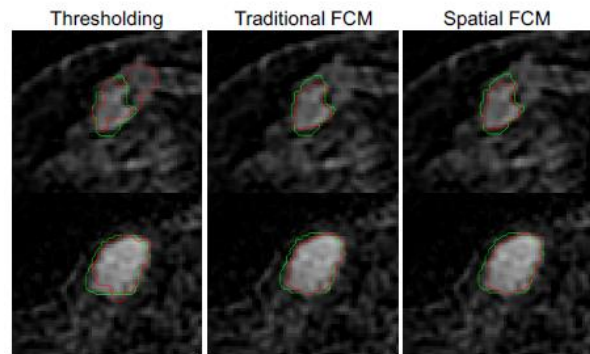
*Militello C. et al. "3D DCE-MRI Radiomic Analysis for Malignant Lesion Prediction in Breast Cancer Patients". Biomedical Signal Processing and Control, 2022*

**Study's objectives:**

- ✓ to develop and validate a radiomic model capable of predicting malignant breast masses by using 3D radiomic features extracted from DCE-MRI
- ✓ to show the feasibility of a radiomics-powered model that could be integrated into the clinical practice by exploiting only standard-of-care DCE-MRI

**Table 4.** Classification metrics obtained in the discovery phase by the predictive models exploiting the best 3 FS methods and the SVM. For each of these metrics, the mean value and standard deviation over all 50 repetitions were calculated. Boldface numbers denote the highest value for each metric.

Predictive Model	AUROC	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
<i>UDFS + SVM</i>	0.557±0.07	0.622±0.17	0.493±0.184	0.552±0.107	0.452±0.145
<i>DGUFs + SVM</i>	<b>0.647±0.058</b>	0.722±0.089	<b>0.574±0.148</b>	<b>0.652±0.059</b>	0.573±0.153
<i>UFSOL + SVM</i>	0.597±0.053	<b>0.778±0.094</b>	0.426±0.107	0.567±0.062	<b>0.599±0.124</b>



- UDFS:**
- Joint Energy (GLCM)
  - Short Run Emphasis (GLRLM)
  - Least Axis Length (3DS)

- DGUFs:**
- Flatness (3DS)
  - Long Run Low Gray Level Emphasis (GLRLM)
  - Joint Energy (GLCM)
  - Elongation (3DS)
  - Least Axis Length (3DS)

- UFSOL:**
- Flatness (3DS)
  - Elongation (3DS)
  - Size-Zone Nonuniformity (GLSZM)

**Radiomic Signatures (set of predictive features)**

**OR4: Selezione dei pazienti reclutabili, prelievo e caratterizzazione genetico-molecolare del campione tissutale (RI).**

Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 97%

**ATTIVITA': Studio radiomico con approccio machine-learning su Imaging PET con colina di pazienti con lesioni di K prostata**

**FINALITA': Estrazione di features predittive di progressione clinico**

**Risultati:** 1. Alongi, P. et al. *Choline PET/CT features to predict survival outcome in high risk prostate cancer restaging: a preliminary machine-learning radiomics study.* Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2020

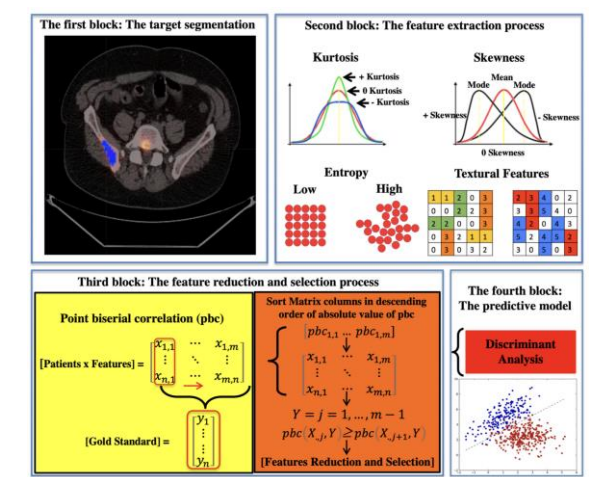
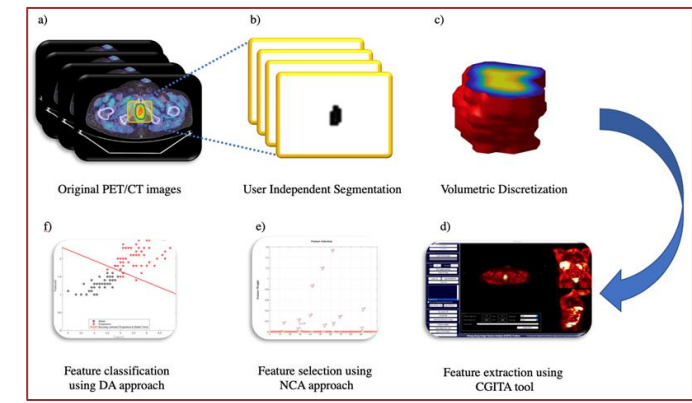
27 high-risk PCa patients for 46 lesions  
 Best performance in **Discriminant Analysis** classification was obtained using the combination of the 13 selected features compared to the use of all features, improving the sensitivity for a more accurate risk stratification in prostate cancer.

2. Alongi P. et al. *Radiomics analysis of 18F-Choline PET/CT in the prediction of disease outcome in high-risk prostate cancer: an explorative study on machine learning feature classification in 94 patients.* Eur Radiol. 2021 Jul;31(7):4595-4605.

94 high-risk PCa patients who underwent restaging Cho-PET/CT  
 The proposed machine learning model demonstrated to be feasible and useful to select Cho-PET features for T, N, and M with valuable association with high-risk PCa patients' outcomes.

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	Accuracy (%)	AUROC (95% CI)
TNM (N° = 94)	47.11	76.54	46.78	67.66	67.24 (57.08–77.41)
T (N° = 38)	91.59	84.06	79.14	86.99	72.62 (54.71–90.53)
N (N° = 44)	68.09	91.42	83.00	82.59	69.87 (51.34–88.39)
M (N° = 52)	64.39	74.60	40.55	72.52	74.72 (56.36–93.09)

*Legends: T, primary tumor or local relapse in prostate lodge; N, nodal disease; M, bone metastasis; N, number of patients; AUROC, area under the receiver operating characteristics; CI, confidence interval; PPV, positive predictive value*



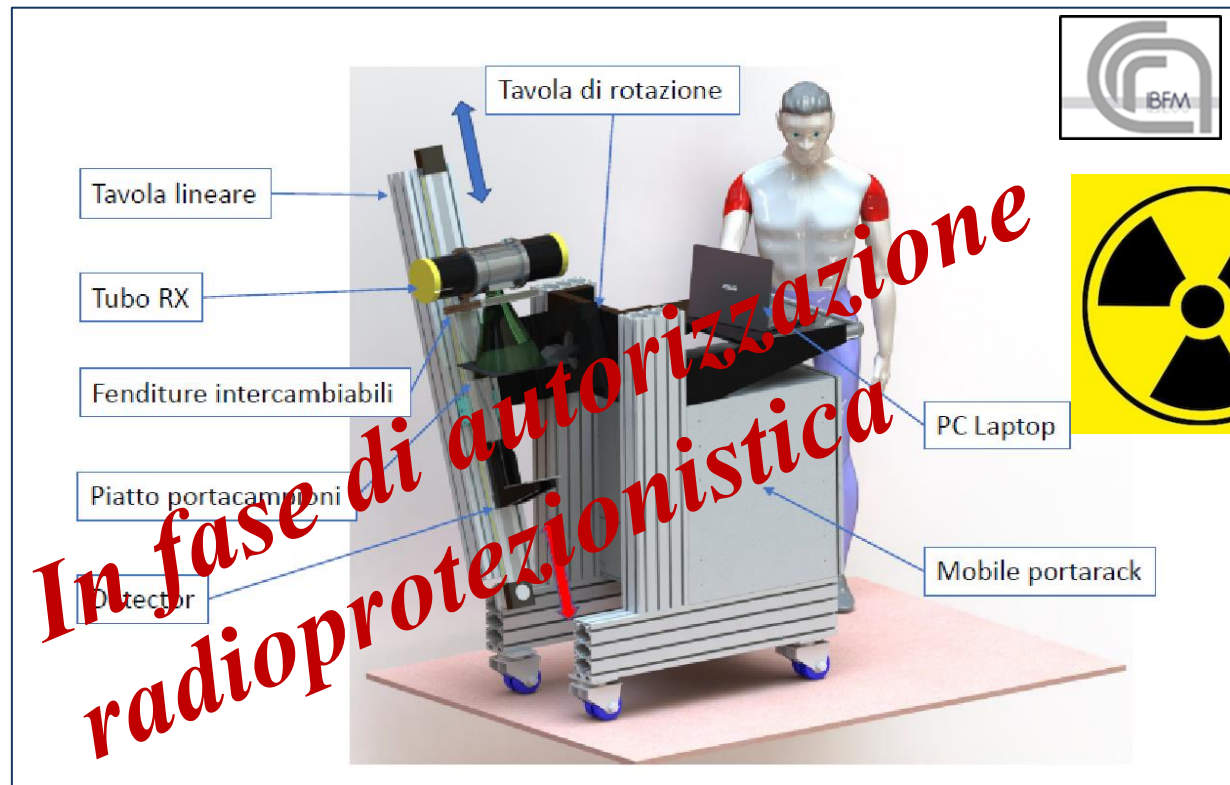
**OR5: CREAZIONE DI UN MODELLO ANIMALE DEL TUMORE ALLA PROSTATA ED ALLA MAMMELLA (avatar) PER LO STUDIO DELLA TERAPIA PERSONALIZZATA (RI).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 65%

Rimodulazione delle attività *in vivo*

- Rimodulazione del protocollo preclinico sulla base delle nuove esigenze (D5.2.1)
- Creazione del modello *Avatar* con inoculo di linee cellulari (D5.2.2)
- Trattamenti farmacologici e trattamenti radioterapici con e senza molecola radiosensibilizzante, utilizzando irradiatore home made con fasci di fotoni (D5.2.3; D6.2.6).
- Monitoraggio del trattamento con Imaging per piccolo animale, funzionale (RM) o molecolare (PET) (D6.2.7).



**Irradiatore home-made (IBFM - CNR)**



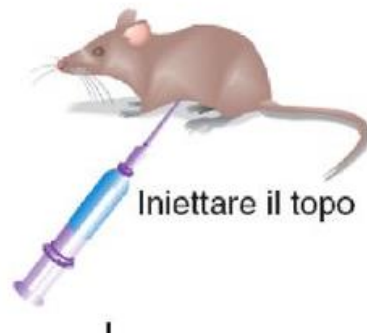
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
OR5	D5.2.1																																																
	D5.2.2																																																
	D5.2.3																																																

**OR5: CREAZIONE DI UN MODELLO ANIMALE DEL TUMORE ALLA PROSTATA ED ALLA MAMMELLA (avatar) PER LO STUDIO DELLA TERAPIA PERSONALIZZATA (RI).** Proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 65%

**Descrizione:** Al fine di garantire lo svolgimento delle attività *in vivo* in ambito radioterapico, si è scelto di utilizzare **facility precliniche già esistenti** che operano in collaborazione con il consulente scientifico IBFM-CNR. Lo studio ha riguardato la valutazione della risposta tumorale al trattamento con Protonterapia.

**Procedura per la creazione di un modello murino Xenograft di tumore metastatico:**

**24 Topi nudi Balb/C,**



$4 \times 10^6$  cellule della linea cellulare metastatica tripla negativa MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER-),

**Protocollo sperimentale:**

- **6 controllo**, di cui 3 topi sono stati sacrificati a **72h** e 3 a **10 giorni**;
- **6 topi** hanno ricevuto la dose di **2 Gy**, di cui 3 topi sono stati sacrificati a 72h e 3 a 10 giorni post-PT
- **6 topi** hanno ricevuto la dose di **6 Gy**, 3 topi sono stati sacrificati a 72h e 3 a 10 giorni post-PT
- **6 topi** hanno ricevuto la dose di **9 Gy**. 3 topi sono stati sacrificati a 72h e 3 a 10 giorni post-PT

Dopo l'espianto, il tessuto tumorale è stato sottoposto a indagini immunoistochimiche e molecolari



*Approvazione ministeriale (n°527/2016-PR).*

**OR6: Radiobiologia *in vitro* e *in vivo* (RI).** Soggetto proponente: Fondazione G. Giglio. Grado di avanzamento: 95%

**Per l'attuazione di questo OR, la Fondazione Giglio si è avvalsa della consulenza dell' IBFM-CNR.**



**Attività *in vitro* svolte:**

- Stesura dei protocollo clinico **(D4.2.1;)**
- Isolamento ed espansione delle linee cellulari primarie da carcinoma della mammella, per la costruzione di una piccola bio-banca **(D6.2.1-2)**
- Studi di caratterizzazione molecolare e radiobiologica in risposta al trattamento in singolo con fasci convenzionali di radioterapia clinica **(D6.2.3/5)**
- Studi di caratterizzazione molecolare e radiobiologica in risposta al trattamento combinato con molecole radiosensibilizzante con fasci convenzionali di radioterapia clinica **(D6.2.4/5)**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48								
OR6	D6.2.1																																																								
	D6.2.2																																																								
	D6.2.3																																																								
	D6.2.4																																																								
	D6.2.5																																																								
	D6.2.6																																																								
	D6.2.7																																																								
	D6.2.8																																																								



**OR6: Radiobiologia *in vitro* (RI) (D6.2.3-5)**

Caratterizzazione molecolare e radiobiologica di linee cellulari primarie ed immortalizzate in risposta al trattamento con fasci clinici (D6.2.3/5)

CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 16: 257-266 (2019)  
doi:10.21873/cgp.20130

**Gene Expression Profiles Induced by High-dose Ionizing Radiation in MDA-MB-231 Triple-negative Breast Cancer Cell Line**

VALENTINA BRAVATÀ<sup>1\*</sup>, FRANCESCO PAOLO CAMMARATA<sup>1\*</sup>, LUIGI MINAFRA<sup>1</sup>, ROSA MUSSO<sup>1</sup>, GAIA PUCCI<sup>1</sup>, MASSIMILIANO SPADA<sup>2</sup>, IVAN FAZIO<sup>3</sup>, GIORGIO RUSSO<sup>1</sup> and GIUSI IRMA FORTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare-Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBFM-CNR), Cefalù, Italy;  
<sup>2</sup>Oncology Unit, Fondazione Istituto G. Giglio, Cefalù, Italy;  
<sup>3</sup>Casa di Cura Macchiarella, Palermo, Italy

**Radiation Gene-expression Signatures in Primary Breast Cancer Cells**

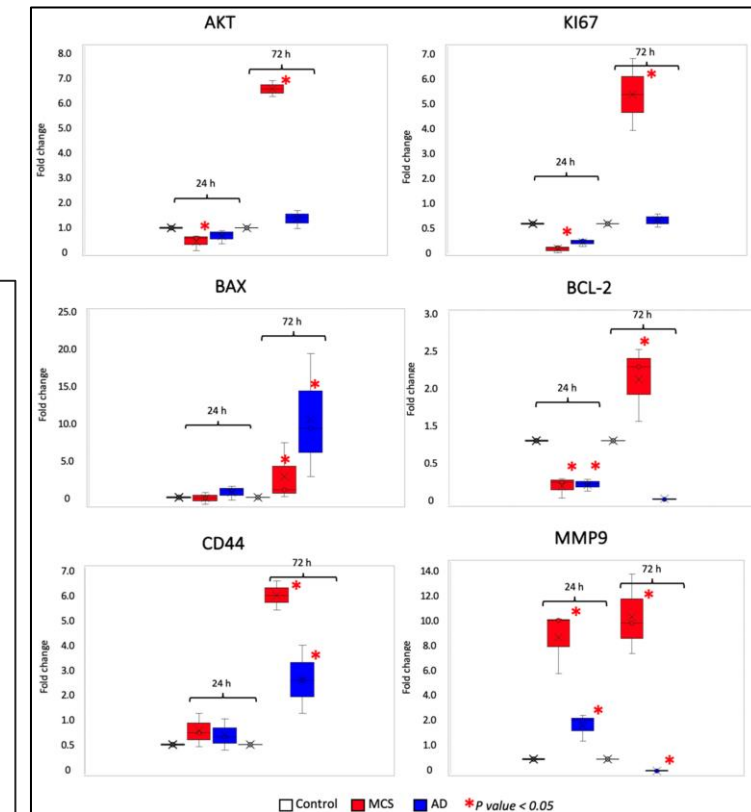
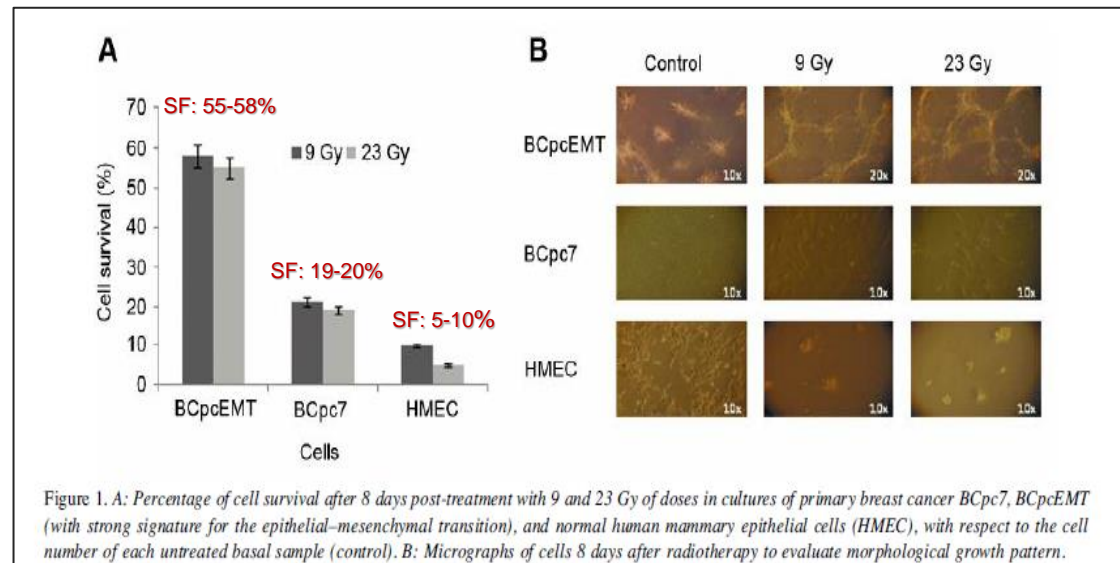
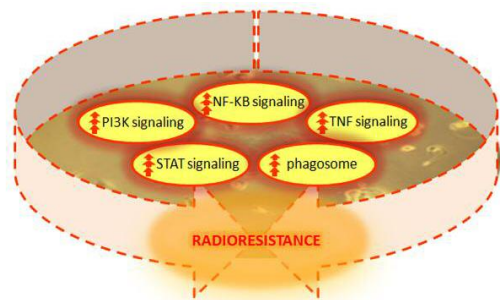
LUIGI MINAFRA<sup>1\*</sup>, VALENTINA BRAVATÀ<sup>1\*</sup>, FRANCESCO P. CAMMARATA<sup>1</sup>, GIORGIO RUSSO<sup>1</sup>, MARIA C. GILARDI<sup>1,2</sup> and GIUSI I. FORTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Bioimaging and Physiology, National Research Council (IBFM-CNR), Cefalù, Italy;  
<sup>2</sup>Nuclear Medicine Unit, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

life MDPI

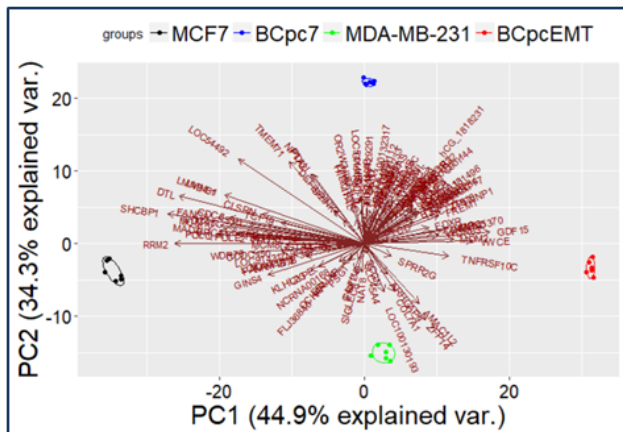
Article  
**Biological and Mechanical Characterization of the Random Positioning Machine (RPM) for Microgravity Simulations**

Marco Calvaruso<sup>1,\*</sup>, Carmelo Militello<sup>1,†</sup>, Luigi Minafra<sup>1,\*</sup>, Veronica La Regina<sup>2</sup>, Filippo Torrisi<sup>3</sup>, Gaia Pucci<sup>4</sup>, Francesco P. Cammarata<sup>1,5</sup>, Valentina Bravatà<sup>1,6</sup>, Giusi I. Forte<sup>1,†</sup> and Giorgio Russo<sup>1,4</sup>



## OR6: Radiobiologia *in vitro* (RI). (D6.2.3-5)

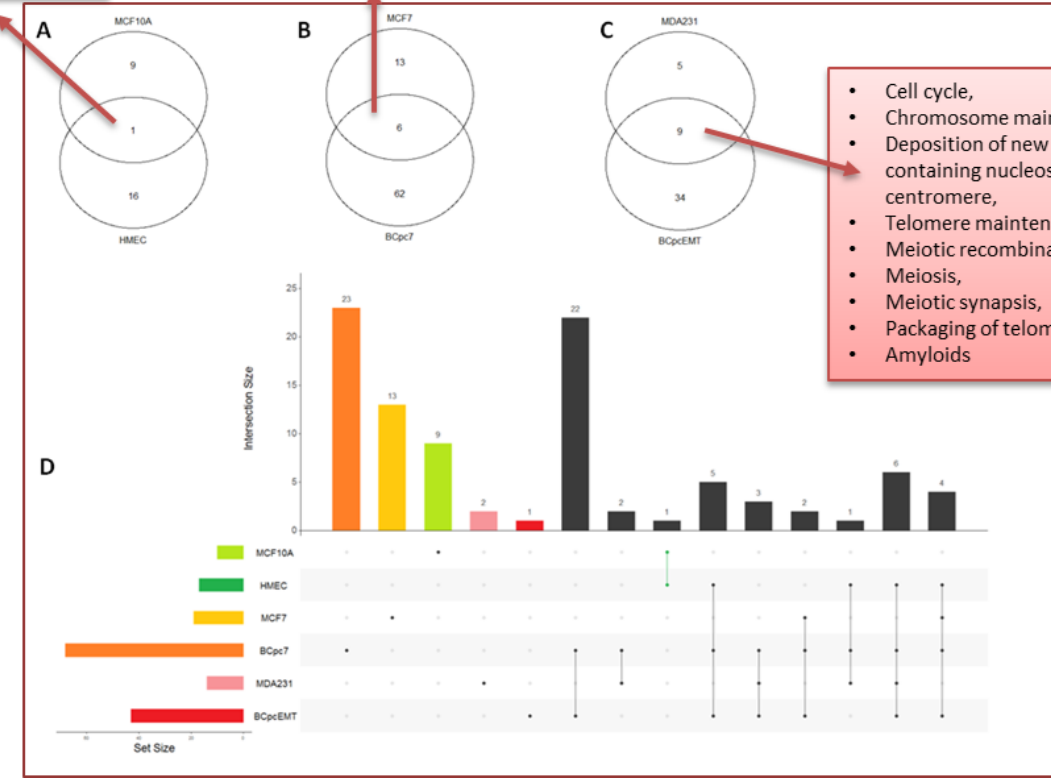
Cell lines	Control Group	BC ER+/PR+/HER2-	BC ER-/PR-/HER2-
Immortalized cells	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231
Primary cell culture	HMEC	BCpc7	BCpc EMT



Considering the gene signature consisting of (a) the **64 DEGs in common between MCF7 and BCpc7**, and (b) the **59 DEGs in common between MDA-MB-231 and BCpcEMT**, the Principal Component Analysis shows that the gene signature was able to separate the different tumorigenic cells.

- peptide ligand binding receptor pathway

- Mitotic-G1-S phases,
- S-phase,
- cell cycle,
- activation of the pre-replicative complex,
- G1-S-transition,
- p53 signaling pathway



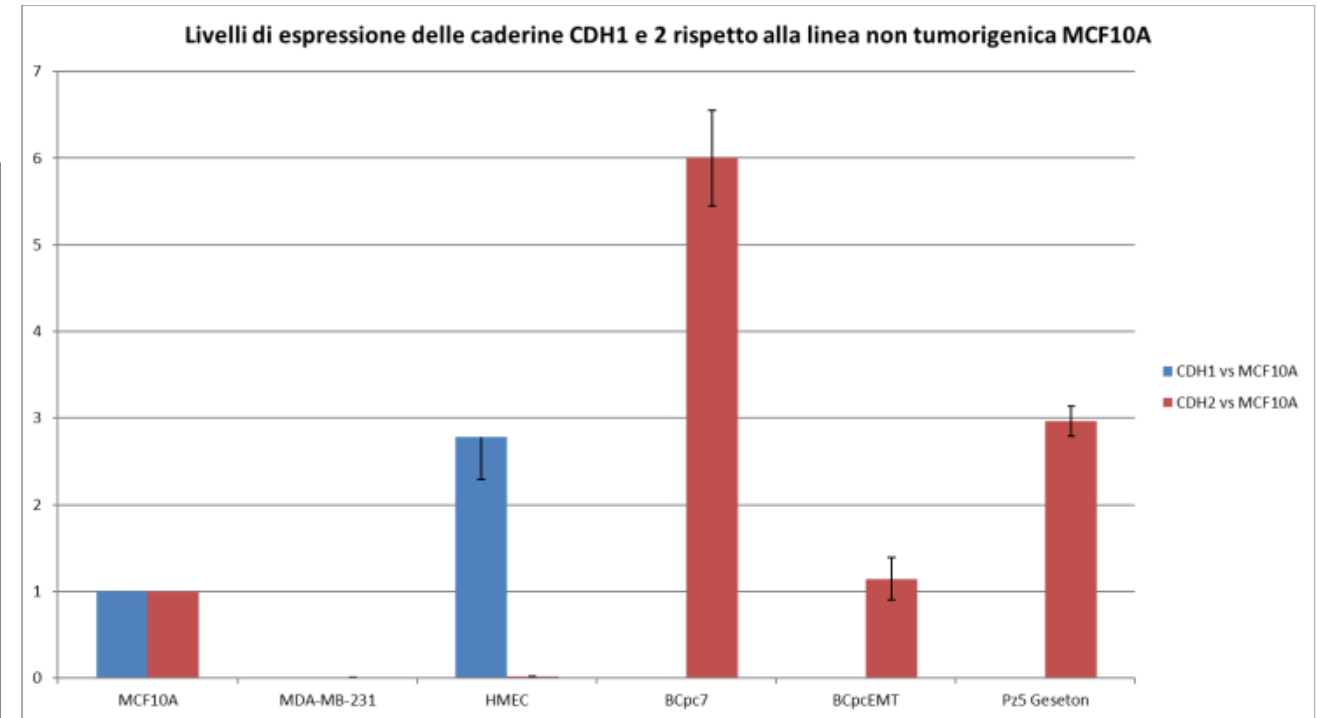
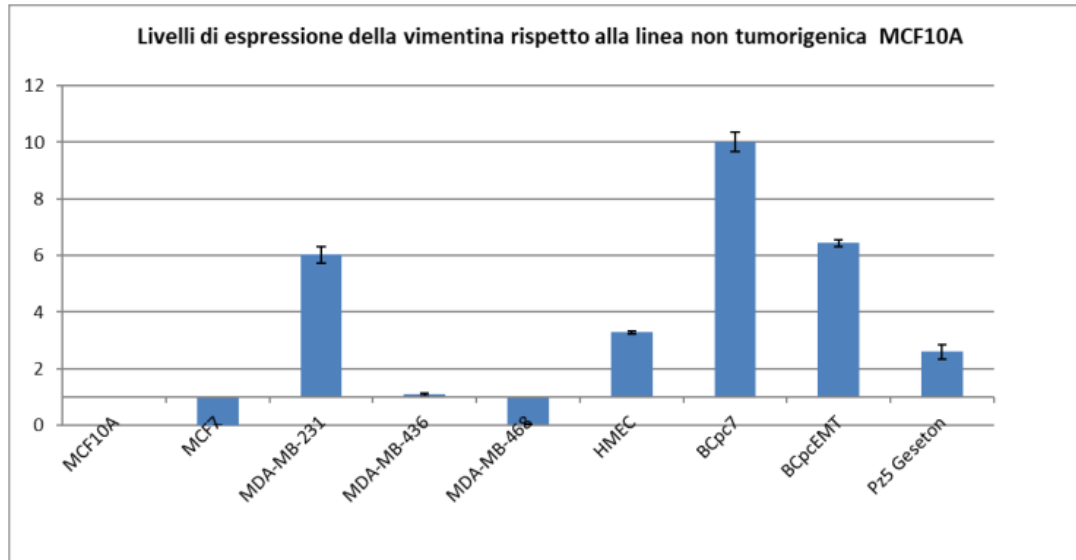
- Cell cycle,
- Chromosome maintenance,
- Deposition of new CENPA containing nucleosomes at the centromere,
- Telomere maintenance,
- Meiotic recombination,
- Meiosis,
- Meiotic synapsis,
- Packaging of telomere ends,
- Amyloids

International Journal of Molecular Sciences  
 Article  
**Radiation-Induced Gene Expression Changes in High and Low Grade Breast Cancer Cell Types**  
 Valentina Bravati <sup>1,2</sup>, Claudia Cava <sup>1,2</sup>, Luigi Minafra <sup>3</sup>, Francesco Paolo Cammarata <sup>1</sup>, Giorgio Russo <sup>1</sup>, Maria Carla Gilardi <sup>1,2</sup>, Isabella Castiglioni <sup>1,2</sup> and Giusi Irma Forte <sup>1</sup>

*IR-induced HR-specific signaling may provide a source of predictive biomarkers of RT outcomes, useful for the optimization of targeted therapies in tandem with RT. Response to radiation is cell-line dependent and few specific gene and pathway signatures seem to be linked to HR status, as for example the p53 signaling in the ER+/PR+/HER2- group.*

**OR6: Radiobiologia *in vitro* e *in vivo* (RI) (D6.2.3-5)**

Caratterizzazione molecolare e radiobiologica di linee cellulari primarie ed immortalizzate in risposta al trattamento con fasci clinici (D6.2.3/5)



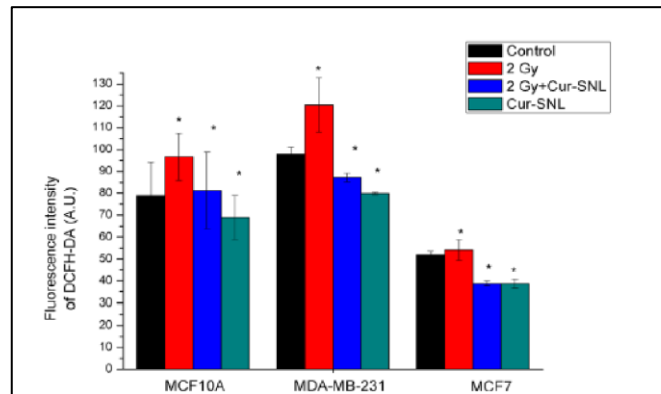
Nelle linee cellulari analizzate, è stata riscontrata una evidente down-regolazione del marker epiteliale **CDH-1** e al contrario una **up-regolazione sia di VIM che di CDH-2**. Tali risultati sostengono la nostra ipotesi di **attivazione del processo EMT** nelle linee cellulari di carcinoma mammario analizzate.

**OR6: Radiobiologia *in vitro* (RI). (D6.2.4-5)**

Dose modifying factor con e senza Cur-free o Cur-SLN

		MCF10A	MCF7	MDA-MB-231
DMF <sub>50</sub> _Photons/ Photons + free-Cur	2,5 μM	1,29	0,99	0,93
	5 μM	1,44	0,92	1,08
	10 μM	2,28	1,68	1,72
DMF <sub>50</sub> _Photons/ Photons + Cur-SLN	2,5 μM	1,65	1,06	0,81
	5 μM	1,65	1,58	1,03
	10 μM	2,76	1,78	1,31

Effetto antiossidante indotto da Cur-free e Cur-SLN



**SCIENTIFIC REPORTS**  
nature research

**Radiosensitizing effect of curcumin-loaded lipid nanoparticles in breast cancer cells**

Luigi Minafra<sup>1</sup>, Nunziatina Porcino<sup>1</sup>, Valentina Bravatà<sup>1</sup>, Daniela Gaglio<sup>1,2</sup>, Marcello Bonanomi<sup>2</sup>, Erika Amore<sup>2</sup>, Francesco Paolo Cammarata<sup>2</sup>, Giorgio Russo<sup>2</sup>, Carmelo Militello<sup>2</sup>, Gaetano Savoca<sup>2</sup>, Margherita Baglio<sup>2</sup>, Boris Abbate<sup>2</sup>, Giuseppina Iacoviello<sup>2</sup>, Giovanna Evangelista<sup>2</sup>, Maria Carla Gilardi<sup>1,2</sup>, Maria Luisa Bondi<sup>2</sup> & Giusi Irma Forte<sup>2</sup>✉

International Journal of  
Molecular Sciences

Review

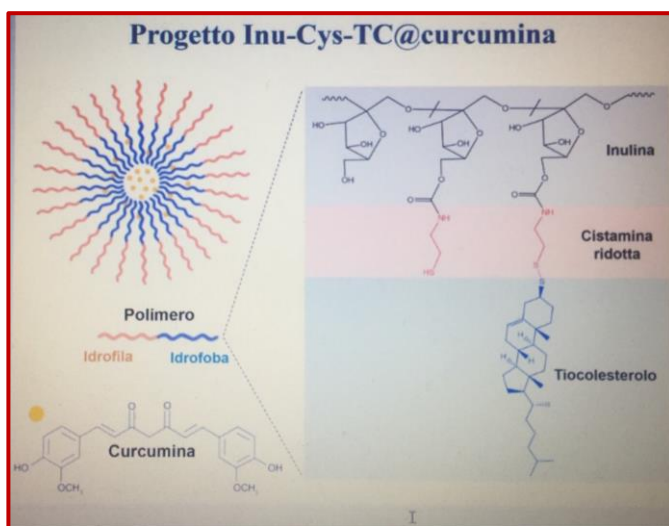
**Nutraceutical Compounds as Sensitizers for Cancer Treatment in Radiation Therapy**

Marco Calvaruso<sup>1</sup>✉, Gaia Pucci<sup>1</sup>, Rosa Musso, Valentina Bravatà<sup>1</sup>✉, Francesco P. Cammarata<sup>2</sup>, Giorgio Russo<sup>2</sup>, Giusi I. Forte<sup>2</sup>✉ and Luigi Minafra<sup>1</sup>✉

Istituto di Bioimmagini e Fisiologia Molecolare-Coraggio Consiglio Nazionale delle Ricerche (IBFM-CNR), 90015 Cefalù (PA), Italy; marco.calvaruso@ibfm.cnr.it (M.C.); gaia.pucci@ibfm.cnr.it (G.P.); rosa.musso@ibfm.cnr.it (R.M.); francesco.cammarata@ibfm.cnr.it (F.P.C.); giorgio.russo@ibfm.cnr.it (G.R.); giusi.forte@ibfm.cnr.it (G.I.F.); luigi.minafra@ibfm.cnr.it (L.M.)

✉ Correspondence: valentina.bravata@ibfm.cnr.it  
† These authors contributed equally to this work.

*Nuova formulazione*



IC50	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231	Ref
free-Cur	10,58	3,8	6,63	*Minafra et al. 2019
Cur-SLN	6,81	2,45	7,6	*Minafra et al. 2019
Cur-ST	13,1±2,7	4,91±0,98	7,66±1,53	

## OR6: Radiobiologia *in vitro* e *in vivo* (RI) (D6.2.3-5)

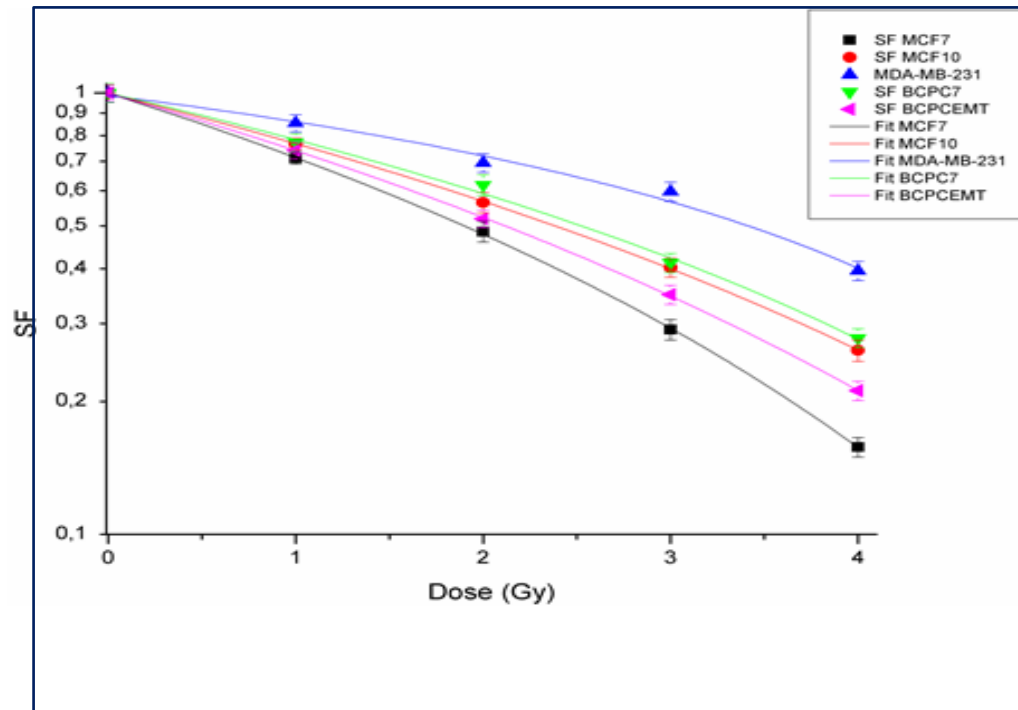
### Miglioramento dei servizi di cura in radioterapia



Article

## Local Disease-Free Survival Rate (LSR) Application to Personalize Radiation Therapy Treatments in Breast Cancer Models

Gaetano Savoca <sup>1,†</sup>, Marco Calvaruso <sup>1,†</sup>, Luigi Minafra <sup>1,\*</sup>, Valentina Bravatà <sup>1</sup>,  
 Francesco Paolo Cammarata <sup>1</sup>, Giuseppina Iacoviello <sup>2</sup>, Boris Abbate <sup>2</sup>, Giovanna Evangelista <sup>3</sup>,  
 Massimiliano Spada <sup>4</sup>, Giusi Irma Forte <sup>1</sup> and Giorgio Russo <sup>1</sup>



$$LSR(D) = e^{-k \cdot e^{(-\alpha D - \beta D^2 + \gamma T)}}$$

Calcolo per 25 frazioni	Dose per frazione con TCP al 100%	Dose per frazione con LSR al 100%
<b>MCF7</b>	1,6	1,7
<b>BcPcEMT</b>	1,9	1,6
<b>MCF10A</b>	2	1,8
<b>BcPc7</b>	2,1	1,9
<b>MDA-MB-231</b>	<b>3</b>	<b>3,2</b>

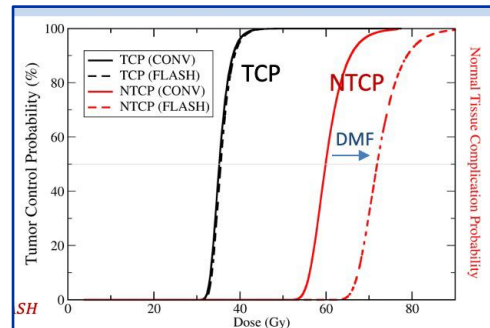
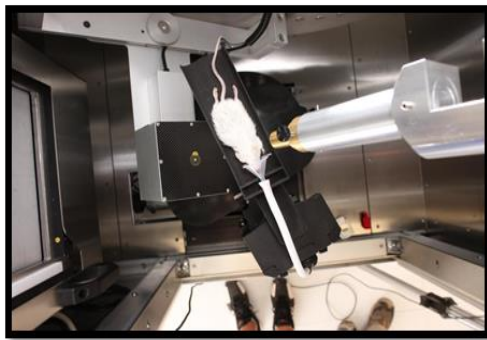
Lo studio elabora un nuovo metodo di calcolo della dose totale personalizzata sulla base di parametri radiobiologici ricavati sperimentalmente.

**OR6: Radiobiologia *in vivo* (RI). (D6.2.6-8)**

- **Miglioramento dei servizi di cura in Radioterapia**
- **Nuovi prodotti: molecole radiosensibilizzanti**

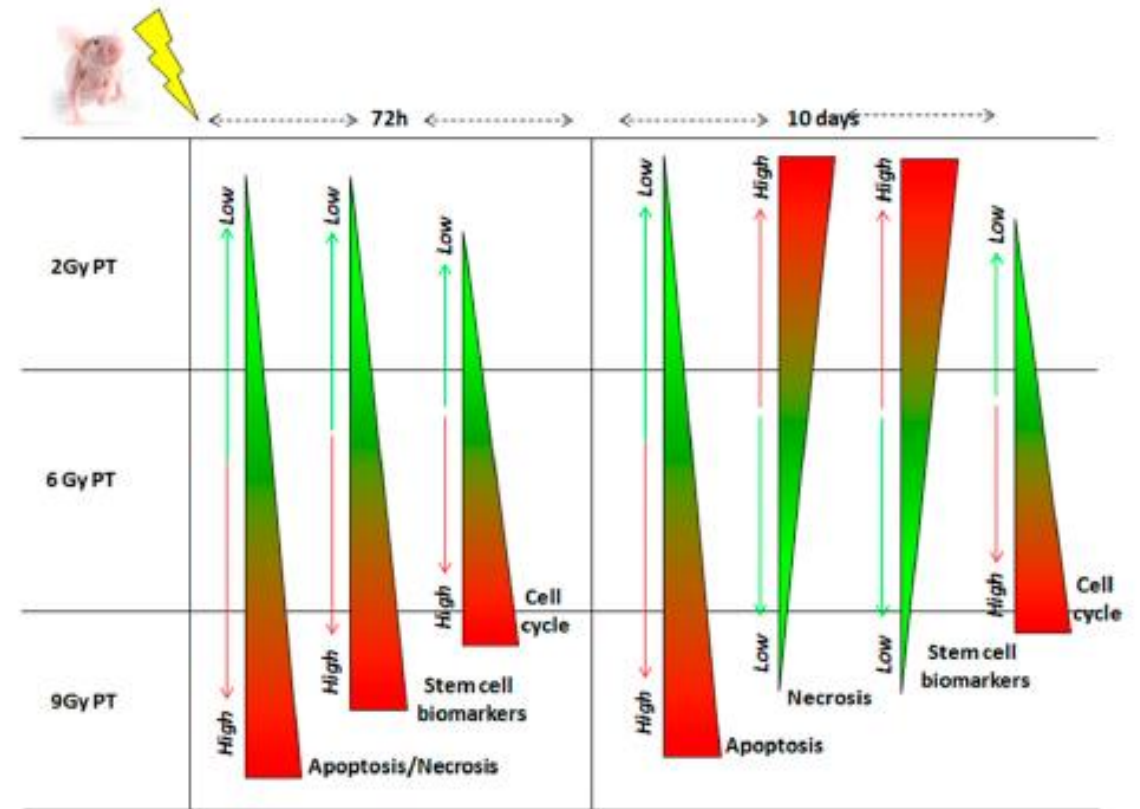
**Attività *in vivo* svolte:**

- Stesura dei protocollo preclinico (D5.2.1)
- Progettazione di un Irradiatore *home-made* (D6.2.6)
- Sperimentazione preclinica su modello murino sottoposto a protonterapia e su modello Zebrafish per la valutazione degli effetti radioprotettivi della curcumina (D6.2.4; D6.2.6)



Article  
**Molecular Investigation on a Triple Negative Breast Cancer Xenograft Model Exposed to Proton Beams**

Francesco P. Cammarata <sup>1,2,4</sup>, Giusi I. Forte <sup>1,2,4</sup>, Giuseppe Broggi <sup>3</sup>, Valentina Bravatà <sup>1,2,4</sup>, Luigi Minafra <sup>1,2</sup>, Pietro Pisciotta <sup>2,4</sup>, Marco Calvaruso <sup>1,2</sup>, Roberta Tringali <sup>5</sup>, Barbara Tomasello <sup>5</sup>, Filippo Torrisi <sup>2,6</sup>, Giada Petringa <sup>2</sup>, Giuseppe A. P. Cirrone <sup>2</sup>, Giacomo Cuttone <sup>2</sup>, Rosaria Acquaviva <sup>5</sup>, Rosario Caltabiano <sup>3</sup> and Giorgio Russo <sup>1,2</sup>



**OR6: Radiobiologia *in vivo* (RI). (D6.2.6-8)**

- Miglioramento dei servizi di cura in Radioterapia
- Nuovi prodotti: molecole radiosensibilizzanti

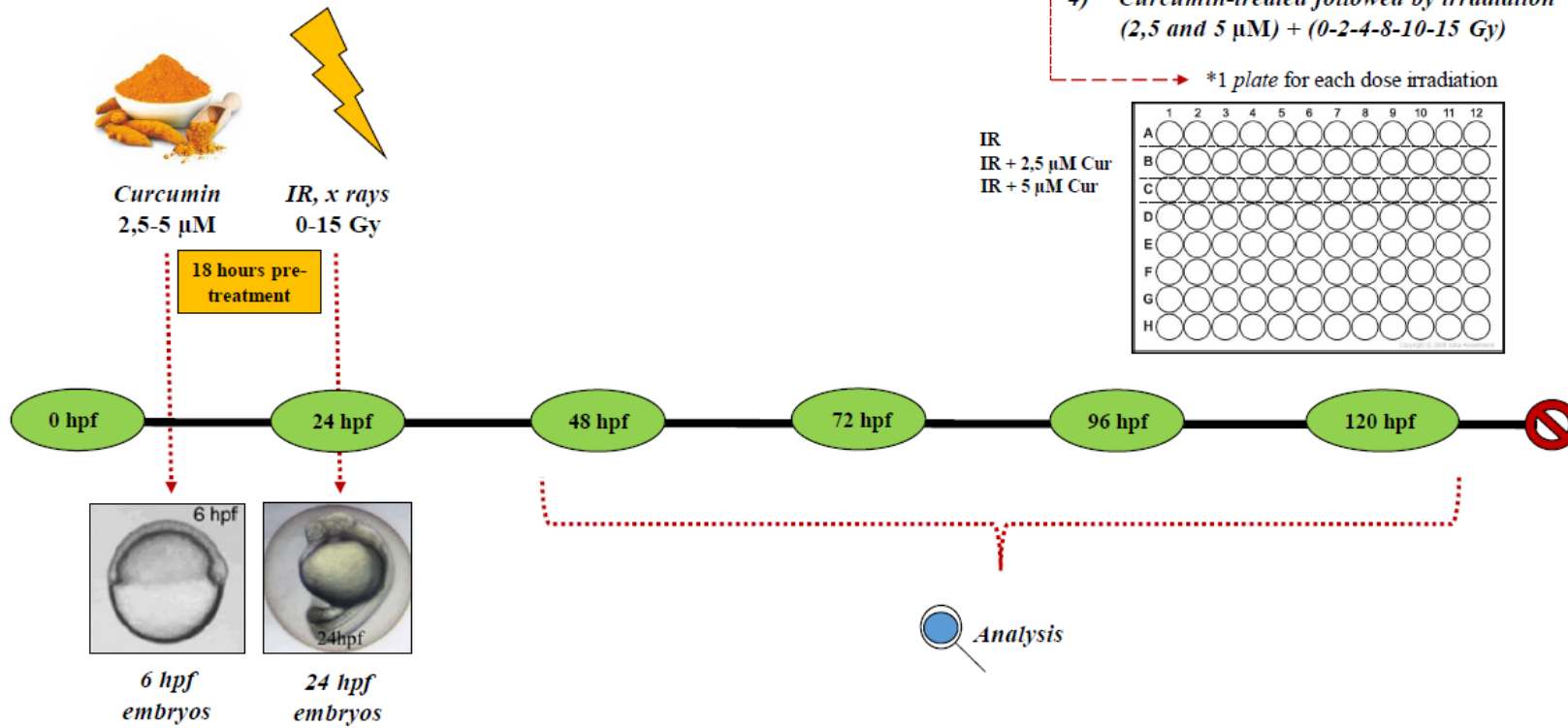
*Combined treatment: experimental planning*

- Experimental groups:*
- 1) Control
  - 2) Curcumin-treated (2,5 and 5  $\mu$ M)
  - 3) Irradiated (0-2-4-8-10-15 Gy)
  - 4) Curcumin-treated followed by irradiation (2,5 and 5  $\mu$ M) + (0-2-4-8-10-15 Gy)

\*1 plate for each dose irradiation

IR  
IR + 2,5  $\mu$ M Cur  
IR + 5  $\mu$ M Cur

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○



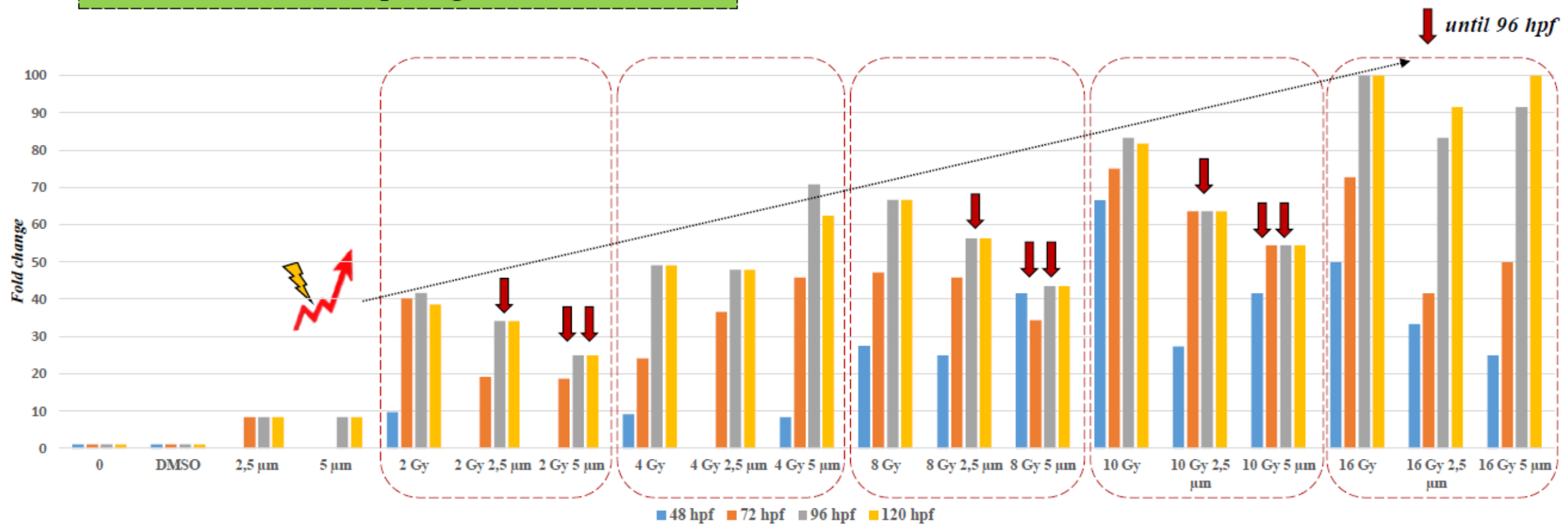
- Developmental delay and yolk sac edema
- Skeleton defects and spinal curve
- Pericardial edema
- Variation in the pigmentation degree



- OR6: Radiobiologia *in vivo* (RI). (D6.2.6-8)**
- Miglioramento dei servizi di cura in Radioterapia
  - Nuovi prodotti: molecole radiosensibilizzanti

*Result Combined treatment (2)*

**Alterations and morphological abnormalities**







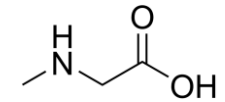


**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

**Descrizione:**

Creazione di un prototipo di kit per la determinazione della Sarcosina in campioni biologici (urina) di pazienti con carcinoma della prostata.

La prima fase della progettazione del prototipo del kit per la determinazione della **Sarcosina**



in campioni di urina richiesto un ampio studio di ricerca. Inizialmente di natura bibliografica, perché era necessaria la verifica di analisi che mostrano i valori di concentrazione di Sarcosina nelle urine.

Questa ricerca ha evidenziato che valori normali di Sarcosina nelle urine, sono compresi in un intervallo tra 0,9 e 22 μMolare\*

Tale intervallo è stato considerato come riferimento per definire i limiti di quantificazione e strutturare il kit diagnostico con alta specificità e sensibilità, pensando anche all'utilizzo dello stesso per analisi predittive.

\*. «Allen R.H. Stabler S. P. et al»

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48				
OR8	D8.2.1																																																				
	D8.2.2																																																				



**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

Il Gruppo di Lavoro Gesan nello sviluppo del kit diagnostico ha tenuto conto di diversi aspetti.

In particolare:

- alta specificità per l’analita in esame;
- alta sensibilità;
- accuratezza;
- pretrattamento semplice del campione (che non lo denaturi o modifichi in alcun modo);
- tempi di rilevazione veloci;
- reperibilità di materie prime non eccessivamente costose;
- possibilità di utilizzare il kit in qualsiasi struttura di Laboratorio di Analisi Cliniche anche senza particolari requisiti di conoscenze specialistiche.

Fatte queste premesse la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata ad un rivelatore di tipo fluorimetrico (**HPLC-FLD**) è stato considerato il metodo migliore in grado di rilevare e **DISCRIMINARE** concentrazioni micromolari di sostanze amminoacidiche quali la Sarcosina (derivato della metilazione della glicina).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48							
OR8	D8.2.1																																																							
	D8.2.2																																																							



**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

Una volta scelta la tecnica di rilevazione, obiettivo principale dello studio è stato quello di ottimizzare le performance analitiche, tali da ottenere delle reazioni specifiche e selettive nei confronti della N-metilglicina, tenendo conto della complessità della matrice urina e delle possibili interferenze.

Per valutare ciò sono stati presi in considerazione standard specifici di Sarcosina (11mM, 1,1 mM, 0,044mM), soluzioni idroalcoliche differenti, lunghezze d'onda di emissione e di eccitazione specifiche, ..., fino a poi, alla fine di tutte le prove effettuate, verificare Campioni di urine presi dal reparto di urologia dell'istituto G. Giglio di Cefalù, previo consenso dei Pazienti coinvolti, e campioni di urine provenienti da altri laboratori clinici accreditati.

Di seguito i dettagli specifici del lavoro svolto e delle scelte finali.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
OR8	D8.2.1																																																		
	D8.2.2																																																		



**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

Attività svolte:

- Tecnica analitica scelta: Cromatografia liquida ad alte prestazioni**  
**Strumento scelto HPLC Vanquish Thermo-Fisher Scientific.**



**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC  
The world leader in serving science

Vantaggi:

- elevata velocità di analisi (25 minuti per campione);
- Specificità elevata nei confronti del target utilizzando un opportuno derivatizzante fluoroforo (cloruro di dansile);
- elevate prestazioni in termini di sensibilità massimizzando il rapporto segnale/rumore;
- continuità analitica H.24.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48				
OR8	D8.2.1																																																				
	D8.2.2																																																				

**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

**Attività svolte:**

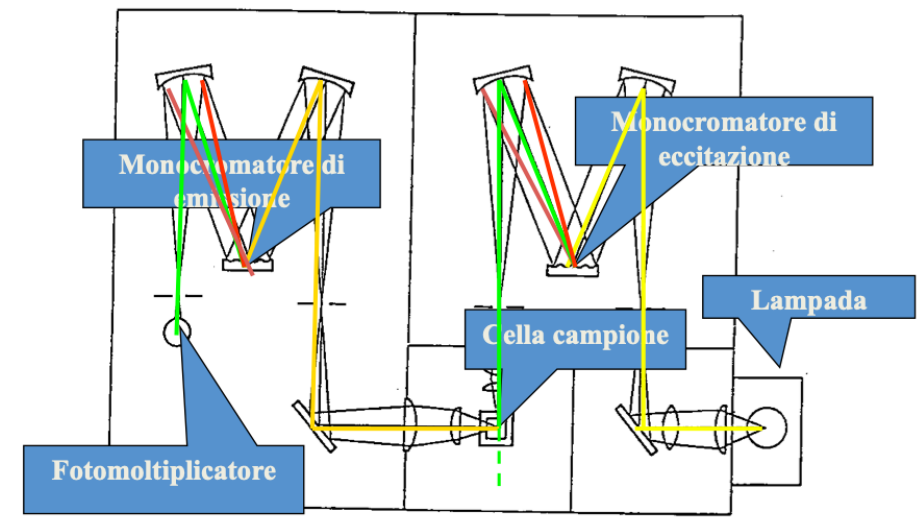
**2. Sviluppo delle opportune condizioni sperimentali: Colonna, parametri di condizionamento, parametri lavoro del fluorimetro.**

**Colonna, parametri di condizionamento:**

- Colonna cromatografica C18, (4.6 particle size) a fase inversa;
- Temperatura della colonna: costante nell'intera corsa pari a 30 °C;
- Flusso eluente 1 mL/min;
- Volume di iniezione 30 microlitri.

**Setting del rivelatore fluorimetrico:**

- Temperatura flow-cell pari a 50°C;
- Lunghezza d'onda di eccitazione a singolo canale 250 nm;
- Lunghezza d'onda di emissione a singolo canale 470 nm.



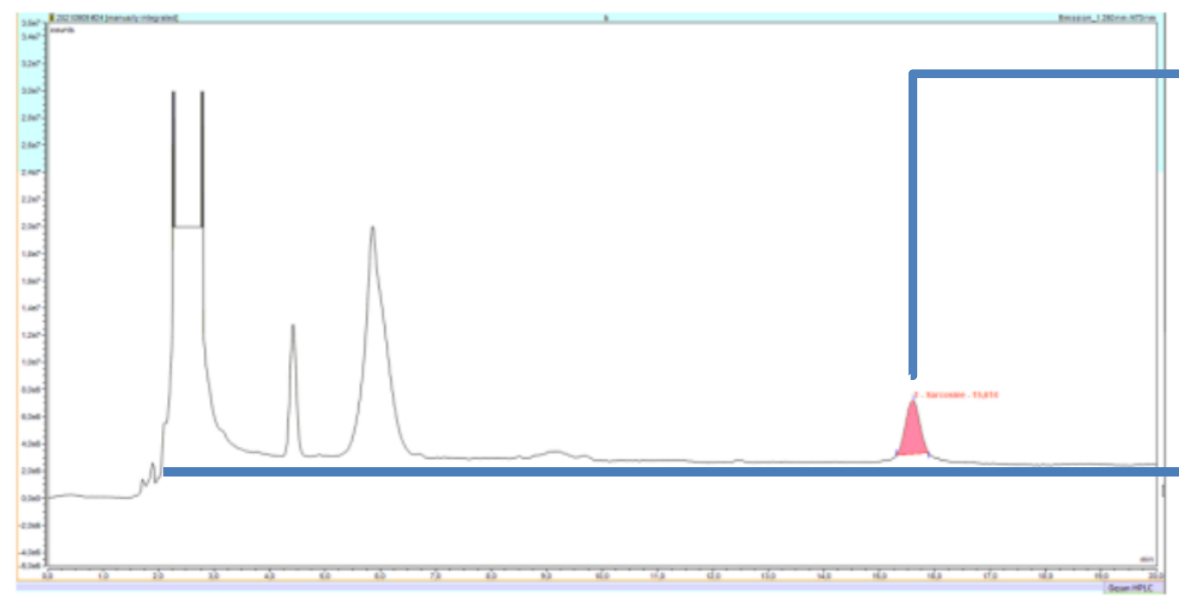
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48						
OR8	D8.2.1																																																						
	D8.2.2																																																						

**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

**Attività svolte:**

**3. Analisi cromatografica del «derivato».**

Di seguito è riportato il cromatogramma dello standard a concentrazione più alta di analita (**S1**) utilizzato per l'elaborazione della la retta di taratura (La retta è stata costruita con i seguenti standard: **S1**: 3.3840 µM; **S2**: 1.6920 µM; **S3**: 0.8460 µM; **S4**: 0.4250 µM).



**Picco della molecola derivata:  
Fluoroforo - N-metilglicina**

**Picco Fluoroforo non derivato**

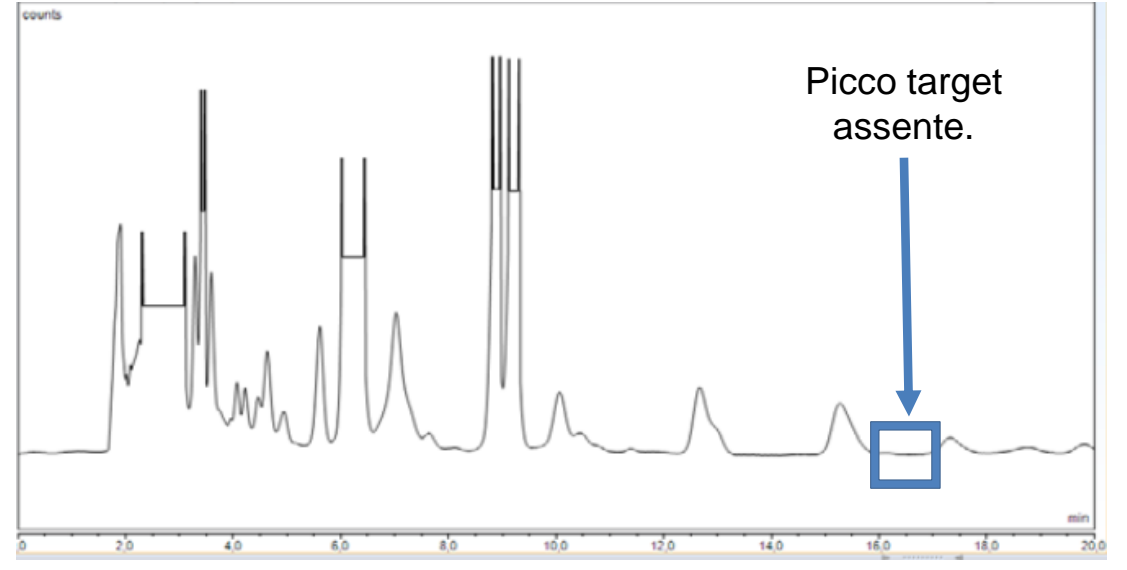
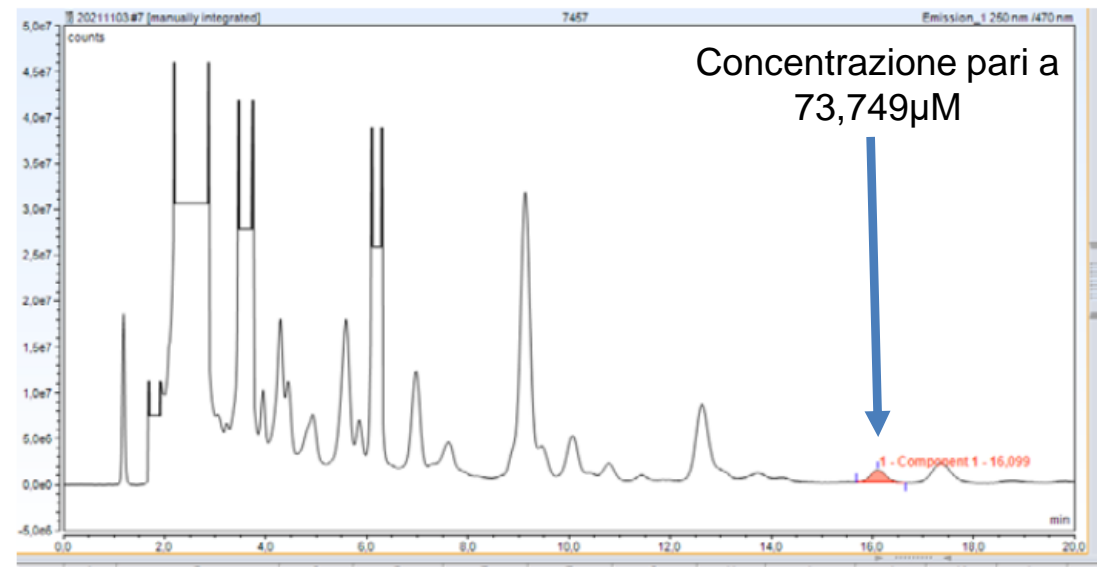
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48			
OR8	D8.2.1																																																			
	D8.2.2																																																			

**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

**Attività svolte:**

**4. Analisi cromatografica.**

Di seguito è riportato il confronto di due cromatogrammi di due pazienti, in cui si rende noto nel primo caso la presenza del picco relativo al derivato **fluoroforo – N-metilglicina**, nel secondo caso un esempio di un campione negativo.



		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48		
OR8	D8.2.1																																																		
	D8.2.2																																																		







**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%

**5. Conclusioni.**

- ❖ Dagli studi effettuati si evince che il metodo scelto è valido nella determinazione dell' amminoacido N-metilglicina su campioni biologici (urina), in quanto permette una corretta separazione dei picchi ed evita una sovrapposizione dovuta a una eluizione contemporanea, portando ad una sovrastima o sottostima del dato analitico.
- ❖ La valutazione dei cromatogrammi mostra che il picco target ha una notevole affinità per la fase stazionaria, in quanto i tempi di ritenzione sono superiori ai 15 minuti. Questo è un vantaggio perché durante tutta la corsa cromatografica eluiranno la gran parte delle sostanze che hanno una minore affinità per la fase stazionaria, riducendo la probabilità di un errata assegnazione del picco di interesse.

**I risultati emersi da questo studio sono rilevanti perché mostrano che il prototipo del kit si avvale di un metodo accurato, specifico, stabile in fase di calibrazione.**

**Si conferma che le procedure di pretrattamento del campione sono molto semplici, pertanto in futuro la validazione del kit per uso diagnostico potrà condurre alla commercializzazione dello stesso ai fini dell'utilizzo nei laboratori di analisi cliniche in routine.**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48						
OR8	D8.2.1																																																						
	D8.2.2																																																						

**OR8: CREAZIONE DEI KIT DIAGNOSTICI (SS).** Soggetto proponente: Gesan Com S.r.l. Grado di Avanzamento: 100%



		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48				
OR8	D8.2.1																																																				
	D8.2.2																																																				



*Ministero dello Sviluppo Economico*

**Grazie per l'Attenzione.**

