

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
SECONDA FACOLTÀ DI INGEGNERIA CON SEDE A CESENA
CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

Titolo

**ANALISI TEMPORALE DI CARATTERISTICHE
MORFOMETRICHE ESTRATTE DA IMMAGINI
DI BRONCOSFERE SOTTOPOSTE A DIFFERENTI
TRATTAMENTI RADIOBIOLOGICI**

Tesi in

Reti Logiche L-A

Relatore

Prof. Alessandro Bevilacqua

Presentata da

Ilaria Fantigrossi

Co-Relatori

Ing. Filippo Piccinini

Dott.ssa Anna Tesei

Dott. Rolando Polico

Sessione II

Anno Accademico 2011-2012

Indice

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	4
CAPITOLO 2 BRONCOSFERE IN BIOLOGIA.....	8
2.1 Caratterizzazione broncosfere.....	8
2.2 Produzione delle broncosfere.....	12
2.3 Trattamenti post-produzione.....	21
CAPITOLO 3 BRONCOSFERE IN RADIOLOGIA.....	24
3.1 Trattamenti radioterapici.....	24
3.2 Danni provocati ai tessuti dalla radioterapia.....	27
3.3 Ipofrazionamento accelerato.....	30
3.4 Radioterapia conformazionale.....	33
3.5 Radioterapia a modulazione d'intensità.....	34
3.6 Strumenti per l'irradiazione.....	36
CAPITOLO 4 PROTOCOLLO GENERAZIONE E ACQUISIZIONE DATI.....	47
4.1 Set-up strumenti utilizzati.....	47
4.2 Motivazioni e correlazioni attese.....	53
4.3 Preparazione e irradiazione piastre.....	57
4.4 Acquisizione immagini.....	61
4.5 Salvataggio e archiviazione dati.....	66
CAPITOLO 5 METODI E ALGORITMI PER L'ANALISI DI IMMAGINI.....	70
5.1 Ricostruzione 2D a partire dall'analisi di video.....	71
5.2 Analisi morfometrica.....	79
CAPITOLO 6 RISULTATI SPERIMENTALI.....	83
6.1 Integrità degli sferoidi.....	83
6.2 Confronto diversi trattamenti a pari numero di sedute.....	89
6.3 Confronto trattamenti a differente numero di sedute.....	96

CAPITOLO 7 CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	103
APPENDICI.....	107
A.1 Algoritmo <i>DataFromImages</i>	107
A.2 Algoritmo <i>FramesFromVideo</i>	110
A.3 Algoritmo <i>TagliaMatriceGinput</i>	111
A.4 Algoritmo <i>Mask_Details</i>	112
BIBLIOGRAFIA	115
RINGRAZIAMENTI	118

Capitolo 1

Introduzione

Il cancro del polmone è, in tutto il mondo, la più comune causa di morte dovuta a patologie oncologiche: circa 1,2 milioni di morti l'anno. In particolare il 95% delle neoplasie polmonari maligne è rappresentato dal carcinoma del polmone. La radioterapia è quella branca specialistica della medicina che prevede l'utilizzo di radiazioni ionizzanti per il trattamento di malattie, principalmente neoplasie. Al giorno d'oggi risulta essere lo standard principale di cura per il carcinoma al polmone. Fondamentalmente, lo scopo principale di un trattamento radioterapico è l'eliminazione di tutte le cellule tumorali presenti nel volume irradiato al fine di distruggere tutti i tessuti maligni e contemporaneamente minimizzare i danni ai tessuti sani [Formenti S.C., 2009]. In particolare, trattamenti radioterapici ipofrazionati accelerati consentono di curare il paziente in un tempo minore rispetto agli standard iperfrazionati, consentendo una più breve ospedalizzazione del paziente, con conseguente riduzione di costi e tempi.

Nonostante l'oggettiva constatazione dei risultati positivi riscontrati nei pazienti a seguito dei trattamenti, i processi biologici responsabili di tali effetti non sono al giorno d'oggi ancora perfettamente compresi. Infatti, ancora non si conoscono completamente gli effetti delle differenti combinazioni di parametri dei trattamenti radioterapici, quali intensità di radiazione e numero di frazionamenti. Pertanto, una delle maggiori difficoltà nell'intervenire efficacemente nella cura dei pazienti risulta essere la personalizzazione della cura con la scelta della migliore combinazione di parametri per il caso specifico in esame. La necessità di

comprendere sempre più nel dettaglio i processi biologici dovuti all'interazione tra le radiazioni e i tessuti, è la motivazione principale che ha portato alla realizzazione di un nuovo Laboratorio operativo all'interno dell'IRCCS-IRST (Istituto scientifico Romagnolo per lo Studio e la cura dei Tumori), considerato a livello nazionale uno dei migliori istituti, all'avanguardia nel campo della cura dei tumori.

Una recente strategia seguita per studiare come differenti trattamenti radioterapici e differenti parametri di cura influiscono sullo sviluppo tumorale, risulta essere l'utilizzo di aggregati multicellulari prodotti *in vitro* a partire da cellule tumorali estratte da pazienti. Questi sferoidi tumorali prodotti *in vitro* sono considerati validi modelli tridimensionali di tumore allo stato solido, idonei a consentire l'identificazione di tutti gli aspetti dei tumori *in vivo* [Kunz-Schughart L.A., 2004]. A tal proposito, il gruppo di ricerca del Laboratorio di Bioscienze dell'IRST di Meldola è riuscito ad isolare recentemente cellule tumorali di tessuto polmonare, identificando un valido protocollo in grado di portare alla stabilizzazione e proliferazione delle cellule estratte, riuscendo inoltre a creare da esse sferoidi *in vitro* [Tesei A., 2009].

Utilizzando gli sferoidi di cellule tumorali è stato possibile eseguire in laboratorio una serie di esperimenti volti a confrontare l'effetto di differenti trattamenti radioterapici, regolando parametri dei trattamenti e monitorando per mezzo di test biologici lo stato di vitalità delle cellule trattate [Kwon J.Y., 2010]. Tuttavia, i test di vitalità attualmente seguiti risultano essere fortemente invasivi, richiedendo la disgregazione del campione in singole cellule. Occorre quindi produrre *in vitro* ingenti quantità di materiale e sottoporlo ai medesimi trattamenti radioterapici al fine di monitorare nel lungo periodo lo stato di proliferazione cellulare dei campioni tumorali trattati mantenendo una statistica significativa. Risulterebbe pertanto particolarmente utile uno strumento non invasivo che consentisse di determinare la miglior combinazione possibile di parametri per le sedute radioterapiche, monitorando lo stato di vitalità del tumore in esame, senza bisogno di ricorrere a studi statistici. Una risposta positiva a tale scopo potrebbe derivare dall'impiego di metodi di *imaging* basati sullo studio di caratteristiche densitometriche degli sferoidi trattati. Ad esempio, studi in letteratura indicano che la variazione percentuale del volume del tumore a seguito dei trattamenti fornisce indicazioni utili sullo stato di vitalità del tumore e sulle capacità rigenerative delle cellule [Juergen F., 2007].

Lo scopo principale del lavoro svolto in questa Tesi consiste nel raccogliere ed analizzare informazioni morfologiche estratte in maniera automatica da un numero notevole di sferoidi trattati secondo differenti modalità di cura

radioterapica. Correlando tali informazioni morfologiche con risultati ottenuti con i tradizionali metodi per il monitoraggio della vitalità cellulare, è possibile al termine fornire indicazioni in modo non invasivo sugli effetti delle radiazioni sul tumore trattato e, auspicabilmente, contribuire a formulare una prognosi più precisa. Grazie agli algoritmi di elaborazione di immagini prodotti e dall'analisi della vasta mole di dati prodotti (sono state acquisite ed analizzate circa 3800 immagini di sferoidi tumorali), sono state ricavate le linee di tendenza temporale di alcuni trattamenti radioterapici attualmente in uso clinico. La validazione approfondita di questi metodi non invasivi fornirebbe al radioterapista un valido strumento di ausilio alla personalizzazione sul paziente del trattamento radioterapico, definendo in maniera più adeguata alcuni parametri di cura quali ad esempio intensità di irradiazione e numero di sedute.

Questo lavoro di Tesi si inserisce nel contesto di un progetto di collaborazione nato tra il neonato Laboratorio di Radiobiologia dell'IRST e il gruppo di ricerca *Computer Vision Group (CVG)* della II Facoltà di Ingegneria dell'Università di Bologna, coordinato dal Prof. Alessandro Bevilacqua. In particolare, sono stata seguita principalmente dalla Dott.ssa Anna Tesei per la parte biologica, dal Dott. Rolando Polico e dalla Dott.ssa Anna Sarnelli per la parte radiobiologica e dal Prof. Alessandro Bevilacqua e dall'Ing. Filippo Piccinini per la parte di analisi di immagini. Questa Tesi sperimentale ha avuto una durata di circa 7 mesi e i risultati ottenuti sono ora in fase di studio approfondito per verificare l'eventuale preparazione di due lavori da sottomettere alla conferenza *IEEE Healthcare Innovation Conference 2012* ed all'*International Journal Of Radiation Biology*, rispettivamente.

Questo elaborato di Tesi è composto dai seguenti altri capitoli:

- Capitolo 2: presenta una descrizione delle cellule e del protocollo utilizzato per la creazione di sferoidi. Vengono inoltre descritte le metodologie operative seguite per la semina degli sferoidi nelle rispettive piastre utilizzate nell'esperimento e la serie di trattamenti post-produzione eseguiti.
- Capitolo 3: vengono descritte, a livello generale, le tipologie di trattamento radioterapico utilizzate per la cura del carcinoma polmonare, facendo riferimento al protocollo seguito internamente dall'istituto IRST. Vengono descritte inoltre le strumentazioni di base del Laboratorio di Radiobiologia

utilizzate per l'esecuzione dei trattamenti radioterapici sulle piastre contenenti sferoidi.

- Capitolo 4: vengono descritti il protocollo di generazione e acquisizione dati, evidenziando i metodi e gli strumenti utilizzati per l'acquisizione delle immagini. Viene riportato inoltre il protocollo dell'esperimento sottolineando le motivazioni e correlazioni attese. Infine, si illustrano le regole di catalogazione ed archiviazione seguite al fine di favorire una corretta analisi dati.
- Capitolo 5: vengono descritti gli algoritmi implementati ed utilizzati per l'analisi automatica dei dati. In particolare, vengono descritti gli algoritmi per l'acquisizione dei differenti piani focali degli sferoidi, per la ricostruzione dell'immagine 2D perfettamente a fuoco e per la costruzione delle linee di tendenza temporale delle specifiche caratteristiche morfologiche degli sferoidi acquisiti.
- Capitolo 6: vengono discussi e analizzati in dettaglio i risultati sperimentali ottenuti. In particolare, vengono confrontati gli effetti dei diversi trattamenti radioterapici, valutando dall'analisi dei dati, i tipi di trattamenti risultati più efficienti.
- Capitolo 7: si traggono le conclusioni dell'esperimento, le capacità apprese, i risultati operativi raggiunti ed i potenziali sviluppi futuri a partire da tali risultati.

Capitolo 2

Broncosfere in biologia

Uno dei principali ostacoli alla realizzazione di studi affidabili sulla cura dei tumori consiste nella mancanza di disponibilità di materiale in quantità tale da possedere significatività statistica, e con le stesse identiche caratteristiche, su cui testare differenti parametri e trattamenti. Una risposta a questo problema può essere fornita dalle broncosfere, sferoidi multicellulari di grandi dimensioni (anche circa 2 mm di diametro) creati in laboratorio partendo da linee stabilizzate di cellule tumorali. Le broncosfere rappresentano un ottimo modello di tumore allo stato solido su cui poter quindi studiare e testare vari trattamenti terapeutici. In questo capitolo vengono descritte le linee cellulari tumorali utilizzate per creare le broncosfere. In particolare, verranno discusse le caratteristiche generali di questi aggregati multicellulari, con attenzione specifica agli aspetti strutturali e alla dinamica della crescita temporale.

2.1 Caratterizzazione broncosfere

Tra i progetti di maggior rilievo del Laboratorio di Farmacologia Preclinica dell'IRST di Meldola, vi è lo studio morfologico e funzionale delle broncosfere, aggregati multicellulari a forma sferica creati in laboratorio a partire da cellule provenienti dai bronchi alveolari e considerati un ottimo modello di tumore allo stato solido su cui testare diversi trattamenti di cura. In particolare, le broncosfere sono create a partire da linee cellulari isolate direttamente dai biologi dell'IRST a

seguito di un recupero cutaneo, mediante biopsia, di un uomo di 68 anni di razza caucasica, sottoposto a toracotomia per una moderata differenziazione di un carcinoma delle cellule squamose del polmone, con coinvolgimento delle ossa. Tali cellule furono denominate CAEP, partendo dalle iniziali delle parole Carcinoma EPidermoidale [Gasperi A.,1998].

In base all'aspetto che le cellule tumorali presentano all'esame microscopico, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito due diversi tipi di tumore al polmone:

1. SCLC (*small cell lung cancer* o carcinoma polmonare a piccole cellule) caratterizzato da cellule di piccola taglia che assai frequentemente si accompagna a metastasi diffuse. È un tumore estremamente maligno con elevatissima mortalità che ha origine dalle cellule neuroendocrine (cellule endocrine che grazie alle terminazioni nervose sono in grado di regolare le secrezioni determinando la liberazione di ormoni).
2. NSCLC (*non small cell lung cancer* o carcinoma polmonare non a piccole cellule), rappresenta l'85-90% di tutti i tumori al polmone. All'interno degli NSCLC si possono distinguere diversi sottotipi istologici tra i quali: carcinoma polmonare a cellule squamose, adenocarcinoma polmonare, carcinoma bronchioloalveolare e carcinoma polmonare a grandi cellule [Maghfoor I., 2005]. Si distingue dal SCLC per la minor propensione alla crescita e alla diffusione (esigua attività metastatica) (Figura 2.1).

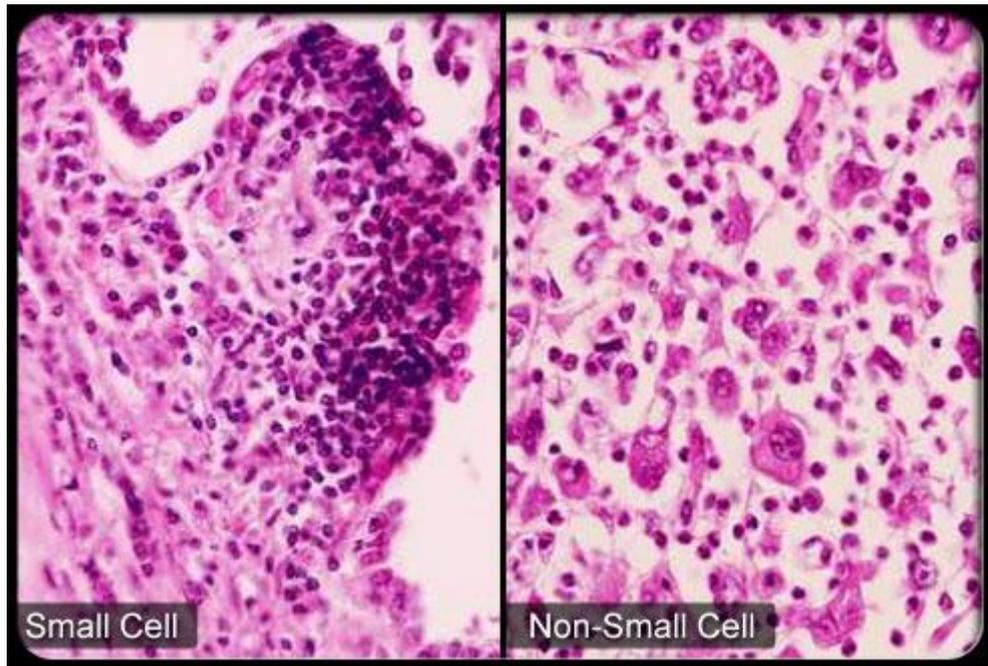


Figura 2.1 Confronto istologico tra Carcinoma Polmonare a Piccole Cellule (SCLC) e Carcinoma Polmonare Non a Piccole Cellule (NSCLC) – Tratta da www.emedicinehealth.com

Il carcinoma polmonare a cellule squamose (o carcinoma epidermoidale) è una delle varianti più frequenti di carcinoma polmonare [Eldridge L., 2012]; appartiene alla categoria dei carcinomi polmonari non a piccole cellule (NSCLC) e rappresenta circa il 30% dei casi di carcinoma polmonare. Si tratta di una neoplasia maligna a carattere invasivo che origina dall'epitelio bronchiale e come tutte le neoplasie di origine epiteliale, ricorda per quanto riguarda l'aspetto istologico il carcinoma squamocellulare della cute (Figura 2.2).

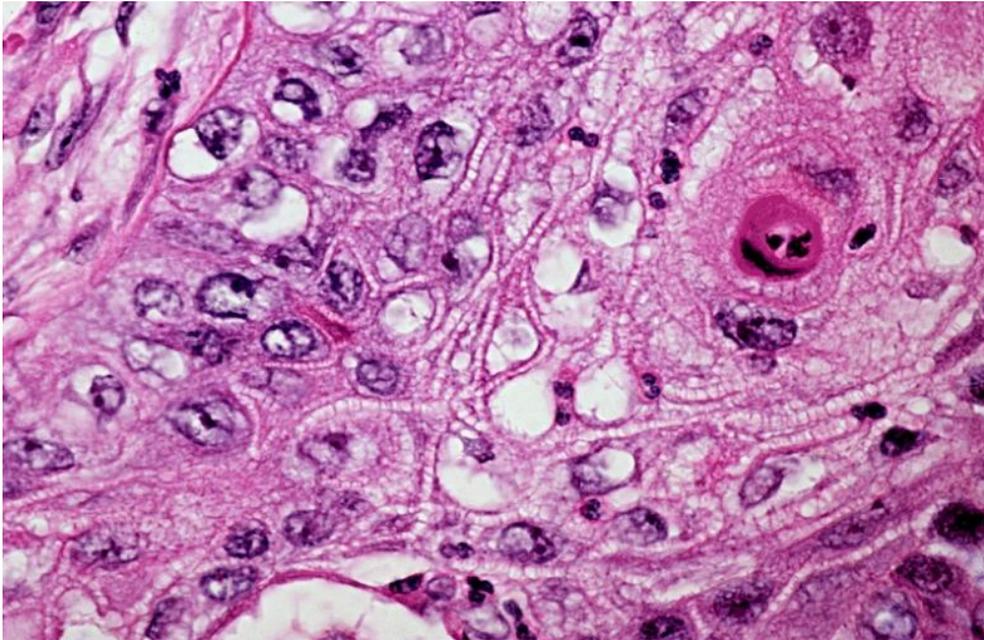


Figura 2.2 Sezione istologica di un carcinoma polmonare a cellule squamose - Tratta da Wikipedia

Analisi morfologiche eseguite mediante microscopia elettronica hanno evidenziato che le broncosfere sono composte da cellule con un'alta espressione di geni regolatori di cellule staminali che risultano essere completamente o solo parzialmente assenti nei tessuti originali [Tesei A., 2009]. In particolare, si è evidenziata la presenza di due distinti fenotipi cellulari:

1. cellule alveolari di tipo II: cellule voluminose di struttura cuboide che ricoprono circa il 5% della superficie alveolare; rappresentano cellule di notevole importanza nella funzionalità del polmone in quanto sono responsabili della secrezione del surfattante (composto glico-proteico che abbassa la tensione superficiale e favorisce gli scambi gassosi).
2. cellule Clara: cellule non mucose e non ciliate, localizzate nei bronchioli primari dei polmoni, responsabili della produzione di uno dei componenti del surfattante e dell'eliminazione di sostanze pericolose inalate nei polmoni, esplicando un'azione protettiva nei confronti dell'epitelio bronchiolare.

Valutando la morfologia delle cellule CAEP con l'ausilio della microscopia ottica in contrasto di fase, è possibile constatare che le cellule appena isolate appaiono

fusiformi, mentre tendono ad assumere una configurazione poligonale quando risultano essere in colture a maggior confluenza. Crescono prevalentemente come monostrati e le cellule risultano collegate da desmosomi (giunzioni di natura proteica tra cellule epiteliali adiacenti che saldano i rispettivi citoscheletri). Nel citoplasma risultano evidenti mitocondri di dimensioni elevate (organuli cellulari addetti principalmente alla produzione di energia, ovvero adenosintrifosfato o ATP) e rari profili di reticolo endoplasmatico rugoso (organulo cellulare costituito da una serie di membrane piegate una sull'altra e ricco di ribosomi: organelli responsabili della sintesi proteica) [Gasperi A., 1998].

2.2 Produzione delle broncosfere

La linea cellulare CAEP risulta essere una tipologia tumorale di primo interesse per lo studio di numerosi casi clinici in quanto ha mostrato una buona propensione alla formazione di sferoidi di dimensioni considerevoli (fino a più di 2 mm di diametro), definendo validi modelli di tumore allo stato solido idonei ad identificare tutti gli aspetti dei tumori *in vivo*.

A partire da tale linea cellulare, si ottengono i campioni tumorali procedendo con la successiva scissione delle cellule CAEP dai rispettivi elementi stromali, dopo una notte d'incubazione a 37°C con collagenasi (enzimi che scindono i legami peptidici presenti nel collagene, componente fondamentale della matrice extracellulare) e ialuronoglucosaminidasi o ialuronidasi (enzimi che degradano l'acido ialuronico, uno dei componenti fondamentali dei tessuti connettivi). Si procede con la filtrazione degli ammassi di cellule tumorali precedentemente raccolti (dimensione pori 50 µm), ed infine con il posizionamento nei rispetti recipienti di plastica (fiasche, Figura 2.3) contenenti una miscela in cui è presente in rapporto 1:1 il terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, terreno di coltura particolarmente adatto per cellule adese) e HAM's f12 (terreno di coltura che differisce dal DMEM per il maggior contenuto di aminoacidi, sali e glucosio), più un 10% di siero fetale e 1% di L-glutammina e insulina [Gasperi A., 1998].

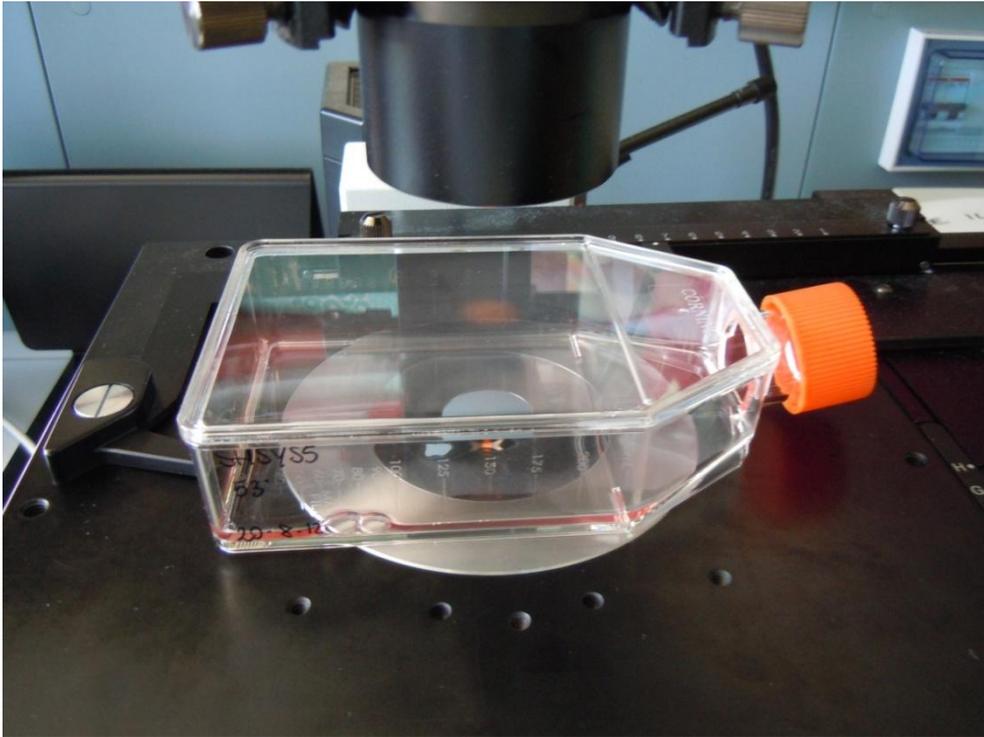


Figura 2.3 Immagine di una fiasca

Per permettere la proliferazione delle cellule *in vitro* è necessario che le condizioni dell'ambiente *in vitro* siano il più simile possibile a quello in cui le cellule si ritrovano *in vivo*. Pertanto, risultano fondamentali fattori quali la temperatura e la composizione del terreno di coltura; le colture cellulari di cellule CAEP vengono mantenute in incubatore a 37°C di temperatura e con una percentuale di CO₂ del 5%. Sono stati scelti questi valori per riprodurre esattamente i livelli di temperatura e CO₂ a cui queste cellule sarebbero sottoposte normalmente nell'organismo.

La produzione degli sferoidi dalla linea cellulare CAEP prevede l'utilizzo di un particolare dispositivo che permette la creazione e propagazione di tessuti a partire da un generico insieme di singole cellule: il bioreattore (Figura 2.4). Tale dispositivo presenta un principio di funzionamento teorico basato sulla simulazione dell'assenza di gravità, in modo da favorire una progressiva adesione cellulare attorno ad un nucleo centrale e favorendo, quindi, la formazione di un corpo tridimensionale (sferoide), inibendo la normale adesione cellulare su fiasca che tenderebbe a formare uno strato sottile di cellule. Per ottenere questo

processo, le cellule poste negli appositi contenitori, vengono fatte ruotare, generando una forte accelerazione centripeta che favorisce l'adesione cellulare delle cellule madri con le rispettive cellule figlie nate durante il processo di mitosi. Il dispositivo presente nel laboratorio di Farmacologia Preclinica dell'IRST, deriva da un brevetto NASA sviluppato per effettuare esperimenti volti ad osservare la crescita cellulare nello spazio, cercando di simularne le stesse condizioni nell'atmosfera terrestre [Botchwey EA, 2004]. Il bioreattore è sostanzialmente una camera incubatore regolata in temperatura e concentrazione gassosa, composta essenzialmente da tre parti:

1. Contenitore della coltura: unità circolari pre-sterilizzate dove sono disposti due rubinetti per iniezione e aspirazione con siringa e un'apertura per riempire e svuotare il contenitore. Le camere sono caratterizzate da una particolare membrana volta ad evitare l'adesione delle cellule sul fondo e che presenta una capacità volumetrica da 10 e 50 ml.
2. Rotatore base: elemento meccanico utilizzato per garantire la funzione di supporto e rotazione dei contenitori. Sono disponibili fino a 8 stazioni di rotazione gestite in maniera simmetrica rispetto al fulcro di rotazione principale in modo da garantire situazioni di equilibrio, minimizzando le vibrazioni. Le stazioni possono essere controllate indipendentemente per ciascun contenitore.
3. Alimentazione: *consolle* con connesso monitor per il controllo della velocità. La *consolle* è collocata fuori dall'incubatore e permette di regolare non solo la velocità ma anche il verso di rotazione dei contenitori.



Figura 2.4 Immagine di un bioreattore. Da www.Synthecon.com

Per poter creare sferoidi dalla linea cellulare CAEP, le cellule vengono fatte proliferare in fiasca fino ad un numero approssimativo di 50 milioni di cellule, in modo da avere una densità di un milione di cellule per millilitro, quando vengono posizionate nei contenitori del bioreattore. Per poter stimare il numero di cellule presenti nella fiasca viene usualmente utilizzato un emocitometro: un piccolo contenitore per cellule formato da uno speciale vetrino portaoggetti con opportuno copri oggetto, con impressa (o stampata) nella superficie una griglia graduata. L'emocitometro è utilizzato abbinato al microscopio ottico per riuscire a contare le cellule in un volume noto, specificato dalla griglia graduata; questo tipo di conteggio è operatore-dipendente ed in generale è più lento rispetto ai sistemi automatizzati, ma ha il vantaggio che permette di osservare lo stato delle cellule e quindi di accorgersi di eventuali anomalie. Quando il numero di cellule all'interno della fiasca è approssimativamente quello desiderato, si procede con l'introduzione delle cellule nei rispettivi contenitori del bioreattore, conseguendo la creazione di uno sferoide cellulare mediante adesione delle cellule madri alle cellule figlie, nate durante il processo di mitosi.

Le fasi che determinano la creazione di broncosfere possono essere riassunte nei seguenti processi:

1. Si prende un contenitore del bioreattore con capacità di 50 ml conseguendo una densità cellulare di circa un milione per millilitro (parametro stimato sperimentalmente dai biologi dell'IRST per ottenere un numero significativo di sferoidi).
2. Si procede ad “attivare” la membrana del contenitore, in modo da renderla non aderente per le cellule. Per l'attivazione si aggiunge 25-30 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline), una soluzione salina tampone contenente cloruro di sodio, fosfato di sodio e in alcune formulazioni, cloruro di potassio e fosfato di potassio, comunemente usata per la sua caratteristica di isotonicità rispetto alle cellule umane.
3. Dopo circa 30 minuti, la membrana posta sul fondo dei contenitori del bioreattore, può considerarsi “attivata” e si procede, quindi, a prelevare il PBS mediante l'utilizzo di una pipetta con puntale sterile (Figura 2.5).
4. Una volta posta la coltura cellulare in una provetta, viene effettuata una centrifugazione, in modo da garantire la separazione dei diversi elementi rispettivamente in base alla loro densità. In tal modo, le cellule, avendo densità maggiore dei componenti del terreno di coltura, andranno a depositarsi sul fondo.
5. Si prelevano le cellule dal fondo della provetta mediante l'utilizzo di una pipetta automatica con puntale sterile e successivamente si introducono nei rispettivi contenitori del bioreattore.
6. Viene aggiunto all'interno dei contenitori il terreno di coltura RPMI1640 (acronimo di Roswell Park Memorial Institute, istituto dove è stato prodotto: è un terreno di coltura costituito essenzialmente da vitamine, aminoacidi, sali e glucosio, comunemente usato per i leucociti del sangue umano), attraverso un rubinetto per iniezione con siringa. Vengono aggiunti inoltre antibiotici quali amfotericina e penicillina.
7. Utilizzando due siringhe, una vuota posta nel rubinetto per l'aspirazione e una contenente il terreno di coltura posta nel rubinetto d'iniezione, si procede all'introduzione del terreno di coltura nei rispettivi contenitori del bioreattore fino a che l'aria residua non

fuoriesca completamente, entrando nella siringa vuota posta nel rubinetto d'aspirazione.

8. Vengono serrati i rubinetti dei contenitori per evitare la fuoriuscita del materiale e si introducono all'interno degli appositi alloggiamenti del bioreattore.
9. Viene impostata la velocità a 12,4 giri al minuto. È stata impostata questa velocità perché consigliata dall'azienda produttrice del bioreattore come valore iniziale di rotazione dei contenitori per tipologie cellulari affini a quella considerata. La velocità non resta costante durante l'intero processo di creazione degli sferoidi: per garantire che gli sferoidi durante la loro crescita rimangano sempre in continuo movimento senza mai collidere contro i bordi del contenitore, è necessario, infatti, incrementare lievemente la velocità per mantenere l'equilibrio nei giorni a seguire.
10. Vengono, infine, controllati i livelli di CO₂ e di temperatura dell'incubatore assicurandosi che risultino settati ai valori precedentemente definiti per il corretto mantenimento delle colture cellulari.

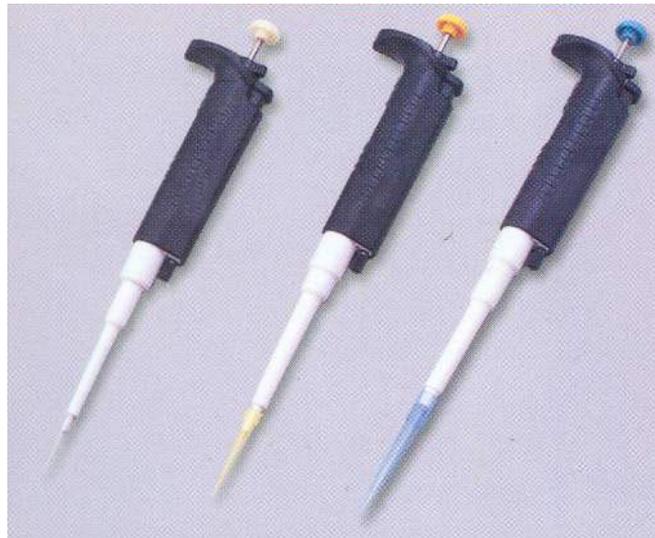


Figura 2.5 Pipette

Circa 2 volte a settimana viene sostituito il terreno di coltura in modo da permettere alle cellule di avere il nutrimento necessario per lo sviluppo cellulare. Questo procedimento prevede l'utilizzo di specifiche accortezze elencate di seguito:

1. Una volta estratto il contenitore dal rotore, viene prelevato e posto in una provetta l'intero contenuto; per evitare che la membrana interna possa seccarsi, perdendo così le sue caratteristiche di inibizione all'adesione cellulare, vengono introdotti nel contenitore 10 ml di terreno nuovo, volume sufficiente a ricoprire superficialmente l'intera membrana.
2. Si procede alla sostituzione del terreno di coltura delle broncofere, utilizzando procedure analoghe precedentemente descritte.
3. Si reintroduce il contenitore nel rotore e si inverte il verso di rotazione.
4. Viene regolata la velocità di rotazione in modo che durante la rotazione del contenitore, gli sferoidi rimangano sempre in continuo movimento senza mai collidere contro i rispettivi bordi.

Mediante osservazioni sperimentali, la creazione degli sferoidi di cellule CAEP può essere ritenuta matura, con formazione di sferoidi di dimensioni superiori a circa 0,5 mm, intorno al quindicesimo giorno dall'introduzione delle cellule nel contenitore del bioreattore, e solitamente rimangono vitali fino a circa il trentesimo giorno. La sequenza temporale degli eventi che portano alla realizzazione degli sferoidi comporta generalmente una formazione di piccoli aggregati poco compatti durante le prime ore (fino a 24 ore; Figura 2.6 (b)) partendo da un monostrato di cellule (Figura 2.6 (a)). Nel periodo successivo (circa 2-5 giorni), gli sferoidi diventano strutture sferiche composte da numerose cellule compattate in cui è difficile distinguere le cellule (Figura 2.6 (c)).

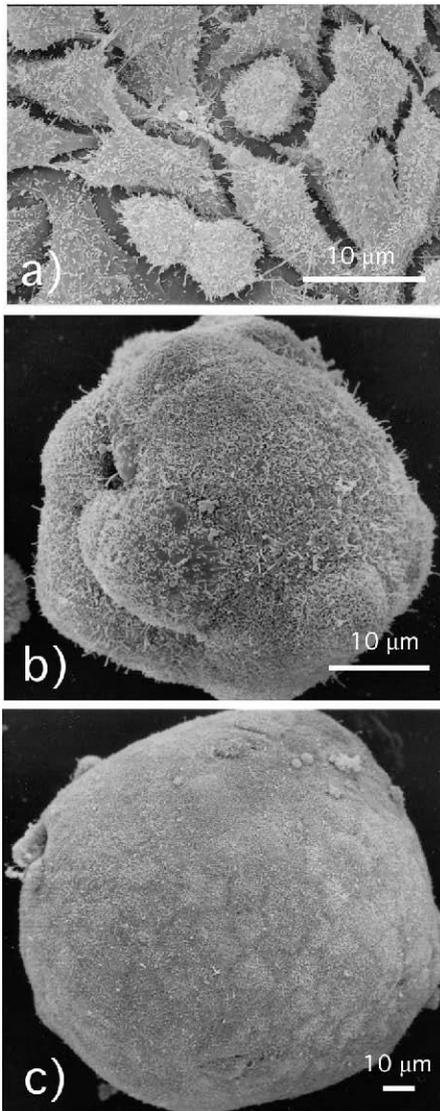


Figura 2.6 Microscopia elettronica a scansione di cellule MG-63 (osteosarcoma umano) cresciute in monostrato per 24 ore (a), e come sferoidi di 72 ore (b) e di cinque giorni (c) [Santini M.T., 2005]

Diversi studi hanno dimostrato che gli sferoidi tumorali sono caratterizzati da una prima fase di crescita esponenziale, seguita da un periodo di crescita rallentata [Sutherland, 1988]. Sono stati messi a punto vari modelli matematici per dimostrare la forte somiglianza esistente tra la crescita di un tumore solido e quella degli sferoidi ed è stato possibile individuare le curve di crescita rappresentanti la dinamica di crescita temporale degli sferoidi, suddivise in tre fasi successive (geometrica, lineare e *plateau*) [Conger S.D., 1983]. La fase geometrica corrisponde all'aggregazione precoce e alla proliferazione di piccoli sferoidi in cui le cellule si dispongono geometricamente nello spazio senza

compattarsi, mentre le fasi lineari e di *plateau* rappresentano, rispettivamente, lo sviluppo di regioni interne non proliferanti e la formazione di centri necrotici negli sferoidi (Figura 2.7).

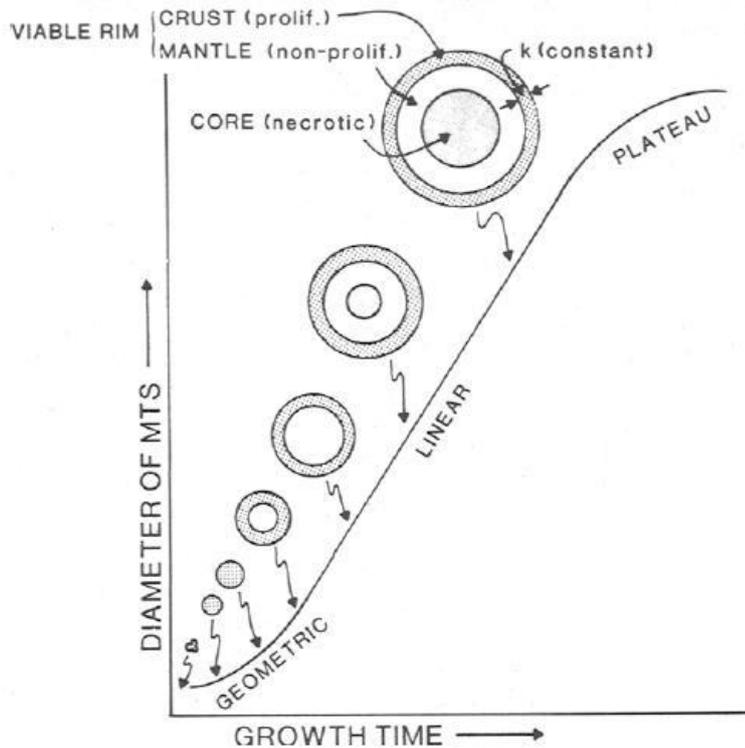


Figura 2.7 Curva rappresentante le fasi di crescita di MTS (Multicellular Tumor Spheroids) *prolif.*, proliferativo; *non-prolif.*, non proliferativo [Ziskin, 1983]

Da tali studi emerge, quindi, che gli sferoidi multicellulari tumorali (MTS) come i tumori solidi *in vivo*, durante la loro fase di crescita, possono essere considerati solidi cellulari eterogenei costituiti essenzialmente da 3 strati: una 'crosta' esterna proliferativa, un 'mantello' non proliferativo e un *core* centrale necrotico [Kempf H., 2010]. Si nota, inoltre, dalla figura che gli spessori della 'crosta' e del 'mantello' rimangono costanti una volta raggiunta la fase finale lineare.

2.3 Trattamenti post-produzione

Terminata la fase di produzione degli sferoidi, si procede con la loro “semina in piastra”. Per effettuare questa operazione le piastre vengono attivate 20 minuti prima in modo da renderle non aderenti per gli sferoidi: prima si inietta in ogni pozzetto 300 μ l di RPMI1640, poi si mantiene la piastra in incubatore a 37°C e con una percentuale di anidride carbonica del 5%. Una volta attivate le piastre, si posizionano sotto cappa e si procede con la semina degli sferoidi nei rispettivi pozzetti. Uno stratagemma per riuscire a raccogliere un singolo sferoide, consiste nel tagliare la punta del puntale sterile di una pipetta automatica (all'incirca intorno alla prima tacca) e procedere prelevando lentamente una piccola quantità di liquido finché non viene aspirato un singolo sferoide (Figura 2.8) che verrà successivamente posto in uno dei 96 pozzetti di una piastra *multiwell* (Figura 2.9).

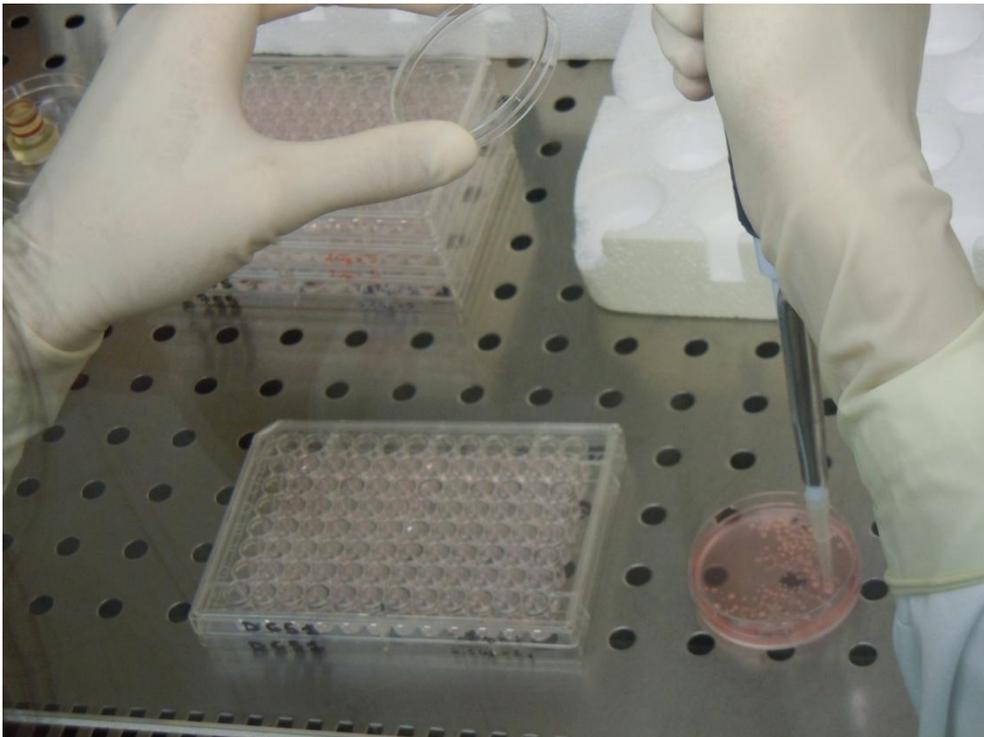


Figura 2.8 Prelevazione degli sferoidi dal contenitore del bioreattore mediante pipetta automatica con puntale sterile

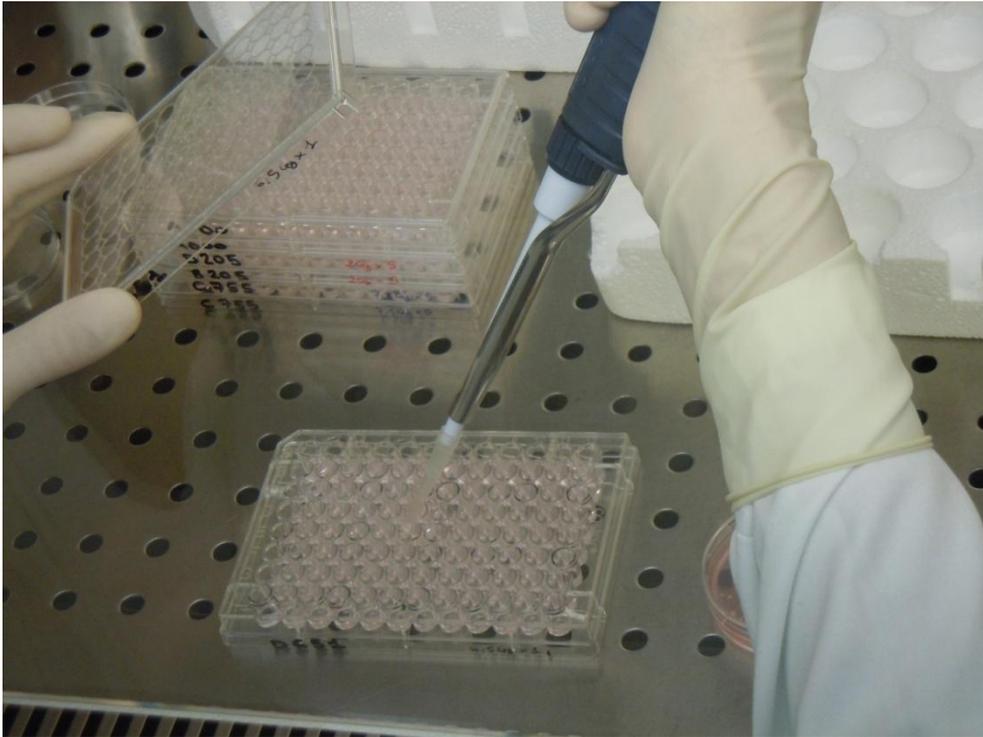


Figura 2.9 Posizionamento degli sferoidi nei rispettivi pozzetti di una piastra *multiwell* da 96

Si ripete questa operazione fino a quando viene posto uno sferoide per ogni pozzetto della piastra. Per garantire il mantenimento degli sferoidi nelle piastre senza rischio di danneggiamento, è necessario che il terreno di coltura non venga sostituito completamente nel corso dei giorni, ma che ad ogni cambio terreno, ne vengano prelevati solo 150 μ l, sostituendolo con altrettanta quantità di terreno nuovo. Questo per evitare di aspirare con la pipetta automatica anche del materiale cellulare. In particolare, si procede con la sostituzione del terreno di coltura con una cadenza di 5 volte a settimana e ogni volta si riposizionano le piastre in incubatore a 37°C e con una percentuale di CO₂ del 5%.

Per determinare come i singoli sferoidi rispondano ai diversi trattamenti radioterapici subiti, vengono tipicamente eseguiti test di vitalità in grado di fornire chiarimenti sullo stato delle cellule. In particolare, nel nostro caso sono stati eseguiti con cadenza settimanale due particolari test di vitalità: il test sulla fosfatasi acida e il test clonogenico. Il test sulla fosfatasi acida o APH (acronimo di Acid Phosphatase Assay), è un test enzimatico che permette di valutare la vitalità delle cellule mediante la quantificazione dell'attività enzimatica della fosfatasi acida. Quest'ultima, normalmente presente in cellule vitali, è in grado di convertire il p-nitrofenil fosfato in p-nitrofenolo, in seguito alla rimozione di un

gruppo fosfato [Kunz, 2007]. Se le cellule sono vitali e sono di tipo tumorale, si riscontra un'elevata percentuale di fosfatasi acida e quindi un elevato grado di p-nitrofenolo.

Il test clonogenico è frequentemente utilizzato nei laboratori di radiobiologia per determinare l'effetto di farmaci o trattamenti radioterapici sulla proliferazione di cellule tumorali. Il termine "clonogenico" si riferisce alla capacità di una cellula di dividersi e produrre un gran numero di progenie (cloni). A tal proposito i biologi considerano come principali indicatori di morte cellulare, la perdita di integrità cellulare e l'incapacità a proliferare. Pertanto, una cellula che mantiene la capacità di sintetizzare le proteine e il DNA, ma non è in grado di proliferare, viene considerata morta. D'altra parte, una cellula in grado di dividersi e generare un gran numero di cloni cellulari, viene considerata viva: si definisce pertanto cellula clonogenica. Nel caso in esame, il test è stato eseguito procedendo inizialmente alla disgregazione degli sferoidi interessati nelle rispettive singole cellule costituenti. Una volta ottenute le singole cellule, si è provveduto a posizionarle in appositi contenitori con un terreno di coltura contenente il 10% di siero fetale bovino, con aggiunta di antibiotici (penicillina-streptomina) e glutammina. Per ogni 500 ml di terreno sono stati aggiunti 55 ml di siero, 5 ml di L-glutammina e 5 mL di penicillina-streptomina. Le cellule sono state in seguito trattate con tripsina (enzima che induce le cellule a staccarsi dal substrato) in modo da ottenere sospensioni monocellulari. Successivamente le singole cellule sono state seminate in una piastra e poste in incubatore per 2 settimane in modo da garantire ad ognuna di esse condizioni ottimali per la proliferazione. Tutte le cellule vive tenderanno a formare delle vere e proprie colonie, facilmente visibili ad occhio nudo, specialmente se fissate e colorate con opportuni reagenti: ad esempio 0,5% di *Gentian Violet* (composto in metanolo). Per poter stimare il numero di colonie generate viene usualmente utilizzato un emocitometro abbinato con un microscopio ottico. Tutte le cellule che compongono una colonia sono la progenie di una singola cellula: ad esempio, se inizialmente sono state seminate 50 cellule, il numero di colonie contate potrà essere compreso tra 0 e 50. Per poter stimare il numero di colonie originate dalle singole cellule, si utilizza un coefficiente denominato PE (acronimo di *Plating Efficiency*). Questo coefficiente indica la percentuale di cellule che ha dato origine ad una colonia: pertanto, nel precedente esempio, se sono presenti 25 colonie, il PE è del 50% [Munshi A., 2005].

Capitolo 3

Broncosfere in radiologia

In questo capitolo sono riassunte le caratteristiche dei principali trattamenti utilizzati in radioterapia per contrastare il carcinoma polmonare. Lo scopo non è il fornire una descrizione dettagliata, ma un'introduzione alle tecniche in uso facendo riferimento ai maggiori problemi che queste cure comportano. Inoltre sono elencati i principali strumenti e le modalità utilizzate nel nostro esperimento, al fine di trattare le broncosfere e comparare gli effetti indotti da differenti trattamenti radioterapici.

3.1 Trattamenti radioterapici

Facendo riferimento al protocollo ufficiale del centro IRST [IRST, 2008], andiamo ad analizzare le tecniche attualmente utilizzate per la cura del carcinoma polmonare, in particolare ci soffermeremo sulle tecniche utilizzate per la tipologia di tumore chiamata in inglese: "Non Small Cell Lung Cancer" (NSCLC).

Il NSCLC rappresenta la prima neoplasia in Italia in termini di mortalità. A seguito della diagnosi, solo il 20% dei pazienti presenta una malattia predisposta al trattamento chirurgico, mentre gli altri presentano una malattia localmente avanzata o in metastasi. La chirurgia, come trattamento primario, è certamente indicata per i pazienti nelle fasi iniziali, mentre nello stadio avanzato, è al massimo utilizzata come pre-trattamento per migliorare la situazione del paziente

accompagnata da trattamenti adiuvanti. Una situazione analoga, dove la chirurgia non è applicabile, si verifica quando i pazienti hanno comorbidità (coesistenza di due o più patologie diverse) importanti che aumentano il rischio chirurgico o limitano la riabilitazione funzionale post-chirurgica. In tutti questi casi, una valida possibilità di cura risulta essere la radioterapia (RT) in associazione o meno con la chemioterapia (CT).

L'integrazione della RT con la CT è stata proposta da molti anni per migliorare il controllo delle neoplasie del polmone localmente avanzato. Questo per un duplice effetto positivo:

1. La CT può contribuire a migliorare il controllo a distanza favorendo l'eradicazione delle micro metastasi della malattia.
2. L'uso di farmaci chemioterapici ad azione radiosensibilizzante insieme alla RT migliora il controllo locale della malattia.

Tuttavia, l'integrazione tra la CT e la RT pone molti problemi circa la tossicità dell'uso combinato di questi due trattamenti. In realtà, diversi approcci sono stati proposti al fine di ottimizzare tale integrazione, ottenendo migliori risultati con minor tossicità:

- Trattamento sequenziale (CT -> RT). Vantaggi: minore tossicità per il paziente dovuta alla non contemporaneità dei trattamenti. Svantaggi: riduzione dell'effetto radiosensibilizzante della chemioterapia e quindi del controllo locale del tumore.
- Trattamento concomitante (CT + RT), con caratteristiche opposte al trattamento sequenziale. Maggiore tossicità del trattamento con maggior controllo locale del tumore. Per diminuire l'effetto tossico della terapia si utilizzano dei farmaci chemioterapici sub-tossici ovvero che hanno una buona radiosensibilizzazione del tessuto e un minor effetto citotossico.
- Trattamento sequenziale concomitante (CT-> CT + RT). Prova a riunire i due differenti trattamenti precedentemente citati, cercando di sfruttare entrambi i pregi.

In particolare, nel centro di ricerca IRST il protocollo seguito nel caso di NSCLC non operabile è un trattamento sequenziale concomitante di questo tipo:

1. Una chemioterapia d'induzione (2 cicli).

- Cisplatino 75 mg/m² endovena, 1 giorno ogni 21 giorni (durata infusione: 1 ora).
- Docetaxel 75 mg/m² endovena, 1 giorno ogni 21 giorni (durata infusione: 1 ora).
- Idratazione per il Cisplatino e premedicazione per il Docetaxel secondo le procedure interne.

2. Una radioterapia ipofrazionata accelerata

- Seguendo il secondo ciclo di chemioterapia d'induzione, i pazienti sono sottoposti a radioterapia con una dose totale di 25-40 Gy da cui si calcola la dose di riferimento in 5 frazioni. La radioterapia sarà effettuata dal 15° al 19° giorno del secondo ciclo.

3. Una chemioterapia consolidante

- Cisplatino 75 mg/m² endovena, 1 giorno ogni 21 giorni.
- Docetaxel 60 mg/m² endovena, 1 giorno ogni 21 giorni.
- Idratazione per il Cisplatino e pre-medicazione per il Docetaxel secondo le procedure interne. La chemioterapia di consolidamento inizierà alla fine della radioterapia.

Nei prossimi paragrafi ci concentreremo soprattutto sulla radioterapia, punto d'interesse del nostro studio.

3.2 Danni provocati ai tessuti dalla radioterapia

La radioterapia è una terapia medica che consiste nell'utilizzo di radiazioni ionizzanti in grado di danneggiare il DNA del tessuto bersaglio. Le cellule tumorali sono, in genere, scarsamente capaci di riparare i propri danni e quindi, se il loro DNA viene danneggiato, vanno incontro a morte cellulare in maniera più accentuata rispetto alle cellule sane. La descrizione dei danni provocati ai tessuti qui a seguito illustrati sono estratti dal libro "Oncologia Medica Pratica" [Arcangeli G., 2010].

Come precedentemente accennato, il principio base della radioterapia è fondato sull'utilizzo di radiazioni ionizzanti. In particolare, queste vengono prodotte sfruttando l'effetto biologico tra radiazioni elettromagnetiche e interazione con la materia: durante l'interazione si ha l'eiezione di un elettrone orbitale, con il risultato di produrre una ionizzazione o un'eccitazione degli atomi e delle molecole. Le radiazioni ionizzanti più comunemente utilizzate sono fotoni ed elettroni e meno frequentemente neutroni e protoni. Ogni radiazione possiede caratteristiche fisiche e biologiche che possono essere vantaggiose in situazioni particolari. Nel nostro caso sono utilizzati fotoni. Questi interagiscono con la materia mediante tre principali meccanismi la cui prevalenza dipende dall'energia delle radiazioni.

EFFETTO FOTOELETTRICO

Nell'effetto fotoelettrico un fotone incidente è completamente assorbito da un elettrone di un'orbita interna con la sua conseguente eiezione (fotoelettrone). L'energia cinetica del fotoelettrone è uguale a quella del fotone incidente meno l'energia di legame dell'elettrone. Il vuoto nell'orbita elettronica dell'atomo viene subito occupato da un altro elettrone di un'orbita esterna dello stesso atomo o di un atomo diverso. Durante tale processo tutta l'energia del fotone è dissipata (Figura 3.1).

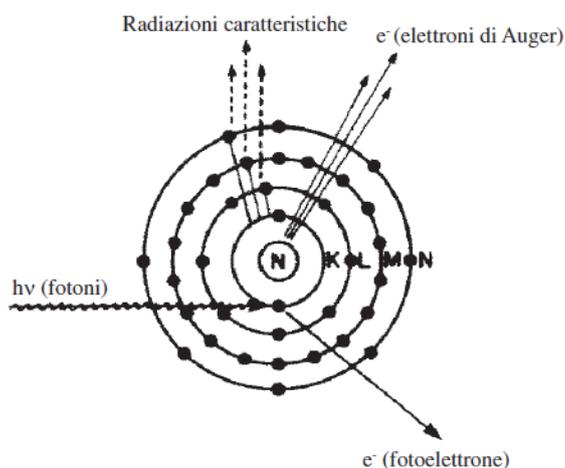


Figura 3.1 Rappresentazione schematica dell'effetto fotoelettrico [Arcangeli G., 2010]

Radiazioni caratteristiche ed elettroni di Auger sono emessi quale risultato della cascata di elettroni, al fine di occupare il vuoto creato dall'emissione elettronica. Si pensa che l'effetto fotoelettrico sia il meccanismo principale per l'interazione dei fotoni gamma e X al di sotto dei 50 keV, ma che sia molto meno importante a energie più elevate.

EFFETTO COMPTON

L'effetto Compton è il meccanismo fondamentale per l'assorbimento dei raggi gamma nell'intervallo di energie "medie", tra 100 keV e 10 MeV. Con tale meccanismo, il fotone cede solo parte della sua energia a un elettrone che si stacca formando l'elettrone Compton. Il fotone risultante, di minore energia, continua il suo cammino incidendo su un elettrone di un altro atomo, perdendo ulteriore energia, e così via fino alla dissipazione completa (Figura 3.2).

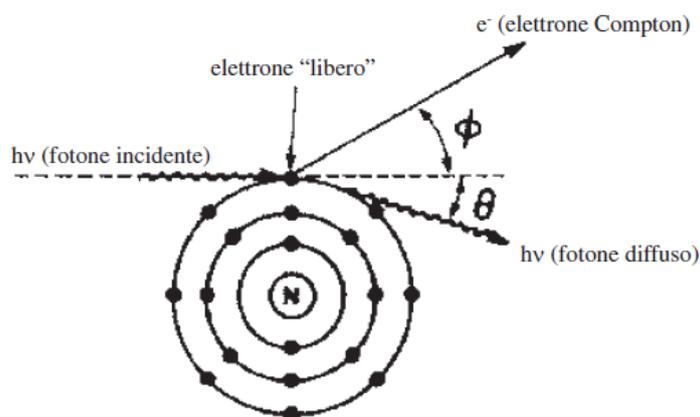


Figura 3.2 Rappresentazione schematica dell'effetto Compton [Arcangeli G., 2010]

EFFETTO DI COPPIA

Per energie fotoniche maggiori di 1.02 MeV, i fotoni che interagiscono con il campo elettromagnetico del nucleo possono produrre una coppia elettrone/positrone. L'elettrone della coppia, in genere chiamato elettrone secondario, è molto ionizzante. Il positrone, invece, avrà vita breve: si ricombina entro 10^{-8} secondi con un elettrone libero. L'intera massa delle due particelle sarà quindi convertita in due fotoni gamma con un'energia di 0.51 MeV ciascuno (Figura 3.3).

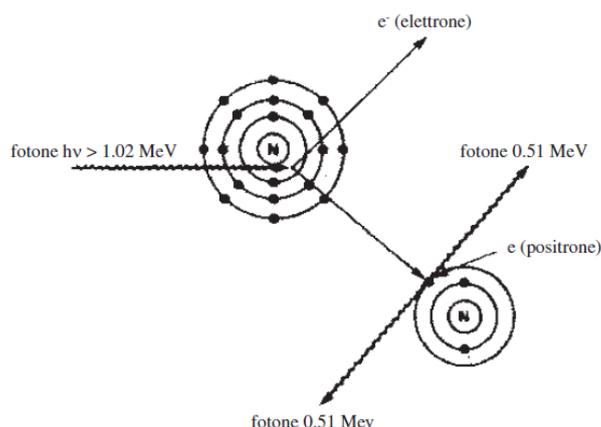


Figura 3.3 Rappresentazione schematica dell'effetto di coppia [Arcangeli G., 2010]

Il danno effettivo alle cellule è effettuato tramite due meccanismi:

1. Danno diretto: riguarda la ionizzazione diretta del DNA che provoca la lisi della struttura con conseguente perdita di funzionalità. Questo meccanismo diretto è più raro da osservare.
2. Danno indiretto: rappresenta il meccanismo predominante della distruzione cellulare, mediante il quale il danneggiamento sul DNA è prodotto indirettamente dai radicali idrossilici prodotti dalla ionizzazione del suo ambiente idrico.

3.3 Ipofrazionamento accelerato

Riportando quanto scritto nel libro “Basic Clinical Radiobiology” [Gordon G., 2002]: la distribuzione ottimale della dose nel corso del tempo è stato un dibattito aperto in tutta la storia della radioterapia e importanti progressi sono stati compiuti in questo settore nel corso degli ultimi anni. L'attuazione di programmi a frazionamento modificato basati su motivazioni biologiche è un elemento centrale della ricerca traslazionale in radioterapia oncologica e sebbene molto lavoro debba essere ancora fatto per determinare il tempo di *onset*, il tasso e il meccanismo di ripopolazione nei tumori e nei tessuti normali durante la radioterapia, si hanno abbastanza informazioni da sostenere che la durata complessiva del trattamento non deve prolungarsi troppo. Inoltre, la riduzione del tempo di trattamento comporta una riduzione del tempo di ospedalizzazione del paziente, con conseguente riduzione dei costi per il Servizio Sanitario Nazionale. In particolare, la radioterapia ipofrazionata accelerata, utilizzata da IRST per il trattamento del NSCLC, sposa questa tendenza di riduzione del tempo di terapia, rispetto alla radioterapia convenzionale.

La terapia convenzionale consiste nell'applicazione di una dose giornaliera di 1,8-2 Gy per 5 frazioni a settimana, per un totale di 9-10 Gy a settimana. In base al tipo, alle dimensioni e alla localizzazione del tumore il range di dose totale data è tra i 40 e i 70 Gy ([Saunders M., 1999], [Horiot J.C., 1997]). Il programma di frazionamento convenzionale è stato sviluppato su base empirica dal Dr. Gilbert Hungerford Fletcher nel 1988 ed è stato il cardine della radioterapia curativa negli ultimi decenni in Europa e negli Stati Uniti. Piccoli tumori come il carcinoma T1 e T2 della testa e del collo (T sta per tumore e il numero crescente da 1 a 4 indica la gravità), possono essere controllati con un danno accettabile al tessuto normale,

usando un frazionamento convenzionale con una dose totale di 60-70 Gy. Tuttavia, questo controllo locale del tumore rapidamente decade alla crescita delle dimensioni del tumore stesso. Ci si potrebbe chiedere se, aumentando la dose totale data, migliora il controllo locale del tumore. All'aumentare della dose, però, non solo aumenta il controllo sul tumore, ma aumenta anche il danno sui tessuti normali circostanti. Questo è spiegabile attraverso la curva dose-risposta che sia per il tessuto tumorale che per il tessuto sano ha un andamento sigmoidale mostrato in (Figura 3.4).

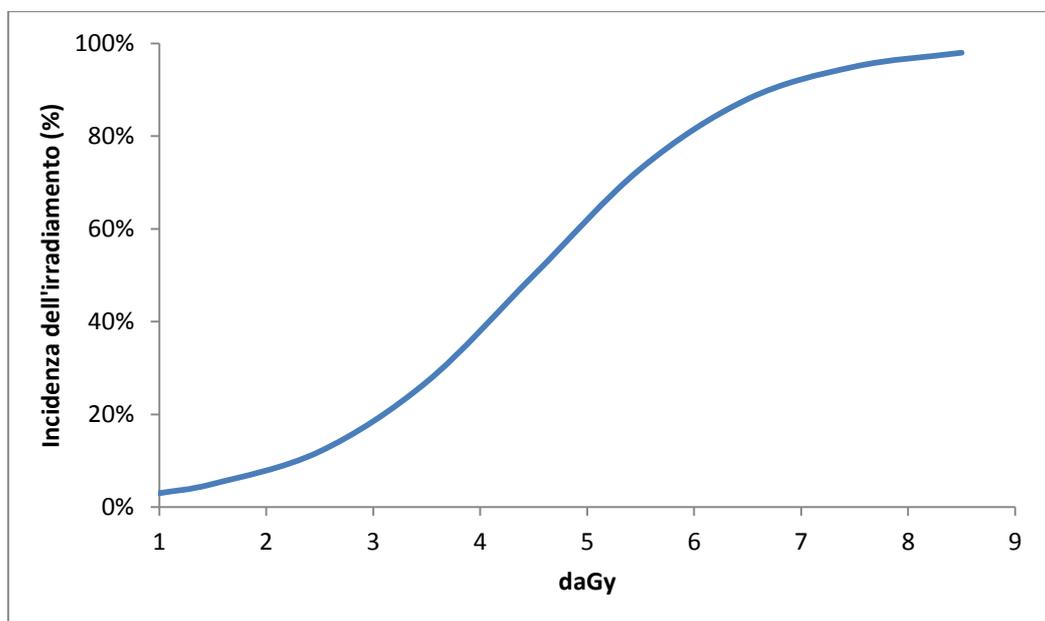


Figura 3.4 Curva sigmoide dose-risposta

Questo è stato riconosciuto già nel 1936, quando H. Holthusen ha sottolineato che il semplice tasso di controllo locale del tumore aumenta inizialmente con l'aumentare della dose, ma poi decade nuovamente a causa del forte aumento d'incidenza sui tessuti normali.

Come detto in precedenza, lo standard utilizzato all'interno dell'IRST, consiste in un frazionamento modificato denominato ipofrazionamento accelerato, dove:

- Il prefisso ipo- indica un numero minore di frazioni per il trattamento rispetto al frazionamento standard con conseguente utilizzo di una dose per frazione maggiore di 2 Gy.

- Il termine accelerato prevede un aumento della dose settimanale che nella terapia standard è di 10 Gy.

Un trattamento di questo tipo riduce notevolmente i tempi totali di cura, se confrontato con un frazionamento standard. La riduzione del tempo di trattamento ha due effetti fondamentali:

1. Il primo è puramente economico sia per l'istituto sia per la comunità e prevede un risparmio in termini di risorse, con la possibilità di poter trattare un numero maggiore di pazienti.
2. Il secondo è a carattere puramente biologico poiché, è stato dimostrato, che diminuendo il tempo tra una seduta e l'altra di trattamento si riesce a ridurre il ripopolamento delle cellule tumorali.

Mentre il primo punto è dimostrabile anche solo a livello logico, per dimostrare il secondo molti scienziati hanno compiuto diversi studi, ma sicuramente il più significativo rimane quello di Withers e della sua équipe [Withers H.R., 1988]. Withers dimostrò che le cellule clonogeniche proliferano rapidamente dopo i trattamenti radioterapici. In questo modo la capacità della radioterapia frazionata di ottenere il controllo locale del tumore diminuisce con l'aumentare del tempo di trattamento. Dopo questo studio il concetto di un fattore tempo nel tumore è stato ampiamente riconosciuto tra i clinici. Questa *review* esamina la correlazione tra controllo dei tumori e il tempo di trattamento globale per carcinomi a cellule squamose della testa e del collo. I dati pubblicati mostrano una chiara tendenza: all'aumentare del tempo complessivo del trattamento, una dose maggiore di radiazione totale è richiesta per riuscire a controllare questi tumori. Ma il legame tempo-radiazione non ha una pendenza costante, infatti, è stato dimostrato sperimentalmente che la pendenza iniziale è poco accentuata. Ciò implica che, per tempi di trattamento brevi di 3-4 settimane, la proliferazione cellulare ha poco effetto e che ci vuole del tempo per avviare il meccanismo di ripopolazione dei tumori. Withers e altri hanno concluso che per tempi di trattamento più lungo di questi, l'effetto di proliferazione era equivalente a una perdita di radiazione pari circa a 0,6 Gy al giorno.

Con lo scopo di contrastare la ripopolazione rapida delle cellule clonogeniche sono stati sviluppati i programmi di frazionamento accelerato. Il frazionamento accelerato è definito come un accorciamento del tempo di trattamento totale o, più precisamente, come un aumento della dose media alla settimana sopra i 10 Gy forniti in frazionamento convenzionale. In uno studio atto a dimostrare l'efficacia del trattamento accelerato nei confronti di quello standard, sono stati scelti 10 casi

clinici. Nove di questi indicano che il programma di frazionamento accelerato è più efficace per ottenere il controllo locale del tumore rispetto al programma di frazionamento convenzionale ([Saunders M., 1999], [Horiot J.C., 1997]). In sintesi, è stato dimostrato che il frazionamento accelerato presenta effetti benefici migliorativi rispetto al trattamento standard per contrastare il fattore tempo nel cancro alla testa, al collo e ai polmoni.

3.4 Radioterapia conformazionale

La radioterapia conformazionale è stata sviluppata con lo scopo di ottenere una maggiore aggressività sui tessuti tumorali salvaguardando i tessuti sani. Questa ha modificato radicalmente il panorama della terapia radiante, ampliandone sensibilmente le indicazioni e consentendo l'adozione di dosi totali più elevate. Tutto ciò è stato reso possibile da una rapida evoluzione tecnologica che ha consentito il possesso di sistemi di pianificazione 3D sempre più sofisticati e di sistemi di erogazione del trattamento controllati dal computer. La radioterapia conformazionale consente oggi di aumentare il controllo locoregionale delle neoplasie mediante la somministrazione di dosi più elevate alla massa tumorale, senza contestuale aumento della tossicità dei tessuti sani. Per far ciò è quindi indispensabile una corretta definizione del volume neoplastico e degli organi a rischio dose-limitanti. Questa tecnica utilizza fasci esterni, in cui il volume di trattamento è conformato in maniera tale da circoscrivere, con stretto margine di sicurezza, il volume bersaglio [Arcangeli G., 2010].

L'acquisizione dei dati relativi al bersaglio e agli organi critici è effettuata mediante TC di centraggio. I dati riguardanti le immagini TC sono trasferiti al sistema di contornamento, dove il radioterapista delinea su ciascuna slide il tumore macroscopicamente evidente e le aree a rischio, ricreando un'immagine volumetrica delle regioni d'interesse. Le immagini sono in seguito trasferite al sistema di pianificazione del trattamento dove si procede all'esecuzione e all'ottimizzazione del piano di cura.

La determinazione delle aree di rischio è di fondamentale importanza per la buona riuscita del trattamento. Gli organi a rischio si dividono in:

1. Organi seriali, ovvero costituiti da più strutture disposte in serie. In questi il danno provocato a una sub-struttura si propaga su tutto l'organo bloccandone il funzionamento. Un esempio di organo seriale è il midollo spinale.

2. Organi paralleli, composti da strutture disposte in parallelo. Danneggiandone una il funzionamento dell'organo è comunque garantito. A questa categoria di organi fa parte ad esempio il polmone.
3. Organi seriali/paralleli (come il cuore). Dispongono sia di strutture seriali (come le arterie coronarie), sia di strutture parallele (come il miocardio).

Logicamente si cercherà di preservare in maniera più efficace le strutture seriali rispetto a quelle parallele in modo da limitare il danno apportato ai tessuti sani.

3.5 Radioterapia a modulazione d'intensità

La radioterapia a modulazione d'intensità (IMRT) altro non è che l'evoluzione della radioterapia conformazionale. Possiede un'elevata selettività spaziale e quindi richiede un'elevata precisione nel contornamento delle aree tumorali e dei tessuti sani. I piani di trattamento IMRT sono elaborati mediante un processo di ottimizzazione automatizzato di "pianificazione inversa": mentre nella radioterapia conformazionale convenzionale il processo prevede la scelta di una determinata configurazione di fasci e la verifica della distribuzione di dose ("pianificazione diretta"). La pianificazione inversa si attua mediante la ricerca della configurazione dei fasci che determina esattamente la distribuzione di dose desiderata. L'ottimizzazione del piano di trattamento è effettuata attraverso la definizione di una "funzione costo", che è un indicatore di qualità del piano per una determinata scelta della modulazione d'intensità dei fasci. Nella definizione della funzione costo si possono considerare variabili fisiche e/o variabili fisiologiche. L'ottimizzazione è raggiunta quando il profilo d'intensità dei fasci che determina il rilascio desiderato di dose è quello che minimizza la funzione costo. La funzione costo è tipicamente basata su vincoli dose volume, che sono preventivamente fissati dal radioterapista in accordo con i dati relativi alla tolleranza dei tessuti sani, che si esprimono come la dose massima o minima da rilasciare all'interno di una determinata percentuale volumetrica dell'organo considerato. La violazione di un vincolo comporta una penalità (e quindi un aumento della funzione costo) specifica per quella regione d'interesse.

Un esempio di piano di trattamento per un tumore ai polmoni è visibile in Figura 3.5. La distribuzione di dose totale prevista nel tumore per questo tipo di

37,1% hanno dato una risposta parziale, l'8,6% si sono mantenuti stabili e l'11,4% hanno mostrato una progressione del tumore [Kwang-Won R., 2009].

3.6 Strumenti per l'irradiamento

I principali strumenti utilizzati per eseguire trattamenti radioterapici sulle piastre contenenti broncosfere sono i seguenti:

- Fantoccio.
- Acceleratore lineare.
- Software Pinnacle.

FANTOCCIO

Il fantoccio è uno strumento fondamentale per l'irradiamento delle piastre contenenti le broncosfere al fine di capire come questi trattamenti influiscono sul corpo umano. Consente di riprodurre in maniera fedele il trattamento effettuato su pazienti reali.

Questo dispositivo (Figura 3.6), è stato progettato ad hoc per gli esperimenti di radiobiologia dal Dott. Rolando Polico, Direttore dell' U.O. di Radioterapia dell'IRST di Meldola.

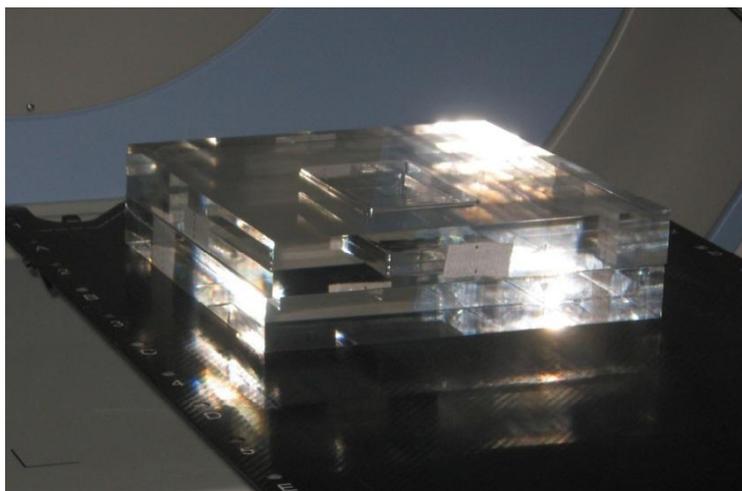


Figura 3.6 Fantoccio utilizzato per simulare i trattamenti effettuati sui pazienti

Il materiale utilizzato per la realizzazione è il PMMA, commercialmente noto come Perspex e caratterizzato da una densità di $1,11 \text{ g/cm}^3$. La scelta del PMMA deriva proprio dalla sua densità, che lo rende a livello radiologico un materiale acqua-equivalente, adatto a simulare il tessuto corporeo che normalmente circonda la sede del tumore da trattare. Il fantoccio è costituito da due semplici parti: una base e un coperchio che andranno a racchiudere in maniera perfetta la piastra per colture cellulari. Base e coperchio sono simmetriche ed hanno le seguenti dimensioni: 40 cm di larghezza \times 40 cm di lunghezza \times 4 cm di spessore. La cavità è posta in modo tale da collocare la piastra contenente le colture cellulari precisamente al centro del fantoccio, in modo da avere, allineando il fantoccio con l'isocentro dell'acceleratore lineare, un irradiazione più omogeneo possibile. Per effettuare tale allineamento sul bordo del fantoccio sono applicati dei riferimenti ottici (Figura 3.7) che favoriscono l'allineamento manuale coperchio-base.

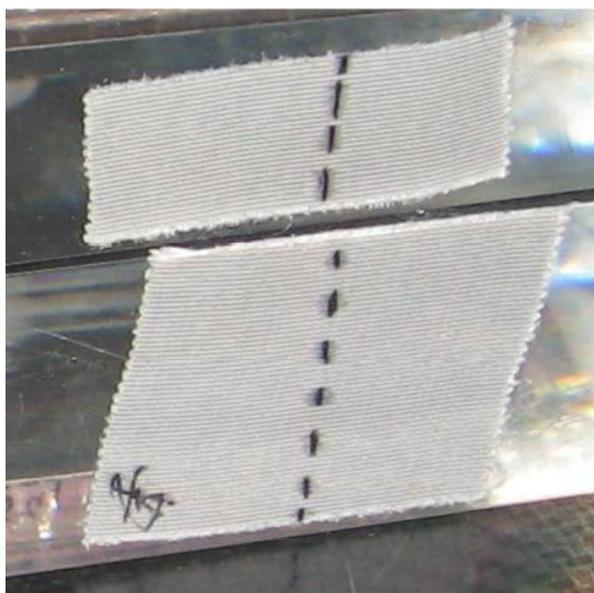


Figura 3.7 Riferimenti ottici applicati sul fantoccio

ACCELERATORE LINEARE

L'acceleratore lineare utilizzato per l'esperimento è stato l'ElektaSynergy prodotto da Elekta Limited ed entrato in commercio nel 2008 (Figura 3.8). Questo

è un apparecchio all'avanguardia a livello tecnologico: consente di effettuare trattamenti di radioterapia conformazionale IMRT (Intensity modulation radiation therapy) supportati da un sistema di registrazione delle immagini ad alta qualità (cone-beam TC).

L'interazione con uno strumento TAC è di fondamentale importanza per massimizzare efficienza della terapia tumorale. Infatti, la progettazione del piano di cura radioterapica si avvale di immagini anatomomorfologiche tridimensionali derivate dall'impiego della TAC. In questo modo si è in grado di migliorare le dimensioni, la posizione e il tipo di trattamento da eseguire sull'aria tumorale d'interesse.

La qualità del trattamento radioterapico dipende essenzialmente dalla disponibilità di tecnologie che consentono di:

1. Dirigere il fascio secondo angolazioni ottimali seguendo la forma del tumore (conformazionalità).
2. Modulare l'intensità in modo da rilasciare dosi diverse a subvolumi del tumore che lo richiedano e mantenere sotto la soglia di tolleranza la dose ricevuta dagli organi critici (sani).
3. Localizzare con precisione la massa bersaglio intratrattamento e intertrattamento.

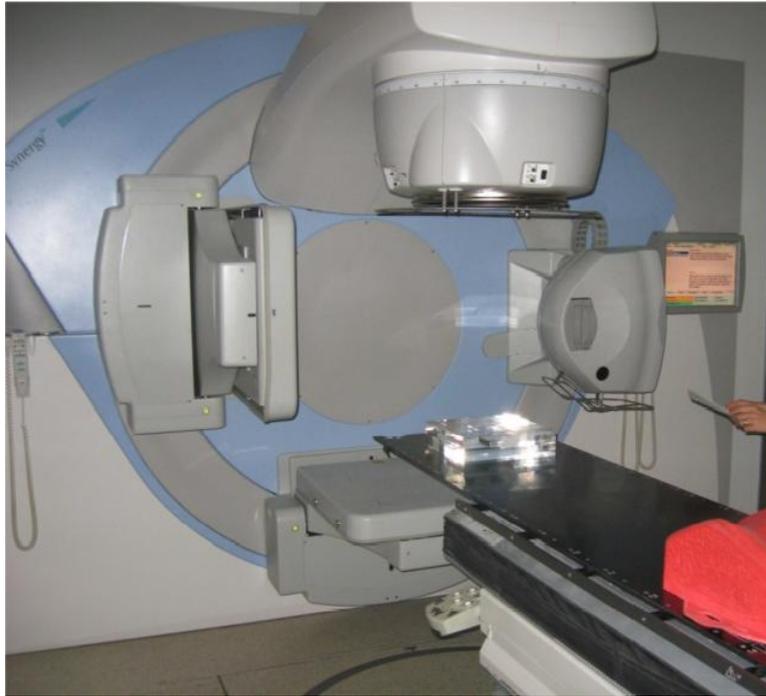


Figura 3.8 ElektaSynergy

Il cuore del macchinario è rappresentato dall'acceleratore lineare, la parte dell'apparecchiatura in grado di produrre fasci di fotoni o di elettroni in base al tipo di terapia. Il LINAC (*LINear ACcellerator*) utilizza onde elettromagnetiche ad alta frequenza (3000 MHz) per accelerare elettroni in un tubo lineare. Il fascio stesso di elettroni ad alta energia può essere utilizzato per il trattamento di tumori superficiali o può essere diretto contro un bersaglio per la produzione di fasci di fotoni ad alta energia (≥ 1 MeV) in grado di raggiungere tumori posti anche in posizioni profonde.

Lo schema a blocchi di un acceleratore lineare è osservabile in Figura 3.9.

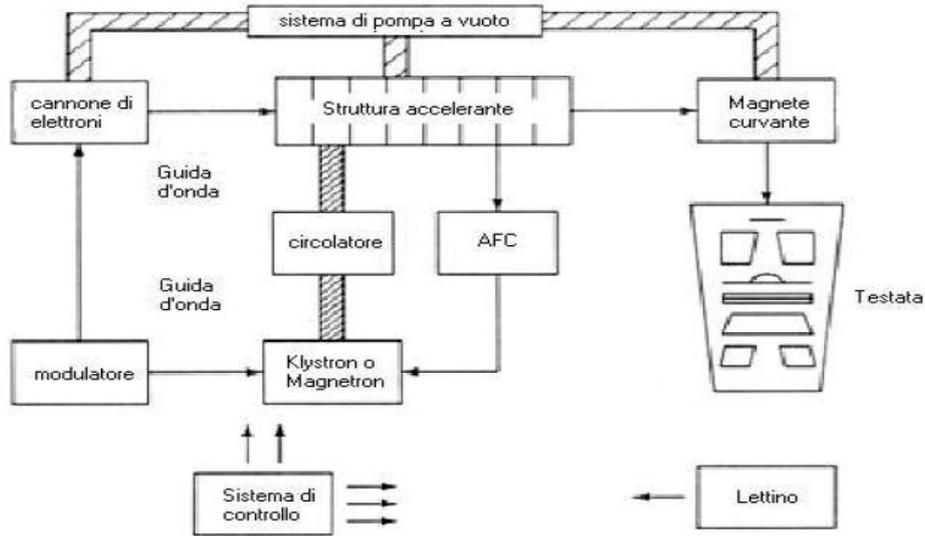


Figura 3.9 Schema a blocchi acceleratore lineare [Fogli J., 2005]

La struttura accelerante consiste in un tubo acceleratore, o guida d'onda, mantenuto a una pressione molto bassa (vuoto spinto) così da evitare collisioni atomiche al suo interno. Il tubo è costruito in rame ed è caratterizzato internamente da dischi di rame di varie dimensioni e spaziatura che hanno la funzione di accelerare gli elettroni all'energia voluta (in campo clinico tipicamente da 4 MeV a 18-25 MeV) e di mantenere il fascio su una traiettoria ben definita nella forma di un fascio "a pennello" di diametro pari a 3 mm. Il fascio di elettroni ad alta energia è convogliato, generalmente mediante un magnete curvante, alla testata di trattamento, dove può:

1. Colpire un *target*, per produrre un fascio di raggi γ (*photon beam mode*);
2. Attraversare un foglio di diffusione, tipicamente una sottile patina di alluminio, che allarga il fascio di elettroni e ne varia l'energia (*electron beam mode*).

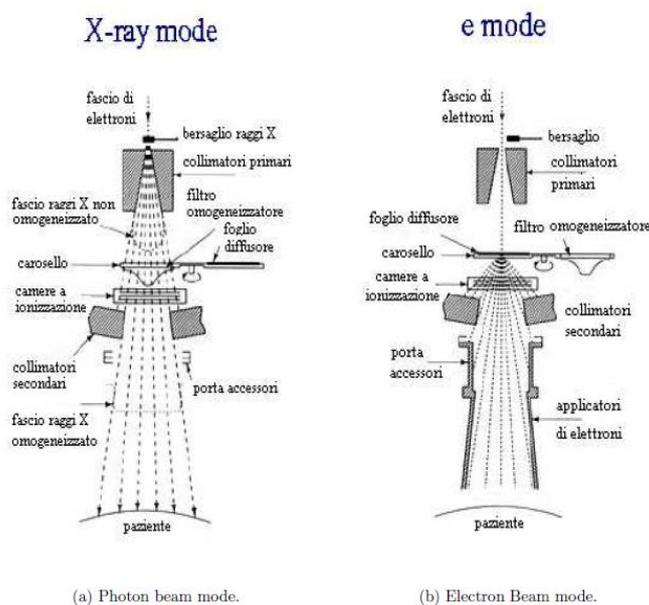


Figura 3.10 Schema della testata di un acceleratore lineare di elettroni nel caso di un fascio di fotoni e in quello di un fascio di elettroni [Fogli J., 2005]

Nel *photon beam mode* i raggi γ sono prodotti per *bremstrahlung* o “radiazione di frenamento”, cioè la radiazione emessa da particelle cariche quando subiscono un'accelerazione o una decelerazione. Nel nostro caso avviene quando gli elettroni si vanno a scontrare contro un bersaglio metallico. In questo modo si vanno a generare fotoni ad alta energia con uno spettro caratteristico che dipende sia dallo spessore sia dal tipo di bersaglio. Il *target* è raffreddato ad acqua ed è abbastanza spesso da assorbire la maggior parte degli elettroni incidenti. L'energia degli elettroni è così convertita in un ampio spettro di energie di fotoni il cui valore massimo corrisponde all'energia degli elettroni incidenti, mentre il valore medio è pari a circa un terzo del valore massimo.

Per rendere uniforme la radiazione viene inserito un filtro di “appiattimento” (*flattening filter*), tipicamente di piombo. La posizione di tale filtro risulta particolarmente critica; qualsiasi minimo spostamento produrrà un'alterazione della simmetria e omogeneità del fascio oltre i limiti di accettazione.

La testata di trattamento è costituita da un guscio molto spesso di materiale schermante ad alta densità come piombo, tungsteno o leghe tungsteno-piombo. La

testata contiene il target per i raggi γ e il foglio di diffusione per i fasci di elettroni; segue un sistema di collimatori fissi che dirige il fascio di raggi γ al filtro di *flattening* (rimosso automaticamente nel caso di trattamenti con fasci di elettroni).

Il fascio di fotoni o di elettroni attraversa successivamente un sistema di camere a ionizzazione per il monitoraggio della dose erogata. Queste camere sono piatte, costituite da piani paralleli e divise in diversi settori, riempite di gas, sigillate in modo che la loro risposta non sia influenzata dalla pressione e dalla temperatura.

Dopo le camere a ionizzazione sono posti i collimatori mobili per raggi γ . Questo sistema è costituito da due coppie di blocchi (*jaws*) mobili, in piombo, che permettono di definire campi di trattamento rettangolari che variano da un minimo di $0 \times 0 \text{ cm}^2$ fino a un massimo di $40 \times 40 \text{ cm}^2$ alla distanza di trattamento pari a 100 cm dalla sorgente.

Per la terapia con fotoni, dopo le camere di monitoraggio, possono essere introdotti a mano o meccanicamente anche dei filtri a cuneo (*wedge*) al fine di produrre una distribuzione di dose volutamente asimmetrica. Questi filtri hanno forme diverse a seconda della ditta costruttrice e dell'effetto desiderato. L'utilizzo di questi particolari filtri è atto a proteggere dalle radiazioni una zona limitrofa a quella da trattare. La definizione del campo è ottenuta attraverso un sistema di localizzazione luminoso, costituito da uno specchio e una fonte luminosa posti tra le camere e i collimatori.

Di fondamentale importanza per la buona riuscita del trattamento è il supporto del *gantry* (la testata dell'acceleratore), i sistemi di guida, che servono a posizionare la sorgente di radiazione rispetto al paziente e il supporto del paziente, ossia il lettino mobile, che deve permettere di collocare il paziente secondo quanto previsto dal trattamento. Il lettino deve essere in grado di eseguire tutti i movimenti verticali, longitudinali, laterali e rotazionali, in modo da allineare correttamente il paziente. Tutti i movimenti devono essere guidati e controllati con un alto grado di precisione (tipicamente 1-2 mm e 1°), e la struttura deve essere stabile rispetto alle sollecitazioni da carico. *Gantry*, lettino e collimatori devono ruotare attorno al comune centro, detto isocentro, che è indicato da una serie di laser, gli stessi utilizzati per il posizionamento del paziente (Figura 3.11), [Fogli J., 2005].

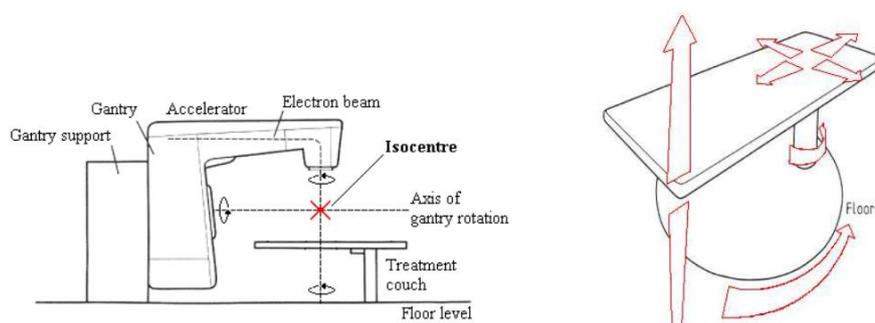


Figura 3.11 Definizione di isocentro e supporto del paziente [Fogli J., 2005]

SOFTWARE PINNACLE

Per impostare l'acceleratore lineare per l'irradiamento delle piastre, è stato utilizzato un software proprietario di Philips chiamato Pinnacle, lanciato su piattaforma Solaris. Questo software riceve in ingresso l'immagine contornata e ricostruita in 3D dal radioterapista, in modo da poter stabilire un trattamento efficace. In questo caso, questo passaggio è stato saltato poiché non utile ai fini dell'esperimento, quindi il software riceverà in ingresso l'immagine grezza. Pinnacle consente l'archiviazione dei vari setup per ogni paziente o nel nostro caso per ogni tipologia di piastra irradiata. Vediamone uno screenshot in Figura 3.12. Nel nostro caso il paziente è stato chiamato "PHANTOM_CELL".

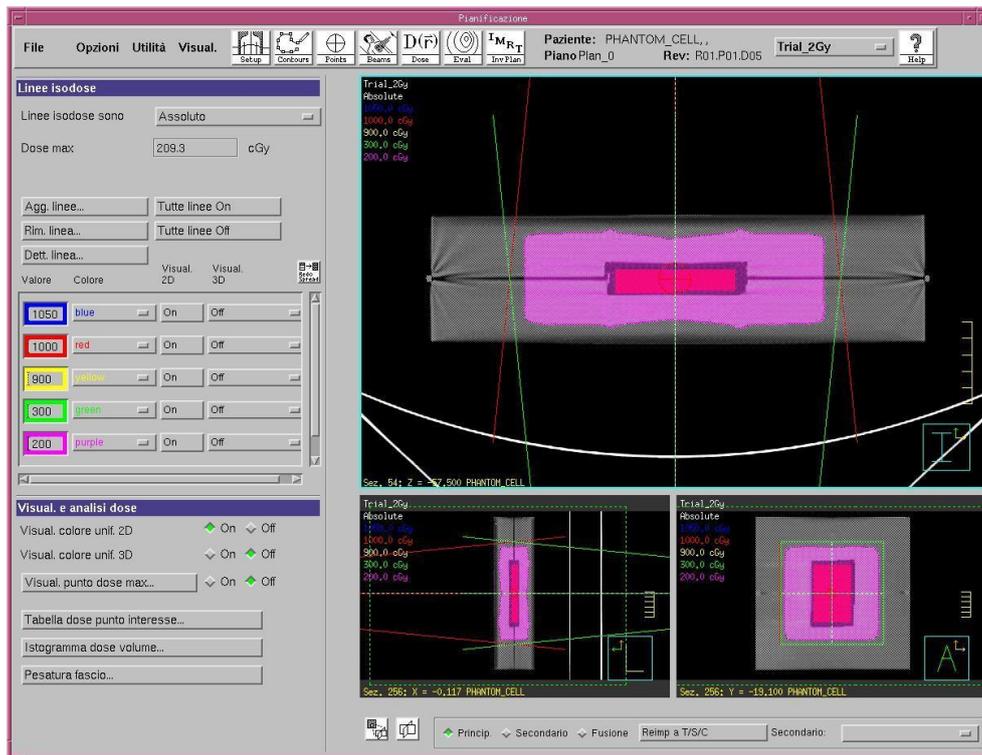


Figura 3.12 Piano di trattamento per piastre contenenti broncosfere

Come possiamo notare dalla figura, in grigio è visualizzata l'immagine TAC del fantoccio corredato di piastra per coltura cellulare. Il tipo di trattamento scelto per questa tipologia di esperimento è detto "APPA" acronimo di Antero-Posteriore Postero-Anteriore. Il nome è dovuto al fatto che questo trattamento in realtà è costituito da due irradiazioni distinte, per l'appunto eseguite la prima in posizione antero-posteriore (in figura rappresentata dalla linea rossa), mentre la seconda effettuata in posizione postero-anteriore (rappresentata in figura dalla linea verde). Entrambe le irradiazioni contengono la stessa dose che corrisponde a metà di quella prescelta. Questo tipo di tecnica, usata soprattutto negli anni '70, è ormai superata da tecniche più moderne che permettono di far ricevere ai tessuti circostanti la regione tumorale, il quantitativo minore possibile di dose, in modo da evitare possibili danni collaterali. La tecnica oggi più utilizzata, come già discusso in precedenza, è la IMRT. In questo caso, non avendo a che fare con un paziente non ci si è preoccupati di eseguire uno studio dosimetrico sui tessuti circostanti la piastra, ovvero sull'irradiazione del fantoccio.

Continuando a osservare lo screenshot notiamo che la GUI del programma prevede la visualizzazione dei tre piani (x, y, z) d'irradiazione con relative zone a

isodose. In particolare, nel caso in figura notiamo che la zona isodose a 2 Gy è la regione colorata di rosa. Questa regione contiene ampiamente la regione colorata di fucsia che corrisponde alla piastra. In questo modo siamo sicuri che la piastra andrà a ricevere una dose pari a quella prestabilita per l'esperimento. Logicamente la dose di 2 Gy è la sommatoria delle dosi ricevute dai due trattamenti distinti. Questi andranno a irradiare il campione come indicato in Figura 3.13:

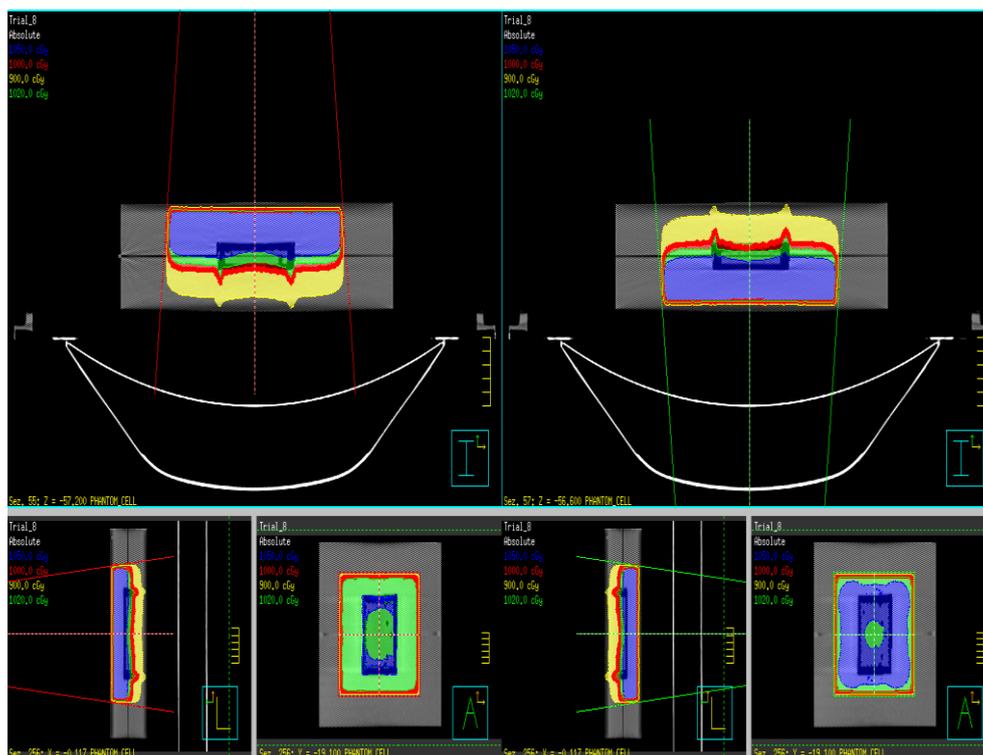


Figura 3.13 Trattamento Antero-Posteriore e Postero-Anteriore per piastre contenenti sferoidi

Il campo totale generato dai trattamenti è un campo quadrato 20×20 cm che va a coprire la zona d'interesse con un sostanziale fattore di sicurezza.

Il software si preoccupa inoltre di calcolare le così dette *Unità Monitor* (UM). Le UM corrispondono al quantitativo di radiazione da rilasciare sul target in linguaggio macchina. La calibrazione delle UM si effettua in modo tale che sia erogato 1 Gy per cento UM alla profondità di 10 cm in acqua, con un campo di dimensioni 10×10 cm², a SSD pari a 100 cm. L'andamento delle UM in funzione della dose è lineare (Figura 3.14), [Fogli J., 2005].

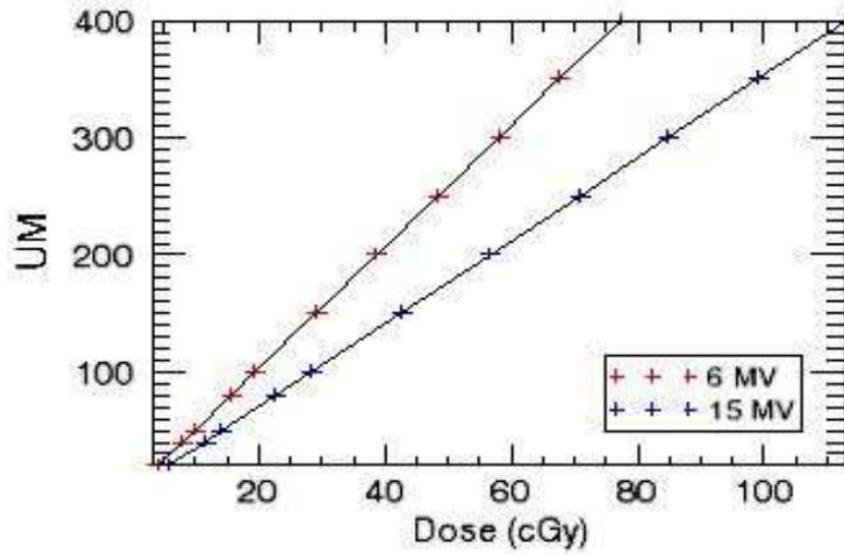


Figura 3.14 Relazione lineare tra UM e dose

Una volta effettuato il settaggio dei vari parametri si può procedere al trattamento effettuato, come detto in precedenza, mediante l'acceleratore lineare ElektaSynergy.

Capitolo 4

Protocollo generazione e acquisizione dati

Per studiare i cambiamenti morfologici di sferoidi sottoposti a diversi trattamenti radioterapici, è stato stabilito un ferreo protocollo di generazione ed acquisizione dati in modo da gestire ed archiviare in maniera ordinata una grande mole di informazioni. La definizione del protocollo risulta di notevole importanza per garantire un efficace *modus operandi* facilmente eseguibile e ripetibile, eventualmente anche da operatori differenti. In questo capitolo vengono descritti il protocollo di generazione e acquisizione dati, evidenziando i metodi utilizzati per l'acquisizione delle immagini. Verranno inoltre illustrate le regole di catalogazione ed archiviazione seguite al fine di favorire la successiva analisi dati.

4.1 Set-up strumenti utilizzati

Come riportato precedentemente, gli sferoidi sono stati posizionati in piastre *multiwell*, in modo da permettere uno studio accurato dell'evoluzione morfologica di ogni singolo sferoide. In particolare, le piastre utilizzate in questo esperimento (modello *Corning 96 wells*) sono del tipo *ultra low attachment* e presentano sulla superficie di ogni pozzetto un idrogel in grado di minimizzare l'adesione cellulare. Vengono vendute in confezione singola e sono realizzate in polistirene

presentando 96 pozzetti a fondo piatto contenenti ognuno un massimo di 360 μ l di volume totale. Per agevolare l'individuazione univoca di ogni pozzetto, le righe e le colonne della piastra sono rispettivamente identificate con le lettere dell'alfabeto da A ad H e i numeri da 1 a 12 (Figura 4.1).

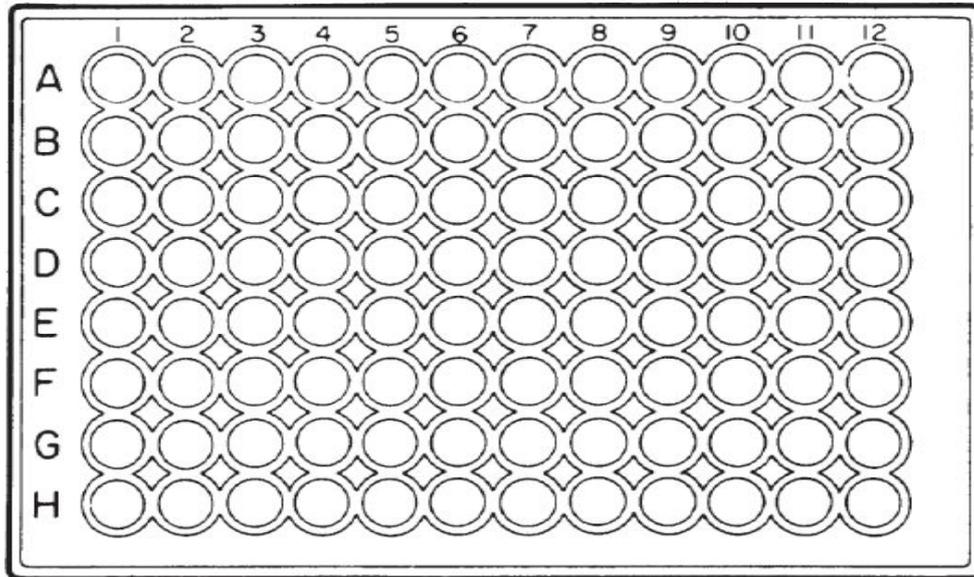


Figura 4.1 Esempio dello schema di una piastra *multiwell* da 96. Da www.internationalpbi.it

Tutte le piastre presentano un coperchio ad incastro che a causa della mancanza di sistemi di ancoraggio non consente una chiusura completa e sicura. Utilizzando le piastre si ha quindi un elevato rischio di contaminazione rispetto ad esempio alle fiasche, che presentano invece una chiusura ermetica. Per limitare questo problema è necessario adoperare molta accortezza nel maneggiare le piastre, utilizzando guanti e prestando molta attenzione a non far fuoriuscire il terreno di coltura contenuto nei pozzetti, ad esempio durante il trasporto da una zona di lavoro all'altra (Figura 4.2).

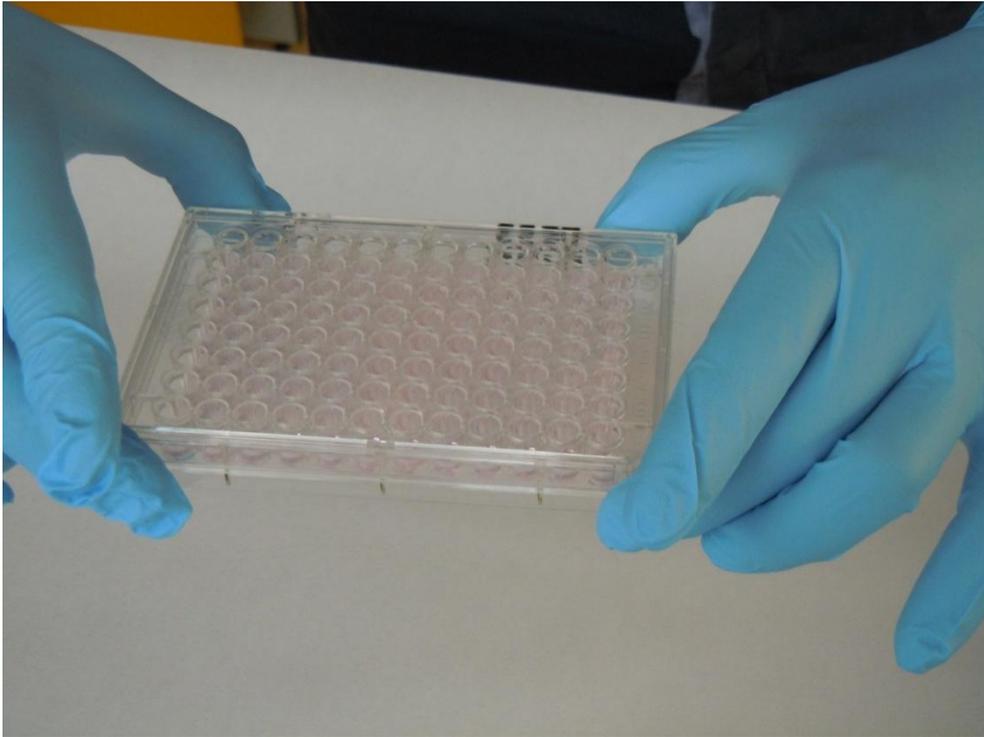


Figura 4.2 Immagine che mostra la corretta tenuta delle piastre *multiwell* contenenti sferoidi

Per acquisire le immagini, le piastre contenenti sferoidi vengono prelevate dall'incubatore e poste sul portaoggetti del microscopio (denominato *holder*). In particolare, per questo esperimento è stato utilizzato un microscopio invertito Olympus IX51 in modalità *brightfield* (BF) con obiettivi 4× o 10×. Nessun particolare filtro è stato inserito nel percorso ottico (Figura 4.3). L'utilizzo di un microscopio invertito (chiamato anche microscopio rovesciato), risulta fortemente consigliato quando si osservano cellule aderenti al fondo della piastra o aggregati che per la forza di gravità tendono ad adagiarsi sul fondo in una posizione di equilibrio. Nei microscopi invertiti la sorgente di luce ed il condensatore sono situati in alto, al di sopra del tavolino portaoggetti, mentre gli obiettivi e la torretta degli oculari sono posizionati in basso. Tale configurazione ottimizza la capacità del microscopio invertito di mettere a fuoco il fondo di ogni pozzetto della piastra rendendo possibile l'osservazione di sferoidi direttamente *in loco*. La telecamera utilizzata per questo esperimento è una *Nikon*, modello *Digital Sight DS-Vi1* e presenta una capacità risolutiva di 2,01 *MegaPixel* (Figura 4.4). Le immagini acquisite sono di tipo RGB, di dimensione 1600×1200 pixels, con una risoluzione di 8 bit e un coefficiente di conversione $\mu\text{m}/\text{pixel}$ di 1.673 e 0.674 per gli obiettivi 4× e 10× rispettivamente. E' possibile spostare il tavolino portaoggetti in

direzione x - y mediante due apposite manopole poste sul fianco del microscopio. La messa a fuoco di ogni campione viene ottenuta invece mediante altre due manopole (poste lateralmente in basso nel microscopio) che regolano rispettivamente lo spostamento macro e micro-metrico, alzando o abbassando il piano contenente gli obiettivi. Per impostare l'intensità luminosa è presente una rotella analogica, di fianco al microscopio, che permette di regolare il grado di luminosità secondo una scala contraddistinta da diverse tacche (per tale esperimento è stato fissato il livello di luminosità al livello due dal minimo).



Figura 4.3 Microscopio OLYMPUS IX51



Figura 4.4 Telecamera Nikon Digital Sight DS-Vi1

Il *software* utilizzato per l'acquisizione delle immagini e video è stato *Nis-Elements (Build 764, versione 4.0)* della Nikon (Figura 4.5). Nella schermata principale del programma si osserva in tempo reale ciò che viene messo a fuoco con il microscopio, mentre al di sotto di essa, vengono memorizzate immagini precedentemente acquisite. I diversi parametri utilizzati per l'acquisizione delle immagini vengono settati tramite il comando *Settings* posto sul lato destro della schermata principale e per agevolarne un loro successivo utilizzo, è possibile creare diversi profili presenti nella barra dei comandi che permettono di salvare i valori dei parametri predefiniti, evitando di reimpostarli ogni volta. Per tale esperimento sono stati creati due profili denominati rispettivamente CVG4x e CVG10x, utilizzati corrispondentemente con gli obiettivi 4x e 10x. La selezione manuale dell'*exposure-time*, lunghezza di tempo effettiva in cui lo *shutter* della fotocamera risulta aperto (lo *shutter* è un dispositivo che permette il passaggio della luce per un determinato periodo di tempo), permette di ottenere immagini non sature (un'immagine a 8 bit completamente satura ha tutti i valori a 255 *gray levels*), mediante l'osservazione del relativo istogramma (comando *Histogram*, Figura 4.6).

L'istogramma di un'immagine è la rappresentazione grafica della quantità di pixel per ogni livello di grigio presente nell'immagine: l'asse orizzontale x rappresenta i valori dei livelli di grigio, mentre l'asse verticale y rappresenta il numero di pixel per ogni livello. L'istogramma fornisce una rappresentazione sintetica delle caratteristiche di luminosità dell'immagine, trascurando però ogni informazione relativa alla posizione dei singoli pixel. Nelle immagini a colori si possono generare tre istogrammi separati che dipendono da come viene rappresentato il colore (ad esempio RGB, ovvero *Red-Green-Blue*).

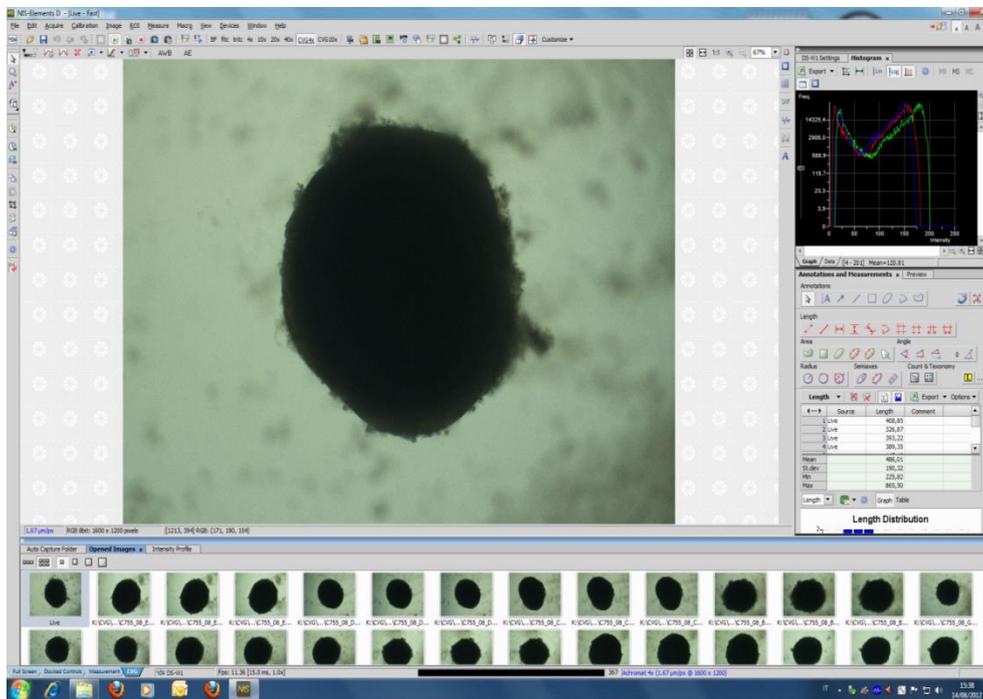


Figura 4.5 Immagine relativa al software Nis-Elements utilizzato per l'acquisizione delle immagini

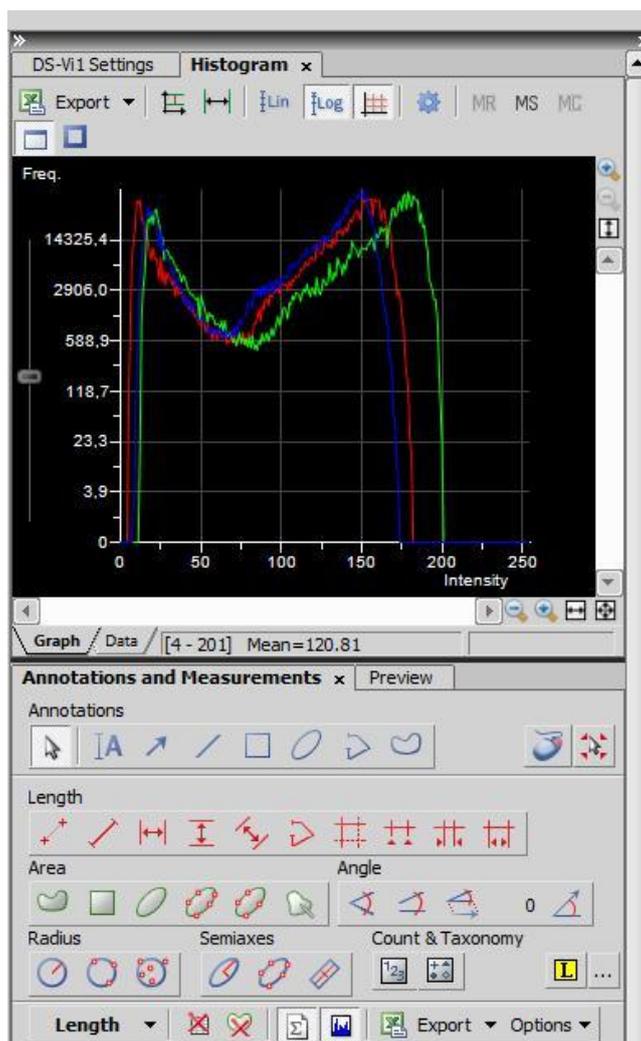


Figura 4.6 Esempio di istogramma di uno sferoide acquisito

4.2 Motivazioni e correlazioni attese

L'esperimento trattato in questo lavoro di Tesi nasce dallo scopo di voler correlare informazioni morfometriche di campioni tumorali a determinati stadi dei trattamenti radioterapici tipicamente utilizzati per curare pazienti. In particolare, si vuole cercare di fornire indicazioni per studiare la risposta delle cellule tumorali a diversi trattamenti radioterapici, utilizzando come parametro di confronto l'area, intesa come proiezione ortogonale dello sferoide sul piano immagine, che viene assunta come sezione trasversale di area massima.

I tumori solidi reali sono caratterizzati da una struttura tridimensionale dove le singole cellule sono esposte ad una distribuzione di ossigeno e di nutrienti non uniforme [Juergen F., 2007]. Per studiare come i trattamenti agiscano sui tumori nelle condizioni più simili alla realtà, è necessario quindi utilizzare strutture tridimensionali come gli sferoidi (Figura 4.7). Utilizzare un semplice film bidimensionale di cellule sarebbe meno realistico perché tutte le cellule sarebbero ugualmente esposte all'ossigeno e alle sostanze nutritive [Hirschhaeuser F., 2010]. In questo esperimento, vengono quindi effettuati dei trattamenti del tutto simili a quelli eseguiti sui pazienti, utilizzando sferoidi di cellule CAEP (broncosfere), scelte per la loro caratteristica di riuscire ad assumere facilmente *in vitro* una struttura tridimensionale, fornendo un valido modello confrontabile con i tessuti reali.

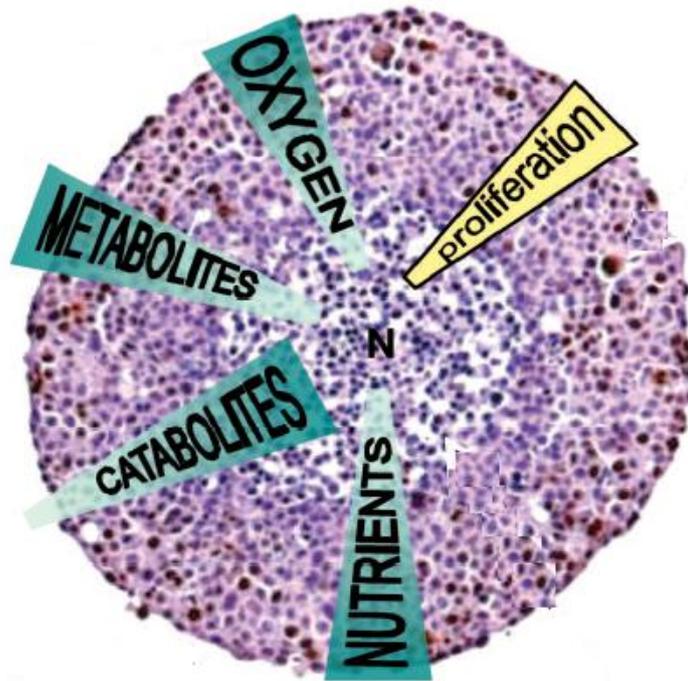


Figura 4.7 Sferoide multicellulare tumorale. Estratta da [Juergen F., 2007]

In questo esperimento sono state utilizzate 8 piastre da 96 *wells* contrassegnate in maniera distinta in base al numero e al tipo di trattamento radioterapico subito. L'intensità di radiazione assorbita viene misurata tipicamente in *gray* (simbolo Gy) e corrisponde ad una radiazione che depone un joule per chilogrammo di materia. La nomenclatura delle piastre è definita in modo tale che ognuna di esse risulta contraddistinta da una lettera dell'alfabeto e da tre cifre finali indicanti il valore di radiazione in decigray (simbolo dGy) e il numero di trattamenti subito. Le specifiche di ogni piastra vengono riportate di seguito:

1. Piastra A000: piastra di controllo non sottoposta ad alcun trattamento radioterapico.
2. Piastra B205: piastra irradiata 5 volte a 20 dGy.
3. Piastra C755: piastra irradiata 5 volte a 75 dGy.
4. Piastra D651: piastra irradiata una sola volta a 65 dGy.
5. Piastra D652: piastra irradiata 2 volte a 65 dGy.
6. Piastra D653: piastra irradiata 3 volte a 65 dGy.
7. Piastra D654: piastra irradiata 4 volte a 65 dGy.
8. Piastra D655: piastra irradiata 5 volte a 65 dGy.

Si riporta un'immagine d'esempio, dove vengono mostrate alcune piastre marcate con la nomenclatura sopra riportata (Figura 4.8).

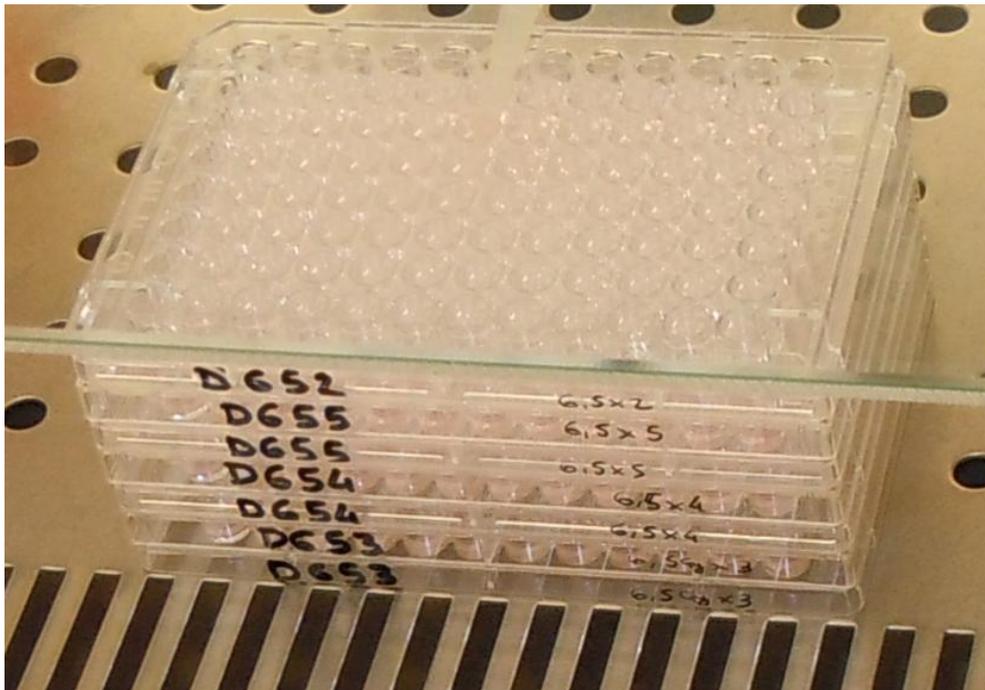


Figura 4.8 Immagine di piastre marcate con intensità e numero di trattamenti radioterapici

Dal confronto di sferoidi trattati:

A) con lo stesso numero di sedute d'irradiamento, ma ad intensità di radiazione diverse

B) con la stessa intensità di radiazione, ma con un diverso numero di sedute d'irradiamento

potremmo studiare e valutare l'efficacia dei diversi trattamenti radioterapici, fornendo quindi un valido protocollo applicabile successivamente ai pazienti in cura.

Elenchiamo di seguito le principali correlazioni attese dall'analisi dati:

1. Confrontando sferoidi sottoposti a differenti intensità di radiazione e a un diverso numero di sedute, si dovrebbe trovare che all'aumentare del numero di sedute e dell'intensità di radiazione, gli sferoidi tendano più facilmente a disgregarsi e a dividersi in più sferoidi di piccole dimensioni.

2. Confrontando sferoidi trattati con lo stesso numero di sedute ma ad intensità di radiazione diverse, si dovrebbe verificare che gli sferoidi trattati ad intensità maggiore presentano una riduzione maggiore della loro area rispetto a quelli trattati ad intensità di radiazione inferiore. Ad esempio, 5 trattamenti da 75 dGy dovrebbero risultare più efficaci rispetto a 5 trattamenti da 65 dGy e ancor più significativi rispetto a 5 trattamenti da 20 dGy.
3. Confrontando sferoidi trattati con la stessa intensità di radiazione ma con un diverso numero di sedute, si dovrebbe verificare che gli sferoidi trattati con un più alto numero di irradiazioni presentano una riduzione maggiore della loro area rispetto a quelli trattati con minor numero di irradiazioni. Ad esempio, uno sferoide trattato 5 volte a 65 dGy dovrebbe presentare una diminuzione di area maggiore rispetto al caso in cui avesse subito solo 1 o 2 trattamenti.

4.3 Preparazione e irradiazione piastre

La preparazione delle piastre segue un protocollo ben specifico in modo da conseguire un corretto posizionamento degli sferoidi nei rispettivi pozzetti: tutte le piastre contengono 16 sferoidi destinati ad indagine morfologiche collocati nei seguenti pozzetti (da A6 ad H6 e da A7 ad H7), 16 sferoidi destinati ad indagini chimiche sulla vitalità collocati nei seguenti pozzetti (da A4 ad H4 a da A5 ad H5) e nei pozzetti denominati D8 ed E8 è presente solo terreno di coltura senza cellule seminate all'interno. Dei 32 sferoidi disponibili per ogni piastra è stato scelto di acquisirne solamente 16 per ognuna, considerando i restanti come sferoidi di sicurezza nel caso in cui gli sferoidi definiti da protocollo presentassero dimensioni troppo elevate e quindi non acquisibili con l'obiettivo 4×. Per gran parte delle piastre sono state acquisite immagini dei pozzetti denominati: da B6 a G6, da B7 a G7, D4, D5, E4, E5 (Figura 4.9); in alcune piastre sono state acquisite immagini di sferoidi posti in pozzetti differenti dal protocollo standard a causa delle dimensioni degli sferoidi troppo elevate, ovvero maggiori del *field of view* della camera (campo di vista che definisce l'area rappresentata nell'immagine). Inoltre, solamente nella piastra di controllo A000 sono state acquisite immagini anche del pozzetto D8, contenente il solo terreno di coltura e del pozzetto A1, completamente vuoto. Infine, al termine delle acquisizioni di tutte le piastre sono state sempre acquisite 5 immagini di *empty field* reale. Una volta terminata la fase

di preparazione, le piastre sono state poste in incubatore alla temperatura di 37°C e con una percentuale di anidride carbonica al 5%.

I cicli di trattamento radioterapico subiti dalle diverse piastre (ad eccezione della piastra di controllo A000) sono stati definiti da protocollo secondo giorni e orari prestabiliti, adattati in base alla disponibilità del laboratorio: tutti i cicli di irradiazione sono stati eseguiti alle 14:00 ed hanno interessato solo la prima settimana dell'esperimento, in quanto si è previsto un massimo di 5 sedute in ogni ciclo di irradiazione per riproporre le medesime condizioni di trattamento subite dai pazienti. Le piastre B205, C755, D655 sono quindi state irradiate 5 giorni, dal Lunedì al Venerdì della prima settimana. Le restanti piastre sono state irradiate in base al numero di trattamenti definito e specificato dall'ultima cifra riportata nella rispettiva nomenclatura. Ad esempio: la piastra **D653**, dovendo subire **3** trattamenti radioterapici, è stata irradiata la prima volta il Mercoledì, mentre la piastra **D652**, dovendo subire **2** trattamenti radioterapici, è stata irradiata la prima volta il Giovedì. L'ultimo trattamento per ogni piastra è stato fatto al Venerdì della prima settimana in modo da sincronizzare il tutto. Nel protocollo sono stati inoltre riportati i giorni relativi al cambio del terreno di coltura dei pozzetti, effettuati generalmente ogni giorno dal Lunedì al Venerdì e i giorni corrispondenti all'esecuzione del test di vitalità, effettuato una volta a settimana, specificando di volta in volta gli sferoidi interessati (Figura 4.10).

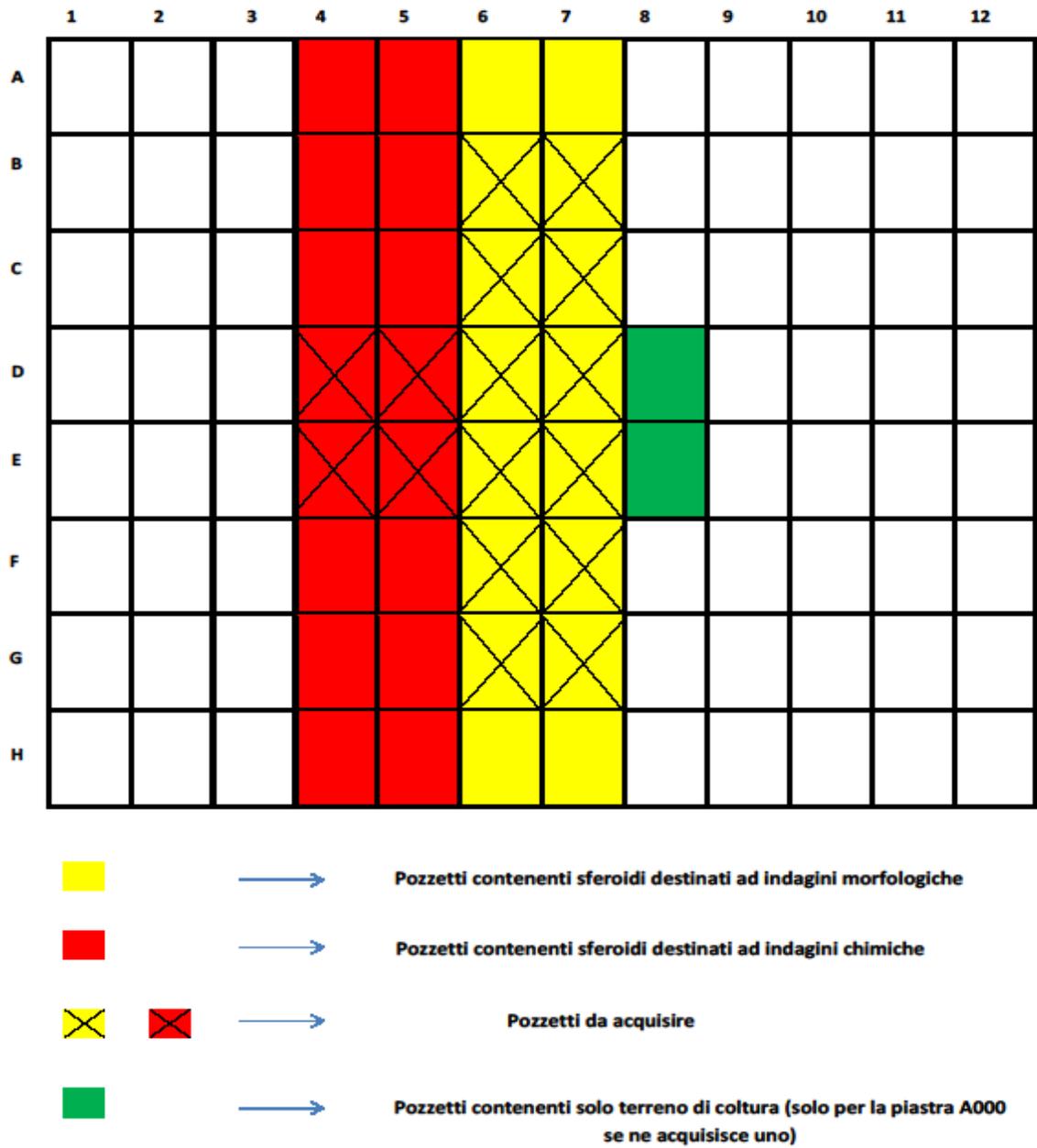


Figura 4.9 Esempio dello schema di acquisizione di una piastra secondo il protocollo standard

EXP2	GIORNO																						
	LUN	MAR	MER	GIO	VEN	SAB	DOM	LUN	MAR	MER	GIO	VEN	SAB	DOM	LUN	MAR	MER	GIO	VEN	SAB	DOM	LUN	MAR
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
	09:00-14:00																						
	ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE	ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE	ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE	ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE	ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE			ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE	ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE			ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE			ACQUISIZIONE IMMAGINI TUTTE LE PIASTRE								
	14:00 - 16:00																						
	IRRADIAMENTO PIASTRE: B205, C755, D655	IRRADIAMENTO PIASTRE: B205, C755, D655, D654	IRRADIAMENTO PIASTRE: B205, C755, D655, D654, D653	IRRADIAMENTO PIASTRE: B205, C755, D655, D654, D653, D652	IRRADIAMENTO PIASTRE: B205, C755, D655, D654, D653, D652, D651																		
	16:00 - 21:00																						
	SEMINA TUTTE LE PIASTRE: A000, B205, C755, D651, D652, D653, D654, D655	CAMBIO TERRENO DI COLTURA	TEST VITALITA SFEROIDI COLONNA 4	CAMBIO TERRENO DI COLTURA	CAMBIO TERRENO DI COLTURA			CAMBIO TERRENO DI COLTURA	TEST VITALITA SFEROIDI COLONNA 5		CAMBIO TERRENO DI COLTURA	CAMBIO TERRENO DI COLTURA			CAMBIO TERRENO DI COLTURA	TEST VITALITA SFEROIDI COLONNIE 5-6-7	CAMBIO TERRENO DI COLTURA	TEST VITALITA SFEROIDI COLONNA 6					

Figura 4.10 Schema del protocollo dell' esperimento

4.4 Acquisizione immagini

Per l'acquisizione delle immagini, le piastre contenenti sferoidi venivano prelevate manualmente dall'incubatore seguendo accortezze quali l'utilizzo di guanti e spostandosi lentamente da una zona di lavoro all'altra, in modo da evitare la fuoriuscita del contenuto dei pozzetti. Le fasi definite dal protocollo di acquisizione d'immagini sono elencate di seguito:

1. Settaggio del microscopio
2. Bilanciamento del bianco
3. Acquisizione delle immagini

Il settaggio del microscopio prevede l'impostazione della lampada settata al livello 2 dal minimo, il diaframma in alto, in mezzo e lo *shutter* aperti e l'impostazione dell'anello di fase in BF (modalità *brightfield*). Una volta accesa la lampada, la telecamera e aperto il software di acquisizione, si pone la piastra sul tavolino portaoggetti del microscopio (Figura 4.11) e si procede con la regolazione longitudinale e laterale per disporsi correttamente sul pozzetto contenente lo sferoide da acquisire.

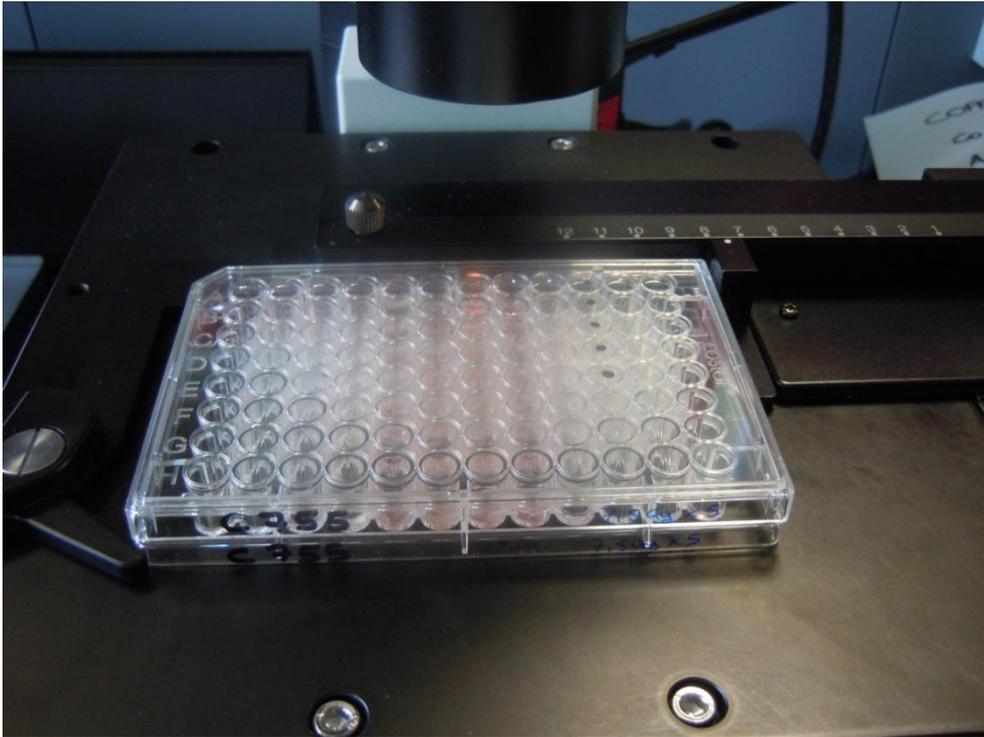


Figura 4.11 Piastra da 96 wells posta sul tavolino del microscopio

Il bilanciamento del bianco (effettuato solo il primo giorno dell'esperimento), risulta necessario per una corretta acquisizione delle immagini e in seguito al salvataggio dei parametri impostati, è possibile garantire gli stessi settaggi per le successive acquisizioni. In particolare, si procede con l'allineamento dell'obiettivo 4× e si posiziona la piastra A000 sull'*holder* del microscopio, mettendo a fuoco il fondo di un pozzetto contenente sferoidi e successivamente, senza cambiare fuoco, si posiziona l'obiettivo sul pozzetto D8 (contenente solo terreno di coltura, senza cellule all'interno). Si utilizza la selezione manuale dell'*exposure time* al fine di non ottenere già in partenza un'immagine completamente satura e si clicca infine da software sul comando "bilanciamento del bianco". Il valore dell'*exposure time* utilizzato in questo esperimento con l'obiettivo 4× è di 15 ms. Viene salvato il profilo con il nome CVG4x e si ripete la stessa procedura per l'obiettivo 10× (utilizzato solo per l'acquisizione dei video), salvando in quest'ultimo caso il profilo con il nome CVG10x ed utilizzando un valore dell'*exposure time* di 30 ms.

L'acquisizione delle immagini è stata definita in modo tale che per ogni sferoide sono state acquisite tre immagini:

1. Immagine con a fuoco i bordi dello sferoide (Figura 4.12).
2. Immagine ottenuta spostando la manopola micrometrica di 50 μm in senso orario, ovvero 50 μm sotto rispetto all'immagine con i bordi a fuoco (Figura 4.13).
3. Immagine ottenuta spostando la manopola micrometrica di 50 μm in senso antiorario, ovvero 50 μm sopra rispetto all'immagine con i bordi a fuoco (Figura 4.14).

Nel caso in cui nel pozzetto era comparso più di uno sferoide (disgregazione dello sferoide principale in diversi sferoidi di più piccole dimensioni), è stato stabilito, da protocollo, di acquisire sempre tre immagini (con i bordi a fuoco, 50 μm sotto e 50 μm sopra) dello sferoide più grande tra quelli rimasti e di acquisire il video di un secondo sferoide (il più grande tra quelli restanti), nel caso in cui risultasse visibile con l'obiettivo 10 \times . Infine, per una corretta acquisizione delle immagini, è stato necessario posizionare ogni sferoide sempre al centro del pozzetto, in modo da evitare variazioni di luminosità dello sfondo, chiamate appunto effetti di bordo. Per ovviare a questo problema, nel caso in cui lo sferoide rimaneva a contatto con il margine del pozzetto o comunque ne risultava troppo vicino, tale da causare uno sfondo con caratteristiche non omogenee, si procedeva a sollevare manualmente la piastra, inclinandola leggermente nella direzione in cui si desiderava portare lo sferoide: essendo lo sferoide non aderente alla plastica, ma semplicemente adagiato sul fondo in un punto d'equilibrio, esso si spostava velocemente nella direzione desiderata.

Nel protocollo d'acquisizione è presente inoltre una sezione dove sono state definite le fasi che prevedono la corretta acquisizione dei video, elencate di seguito:

1. Si pone l'obiettivo sul pozzetto desiderato e si individua lo sferoide.
2. Si procede mettendo a fuoco i bordi dello sferoide e controllando, successivamente, quanti giri della manopola micrometrica occorre effettuare per raggiungere prima e dopo il fuori fuoco.
3. Una volta rimessi a fuoco i bordi dello sferoide, ci si posiziona sul lato basso fuori fuoco dell'immagine acquisita e si inizia la

scannerizzazione, senza più guardare il monitor, per il numero fisso di giri stimato a priori.

Spostando l'*holder* del microscopio lungo la direzione z dell'asse ottico (verticale), si ottengono diverse sezioni ottiche dell'oggetto osservato chiamate *slices*: per l'acquisizione dei video con l'obiettivo 10× veniva spostata la manopola micrometrica di 10 μm per volta. Infatti, cliccando sulla sezione riguardante le caratteristiche degli obiettivi (*Objectives*), presente nel software di acquisizione utilizzato, si osserva che per l'obiettivo 10×, il fuoco di ogni *slice* corrisponde a 16 μm (parametro Z-Step (Slices)) e di conseguenza il numero di micrometri a fuoco sopra e sotto ogni *slice* (parametro Z-Step AF) è esattamente la metà del parametro precedente, ovvero 8 μm (nell'acquisizione dei video è stato approssimato tale valore a 10 μm). Viene inoltre riportato un terzo campo (parametro AF Range) che indica la quantità micrometrica di volume scannerizzata in maniera automatica dal software per trovare il fuoco, corrispondente per l'obiettivo 10× ad 80 μm (Figura 4.15).

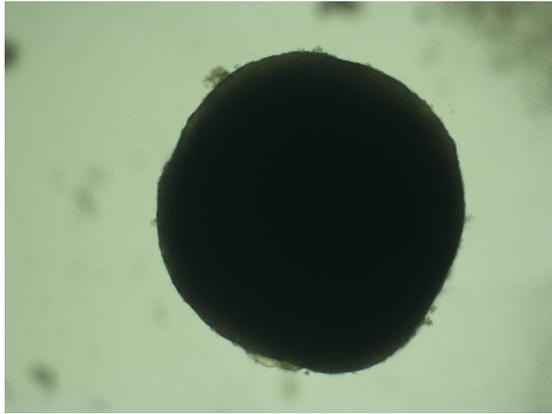


Figura 4.12 Immagine di uno sferoide con i bordi a fuoco

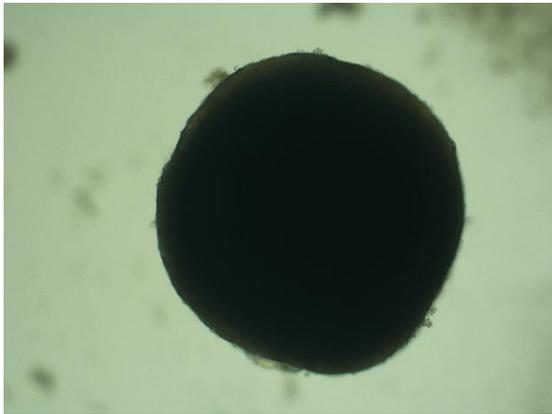


Figura 4.13 Immagine dello sferoide acquisito 50 μm sotto rispetto all'immagine con i bordi a fuoco

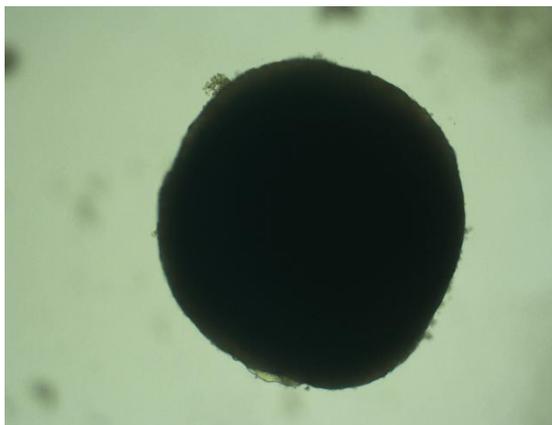


Figura 4.14 Immagine dello sferoide acquisito 50 μm sopra rispetto all'immagine con i bordi a fuoco

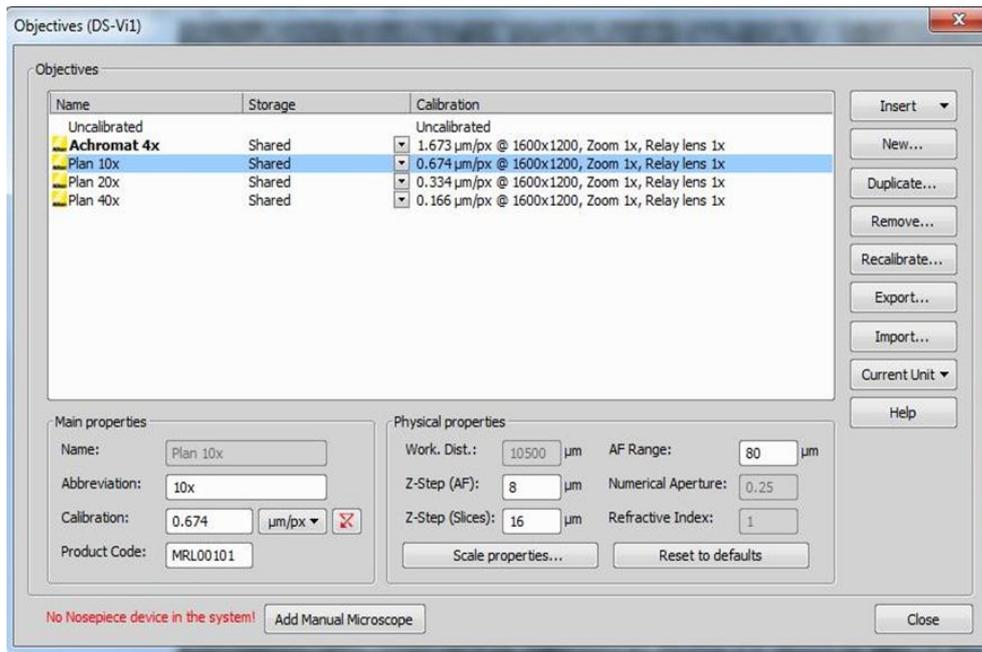
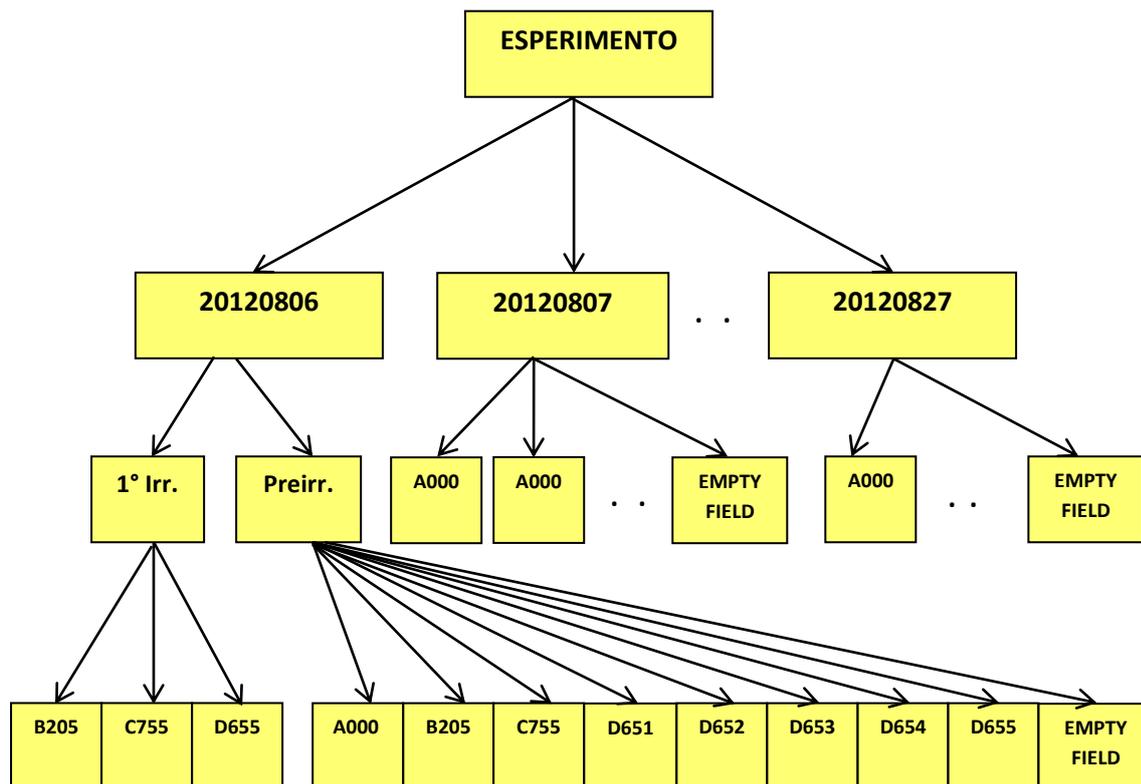


Figura 4.15 Immagine relativa alle caratteristiche dell'obiettivo 10× presente nella sezione *Objectives* del software di acquisizione Nis-Elements

4.5 Salvataggio e archiviazione dati

Una classificazione ordinata e facilmente comprensibile dei dati acquisiti risulta di fondamentale importanza per garantire la loro conservazione e fruibilità. È necessaria pertanto una catalogazione dei dati acquisiti in funzione delle loro caratteristiche peculiari. Nel caso in esame è stato creato un albero di cartelle organizzate in base al giorno d'acquisizione delle immagini e al tipo di piastra considerata. Illustriamo uno schema a blocchi in modo da mostrare nel dettaglio la classificazione delle cartelle sopra citate.



Come si nota dallo schema, tutto il materiale è stato archiviato in una cartella denominata **ESPERIMENTO**, a sua volta suddivisa in sottocartelle distinte in base alla data in cui è stata effettuata l'acquisizione delle immagini. La data con cui sono state nominate le varie cartelle segue il formato anno-mese-giorno: in particolare nel caso in esame sono state create 12 cartelle rispettivamente con data d'inizio delle acquisizioni il 6/08/2012 e data di fine acquisizioni il 27/08/2012. Le restanti cartelle presentano date di riferimento in base ai giorni in cui sono state effettuate le acquisizioni specificate dal protocollo riportato in precedenza.

Continuando a seguire lo schema, notiamo che ogni cartella riferita al giorno d'acquisizione, è a sua volta suddivisa in ulteriori sottocartelle distinte in base al tipo di piastra considerata. In particolare, sono state create 8 cartelle riferite alle 8 piastre descritte in precedenza e un'ulteriore cartella contenente 5 immagini di *empty field* reale (acquisite sempre al termine di ogni giornata). L'unica eccezione nella catalogazione delle immagini è stata effettuata il primo giorno d'acquisizione in cui sono state distinte le immagini di tutte le cartelle riferite alle piastre acquisite prima del primo irradimento (contenute nella cartella preirradimento) e le immagini delle sole tre piastre irradiate il primo giorno (contenute nella cartella 1° Irradimento).

La nomenclatura delle immagini è stata stabilita riportando le seguenti informazioni:

1. Tipo di piastra considerata.
2. Giorno in cui è stata effettuata l'acquisizione (stabilito da protocollo).
3. Tipo di obiettivo utilizzato (per l'acquisizione delle immagini si è utilizzato sempre il 4×).
4. Valore dell'*exposure time* (impostato a 15 ms).
5. Numero dell'immagine acquisita (indicando come **001** l'immagine dello sferoide con i bordi a fuoco, come **002** l'immagine dello sferoide acquisita 50 μm sotto rispetto all'immagine precedente e come **003** l'immagine dello sferoide acquisita 50 μm sopra rispetto all'immagine con i bordi a fuoco).

A titolo rappresentativo si riporta di seguito un esempio di nomenclatura di un'immagine: **D653_01_B6_04x_Exp15_001**. Questa immagine è riferita allo sferoide presente nel pozzetto **B6** della piastra **D653**, acquisito il giorno **01** del protocollo (Martedì 7/08/2012) con obiettivo **4x**, un valore dell' *exposure time* equivalente a **15 ms** e con i bordi a fuoco.

In alcune cartelle di raccolta dati è stato riportato un file NOTE.txt utile a raccogliere varie informazioni aggiuntive relative allo sferoide acquisito, ad esempio: presenza di più di uno sferoide nel pozzetto considerato (Figura 4.16), difficoltà nell'acquisizione (Figura 4.17), disgregazione completa dello sferoide (Figura 4.18).

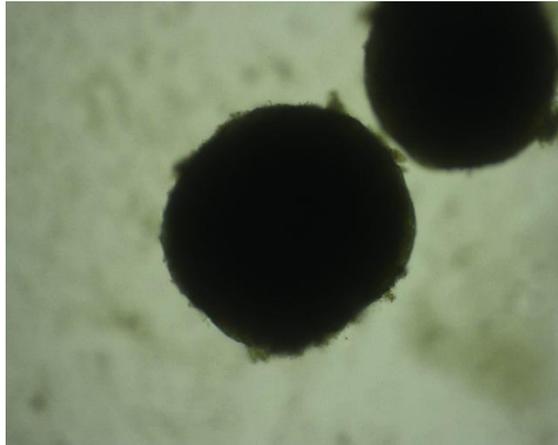


Figura 4.16 Immagine relativa al pozzetto E5 della piastra C755, acquisita il terzo giorno, contenente più di uno sferoide



Figura 4.17 Immagine relativa al pozzetto F6 della piastra B205, acquisita l'ottavo giorno, contenente uno sferoide fuori dal *field of view*

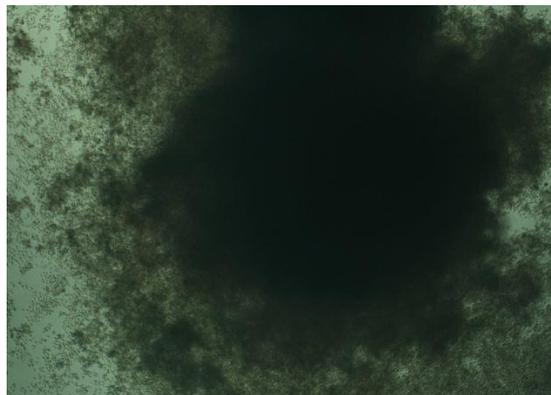


Figura 4.18 Immagine relativa al pozzetto E6 della piastra C755, acquisita l'ottavo giorno, contenente uno sferoide completamente disgregato

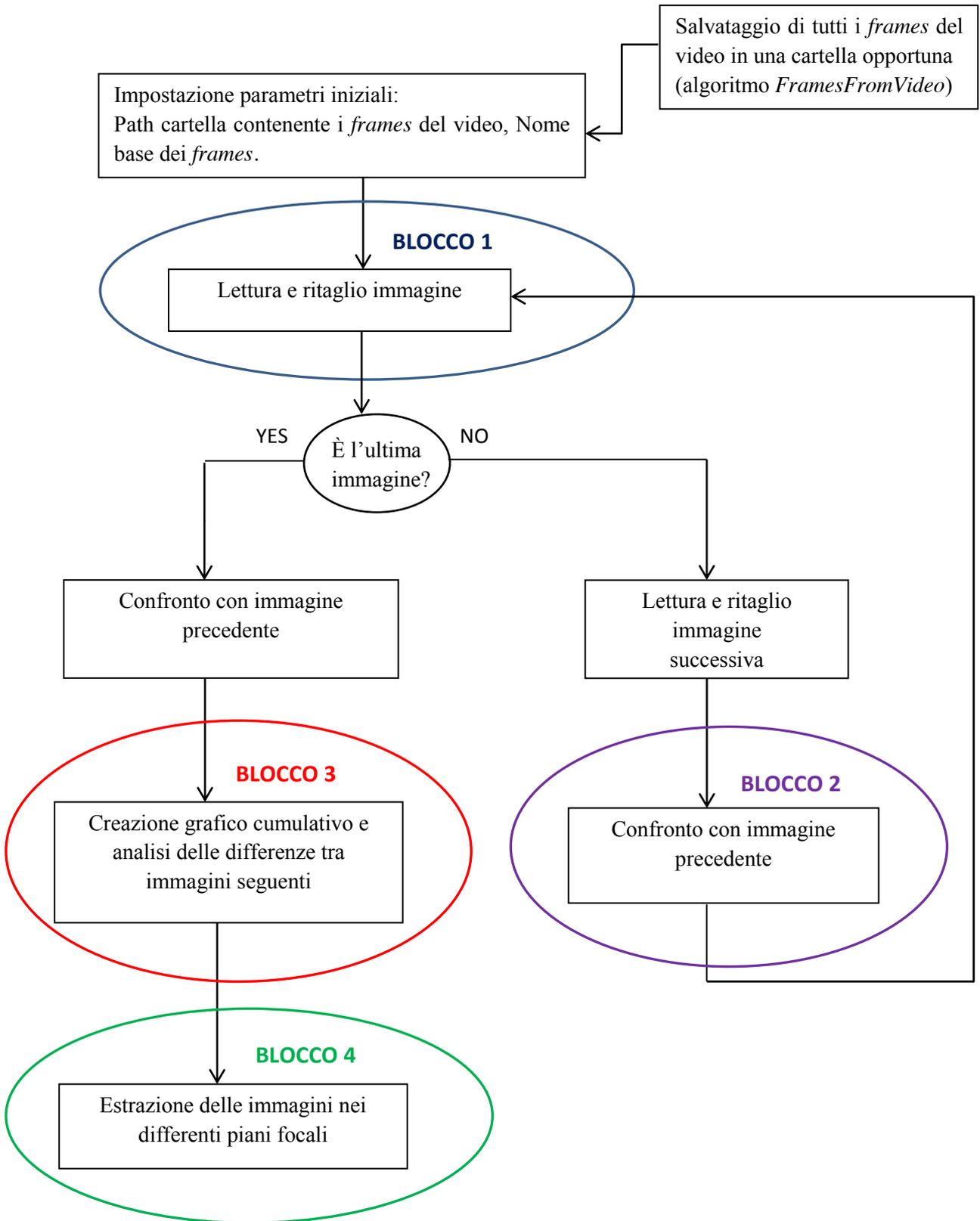
Capitolo 5

Metodi e algoritmi per l'analisi di immagini

Partendo dalle immagini degli sferoidi trattati con differenti cure radioterapiche, sono state estratte, in maniera automatica e ripetibile grazie all'ausilio di tecniche di elaborazione di immagini, differenti caratteristiche morfologiche degli sferoidi quali, area, perimetro, rapporto tra gli assi, etc. I dati ottenuti risultano fondamentali per comparare i diversi trattamenti radioterapici in maniera qualitativa e quantitativa attraverso lo studio delle linee di tendenza temporale create. In particolare, in questo capitolo vengono descritti gli algoritmi implementati per l'acquisizione dei differenti piani focali degli sferoidi acquisiti per la ricostruzione di un'immagine 2D perfettamente a fuoco con tecniche di estensione della profondità di fuoco a partire dai differenti piani focali, ed infine l'algoritmo per costruire le linee di tendenza temporale delle specifiche caratteristiche morfologiche in esame, ad esempio la variazione dell'area a seguito dei differenti trattamenti .

5.1 Ricostruzione 2D a partire dall'analisi di video

Per gli sferoidi di piccole dimensioni, visibili con obiettivo 10 \times , sono stati acquisiti video scannerizzando lo sferoide nell'asse z e mantenendo invariata la posizione x - y del piano portaoggetti del microscopio. Lo scopo era di ottenere in maniera estremamente veloce una rappresentazione dei diversi piani focali, al fine di ricostruire una immagine 2D con ogni parte dello sferoide completamente a fuoco. A tal fine è stata studiata una procedura di acquisizione dei video in cui era previsto che l'operatore si soffermasse per alcuni secondi ogni 10 μm , mentre muovesse in maniera veloce il fuoco del microscopio tra una posizione e l'altra. È stato quindi realizzato un algoritmo (denominato *DataFromImages*: vedi Appendice A.1 Algoritmo *DataFromImages*), in grado di calcolare a partire dai video salvati, gli intervalli di separazione tra l'acquisizione di un determinato piano focale (quando la manopola micrometrica è mantenuta fissa per un tot di secondi) e il passaggio al piano focale successivo (muovendo la manopola micrometrica di 10 μm per volta per il numero fisso di giri stimato a priori), riuscendo quindi ad estrarre le immagini relative ai differenti piani focali. La logica di base dell'algoritmo è che la differenza tra le immagini di una regione in cui l'operatore ha mantenuto fissa la manopola micrometrica per qualche secondo è sicuramente inferiore alla differenza tra le immagini acquisite durante le fasi di movimento del fuoco. Il riconoscere le regioni in cui la differenza tra le immagini è molto bassa consente di riconoscere le immagini relative ai differenti piani focali dello sferoide. L'algoritmo è stato implementato in MATLAB (© The MathWorks, Inc., Massachusetts, USA), ambiente di lavoro utilizzato per il calcolo numerico e l'analisi statistica dove è possibile manipolare matrici, visualizzare funzioni e dati, implementare algoritmi e interfacciarsi con altri programmi. Per eseguire l'algoritmo è necessario, innanzi tutto, estrarre e salvare tutti i singoli *frames* del video considerato in una cartella opportuna: l'algoritmo *FramesFromVideo* è stato appositamente creato per compiere questa operazione (vedi Appendice A.2 Algoritmo *FramesFromVideo*). Si riporta, in seguito, uno schema a blocchi per illustrare schematicamente la logica generale dell'algoritmo creato per estrarre le immagini dei differenti piani focali.



Descriviamo sinteticamente per blocchi il funzionamento del programma:

BLOCCO 1: Lettura e ritaglio dell'immagine. In MATLAB si esegue la lettura dell'immagine mediante il comando *imread*, impostando come parametri in input il nome dell'immagine e il *path* della cartella specifica. Per effettuare il ritaglio dell'immagine in modo che tutti i *frames* confrontati siano delle stesse dimensioni, ma anche per evidenziare una definita regione d'interesse dell'immagine poco maggiore dell'area dello sferoide in esame, è stato implementato un ulteriore algoritmo: *TagliaMatriceGinput* (vedi Appendice A.3 Algoritmo *TagliaMatriceGinput*). Eseguendo l'algoritmo è possibile, data una matrice ottenuta da un'immagine di partenza (Figura 5.1), ritagliare visualmente il rettangolo inscritto nei due punti selezionati manualmente dall'utente, ottenendo in output:

1. Una maschera di dimensioni identiche all'immagine in input che mostra il rettangolo selezionato manualmente (Figura 5.2).
2. L'immagine ritagliata usando il rettangolo selezionato, ma delle stesse dimensioni dell'immagine in input (Figura 5.3).
3. L'immagine ritagliata, delle stesse dimensioni del rettangolo selezionato (Figura 5.4).

BLOCCO 2: Confronto con immagine precedente. Si crea inizialmente un vettore avente la stessa lunghezza del numero di *frames* totali (denominato *Trend*). Si procede eseguendo la differenza di ogni immagine con l'immagine precedente, calcolandone il valore medio che verrà sommato di volta in volta al risultato ricavato dal confronto dei *frames* precedenti. Il valore ottenuto viene salvato nel vettore *Trend*. Si ripete questa operazione fino ad arrivare all'ultima immagine, procedendo di volta in volta con l'aggiornamento del parametro *Trend*.

BLOCCO 3: Creazione grafico cumulativo e analisi delle differenze tra immagini seguenti. Terminato il confronto delle differenze tra le immagini, si procede con la rappresentazione grafica del vettore *Trend*, ottenendo in output un grafico

cumulativo (Figura 5.5). Una volta effettuata la derivata del parametro *Trend* (Figura 5.6), si procede con l'individuazione delle zone d'interesse (quelle a derivata bassa), corrispondenti all'acquisizione dei differenti piani focali in cui l'operatore mantiene fissa la manopola micrometrica. L'impostazione del livello di soglia utile per l'individuazione delle zone d'interesse, si ottiene sfruttando il metodo di Otsu (Figura 5.7). Tale algoritmo permette di calcolare automaticamente il livello di soglia basandosi sulla massimizzazione della varianza tra classi di pixel, distinte in base al livello di grigio riportato nell'istogramma dell'immagine. Tanto più è elevato il valore della varianza, tanto più la distinzione tra le classi risulterà netta, e quindi la sogliatura più efficace [Zhang J., 2008].

BLOCCO 4: Estrazione delle immagini nei differenti piani focali. Una volta individuate le zone d'interesse, viene effettuata un'analisi delle aree per capire da quante immagini risultano mediamente composte. In questo modo è possibile filtrare ed eliminare le zone più piccole di una costante considerate rumore. Vengono infine calcolati gli intervalli delle immagini coincidenti con i differenti piani focali dello sferoide considerato, riportando in output il valore minimo e massimo di ogni intervallo (Figura 5.8).

Mediante tecniche di estensione della profondità di fuoco a partire dai differenti piani focali acquisiti, è possibile ricostruire l'immagine 2D di uno sferoide perfettamente a fuoco. Fin dagli anni '70 sono stati proposti innumerevoli metodi per estendere la profondità di fuoco dei microscopi attraverso tecniche di fusione di immagini. In generale, con il termine fusione di immagini si indicano quei processi in grado di combinare le diverse informazioni provenienti da due o più immagini di una stessa scena, acquisite con lo stesso o eventualmente anche diversi tipi di sensore, al fine di formare un'immagine composita finale più informativa, visivamente migliore, meno rumorosa e più adatta per essere utilizzata per eventuali successive elaborazioni. In particolare, faremo riferimento ad una tecnica per l'estensione della profondità di fuoco (*depth of focus*) riguardante la fusione di immagini della stessa scena acquisite a distanze focali differenti utilizzando uno stesso sensore. L'algoritmo in questione è basato su un'analisi puntuale-locale delle varie immagini (da qui denominato *AnPuLo*) originali che compongono lo *stack* di partenza (lo *stack* è un array espandibile d'immagini necessariamente della stessa dimensione, allineate tra loro). Nell'esecuzione dell'algoritmo i pixel delle singole immagini che compongono lo *stack* vengono comparati tra loro e attraverso una regola di fusione, fondamentalmente basata

sulla ricerca del massimo valore della derivata locale, viene ricostruita l'immagine composta finale copiando i valori dei pixel dalle immagini originali [Pollini D., 2012].

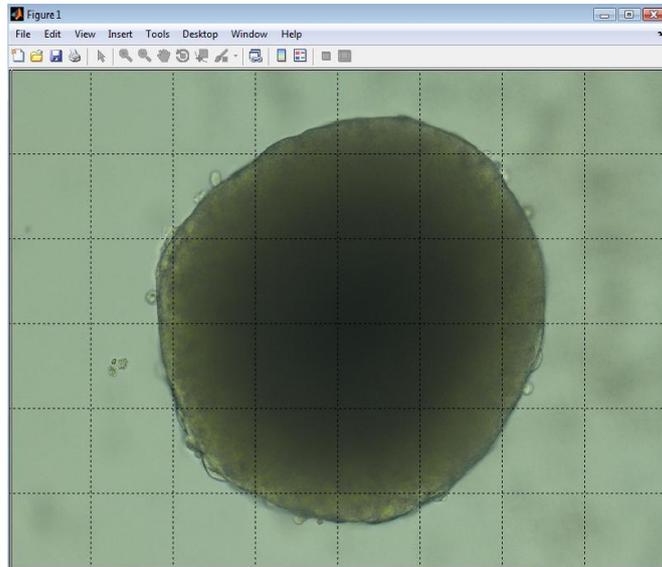


Figura 5.1 Matrice dell'immagine di uno sferoide

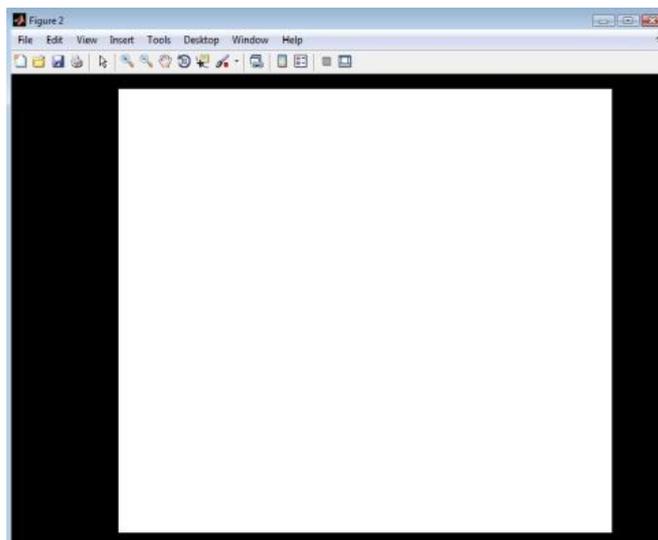


Figura 5.2 Maschera dell'immagine di partenza che mostra il rettangolo selezionato manualmente

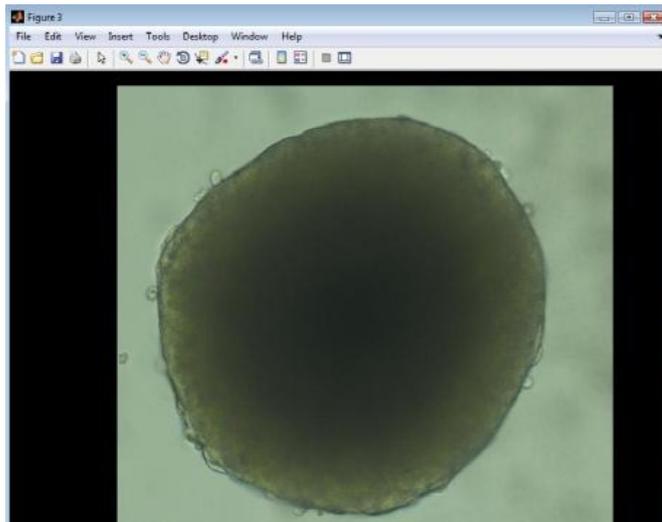


Figura 5.3 Immagine ritagliata dal rettangolo selezionato delle stesse dimensioni dell'immagine in input

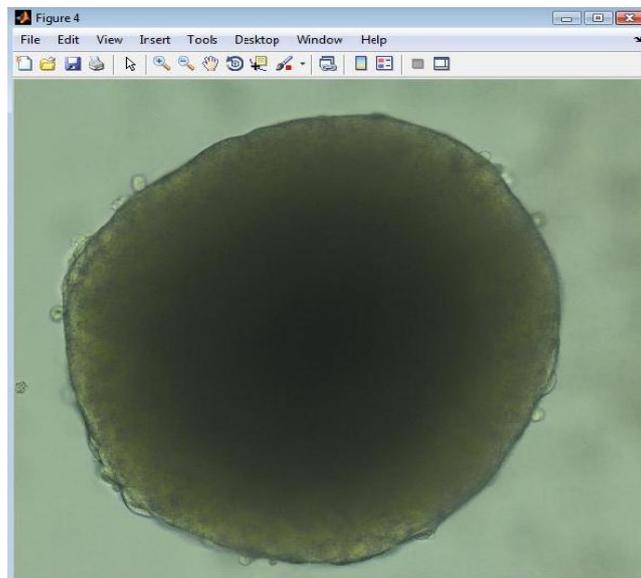


Figura 5.4 Immagine di partenza ritagliata delle stesse dimensioni del rettangolo selezionato

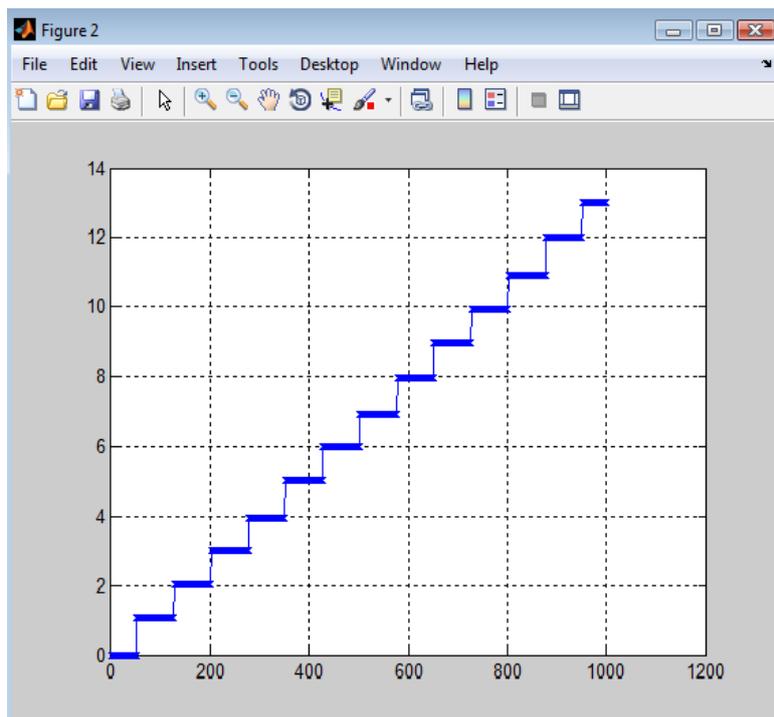


Figura 5.5 Grafico cumulativo ottenuto a partire da un video sintetico di test dell'algoritmo

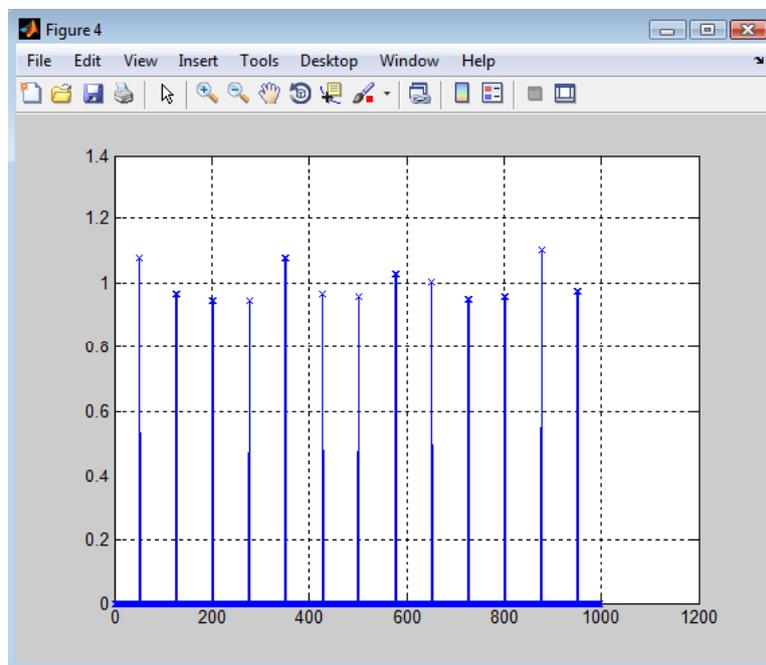


Figura 5.6 Rappresentazione della derivata relativa al grafico cumulativo precedente

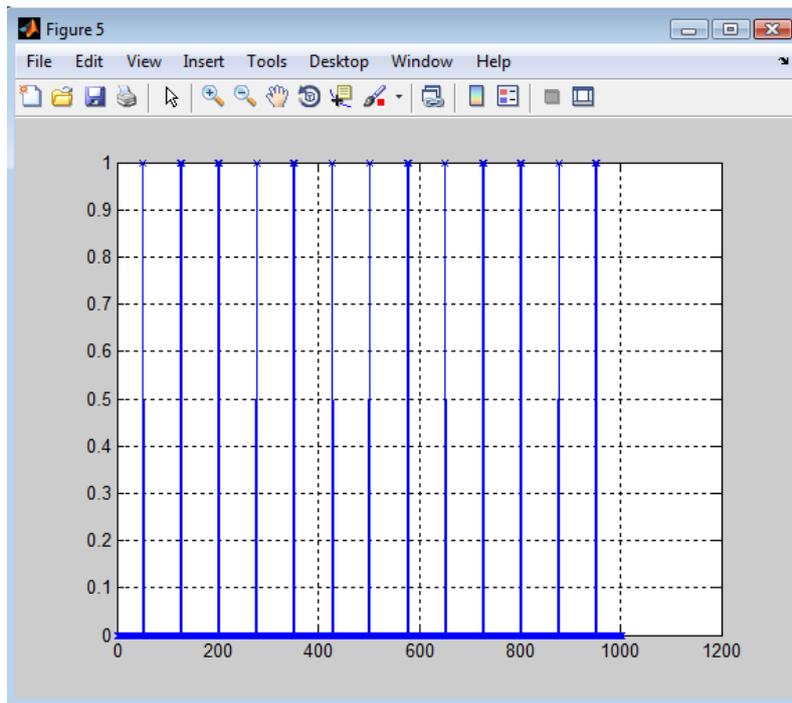


Figura 5.7 Sogliatura del grafico precedente, ottenuta applicando il metodo di Otsu

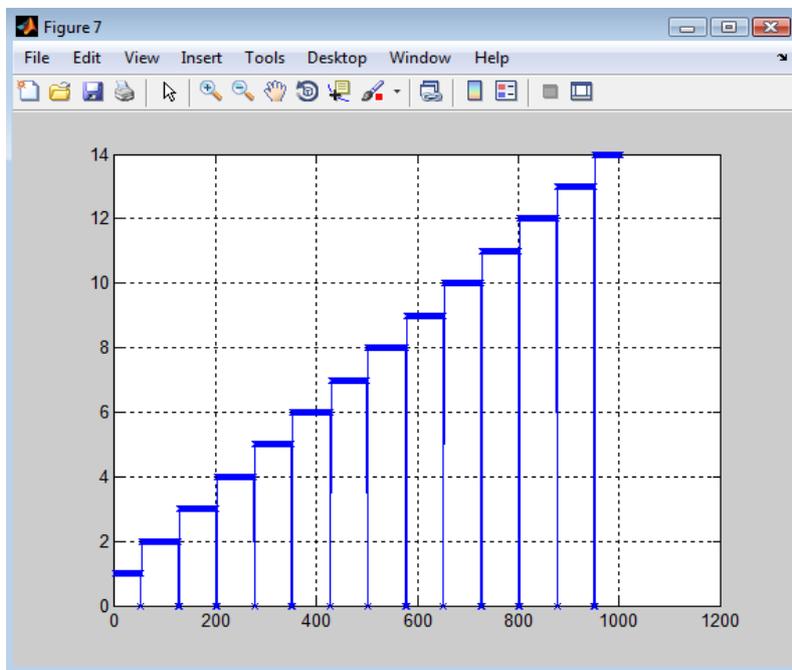


Figura 5.8 Intervalli delle immagini coincidenti con i differenti piani focali

5.2 Analisi morfometrica

Al fine di analizzare e correlare gli effetti dei differenti trattamenti radioterapici sugli sferoidi, sono state ricavate differenti caratteristiche morfologiche da ogni immagine acquisita. L'analisi quantitativa delle caratteristiche morfologiche di tutti gli sferoidi acquisiti in questo esperimento, ha rappresentato un valido strumento di correlazione dei diversi trattamenti radioterapici conseguiti. In particolare, sono state ricavate le seguenti caratteristiche morfologiche:

1. Area
2. Perimetro
3. Lunghezza Asse Maggiore
4. Lunghezza Asse Minore
5. Rapporto tra gli Assi

Al fine di ricavare le caratteristiche morfologiche sopra citate, risulta necessario individuare ed estrarre da ogni immagine gli oggetti di particolare interesse, nel nostro caso gli sferoidi. Tale processo è noto come *segmentazione*. Lo scopo della segmentazione è semplificare e/o cambiare la rappresentazione delle immagini in qualcosa che risulti più significativo e facile da analizzare. Nel caso in esame, sono state segmentate manualmente 1325 immagini di sferoidi acquisiti, dalle quali sono state create le corrispondenti maschere, utilizzando il *software* ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Questo *software* nato per l'elaborazione di immagini medico-biologiche digitali è ampiamente utilizzato in quanto *open source* e prevede la possibilità di avere estensioni tramite *plug-in* (Figura 5.9).

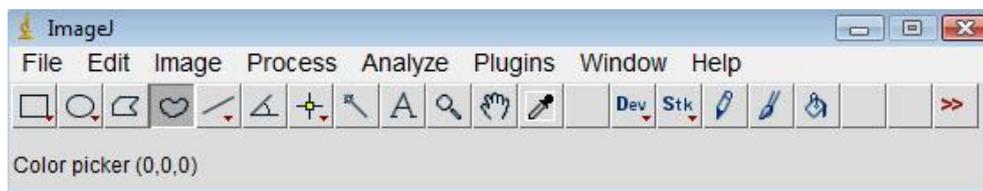


Figura 5.9 Immagine relativa al *software* ImageJ utilizzato per la segmentazione delle immagini

Elenchiamo di seguito le fasi che prevedono la creazione delle maschere a partire dalle immagini in input:

1. Caricamento dell'immagine nel programma ImageJ (Figura 5.10).
2. Conversione immagine da RGB a 8-bit e segmentazione dello sferoide utilizzando un apposito Plug-In (Figura 5.11).
3. Creazione maschera finale (Figura 5.12).

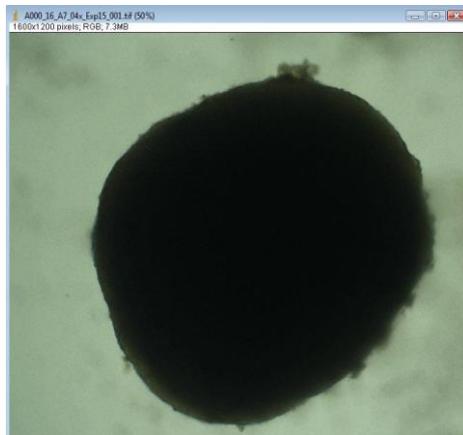


Figura 5.10 Immagine RGB di uno sferoide

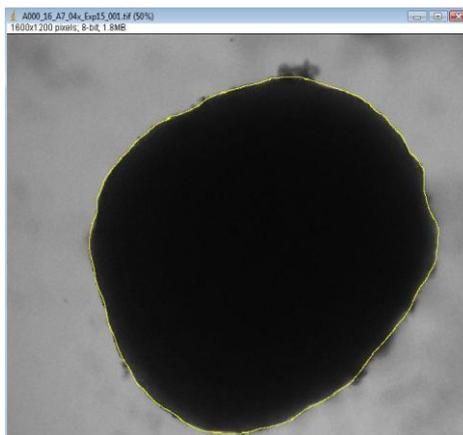


Figura 5.11 Immagine di partenza a 8-bit e segmentazione dello sferoide

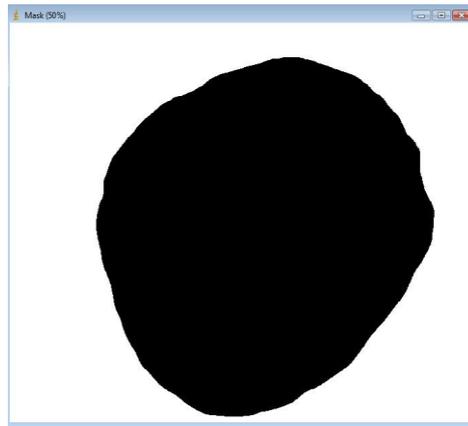


Figura 5.12 Creazione maschera finale

Per l'archiviazione delle maschere è stato creato un albero di cartelle sfruttando lo stesso schema già riportato in precedenza per la catalogazione delle immagini. Inoltre ogni maschera è stata salvata utilizzando la stessa nomenclatura dell'immagine corrispondente.

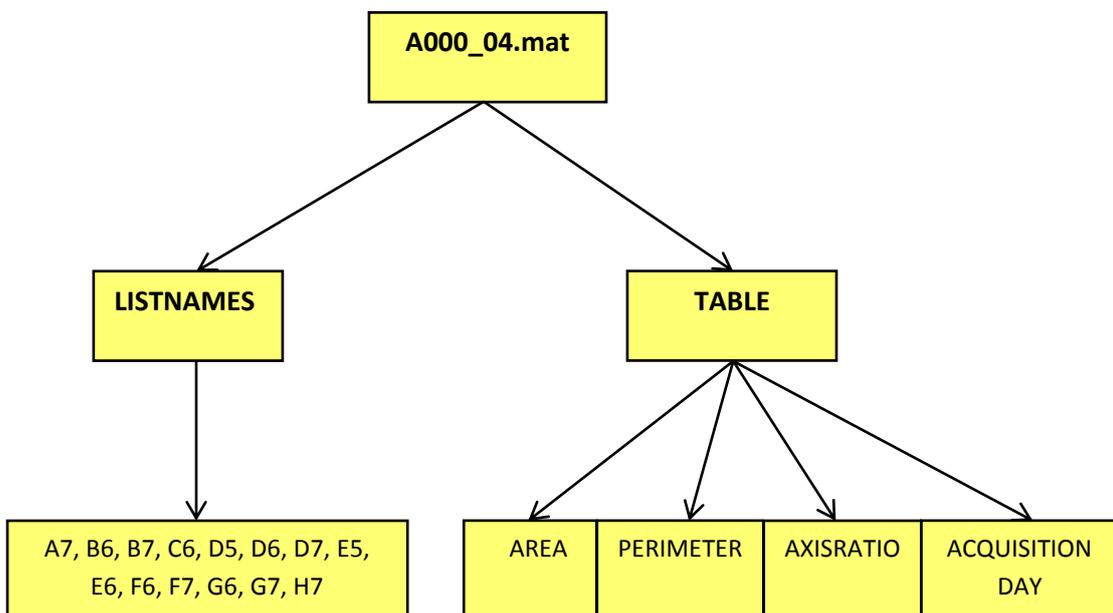
Infine, è stato ideato un algoritmo (denominato *Mask_Details*, vedi Appendice A.4 Algoritmo *Mask_Details*), in grado di ricavare le caratteristiche morfologiche specificate in precedenza a partire dalle maschere create. L'algoritmo si basa sull'utilizzo del comando Matlab *regionprops*. Con questo comando, data un'immagine binaria in ingresso, è possibile calcolare l'insieme delle proprietà di ogni oggetto dell'immagine, specificate tra apici. Ad esempio, data un'immagine in input denominata `Test`, si valuta per ogni oggetto:

1. l'area → comando Matlab: `Area = regionprops(Test, 'Area');`
2. il perimetro → comando Matlab: `Perimeter = regionprops(Test, 'Perimeter');`
3. la lunghezza dell'asse maggiore → comando Matlab: `MajorAxisLength = regionprops(Test, 'MajorAxisLength');`
4. la lunghezza dell'asse minore → comando Matlab: `MinorAxisLength = regionprops(Test, 'MinorAxisLength');`
5. il rapporto tra gli assi → comando Matlab: `AxisRatio = MajorAxisLength{1}/MinorAxisLength{1};`

Le caratteristiche morfologiche di ogni sferoide sono state valutate utilizzando i comandi sopra riportati. Eseguendo l'algoritmo si ottengono in output diversi *file.mat*, distinti in base al tipo di piastra considerata e al giorno di acquisizione. Pertanto ogni *file.mat* presenta una nomenclatura specifica che segue il seguente formato: NomeDellaPiastra_GiornoDiAcquisizione. Ad esempio, il file **A000_04.mat** si riferisce alla piastra di controllo **A000** acquisita il **4°** giorno. Inoltre ogni *file.mat* comprende:

1. la lista dei nomi degli sferoidi (parametro *ListNames*)
2. una struttura contenente 4 tabelle dove vengono riportate nell'ordine le seguenti proprietà degli sferoidi:
 - area
 - perimetro
 - rapporto tra gli assi
 - giorno di acquisizione

Illustriamo uno schema a blocchi semplificato:



Capitolo 6

Risultati sperimentali

Riuscire a fornire indicazioni per studiare la risposta delle cellule tumorali a diversi trattamenti radioterapici è un importante obiettivo al fine di progettare nuove e migliori strategie terapeutiche, eventualmente personalizzando i trattamenti anche sul paziente stesso. In particolare, l'esperimento trattato in questo lavoro di Tesi ha rappresentato un valido *step* di partenza per lo studio della cinetica di crescita tumorale in risposta a diversi trattamenti radioterapici tipicamente utilizzati nella cura dei pazienti. In questo capitolo verranno analizzati i dati raccolti, relativi alla perdita di integrità degli sferoidi sottoposti a diversi trattamenti radioterapici e utilizzando come parametro di confronto la variazione percentuale di area, verranno analizzati gli effetti dei trattamenti in due differenti tipi di confronto: diversi trattamenti radioterapici a pari numero di sedute e stesso trattamento radioterapico a differente numero di sedute.

6.1 Integrità degli sferoidi

Come prima analisi abbiamo confrontando i diversi trattamenti radioterapici tenendo traccia di due effetti macroscopici che possono verificarsi negli sferoidi: la disgregazione in singole cellule e la divisione in più sferoidi di dimensioni minori. In particolare, sono state analizzate per ogni giorno di acquisizione e per ogni piastra, tutte le immagini degli sferoidi acquisiti al fine di creare tabelle

riassuntive che riportassero informazioni relative all'eventuale presenza di più sferoidi per pozzetto (tipicamente a causa della scissione dello sferoide principale in più sferoidi di piccole dimensioni) e di sferoidi disgregati o in fase di disgregazione (che indica uno stato di salute non ottimale delle cellule che compongono lo sferoide). Considerando la disgregazione come un fenomeno rappresentativo di un eventuale danno subito dallo sferoide, secondo le correlazioni attese, dal confronto di sferoidi sottoposti a differenti trattamenti radioterapici, avremmo dovuto verificare che all'aumentare del numero di sedute e dell'intensità di radiazione, gli sferoidi tendevano più facilmente a disgregarsi e a dividersi in più sferoidi di piccole dimensioni. Dall'analisi dei dati è stato osservato che le correlazioni attese sono state in gran parte soddisfatte, nonostante possa essere fatta solo un'analisi qualitativa approssimativa a causa di un numero di sferoidi limitato. In Figura 6.1 è riportata la tabella di confronto delle 8 piastre trattate, nella quale compare il numero di sferoidi integri in base al giorno di acquisizione.

Figura 6.1 Tabella riassuntiva del numero di sferoidi integri in ogni piastra, in ogni giorno

SPHEROIDS NUMBER		DAY											
		0	1	2	3	4	7	8	11	14	16	18	21
PLATE	A000	16	16	14	14	14	14	14	14	14	12	11	9
	BXX5	16	16	9	9	9	9	6	6	6	4	4	3
	C755	15	15	12	12	12	12	12	12	11	7	5	5
	D655	16	16	14	14	14	14	11	10	9	5	4	4
	D654	16	16	14	14	14	14	14	14	13	10	9	6
	D653	16	16	14	14	14	14	13	13	12	8	8	8
	D652	16	16	14	14	14	14	12	12	12	10	8	8
	D651	16	16	14	14	14	14	13	12	11	8	8	7

di acquisizione

La tabella è stata creata riportando in alto il giorno di acquisizione specificato da protocollo (**DAY**) e sul lato sinistro il tipo di piastra considerata (**PLATE**). Come si osserva dalla tabella, tutte le piastre sono state nominate seguendo lo standard predefinito, ad eccezione della piastra B205, rinominata **BXX5**. Infatti, a causa

dell'errore dovuto all'ultimo trattamento radioterapico eseguito a 50 dGy, tale piastra ha subito solamente 4 trattamenti a 20 dGy.

A seguito alcune considerazioni sui dati riassunti in tabella:

1. Tutte le piastre presentano il primo giorno di acquisizione un numero di sferoidi integri pari a 16, ad eccezione della piastra C755 per la quale è stato considerato uno sferoide in meno a causa della presenza nel pozzetto di due sferoidi di dimensioni paragonabili già dal primo giorno.
2. La diminuzione del numero di sferoidi evidente in tabella il 2° giorno, non è dovuta alla presenza di sferoidi disgregati o multipli, ma all'eliminazione precoce di alcuni sferoidi a causa di un errore conseguito per l'esecuzione del test di vitalità.
3. Confrontando le immagini di sferoidi relativi alla piastra BXX5, si osservano netti cambiamenti morfologici in un intervallo di tempo pari a 24 ore. In particolare, all'inizio della seconda settimana, visualizzando le immagini del 7° e dell'8° giorno, si evidenzia che circa un terzo degli sferoidi risulta completamente disgregato (Figura 6.2) e (Figura 6.3) o in fase di scissione (Figura 6.4) e (Figura 6.5). Osservando la tabella a partire dal 2° giorno di acquisizione, risulta evidente che la piastra BXX5 presenta solo 9 sferoidi rispetto ad una media di 14 sferoidi delle restanti piastre. Questo è dovuto all'errore conseguito per l'esecuzione del test di vitalità.
4. Gli sferoidi della piastra C755 evidenziano i primi effetti di disgregazione solo a partire dalla 3° settimana e in maniera meno evidente rispetto agli sferoidi della piastra D655, già in fase di disgregazione a partire dalla fine della seconda settimana.
5. Le restanti piastre irradiate a 65 dGy evidenziano i primi effetti notevoli di disgregazione solo a partire dalla fine della 3° settimana.

Secondo il protocollo, il numero di sferoidi totali presenti al 21° giorno di acquisizione senza alcun segno evidente di disgregazione o scissione nel corso

dell'esperimento, dovrebbe essere pari a 10, a causa degli sferoidi utilizzati per eseguire il test di vitalità.

Dall'analisi dei dati possiamo trarre le seguenti considerazioni:

1. Gli sferoidi non trattati relativi alla piastra A000 non hanno mai evidenziato effetti di disgregazione o scissione: al 21° giorno è presente uno sferoide in meno a causa di un errore nell'esecuzione del test di vitalità. Quindi possiamo affermare che tutti i trattamenti eseguiti portano effetti di cura (disgregazione, rottura, etc) sugli sferoidi trattati.
2. Gli effetti dei trattamenti radioterapici risultano evidenti solo a partire dall'ottavo giorno, cioè dalla seconda settimana. Infatti, fino al termine dell'ultimo trattamento, eseguito il venerdì della prima settimana, non si osserva alcun segno evidente di disgregazione o scissione degli sferoidi. Questo fortifica le considerazioni dei radioterapisti che sostenevano che per valutare gli effetti dei diversi trattamenti radioterapici è necessario attendere qualche giorno dopo la fine dell'ultimo trattamento in modo da permettere alle cellule trattate di assimilare la dose irradiata.
3. Le piastre irradiate 5 volte (BXX5, C755, D655) hanno evidenziato una netta maggior disgregazione degli sferoidi rispetto alle altre piastre. In particolare, la piastra C755 presenta al 21° giorno solo 5 sferoidi integri, mentre la piastra D655 ne presenta 4. Per quanto riguarda la piastra BXX5, non possiamo trarre robuste considerazioni a causa dell'errore dovuto all'ultimo trattamento radioterapico e a causa di un numero rimanente di campioni molto inferiore rispetto alle altre piastre.
4. Le rimanenti piastre irradiate a 65 dGy hanno evidenziato il minor numero di sferoidi disgregati presenti al 21° giorno di acquisizione. In particolare, la piastra D654 presenta 6 sferoidi integri, le piastre D653 e D652 presentano 8 sferoidi integri e la piastra D651 ne presenta 7. Questo probabilmente indica che il numero minimo di 5 sedute proposte in letteratura per i trattamenti radioterapici è di fondamentale importanza per garantire un trattamento efficiente.

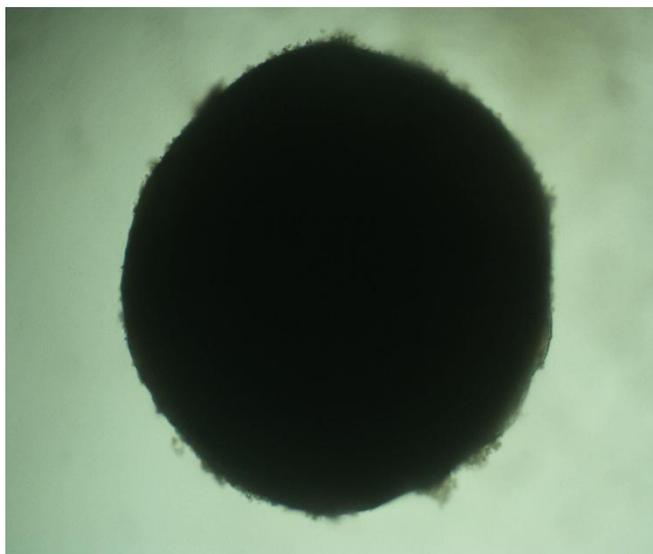


Figura 6.2 Immagine relativa al pozzetto E7 della piastra B205, acquisita il 7° giorno

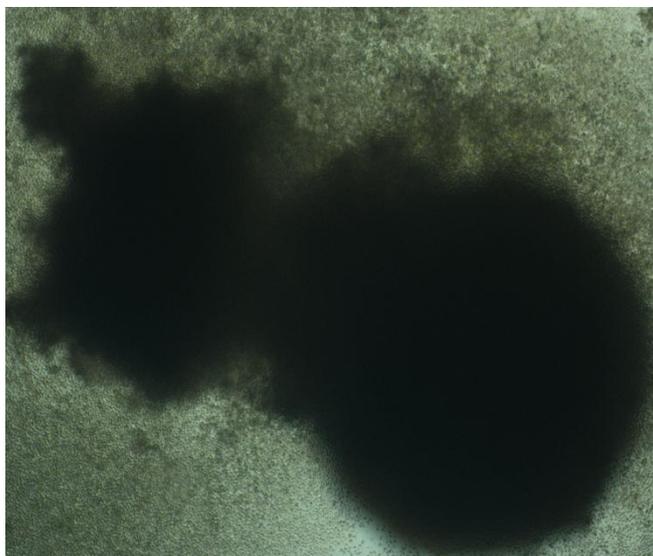


Figura 6.3 Immagine dello sferoide precedente, in fase di disgregazione, acquisita il giorno successivo

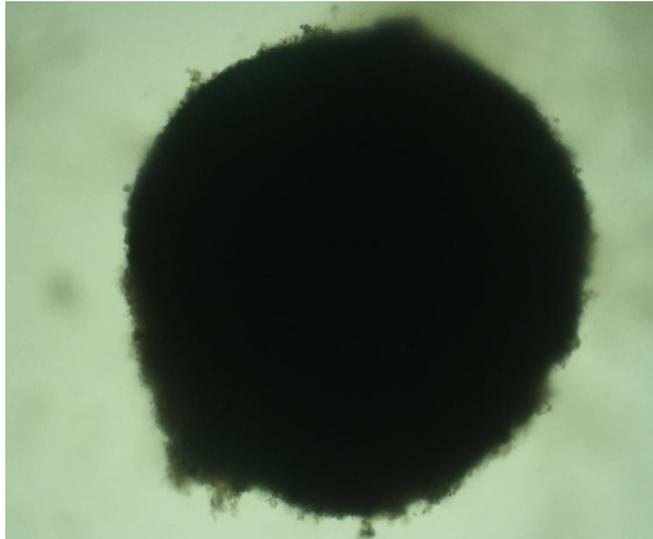


Figura 6.4 Immagine del pozzetto F6 della piastra B205, acquisita il 7° giorno

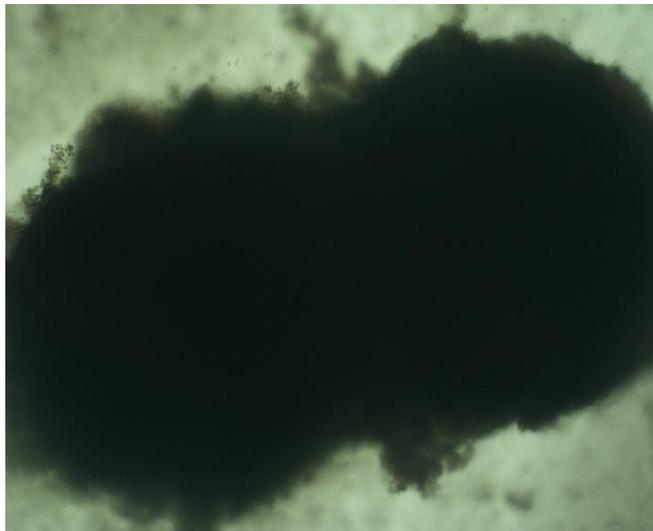


Figura 6.5 Immagine dello sferoide precedente, in fase di scissione, acquisita il giorno successivo

6.2 Confronto diversi trattamenti a pari numero di sedute

Abbiamo scelto di analizzare, utilizzando come parametro di confronto la variazione di area, come diversi trattamenti radioterapici a pari numero di sedute influiscono sugli sferoidi tumorali. Secondo le correlazioni attese, si sarebbe dovuto verificare che gli sferoidi trattati ad intensità di radiazione maggiore presentano una riduzione maggiore della loro area rispetto a quelli trattati ad intensità inferiore. Per verificare l'ipotesi formulata, sono stati confrontati i dati relativi alle piastre A000 (piastra di controllo non irradiata), B205, C755 e D655, cioè delle piastre trattate sempre per un numero di sedute pari a 5. Per ogni piastra, in base al giorno di acquisizione, è stato calcolato il valore mediano dell'area degli sferoidi. In particolare, per ogni sferoide è stato calcolato in maniera automatica il valore assoluto di area per ognuno dei 12 giorni di acquisizione previsti da protocollo. Tutti i valori ottenuti per uno specifico sferoide sono stati in seguito normalizzati al valore assoluto dell'area relativo al primo giorno di acquisizione. Infine, per ogni giorno di acquisizione, per ogni piastra, è stato estratto il valore mediano di area normalizzata, considerato rappresentativo degli sferoidi trattati in quella modalità di cura.

In Figura 6.6 è mostrato il grafico dei valori mediani di area normalizzata, per ognuna delle piastre confrontate: sono presenti 4 curve relative alle 4 piastre indicate, dove per ognuna di esse, vengono rappresentati i punti coincidenti con il valore mediano dell'area normalizzata, rappresentati in corrispondenza del giorno di acquisizione degli sferoidi. A causa degli errori commessi, riportati in precedenza, ricordiamo che la piastra B205 viene indicata in figura come BXX5.

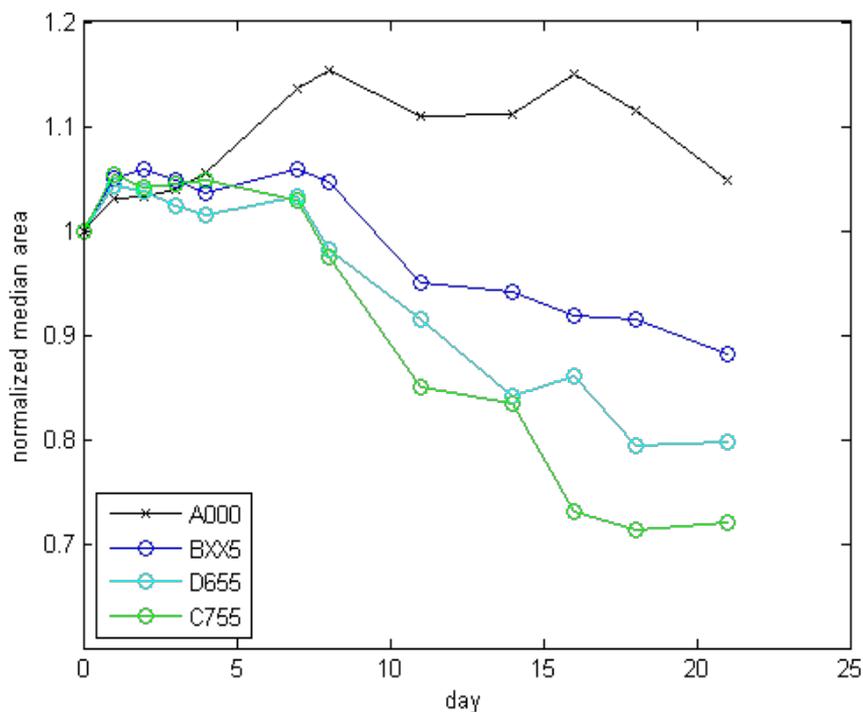


Figura 6.6 Confronto diversi trattamenti a pari numero di sedute

Al fine di analizzarlo, suddividiamo il grafico in tre diverse regioni in modo da valutare in maniera più accurata gli effetti dei diversi trattamenti radioterapici nel tempo:

1. Dal giorno **0** al giorno **4** (Figura 6.7). In maniera assoluta, si nota che fino al 4° giorno, non si evidenzia alcun cambiamento notevole a livello di area, tanto che le curve risultano qualitativamente confrontabili e in parte sovrapposte. Da tale risultato possiamo confermare quanto già accennato in precedenza, cioè che è necessario attendere qualche giorno dalla fine del trattamento per permettere alle cellule trattate di assimilare la dose irradiata. Ricordiamo che questa considerazione, a seguito di ulteriori prove e convalide, era stata già anticipata dai radioterapisti.

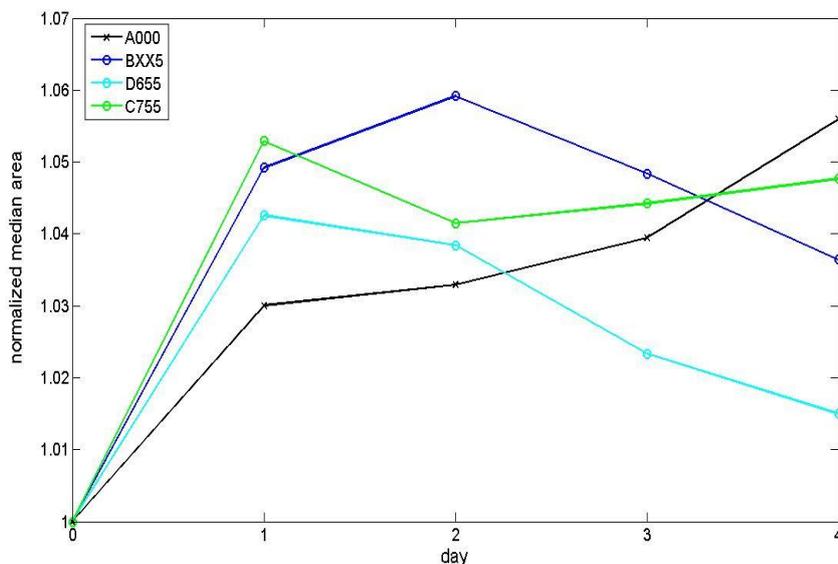


Figura 6.7 Confronto diversi trattamenti a pari numero di sedute dal giorno 0 al giorno 4

2. Dal giorno **5** al giorno **17** (Figura 6.8). In questo intervallo di tempo, le curve qualitativamente sono molto differenti: si evidenziano i primi effetti dei trattamenti radioterapici. In particolare, si osserva che:

- La piastra di controllo A000, non essendo stata mai irradiata, presenta un andamento crescente di area. Ne segue che le cellule tumorali non trattate continuano a proliferare, aumentando di dimensione.
- La piastra B205 presenta inizialmente un leggero incremento di area degli sferoidi. Intorno al 7° giorno evidenzia però moderati andamenti decrescenti, confermando la lieve intensità degli effetti radioterapici subiti.
- La piastra D655 presenta inizialmente un leggero incremento di area degli sferoidi, ma nettamente inferiore rispetto alla piastra B205. Intorno al 7° giorno evidenzia però accentuati andamenti decrescenti, confermando una migliore efficacia di questo trattamento rispetto al precedente.

- La piastra C755, come presupposto dalle correlazioni attese, ha fornito i migliori risultati rispetto alle precedenti piastre. Infatti, come si osserva dalla figura, si nota fin da subito una maggiore diminuzione di area degli sferoidi.

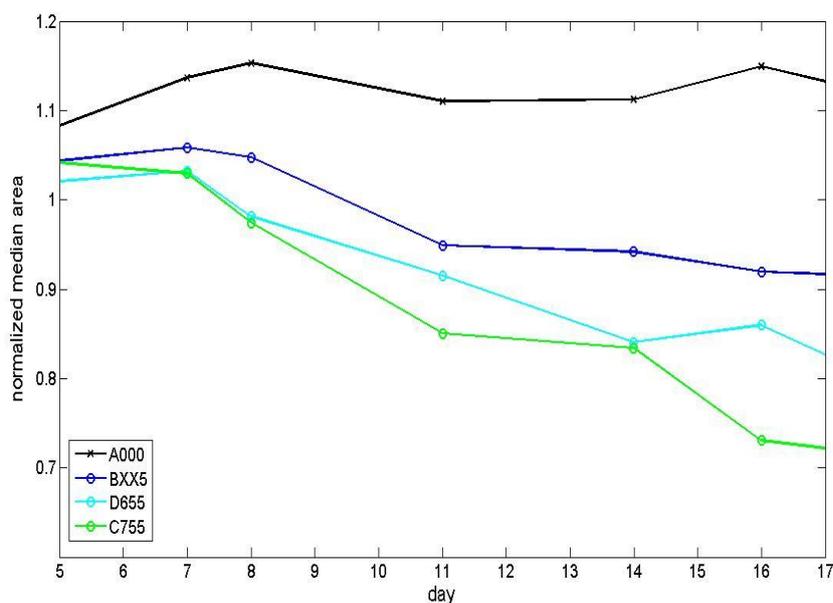


Figura 6.8 Confronto diversi trattamenti a pari numero di sedute dal giorno 5 al giorno 17

3. Dal giorno **18** al giorno **21** (Figura 6.9). A partire dal 18° giorno le curve presentano andamenti approssimativamente piatti (zone di *plateau*). I radioterapisti hanno concluso che questo effetto potrebbe dipendere da due fenomeni:
 - A. Un ripopolamento cellulare in cui si osserva che il numero di cellule morte è equivalente al tasso di formazione di nuove cellule.

B. L'effetto ritardato della radiazione assorbita dalle cellule tumorali trattate. Infatti, le cellule irradiate in fase di necrosi non determinano un calo immediato di area dello sferoide poiché impiegano un certo intervallo di tempo prima di disgregarsi e staccarsi dallo sferoide portando ad una diminuzione di volume.

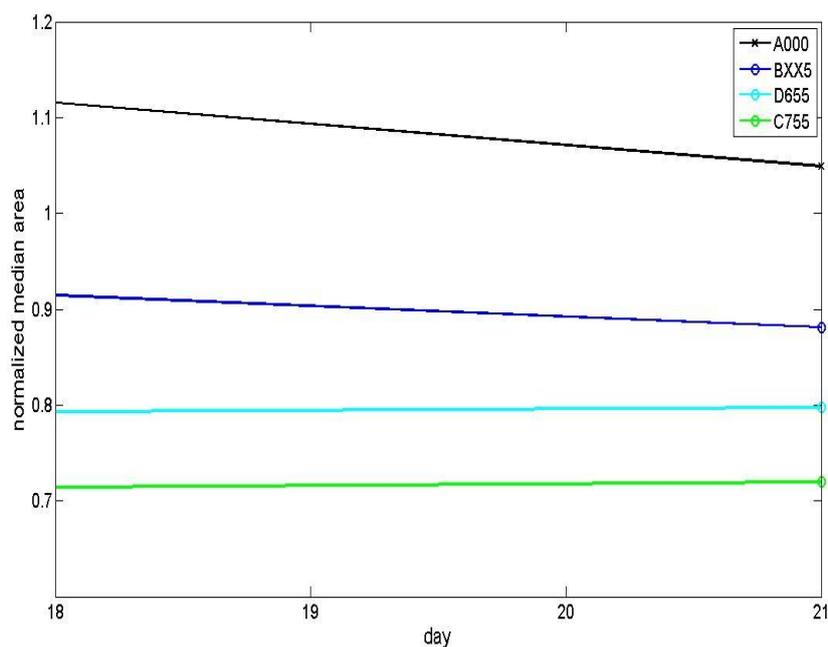


Figura 6.9 Confronto diversi trattamenti a pari numero di sedute dal giorno 18 al giorno 21

Vengono infine riportati di seguito i grafici relativi all'area media normalizzata di ogni singola piastra con i rispettivi margini di errore: piastra A000 (Figura 6.10), piastra B205 (Figura 6.11), piastra D655 (Figura 6.12) e piastra C755 (Figura 6.13).

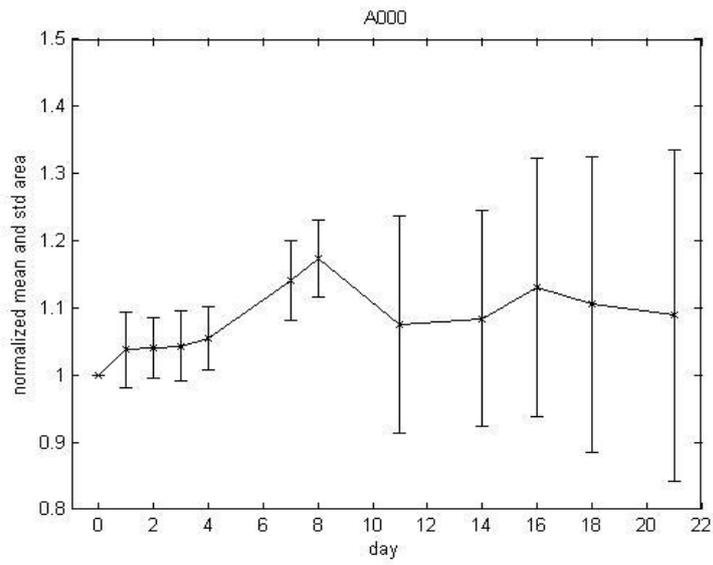


Figura 6.10 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra A000 con il rispettivo margine di errore

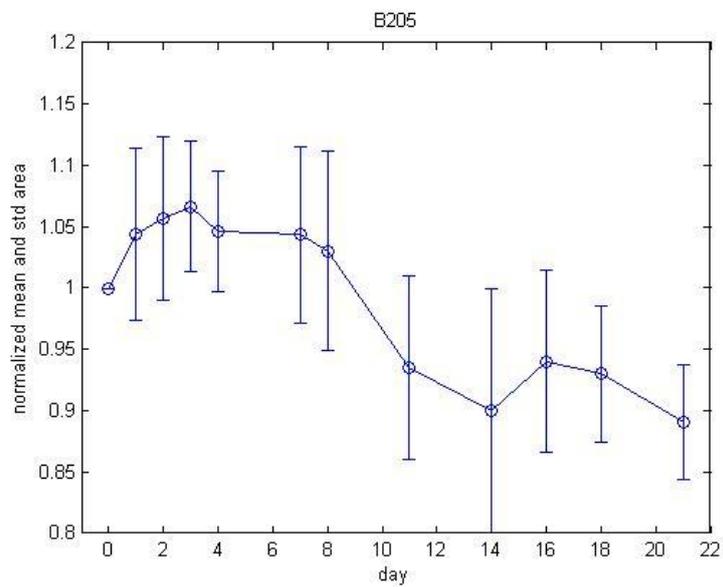


Figura 6.11 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra B205 con il rispettivo margine di errore

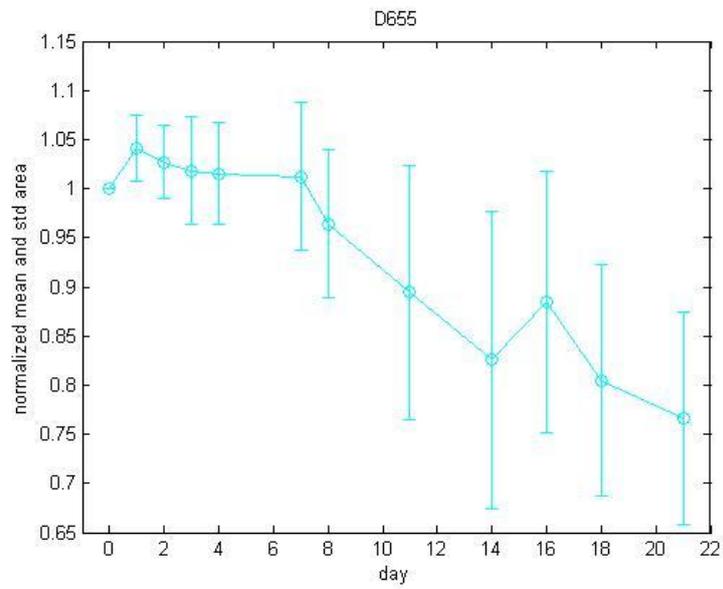


Figura 6.12 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra D655 con il rispettivo margine di errore

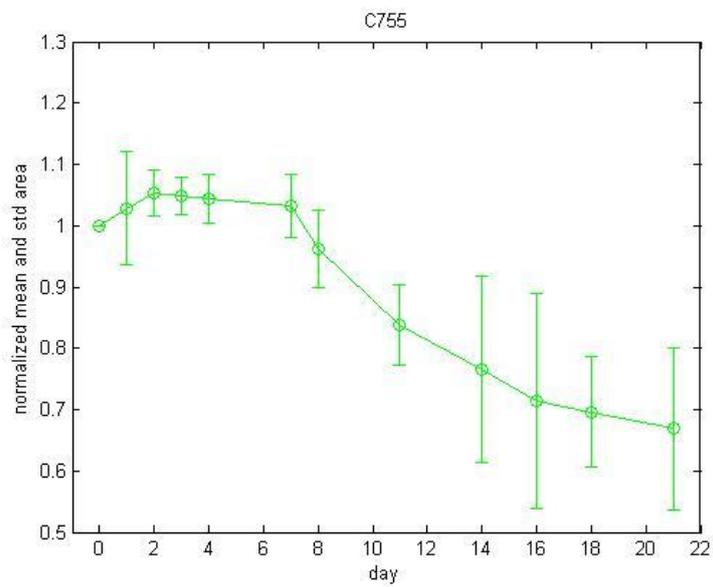


Figura 6.13 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra C755 con il rispettivo margine di errore

6.3 Confronto trattamenti a differente numero di sedute

Abbiamo scelto quindi di proseguire l'analisi, utilizzando come parametro di confronto sempre la variazione di area, come trattamenti radioterapici a pari intensità di radiazione ma differente numero di sedute, influiscono sugli sferoidi tumorali. Secondo le correlazioni attese, a parità di intensità di radiazione, gli sferoidi trattati ad un numero maggiore di sedute presentano una riduzione maggiore della loro area rispetto a quelli trattati con minor numero di sedute. In particolare, sono stati confrontati i dati relativi alle piastre trattate a 65 dGy per 1, 2, 3, 4 e 5 sedute: D651, D652, D653, D654, D655 sempre in riferimento alla piastra di controllo A000 non irradiata. Per ogni piastra e in ogni giorno di acquisizione, abbiamo preso in considerazione sempre il valore mediano di area normalizzata, ottenuto calcolando i valori assoluti di area per ogni sferoide delle singole piastre.

In Figura 6.14 è mostrato il grafico dei valori mediani di area normalizzata, per ognuna delle piastre. Sono presenti 6 curve relative alle 6 piastre indicate, dove per ognuna di esse, vengono rappresentati i punti coincidenti con il valore mediano dell'area normalizzata, rappresentati in corrispondenza del giorno di acquisizione degli sferoidi.

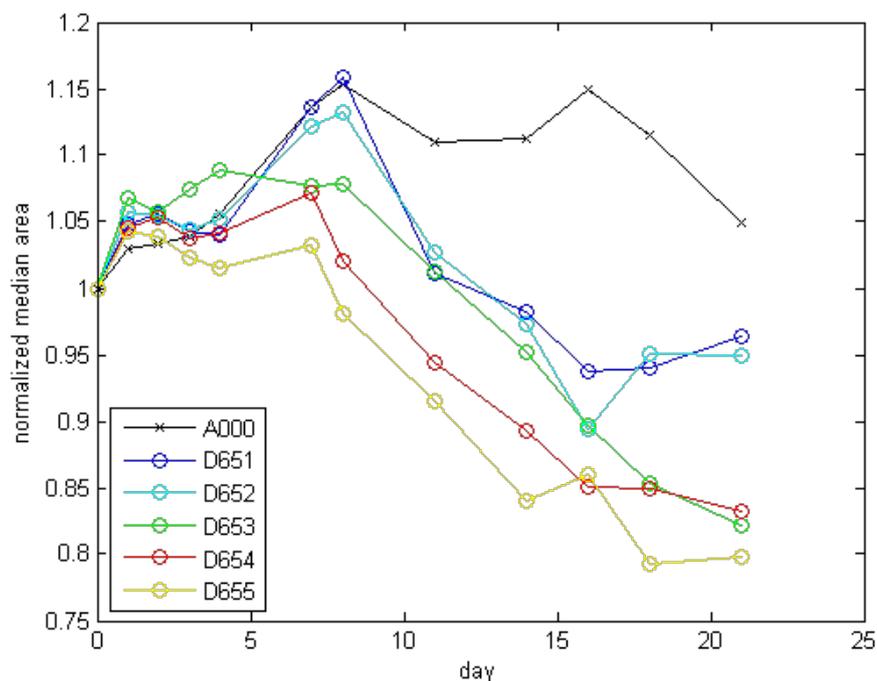


Figura 6.14 Confronto dei trattamenti a 65 dGy eseguiti con differente numero di sedute

Suddividiamo il grafico in tre diverse regioni in modo da valutare in maniera più accurata gli effetti dei diversi trattamenti radioterapici nel tempo:

1. Dal giorno 0 al giorno 4 (Figura 6.15). Fino al 4° giorno, non si evidenzia alcun cambiamento notevole a livello di area, tanto che le curve risultano qualitativamente molto simili e in parte sovrapposte. Anche in questo caso possiamo confermare quanto già accennato in precedenza, cioè che è necessario attendere qualche giorno dalla fine del trattamento per permettere alle cellule trattate di assimilare la dose irradiata.

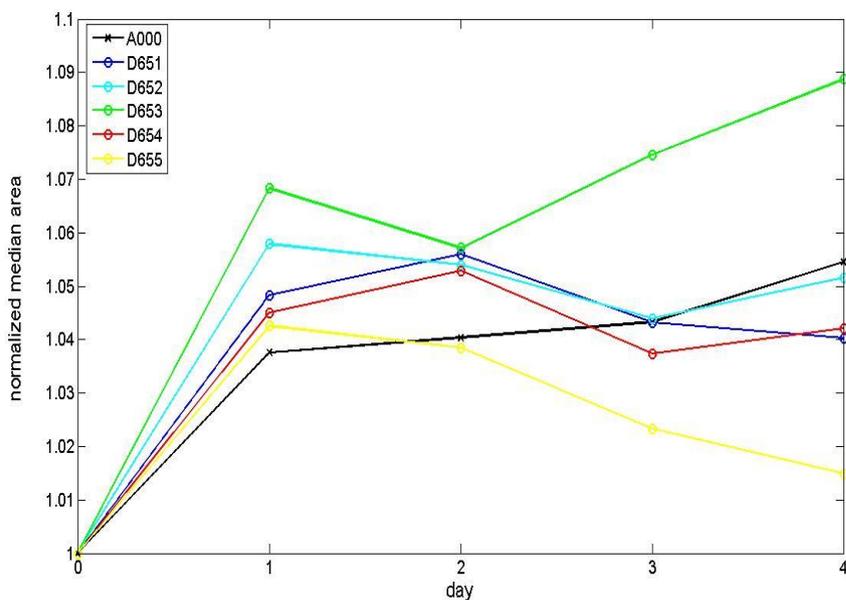


Figura 6.15 Confronto trattamenti a diverso numero di sedute dal giorno 0 al giorno 4

2. Dal giorno 5 al giorno 17 (Figura 6.16). In questo intervallo di tempo, si evidenziano i primi effetti dei trattamenti radioterapici, tanto che le curve presentano andamenti nettamente distinti. In particolare, si osserva che:

- Le piastre D651 e D652 evidenziano moderati andamenti decrescenti a livello di area, in accordo alla modesta dose somministrata.
- La piastra D653 evidenzia maggiori andamenti decrescenti a livello di area rispetto ai precedenti, confermando quindi un migliore effetto radioterapico di questo trattamento rispetto ai precedenti.
- Le piastre D654 e D655, come presupposto dalle correlazioni attese, hanno fornito i risultati migliori rispetto alle precedenti piastre. Infatti, come si osserva dalla figura, si nota fin da subito una maggiore diminuzione di area degli sferoidi, particolarmente evidente per la piastra D655.

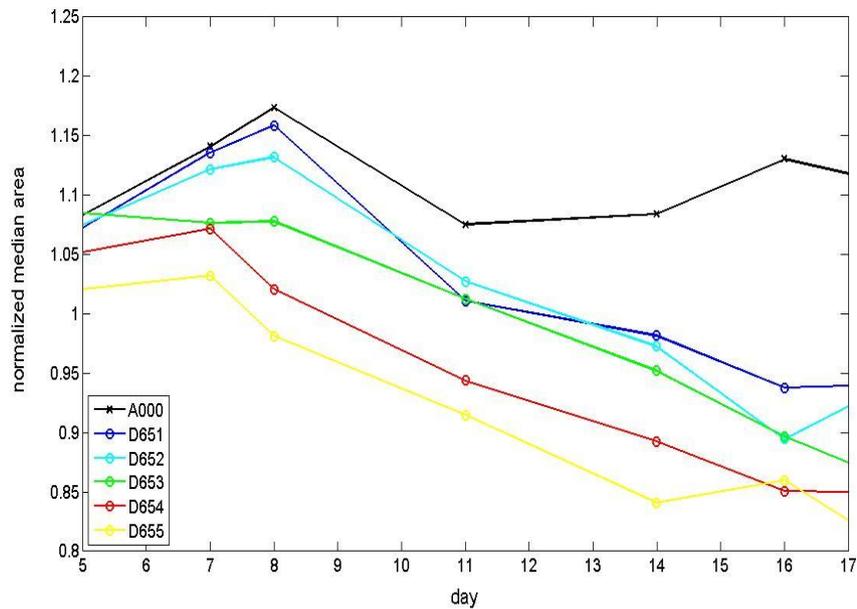


Figura 6.16 Confronto trattamenti a diverso numero di sedute dal giorno 5 al giorno 17°

3. Dal giorno **18** fino al giorno **21** (Figura 6.17). Si nota che a partire dal 18° giorno, le curve presentano andamenti approssimativamente piatti (zone di *plateau*). Come già accennato in precedenza, anche in questo caso potremmo spiegare questo andamento, a seguito di un ripopolamento cellulare negli sferoidi, oppure a causa dell'effetto ritardato della radiazione assorbita dalle cellule tumorali.

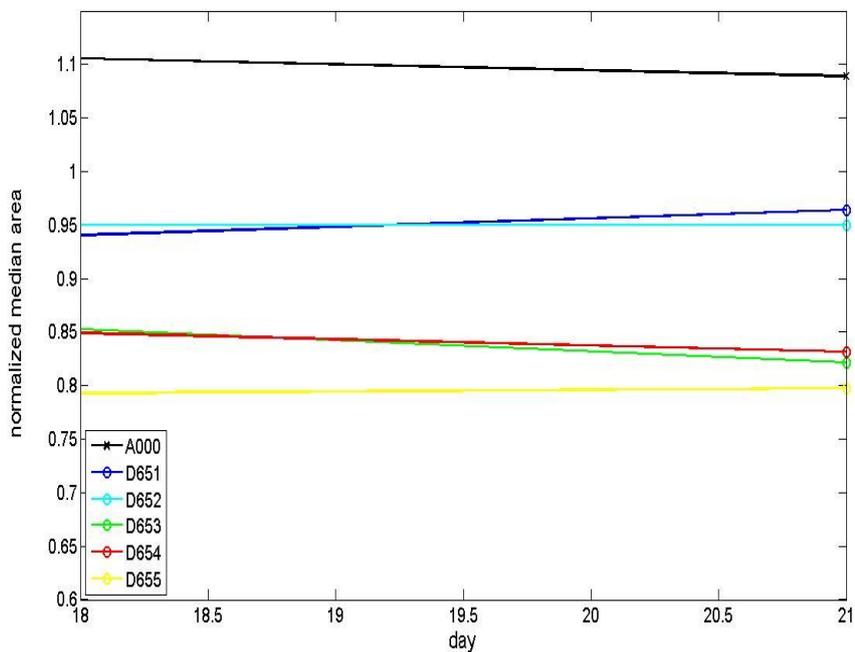


Figura 6.17 Confronto trattamenti a diverso numero di sedute dal giorno 18 al giorno 21

Vengono infine riportati di seguito i grafici relativi all'area media normalizzata di ogni singola piastra con i rispettivi margini di errore: piastra D651 (Figura 6.18), piastra D652 (Figura 6.19), piastra D653 (Figura 6.20) e piastra D654 (Figura 6.21). Non sono stati riportati i grafici relativi alle piastre A000 e D655 in quanto già rappresentati in precedenza.

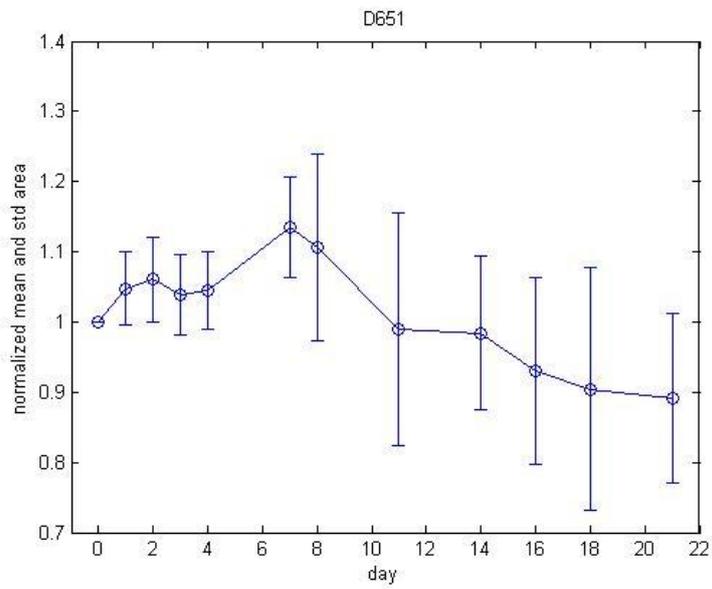


Figura 6.18 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra D651 con il rispettivo margine di errore

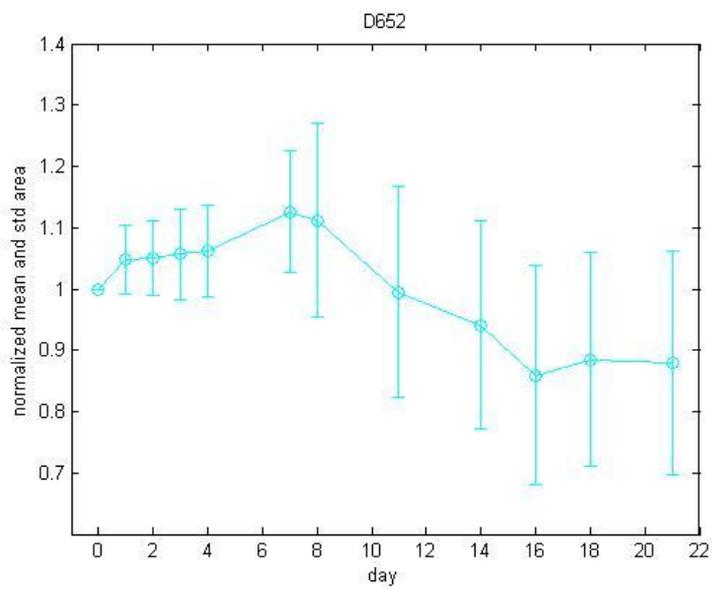


Figura 6.19 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra D652 con il rispettivo margine di errore

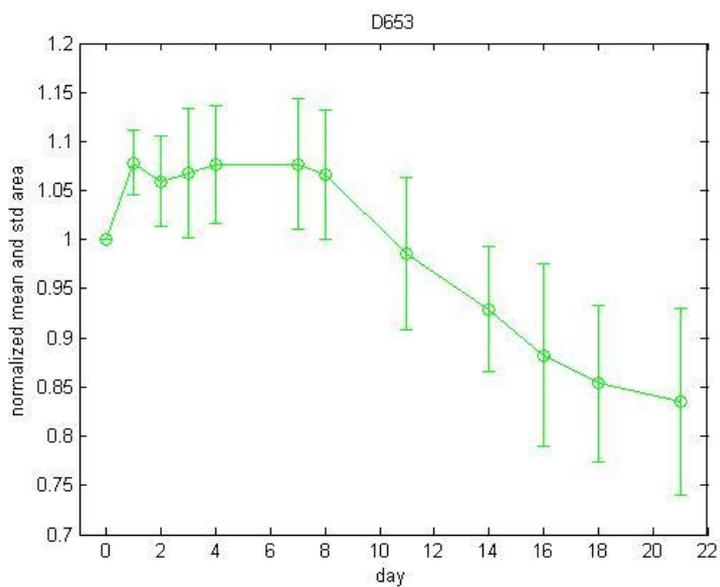


Figura 6.20 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra D653 con il rispettivo margine di errore

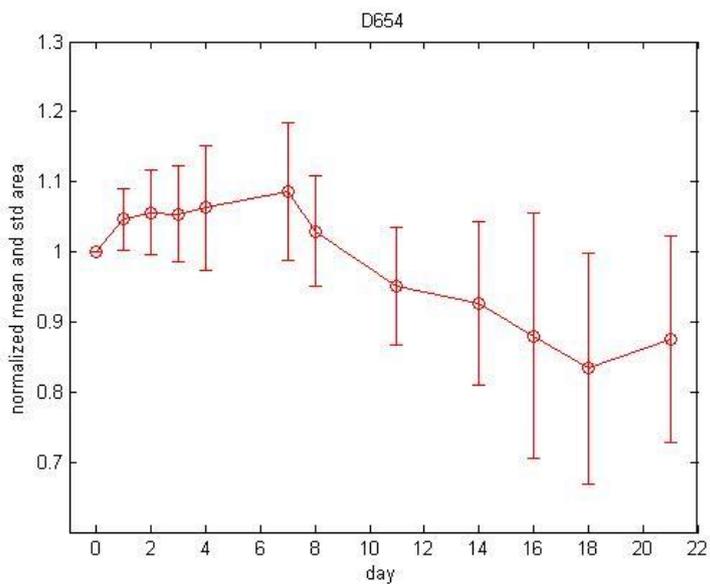


Figura 6.21 Andamento valore medio dell'area di sferoidi relativi alla piastra D654 con il rispettivo margine di errore

Capitolo 7

Conclusioni e sviluppi futuri

Lo scopo principale del lavoro svolto in questa Tesi era di raccogliere ed analizzare informazioni morfologiche estratte in maniera automatica da un numero elevato di sferoidi, trattati secondo differenti modalità di cura radioterapica. L'obiettivo era quello di ottenere uno strumento non invasivo, validato, per la valutazione degli effetti del trattamento sul tumore, in grado di fornire al radioterapista importanti indicazioni per personalizzare o modificare la terapia per lo specifico paziente in cura. In particolare, si voleva analizzare gli effetti provocati sul tumore da differenti livelli d'intensità di radiazione e numero di sedute. A tal proposito, sono stati effettuati i differenti trattamenti radioterapici tipicamente utilizzati sui pazienti sia su "fantocci", creati per simulare il tumore *in situ* nel corpo umano, sia su modelli di tumore tridimensionale, allo stato solido, confrontabile con i tessuti reali, costituiti da minuscoli sferoidi multicellulari. Questi aggregati, chiamati broncosfere e del diametro generalmente inferiore al millimetro, sono stati creati in laboratorio a partire da cellule di carcinoma polmonare estratte da pazienti, scelte per la loro caratteristica di riuscire ad assumere facilmente *in vitro* la struttura tridimensionale. Nell'esperimento sono quindi state create ed utilizzate 8 differenti piastre da 96 *wells*, contenenti sferoidi tumorali creati *in vitro*, al fine di raccogliere informazioni su differenti intensità di radiazione (20, 65 e 75 dGy) e numero di sedute, variabile da 1 a 5.

Per la progettazione e la realizzazione dell'esperimento sono stati impiegati circa 7 mesi, con un periodo di 37 giorni di laboratorio dedicato alla produzione delle broncosfere, ai *test* di vitalità ed all'acquisizione delle immagini. In questa parte sperimentale del lavoro di Tesi, sono state acquisite manualmente 3 immagini per ogni sferoide, per un totale di 3975 immagini. Tali immagini sono state poi catalogate ed archiviate con opportuna nomenclatura e utilizzando una gerarchia di cartelle ottimizzata al fine di consentire una facile identificazione del dato di interesse, facilitando l'analisi automatica dei dati.

I dati ottenuti hanno consentito di approfondire tre diversi tipi di analisi qualitative. La prima, per avere un'indicazione a riguardo di quando e quanti sferoidi si disgregano a causa delle sedute di radioterapia condotte. La seconda, per ottenere informazioni comparative riguardo ai differenti trattamenti radioterapici con numero di sedute fisso, ma differenti intensità di radiazione. La terza, per comparare gli effetti sugli sferoidi di trattamenti con stessa intensità di radiazione, ma differente numero di sedute.

A partire dalle immagini acquisite, sono state estratte in maniera automatica e ripetibile differenti caratteristiche morfologiche degli sferoidi calcolate sulla sezione di area massima quali, area, perimetro, rapporto tra gli assi, etc.. Infine, a partire dai dati ottenuti sono state create linee di tendenza temporale relative alla variazione di area degli sferoidi acquisiti. I codici sono stati tutti sviluppati all'interno del CVG ed implementati in MATLAB.

Dall'analisi dei risultati ottenuti è stato possibile dimostrare, per il momento a livello qualitativo, come numero di sedute e intensità di radiazione influiscono sugli sferoidi tumorali trattati. In particolare, analizzando le linee di tendenza temporale correlate alla variazione di area degli sferoidi e i dati relativi alla perdita di integrità degli stessi, sono state tratte le seguenti conclusioni, che confermano le ipotesi formulate a priori e le correlazioni attese:

1. Sferoidi tumorali non sottoposti ad alcun trattamento radioterapico, continuano a proliferare, aumentando di dimensione, senza mostrare alcun segno di disgregazione durante tutta la durata dell'esperimento.
2. A parità di numero di sedute, l'utilizzo di un trattamento a dose radioterapica maggiore determina una maggiore diminuzione di area degli sferoidi trattati, oltre che un notevole numero di campioni in fase di scissione o già disgregati. Viene pertanto confermato a livello

morfologico il maggior effetto necrotico del trattamento radioterapico a più alta intensità di dose.

3. A parità d'intensità di radiazione per unità di trattamento, l'utilizzo di un più alto numero di sedute ha determinato linee di tendenza temporale con la più rilevante diminuzione di area degli sferoidi trattati, oltre che un notevole numero di campioni in fase di scissione o già disgregati.

Naturalmente questi risultati sono preliminari e non sono sufficienti per giustificare l'utilizzo di questi trattamenti come migliore modalità di cura del carcinoma polmonare, poiché sono stati analizzati andamenti puramente qualitativi a livello morfologico, attualmente non supportati dallo studio di correlazione con dati biologici (in quanto non è ancora giunto a conclusione) e senza valutare i danni collaterali indotti su cellule sane.

Il compimento dello studio di correlazione di questi risultati ottenuti con un metodo non invasivo ed i dati biologici relativi allo stato di vitalità delle cellule, permetterà di approfondire l'analisi del comportamento e della correlazione tra differenti parametri del protocollo di cura con l'obiettivo di definire le più efficaci modalità e intensità di irradiazione che recano minori danni collaterali possibili ai pazienti.

Tra i numerosi sviluppi futuri di questa Tesi, evidenziamo:

1. La validazione delle maschere relative alla segmentazione manuale effettuata per identificare gli sferoidi nelle immagini acquisite: non è facile identificare con certezza i bordi degli sferoidi ed attualmente sono state segmentate da un unico operatore. La segmentazione andrà estesa a più operatori.
2. Lo sviluppo di un metodo automatico per segmentare gli sferoidi al fine di avere una segmentazione operatore indipendente per ottenere le maschere di input utilizzate nell'algoritmo per stimare le grandezze morfologiche estratte dagli sferoidi.
3. Lo studio delle singole cellule costituenti gli sferoidi per dimostrare come e in che percentuale le radiazioni necrotizzano le cellule

tumorali. In tal modo sarà possibile determinare i parametri radioterapici più efficaci nel necrotizzare il “cuore” del tumore senza danneggiare le cellule epiteliali esterne.

4. Correlare le linee di tendenza temporale, ottenute dai dati morfologici estratti in maniera non invasiva partendo da immagini degli sferoidi, agli indici di vitalità ottenuti dai test clonogenici (altamente invasivi), condotti su campioni trattati in parallelo in maniera identica agli sferoidi citati.

In conclusione questo lavoro di Tesi rappresenta sicuramente un importante punto di partenza per uno studio comparativo non invasivo sull'effetto dei trattamenti radioterapici attualmente utilizzati per combattere il carcinoma polmonare, una delle principali cause di morte dei paesi industrializzati. Una volta validate le linee di tendenza temporale ottenute con i dati relativi alla vitalità, potrà essere fornito ai radioterapisti un utile strumento non invasivo per valutare la vitalità cellulare del tumore al fine di personalizzare la terapia al paziente o modificare la terapia in corso in modo da massimizzare l'effetto di cura.

Appendici

A.1 Algoritmo *DataFromImages*

Questo algoritmo permette di ottenere, a partire da video salvati in cui si spostava il tavolo porta oggetti del microscopio solo in direzione z , le immagini relative ai differenti piani focali, calcolando gli intervalli di separazione tra l'acquisizione di un determinato piano focale e il passaggio al piano focale successivo.

```
% AUTHORS: Ilaria Fantigrossi, Filippo Piccinini
% Date: 15/06/2012
% Example of use: Intervals = DataFromImages_v3('C:\Users\
% Administrator\Desktop\2012_FantigrossiIlaria\Materiale\
% Mat_VideoAnalysis\Test','Video*');

function Intervals = DataFromImages_v3(ImagesFolder, ImageBaseName)

% Corregge se in fondo al path in ImagesFolder non era stato messo
lo slash

if isunix()
    Slash = '/';
else
    Slash = '\';
end;
if ~strcmp(ImagesFolder(end), Slash)
    ImagesFolder = strcat(ImagesFolder, Slash);
end

% Legge i nomi delle immagini nella cartella

dirList = dir([ImagesFolder ImageBaseName]);
```

```

dirList_length = length(dirList);

% Croppa le immagini

Nome = dirList(ceil(dirList_length/2)).name;
Input_half = imread([ImagesFolder Nome]);
[Maschera, M_tagliata_grande, M_tagliata_piccola, PUNTI] =
FP_TagliaMatriceGinput(Input_half);
clear Input_half Maschera M_tagliata_grande M_tagliata_piccola

% Carica la prima immagine e confronta l'immagine n-esima con la
% (n-1)-esima creando il grafico cumulativo

flag_CalcolaDifferenze = 1;
if flag_CalcolaDifferenze == 1
    Nome = dirList(1).name;
    INPUT_A = imread([ImagesFolder Nome]);
    [Maschera, M_tagliata_grande, Input_old, punti2] =
FP_TagliaMatriceGinput(INPUT_A, PUNTI);
    clear INPUT_A Maschera M_tagliata_grande punti2
    Trend = NaN(dirList_length,1);
    Value_old = 0;
    for nf = 2:dirList_length
        Nome = dirList(nf).name;
        INPUT_B = imread([ImagesFolder Nome]);
        [Maschera, M_tagliata_grande, Input_new, punti2] =
FP_TagliaMatriceGinput(INPUT_B, PUNTI);
        clear INPUT_B Maschera M_tagliata_grande punti2
        Value_new = mean(abs(Input_old(:) - Input_new(:)));
        Trend(nf-1) = Value_new + Value_old;
        Value_old = Value_new + Value_old;
        Input_old = Input_new;
        clear Input_new Value_new
    end
    figure, plot(Trend, 'x-'), grid
    save Trend Trend
else
    load('Trend.mat')
end

% Piccolo filtraggio mediano per pulire da rumore eventualmente
presente

KernelSize = [5, 1];
Trend_p = padarray(Trend, KernelSize, 'replicate', 'both');
Trend_p = medfilt2(Trend_p, KernelSize);
Trend_f = Trend_p(1+KernelSize(1):end-
KernelSize(1),1+KernelSize(2):end-KernelSize(2));
figure, plot(Trend_f, 'x-'), grid

% Derivazione richiamando una funzione esterna

Trend_d = FirstDerivativeX(Trend_f)';
figure, plot(Trend_d, 'x-'), grid

```

```

% Sogliatura black and white (le zone di interesse sono le black,
cioè quelle a derivata bassa)

Th_level = graythresh(Trend_d);
Trend_bw = im2bw(Trend_d, Th_level);
figure, plot(Trend_bw, 'x-'), grid

% Labeling black (per contare e separare le zone di interesse)

Trend_la = bwlabel(~Trend_bw, 4);
figure, plot(Trend_la, 'x-'), grid

% Valutazione delle aree per capire da quante immagini
medianamente sono composte e filtrazione eliminando le zone più
piccole di una costante

ItemsNumber = zeros(max(Trend_la),1);
CoefAreaDeletion = 3;
for a = 1:max(Trend_la);
    ItemsNumber(a,1) = length(find(Trend_la==a));
end
MinItemsNumber = ceil(median(ItemsNumber)/CoefAreaDeletion);

% Eliminazione delle aree piccole considerate rumore

Trend_vd = Trend_la;
for a = 1:max(Trend_la);
    if ItemsNumber(a,1) < MinItemsNumber
        Trend_vd(Trend_la==a)=0;
    end
end
figure, plot(Trend_vd, 'x-'), grid

% Calcolo degli intervalli delle immagini di interesse

Indice = 1;
for a = 1:max(Trend_la);
    SpecificIntervals = find(Trend_vd==a);
    if ~isempty(SpecificIntervals)
        Intervals(Indice,1)=min(SpecificIntervals);
        Intervals(Indice,2)=max(SpecificIntervals);
        Indice = Indice + 1;
    end
    clear SpecificIntervals
end

```

A.2 Algoritmo *FramesFromVideo*

Questo algoritmo permette di salvare tutti i *frames* di un video. Occorre che il video letto sia salvato nella stessa cartella di questa funzione, mentre le immagini di output vengono salvate in una cartella nominata “output” automaticamente creata.

```
% Authors: Ilaria Fantigrossi, Filippo Piccinini
% Date: 22/05/2012
% Example of use: FP_FramesFromVideo('example.avi', 'NomeVideo',
% 'tif', 1);
% Description: Se "passo" == 1 vengono salvati tutti i frames,
% altrimenti vengono salvati i frames [1, n+1] con n=1,2,..

function FP_FramesFromVideo(nomeInput, nomeOutput, formatoOutput,
passo)

%rmdir('OUTPUT','s') %Serve per cancellare una cartella e tutto il
suo contenuto

currentDirectory = cd; %Serve per memorizzare la path della
cartella da cui viene chiamata la funzione

mkdir(nomeOutput) %Serve per creare una cartella, se già esiste
non viene cancellata

obj = mmreader(nomeInput); %Serve per leggere un file video
passato come 'nome.type'

numFrames = get(obj, 'NumberOfFrames');
sprintf('Numero di Frame nel Video: %s', num2str(numFrames))
j = 1;
cd(nomeOutput) %Serve per posizionarsi nella cartella dove voglio
salvare le immagini di output

for i = 1:passo:numFrames
    Immagine = read(obj, i); %Così legge un frame per volta
    strnum = sprintf('%0.3d',j); %Serve per scrivere un numero
                                con degli zero davanti.
    imwrite(Immagine,[nomeOutput '_' strnum '.'formatoOutput],
            formatoOutput)

    j = j+1;
end
cd(currentDirectory) %Serve per posizionarsi nella cartella da
dove è stata chiamata la funzione.

end
```

A.3 Algoritmo *TagliaMatriceGinput*

Questo algoritmo permette, data un'immagine di partenza, di ritagliare una definita regione d'interesse delimitata dal rettangolo inscritto da due punti selezionati manualmente dall'utente. Può essere utilizzato per effettuare il ritaglio delle immagini in modo che tutti i *frames* confrontati siano delle stesse dimensioni, ma anche per evidenziare una definita regione d'interesse dell'immagine, ottenendo in output l'immagine ritagliata delle stesse dimensioni del rettangolo selezionato.

```
% Authors: Ilaria Fantigrossi, Filippo Piccinini
% Date: 18/07/2012
% input1: matrice che si vuole tagliare
% input2: facoltativo: corners = [x_ULC y_ULC; x_DRC y_DRC] del
% quadrato che si vuole ritagliare.
% output1: maschera di dimensioni identiche a input1. Il valore 1
% indica la parte tagliata, il valore 0 indica la parte non
% tagliata.
% output2: rettangolo tagliato circondato da una corona di 0. Le
% dimensioni sono identiche a input1.
% output3: rettangolo tagliato. Le dimensioni sono quelle del
% rettangolo tagliato.
% output3: punti2 = [x_ULC y_ULC; x_DRC y_DRC] i due punti in cui
% si è tagliato il rettangolo.

function [Maschera, M_tagliata_grande, M_tagliata_piccola,
punti2]= FP_TagliaMatriceGinput(M, corners)

if nargin<2
    M = double(M);
    figure, imshow(uint8(M), 'Border', 'Tight'), grid on, axis on,
title('M')
    disp('Delimitare un rettangolo prendendo 2 punti (consiglio in
senso orario partendo da in alto a sinistra')
    corners = ginput(2); grid on, axis on
end

punti2 = round(corners);

if punti2(1,1)<punti2(2,1)
    ULC_x = punti2(1,1);
    DRC_x = punti2(2,1);
else
    ULC_x = punti2(2,1);
    DRC_x = punti2(1,1);
end
if punti2(1,2)<punti2(2,2)
    ULC_y = punti2(1,2);
    DRC_y = punti2(2,2);
```

```

else
    ULC_y = punti2(2,2);
    DRC_y = punti2(1,2);
end
Maschera = zeros(size(M));
Maschera(ULC_y:DRC_y,ULC_x:DRC_x,:) = 1;

M_tagliata_grande = zeros(size(M));
M_tagliata_grande(ULC_y:DRC_y,ULC_x:DRC_x,:) =
M(ULC_y:DRC_y,ULC_x:DRC_x,:);

M_tagliata_piccola = M(ULC_y:DRC_y,ULC_x:DRC_x,:);

%figure, imshow(Maschera, [], 'Border', 'Tight')
%figure, imshow(uint8(M_tagliata_grande), 'Border', 'Tight')
%figure, imshow(uint8(M_tagliata_piccola), 'Border', 'Tight')

```

A.4 Algoritmo *Mask_Details*

Questo algoritmo permette, data un'immagine binaria in ingresso, di ricavare il valore relativo ad alcune classiche proprietà morfologiche (area, perimetro, rapporto degli assi maggiori, etc.) per ogni oggetto dell'immagine.

```

% AUTHORS: Ilaria Fantigrossi, Filippo Piccinini
% Date: 10/08/2012
% Example of use: [Table, ListNames] =
% Mask_Details_v4 ('C:\FPICININI\Dottorato\Other\TesiTirocini\
% 2012_FantigrossiIlaria\Codice\Mat_DataFromMasks\Maschere', 255);

function [Table, ListNames] = Mask_Details_v4(ImagesFolder,
BGvalues, OutputFolder)
% Corregge se in fondo al path non era stato messo lo slash
if isunix()
    Slash = '/';
else
    Slash = '\';
end;
if ~strcmp(ImagesFolder(end), Slash)
    ImagesFolder = strcat(ImagesFolder,Slash);
end

% Legge i nomi delle immagini nella cartella
dirList = dir([ImagesFolder '*.tif']);
dirList_length = length(dirList);

```

```

PlateBaseNameVecchio = '';
indice = 0;
for nf = 1:dirList_length

% Crea la maschera
    Nome = dirList(nf).name;
    Input = imread([ImagesFolder Nome]);
    Servizio = zeros(size(Input));
    Servizio(Input~=BGvalues) = 1;
    Input = bwlabel(Servizio);
    clear Servizio

% Calcola i valori
    Area = struct2cell(regionprops(Input, 'Area'));
    Perimeter = struct2cell(regionprops(Input, 'Perimeter'));
    MajorAxisLength =
struct2cell(regionprops(Input, 'MajorAxisLength'));
    MinorAxisLength =
struct2cell(regionprops(Input, 'MinorAxisLength'));
    AxisRatio = MajorAxisLength{1}/MinorAxisLength{1};
    clear Input

% Crea le tabelle finali
    LessPositions = strfind(Nome, '_');
    Pointpositions = strfind(Nome, '.');
    PlateBaseNameNuovo = Nome(LessPositions(2)+1:LessPositions(3)-
1);
    ImageDay =
str2double(Nome(LessPositions(1)+1:LessPositions(2)-1));
    if ~strcmp(PlateBaseNameNuovo, PlateBaseNameVecchio)
        indice = indice+1;
        contatore = 1;
        ListNames{indice, contatore} = PlateBaseNameNuovo;
    else
        contatore = contatore + 1;
    end
    Table.area(indice, contatore) = Area{1};
    Table.perimeter(indice, contatore) = Perimeter{1};
    Table.axisRatio(indice, contatore) = AxisRatio;
    Table.acquisitionDay(indice, contatore) = ImageDay;

    PlateBaseNameVecchio = PlateBaseNameNuovo;
    clear Slashpositions ImageDay PlateBaseNameNuovo

end

if ~isempty(OutputFolder)

% Corregge se in fondo al path non era stato messo lo slash
if isunix()
    Slash = '/';
else
    Slash = '\';
end;

```

```
if ~strcmp(OutputFolder(end), Slash)
    OutputFolder = strcat(OutputFolder,Slash);
end

Nome = dirList(1).name;
LessPositions = strfind(Nome, '_');
PiastraName = Nome(1:LessPositions(1)-1);
ImageDayName = Nome(LessPositions(1)+1:LessPositions(2)-1);
save([OutputFolder PiastraName '_' ImageDayName], 'ListNames',
'Table')
end
```

Bibliografia

[Arcangeli G., 2010] Arcangeli G., Saracino B., Amodio A., "Oncologia medica pratica: Principi di radioterapia", SEU, pp. 369-408, 2010.

[Botchwey E.A., 2004] Botchwey E.A., Pollack S.R., Levine E.M., Johnston E.D., Laurencin C.T., "Quantitative analysis of three-dimensional fluid flow in rotating bioreactors for tissue engineering", J Biomed Mater Res, Vol. 69A, pp. 205-215, 2004.

[Conger S.D., 1983] Conger S.D. and Ziskin M.C., "Growth of Mammalian Multicellular Tumor Spheroids", Cancer Res, Vol. 43, pp. 556-560, 1983.

[Eldridge L., 2012] Eldridge L., "Squamous Cell Carcinoma of the Lungs", About.com Health's Disease and Condition - The New York Times Company, 2012.

[Fogli J., 2005] Fogli J., "Caratterizzazione e applicazioni cliniche di un sistema di Radiografia Computerizzata per immagini nelle procedure del trattamento radioterapico", Elaborato di Tesi di Laurea in Fisica, Università di Trieste, 2005. Relatore: Bertocchi L., Correlatori: Cupardo F., Vidimari R.

[Formenti S.C., 2009] Formenti S.C., Demaria S., "Systemic effects of local radiotherapy", The LANCET Oncology, Vol. 10, N. 7, pp. 718-726, 2009.

[Gasperi A., 1998] Gasperi A., Roncuzzi L., Ricotti L., Lenzi L., Gruppioni R., Sensi A., Zini N., Zoli W. and Amadori D., "Molecular and Biological Features of Two New Human Squamous and Adenocarcinoma of the Lung Cell Lines", Cancer Genet Cytogenet, Vol. 107, pp. 11-20, 1998.

[Gordon Steel G., 2002] Gordon Steel G., "Basic clinical Radiobiology", Arnold, pp. 94-157, 2002.

[Hirschhaeuser F., 2010] Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L.A., "Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again", *Journal of Biotechnology*, Vol. 148, N. 1, pp. 3-15, 2010.

[Horiot J.C., 1997] Horiot J.C., Bontemps P., Van den Bogaert W., Le Fur R., Van den Weijngaert D., Bolla M., Bernier J., Lusinchi A., Stuschke M., Lopez-Torrecilla J., Begg A.C., Pierart M., Collette L., "Accelerated fractionation (AF) compared to conventional fractionation (CF) improves loco-regional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancers: results of the EORTC 22851 randomized trial", *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 44, pp. 111-121, 1997.

[IRST, 2008] IRST, "Cisplatin and Docetaxel followed by short-course of radiotherapy and consolidation chemotherapy with Ciplatin and Docetaxel in inoperable non small cell lung cancer (NSCLC-Stage III)", *Protocollo*, 2008.

[Juergen F., 2007] Juergen F., Reinhard E. and Leoni A. ,Kunz-Schughart L.A., "Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?", *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 83, pp. 849 – 871, Nos. 11 – 12, November/December 2007.

[Kempf H., 2010] Kempf H., Bleicher M., Meyer-Hermann M., "Spatio-temporal cell dynamics in tumour spheroid irradiation", *The European Physical Journal D*, Vol. 60, pp. 177-193, 2010.

[Kunz-Schughart L.A., 2004] Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R., "The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening: The Multicellular Spheroid Model" , *J Biomol Screen*, Vol. 9, 2004.

[Kunz-Schughart L.A., 2007] Kunz-Schughart L.A., Friedrich J., Wolfgang E., Castaneda J., Doss M., Huber E., Ebner R. and Leoni A., "A Reliable Tool to Determine Cell Viability in Complex 3-D Culture: The Acid Phosphatase Assay" , *J Biomol Screen*, pp. 925-937, 2007.

[Kwang-Won R., 2009] Kwang-Won R., Jang J.S., Kim M.S., Sun D.I., Kim B.S., Jung S.L., Kang J.H., Yoo E.J., Yoon S.C., Jang H.S., Chung S.M. and Kim Y.S., "Fractionated stereotactic radiotherapy as reirradiation for locally recurrent head and neck cancer", *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 74, N. 5, pp. 1348–1355, 2009.

[Kwon J.Y., 2010] Kwon J.Y., Seo Y.R., "Genome-wide profiling induced by ionizing radiation (IR) in non-small cell lung cancer (NSCLC) grown as three-dimensional spheroid", *Molecular & Cellular Toxicology*, Vol. 6, N. 3, pp. 229-237, 2010.

[Maghfoor I., 2005] Maghfoor I., "Non-Small-Cell Lung Cancer", National Cancer Institute, 2005.

[Munshi A., 2005] Munshi A., Hobbs M., and Raymond E. M., "Clonogenic Cell Survival Assay", *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 110, pp. 21-28, 2005.

[Pollini D., 2012] Pollini D., "Ricostruzione di Immagini di Broncosfere in Microscopia Ottica con Tecniche di Estensione della Profondità di Fuoco". Elaborato di Tesi Magistrale in Ingegneria Biomedica, Università di Bologna, 2012. Relatore: Bevilacqua A., Correlatori: Piccinini F., Tesei A.

[Santini M.T., 2005] Santini M.T., "Gli sferoidi in radiobiologia", *Bollettino SIRR*, Vol. 2, pp. 5-8, 2005.

[Saunders M., 1999] Saunders M., Dische S., Barrett A., Harvey A., Griffiths G., Parmar M., "Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small cell lung cancer: mature data from the randomised multicentre trial", *Radiotherapy and Oncology*, Vol. 52, N. 2, pp. 137-148, 1999.

[Sutherland R.M., 1988] Sutherland R.M., "Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicellular spheroid model", *Science*, Vol. 240, pp. 177-184, 1988.

[Tesei A., 2009] Tesei A., Zoli W., Arienti C., Storci G., Granato A.M., Pasquinelli G., Valente S., Orrico C., Rosetti M., Vannini I., Dubini A., Dell'Amore D., Amadori D. and Bonafè M., "Isolation of stem/progenitor cells from normal lung tissue of adult humans", *Cell Prolif.*, Vol. 42, pp. 298-308, 2009.

[Whiters H.R., 1988] Whiters H.R., Taylor J.M.G., Maciejewski B., "The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy", *Acta Oncol.*, Vol. 27, N. 2, pp. 131-46, 1988.

[Zhang J., 2008] Zhang J. and Jinglu H., "Image Segmentation Based on 2D Otsu Method with Histogram Analysis", *International Conference on Computer Science and Software Engineering*, Vol. 6, pp. 105-108, 2008.

Ringraziamenti

Scrivere questa pagina è forse uno dei momenti più emozionanti di questi ultimi mesi, non solo perché mi permette di rivivere esperienze che hanno arricchito veramente di molto la mia personalità, ma anche perché segna l'inizio di un percorso che mi auguro di continuare a seguire con la stessa passione che mi ha accompagnato fin dal primo istante.

Colgo l'occasione di ringraziare il mio relatore, il Prof. Alessandro Bevilacqua per la stima che ha mostrato fin dal primo giorno nei miei confronti e per avermi dato la possibilità di collaborare ad un progetto che avrà sicuramente degli ottimi riscontri in futuro. Ogni sua idea o realizzazione mi è sempre servita da stimolo per proseguire nel mio operato con la giusta determinazione e passione che dovrebbe guidare ogni ricerca.

Un ringraziamento particolare va al mio correlatore, l'Ing. Filippo Piccinini, per avermi seguita accuratamente nel corso di questi mesi, per avermi aiutata a maturare professionalmente e soprattutto per la disponibilità e la pazienza che ha sempre mostrato in questo periodo. È stato un piacere collaborare con lui e in particolare sono contenta di aver creato un rapporto di stima e fiducia che va oltre il solo lavoro.

Ringrazio inoltre la Dott.ssa Anna Tesei, per avermi dato la possibilità di lavorare a tale progetto e per aver chiarito con cordialità e disponibilità ogni mio dubbio. Grazie anche alle biologhe del laboratorio Sara Pignatta, Giulia Paganelli e Chiara Arienti, per la disponibilità e l'interesse mostrato nell'aiutarmi, rispondendo in maniera accurata alle mie numerose domande sugli aspetti biologici dell'esperimento.

Ringrazio il Dott. Rolando Polico e la Dott.ssa Anna Sarnelli per la loro completa disponibilità e cordialità mostrata nel rispondere alle molteplici domande sugli aspetti radiobiologici dell'esperimento, fondamentali per la stesura finale di questo elaborato.

Un ringraziamento speciale a Mattia, ai miei genitori e ai miei parenti, per essermi stati sempre vicini in ogni momento, per avermi incoraggiato ad affrontare ogni ostacolo, per avermi sopportato in questi mesi intensi sempre con animo sereno e positivo.

Grazie a Luigi, per aver collaborato con me in questo progetto, per ogni momento trascorso insieme e per la pazienza portata in questi mesi. Ringrazio inoltre tutti i miei amici, quelli di sempre, quelli nuovi, quelli ritrovati che hanno sempre accompagnato con sorriso e spensieratezza ogni giorno trascorso insieme e ogni avventura indimenticabile.