

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

**STUDIO DI CLASSI DI SFEROIDI MULTICELLULARI
DI CARCINOMA POLMONARE EPIDERMOIDALE
IN RADIOBIOLOGIA**

Tesi in

Bioimmagini e Visione LM

Relatore

Prof. Alessandro Bevilacqua

Presentata da

Luigi Caiffa

Correlatori

Ing. Filippo Piccinini

Dott.ssa Anna Tesei

Dott. Rolando Polico

Sessione III

Anno Accademico 2011-2012

Keywords

Image processing

Automatic segmentation

Light microscopy

Cancer treatment

Oncology

Indice

ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	8
CAPITOLO 1	
SFEROIDI IN RADIOBIOLOGIA.....	14
1.1 Cellule CAEP.....	15
1.2 Produzione di sferoidi multicellulari tumorali.....	17
1.3 Trattamenti post-produzione.....	23
1.4 Trattamenti radioterapici.....	27
1.4.1 Danni provocati ai tessuti dalla radioterapia.....	29
1.4.2 Ipofrazionamento accelerato.....	32
1.4.3 Radioterapia conformazionale.....	35
1.4.4 Radioterapia a modulazione d'intensità.....	36
1.4.5 Strumenti per l'irradiazione.....	38
CAPITOLO 2	
GENERAZIONE E ACQUISIZIONE DATI.....	48
2.1 Set-up strumenti utilizzati.....	49
2.2 Motivazioni.....	55
2.3 Correlazioni attese.....	60
2.4 Preparazione e irradiazione piastre.....	61
2.5 Acquisizione immagini.....	64
2.6 Salvataggio e archiviazione dati.....	69
2.7 Problemi incontrati.....	73
CAPITOLO 3	
TASSONOMIA SFEROIDI.....	76
3.1 Integrità dello sferoide.....	77
3.2 Perimetro globale.....	78
3.3 Forma.....	79
3.4 Bordo locale.....	81

3.5 Tassonomia livello II	84
3.6 Possibili correlazioni biologiche.....	84
3.7 Albero delle classi.....	86
3.8 Tassonomia semplificata.....	89

CAPITOLO 4

IMAGE PROCESSING.....	92
4.1 Segmentazione grezza.....	93
4.2 Segmentazione accurata.....	95
4.2.1 Corona di bordo.....	95
4.2.2 Direzioni d'interesse	97
4.2.3 Stima dei raggi	98
4.2.4 Sferoidi secondari.....	100
4.2.5 Protuberanze.....	101
4.2.6 Detriti	103
4.3 Salvataggio delle maschere.....	105

CAPITOLO 5

IMAGE ANALYSIS	109
5.1 Estrazione di indici generali	111
5.2 Estrazione di indici specifici.....	111
5.2.1 Forma	111
5.2.2 Bordo.....	115
5.2.3 Area	116

CAPITOLO 6

ALGORITMO DI CLUSTERING.....	117
6.1 Descrizione generale classificatori	117
6.2 Clustering.....	119
6.2.1 Criteri di clustering	120
6.2.2 Dati di ingresso	121
6.2.3 I clusters	122
6.2.4 Suddivisione in clusters.....	123
6.3 Fuzzy Clustering and Data Analysis Toolbox	126
6.3.1 Algoritmi K-means e K-medoid.....	126
6.3.2 Algoritmo fuzzy C-means	127
6.3.3 Algoritmo Gustafson-Kessel.....	130
6.4 Validazione della classificazione.....	132

CAPITOLO 7	
ANALISI EVOLUZIONE TEMPORALE.....	134
7.1 Classi di evoluzioni temporali	135
7.2 Conclusioni generali sull'analisi visiva	144
CAPITOLO 8	
ANALISI AUTOMATICA PER VALIDAZIONE ANALISI VISIVA.....	146
8.1 Rapporto area 11° e 7° giorno (piastre A000, D651)	147
8.2 Quantità di detriti presenti (piastre A000, D651)	149
8.3 Rapporto area 11° e 7° giorno (piastre D655, C755).....	150
8.4 Quantità di detriti presenti (piastre D655, C755)	152
8.5 Valore assoluto di area al giorno 7 (piastre D655, C755)	154
CAPITOLO 9	
ANALISI AUTOMATICA A SCOPO PREDITTIVO.....	156
9.1 Analisi dell'area iniziale (piastre D655 e C755)	157
9.1.1 Confronto classificazione manuale e automatica.....	159
9.1.2 Conclusioni	162
9.2 Analisi dell'area iniziale (piastre A000 e D651)	163
9.2.1 Conclusioni	165
CAPITOLO 10	
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....	166
BIBLIOGRAFIA.....	169

Abstract

Il tumore del polmone rappresenta la prima causa di morte nei paesi industrializzati. Le possibilità di trapianto ed intervento chirurgico risultano molto limitate pertanto lo standard di cura risulta essere la radioterapia, a volte abbinata alla chemioterapia. Sebbene trattando radioterapeuticamente il tumore si ottengano ottimi risultati, attualmente non esistono solide linee guida per la personalizzazione del trattamento al paziente.

Il poter eseguire in laboratorio test radioterapici su un elevato numero di campioni risulterebbe un valido approccio sperimentale d'indagine, ma la carenza di materiale su cui poter condurre gli esperimenti limita questa possibilità. Tipicamente, per ovviare al problema vengono utilizzati sferoidi multicellulari tridimensionali creati in laboratorio partendo da singole cellule del tumore in esame. In particolare, l'efficacia del trattamento viene tipicamente correlata alla riduzione volumetrica media stimata utilizzando un set di sferoidi teoricamente identici.

In questo studio vengono messe in discussione la validità delle affermazioni tipicamente sostenute attraverso l'analisi di volumi medi. Abbiamo utilizzato un set circa 100 sferoidi creati in laboratorio partendo da singole cellule di carcinoma epidermoidale polmonare e trattati secondo sette differenti modalità di trattamento radioterapico (variando intensità di radiazione e numero di frazioni). In una prima fase abbiamo analizzato le singole immagini, acquisite al microscopio ottico circa ogni 48 ore, per identificare *features* morfometriche significative da affiancare all'analisi volumetrica. Sulla base dell'andamento temporale di queste *features* abbiamo suddiviso gli sferoidi in sottoclassi con evoluzioni completamente differenti che fanno supporre un differente "stato" biologico. Attraverso algoritmi

di estrazione di *features* e classificazione e analizzando riduzione volumetrica, grado di frastagliatura del bordo e quantità di cellule liberate nel terreno di coltura abbiamo definito un protocollo per identificare in maniera automatica le sottopopolazioni di sferoidi. Infine, abbiamo ricercato con successo alcune *features* morfometriche in grado di predire, semplicemente analizzando immagini acquisite nei giorni seguenti all'ultimo trattamento, lo "stato di salute" del tumore a medio/lungo periodo.

Gli algoritmi realizzati e le *features* identificate se opportunamente validate potrebbero risultare un importante strumento non invasivo di ausilio per il radioterapista per valutare nel breve periodo gli effetti a lungo periodo del trattamento e quindi poter modificare parametri di cura al fine di raggiungere uno stato desiderato del tumore.

Introduzione

Il tumore del polmone rappresenta la prima causa di morte nei paesi industrializzati [AIRC 2012]. Per la precisione, a livello mondiale nel 2008, è stata negli uomini la prima e per le donne la seconda principale causa di morte [Jemal A. 2011]. Confrontando i dati relativi al tumore del polmone con le altre neoplasie, si scopre che rappresenta il 13% (1,6 milioni) del totale dei tumori diagnosticati e il 18% (1,4 milioni) delle morti per tumore (dato relativo all'anno 2008 [Jemal A. 2011]). In particolare, il 95% delle neoplasie polmonari maligne è rappresentato dal carcinoma del polmone [Horner M.J. 2009]. In passato tale neoplasia non fu considerata, almeno fino al 1800, un'entità patologica a sé stante. Con la crescita esponenziale del numero di casi aumentò lo studio e la ricerca sulla patologia fino alla scoperta della forte correlazione tra carcinoma polmonare e tabagismo, individuata dal Fritz Lickint nel 1929 [Witschi H. 2001]. Nel corso degli anni differenti tipologie di trattamento sono state applicate per cercare di curare questa neoplasia. Il primo intervento riuscito di pneumectomia per carcinoma del polmone è stato effettuato nel 1933. Negli anni quaranta fu introdotta la radioterapia palliativa, mentre la radioterapia radicale (ad alti dosaggi) cominciò ad essere presa in considerazione dagli anni cinquanta in poi, in particolare come presidio terapeutico nei soggetti con carcinoma del polmone limitato ma inadatti all'intervento chirurgico. Nel 1997 la radioterapia continua accelerata iperfrazionata (CHART) soppiantò la convenzionale radioterapia radicale per la cura delle neoplasie polmonari. Ancora oggi, la radioterapia risulta essere lo *standard* di cura per questo tipo di tumore. Questa usualmente è coadiuvata da trattamenti chemioterapici atti a prevenire la formazione di metastasi, mentre i trattamenti radioterapici agiscono a livello locale, cercando di interrompere la genesi della malattia. In particolare, trattamenti radioterapici ipofrazionati accelerati, consentono di curare il paziente in un tempo

minore rispetto agli *standard* iperfrazionati, permettendo una più breve ospedalizzazione del paziente, con conseguente riduzione dei costi.

Sebbene sia stato dimostrato che tramite queste terapie è possibile curare il carcinoma del polmone, non è ancora ben chiaro come esse agiscano a livello macroscopico per contrastare la malattia. Difatti, al giorno d'oggi non si conoscono in modo completo le conseguenze delle differenti combinazioni di parametri dei trattamenti radioterapici, quali intensità di radiazione e numero di frazionamenti. Di conseguenza una delle maggiori difficoltà nell'intervenire efficacemente per curare il paziente consiste nel definire la miglior combinazione di parametri per il caso specifico in esame. Attualmente, infatti, non esiste una procedura per personalizzare la terapia sullo specifico paziente in cura.

Eseguire test radioterapici su un elevato numero di campioni di carcinoma polmonare, variando le differenti combinazioni dei parametri, risulterebbe essere un valido approccio sperimentale per indagare a fondo l'efficacia dei differenti possibili trattamenti. Questi test dovrebbero portare al monitoraggio dello "status" clinico-biologico del tumore nel tempo, al fine di valutare quale combinazione di parametri di trattamento porta alla maggior efficacia (intesa come numero di cellule precedentemente attive indotte a morte). Il limite principale di questi test biologici consiste nella carenza di materiale su cui poter condurre gli esperimenti: è stato ampiamente dimostrato che colonie cellulari monostrate non rappresentano un valido modello per poter predire gli effetti che avrebbe lo stesso trattamento *in-vivo* [Hirschhaeuser F. 2010]. Una risposta al problema può essere data dall'utilizzo di sferoidi multicellulari tridimensionali di grandi dimensioni (anche fino a 2 mm), creati espandendo eventualmente anche cellule prelevate direttamente dal tumore del paziente in cura.

In questo lavoro si vuole indagare a fondo la possibilità di utilizzare sferoidi tumorali come valido modello *in-vitro* per stimare gli effetti che gli stessi parametri di cura radioterapica porterebbero all'utilizzo *in-vivo*. In particolare, si è voluto creare un solido protocollo di trattamento degli sferoidi, acquisizione di immagini ed analisi comparativa dei vari trattamenti subiti dagli sferoidi, che rappresenti le fondamenta di un futuro strumento di analisi. Questo sarebbe in grado di predire, partendo da informazioni visive estratte nei primi giorni successivi al trattamento degli sferoidi, effettuato secondo parametri diversi (in particolare variando intensità totale di radiazione e numero di frazioni), quale trattamento avrà *in-vivo* una maggior efficacia. Questo *tool* potrebbe essere un valido strumento per consentire all'Oncologo di personalizzare la cura radioterapica sul paziente al fine di massimizzarne l'efficacia.

Per questo esperimento sono stati utilizzati sferoidi multicellulari creati a partire da cellule CAEP (ovvero cellule di CArcinoma EPidermoidale). In particolare, questi sferoidi multicellulari, dopo essere stati sottoposti a tecniche radioterapiche *standard*, sono stati osservati nel tempo, tramite l'acquisizione di immagini, al fine di creare un *report* fotografico. Sono state identificate diverse caratteristiche visivo-morfologiche, considerate auspicabilmente correlate a stati biologici d'interesse, ed è stato studiato il loro andamento temporale. Lo scopo è valutare l'evoluzione dello sferoide in esame come se esistesse una transizione di "classi", definite in base a parametri morfometrici, in cui può essere descritto e riassunto lo stato biologico dello stesso sferoide. Lo studio della transizione delle classi risulta essere il cuore dell'esperimento: ci si aspetta che differenti classi iniziali determinino differenti "stati" finali dello sferoide. La validazione di questo approccio fornirebbe uno strumento in grado di predire lo stato finale dello sferoide, analizzando semplicemente la sequenza delle classi dopo i primi giorni di trattamento. Questo consentirebbe quindi di predire gli effetti a lungo termine della cura, valutando semplicemente gli effetti a breve termine. Eseguendo successivamente una serie di test, e variando i parametri del trattamento radioterapico, si riuscirebbe a valutare quale combinazione risulta essere più efficiente nel lungo periodo.

Tramite tecniche di *imaging* sono state valutate le "condizioni" morfometriche degli sferoidi sottoposti a differenti parametri di cura. Le "condizioni" morfometriche di uno sferoide corrispondono a quanto è possibile percepire sul suo stato biologico tramite la semplice osservazione mediante un microscopio a luce trasmessa. Si potrebbe dunque parlare di caratteristiche riguardanti la forma, l'area, il perimetro, etc. A tal fine sono stati eseguiti alcuni esperimenti preliminari per valutare l'efficacia di questi metodi di *imaging* per estrarre ed analizzare alcune caratteristiche dello sferoide. Partendo dunque dalle immagini provenienti dal microscopio, si procede all'estrazione automatica delle caratteristiche morfometriche degli sferoidi tramite algoritmi di segmentazione. In seconda istanza, sulla base delle caratteristiche morfometriche estratte ed in maniera completamente automatica, gli sferoidi sono assegnati ad una classe identificativa. Alla fine del processo si otterranno delle sequenze temporali di classi rappresentative dell'evoluzione del tumore a seguito di differenti trattamenti radioterapici. Per ciascun parametro del protocollo radioterapico, la sequenza di classi di sferoidi differenti sono poi state confrontate al fine di verificare la presenza di sequenze ricorrenti. In questo modo potrebbe esser compresa la capacità di un determinato parametro nell'influenzare l'efficienza della terapia.

Di seguito è riportato l'elenco rappresentativo dei Capitoli presenti in quest'elaborato con relativo riassunto dei principali argomenti trattati.

- *Capitolo 1 Sferoidi in radiobiologia:* nella prima parte vengono descritti la tipologia di cellule utilizzate (CAEP) e il protocollo di formazione degli sferoidi tridimensionali a partire da queste cellule. Nella seconda parte è presentato il protocollo radioterapico eseguito per trattare questi tumori *in-vitro*, atto ad emulare il più fedelmente possibile il caso reale.
- *Capitolo 2 Generazione e acquisizione dati:* vengono elencati, spiegandone il funzionamento, la strumentazione utilizzata durante l'esperimento e il protocollo impiegato per il salvataggio e per l'archiviazione delle immagini acquisite. Vengono inoltre fornite le motivazioni che hanno motivato la ricerca in questo settore e le possibili correlazioni attese dall'esperimento.
- *Capitolo 3 Tassonomia sferoidi:* viene fornita una classificazione gerarchica delle caratteristiche morfometriche degli sferoidi atta a rappresentare lo "stato" di uno sferoide mediante una classe rappresentativa. Due sferoidi appartenenti ad una classe saranno tra loro più simili, a livello visivo, rispetto a due sferoidi appartenenti a classi distinte.
- *Capitolo 4 Image processing:* viene descritto il funzionamento di alcuni algoritmi creati per l'esperimento specifico in esame. Questi, ricevendo in ingresso l'immagine grezza proveniente dal microscopio, sono in grado di creare una maschera binaria rappresentativa degli aspetti morfometrici dello sferoide.
- *Capitolo 5 Image analysis:* viene chiarito il funzionamento degli algoritmi in grado, ricevendo in ingresso la maschera binaria individuata al passo precedente, di fornire in uscita degli indici numerici. Questi indici hanno lo scopo di caratterizzare quantitativamente alcuni aspetti morfometrici scelti per lo sferoide.
- *Capitolo 6 Clustering:* viene descritto il funzionamento degli algoritmi di *clustering*. Questi rappresentano un insieme di tecniche volte alla selezione e al raggruppamento di elementi omogenei in un insieme di dati. La similarità o dissimilarità tra due elementi è valutata all'interno di uno spazio multidimensionale appositamente creato, e quantificata in termini di distanza mediante metriche specifiche.
- *Capitolo 7 Analisi evoluzione temporale:* vengono identificate le possibili *features* morfologiche significative per caratterizzare le immagini dei vari sferoidi attraverso l'analisi visiva e il confronto delle loro evoluzioni temporali; quest'indagine ha lo scopo di individuare per ogni trattamento come le *features* siano legate al tempo e agli stati precedenti. In particolare si è cercato di identificare tra le diverse sequenze, classi di evoluzioni temporali simili cercando di definire quali singole *features* influivano

particolarmente il sistema visivo umano nel classificare le evoluzioni temporali come simili o come diverse.

- *Capitolo 8 Analisi automatica per validazione analisi visiva:* dove di cerca di confermare, attraverso degli algoritmi, l'effettiva capacità di una determinata *feature* di suddividere il campione in diverse classi d'appartenenza, validando così il lavoro svolto nel capitolo precedente attraverso l'analisi visiva.
- *Capitolo 9 Analisi automatica a scopo predittivo:* a partire dalle caratteristiche identificate per mezzo dell'analisi visiva, validate per mezzo dell'analisi automatica, si è in grado di utilizzare nuovamente l'analisi automatica su singole *feature* o gruppi di *features* al fine di identificare automaticamente la classe dello sferoide e quindi prevedere il suo comportamento nel tempo. Questo risulta essere un importante risultato in quanto fornirebbe al Radioterapista un valido ausilio per predire in maniera automatica lo stato del tumore ad esempio dopo 10 giorni dal trattamento e eventualmente correggere la terapia, semplicemente elaborando immagini acquisite dopo 3 giorni.
- *Capitolo 10 Conclusioni e sviluppi futuri:* vengono trattate le conclusioni dell'esperimento, risultati operativi raggiunti e potenziali sviluppi futuri a partire da tali risultati.

Il lavoro sviluppato in questa Tesi è stato effettuato all'interno del Computer Vision Group (CVG), Dipartimento di Elettronica Informatica e Sistemistica, Università di Bologna, diretto dal Prof. Alessandro Bevilacqua, nel contesto della collaborazione con l'Istituto Romagnolo per lo Studio e la cura dei Tumori (IRCCS-IRST) con sede a Meldola (FC), ed in particolare con:

- Laboratorio di Bioscienze, diretto dal Dott. Wainer Zoli.
- Laboratorio di Radiobiologia, diretto dalla Dott.ssa Anna Tesei.
- Unità Operativa di Radioterapia, diretta dal Dott. Polico.

Il lavoro di tesi ha avuto la durata complessiva di 7 mesi che sono stati impiegati per raggiungere i seguenti obiettivi:

- studio degli esperimenti precedentemente effettuati nell'ambito del progetto STAMINAL (acronimo per *STem cells through support for Automatic analysis of the MICroscopic images in pre-clINicAL therapy*) (1 mese);
- studio e definizione del protocollo dell'esperimento e acquisizione delle immagini (~3800 immagini) (1 mese);

- definizione delle caratteristiche morfologiche di interesse e sviluppo degli algoritmi di estrazione automatica delle caratteristiche e classificazione gli sferoidi (2 mesi);
- scrittura e revisione della tesi (3 mesi).

Capitolo 1

Sferoidi in radiobiologia

Uno dei principali limiti sullo studio dei tumori è la mancanza di disponibilità di grandi quantità di materiale con caratteristiche simili al tumore dei pazienti. Infatti, se si avesse questo materiale, sarebbe possibile testare il funzionamento di differenti parametri e trattamenti mediante analisi non invasive per il paziente. Una risposta a questo problema può essere fornita dalle colture di cellule tumorali, ad esempio sferoidi multicellulari di grandi dimensioni (anche 2 mm di diametro) creati in laboratorio partendo da linee stabilizzate di cellule tumorali [Ingram M. 1997]. Gli sferoidi multicellulari tumorali rappresentano un ottimo modello sperimentale su cui poter quindi studiare e testare *in-vitro* vari trattamenti terapeutici. Possedendo infatti una struttura tridimensionale, sono in grado di imitare in maniera migliore, rispetto a *layer* bidimensionali, le condizioni delle cellule tumorali reali, che interagiscono con l'ambiente circostante in maniera differenziata al variare della posizione all'interno del tumore [Sutherland R.M. 1988]. Un aspetto di fondamentale importanza risulta essere la quantità di ossigeno a disposizione per le cellule tumorali facenti parte dello sferoide. Si può facilmente dedurre che questa decresce all'aumentare della distanza dal bordo esterno dello sferoide. È stato dimostrato infatti che le cellule ipossiche risultano resistenti alle radiazioni [Debessy C. 2000].

In questo Capitolo sono descritte le linee cellulari tumorali che sono state utilizzate per creare gli sferoidi multicellulari utilizzati in questo lavoro. In particolare, saranno discusse le caratteristiche generali di questi aggregati multicellulari, con

attenzione specifica agli aspetti strutturali e alla dinamica della crescita temporale. Successivamente si passerà ad analizzare le caratteristiche dei principali trattamenti utilizzati in radioterapia per contrastare le tipologie tumorali d'interesse. Lo scopo di questo Capitolo non è il fornire una descrizione dettagliata, ma un'introduzione alle tecniche in uso facendo riferimento ai maggiori effetti collaterali che queste cure comportano.

1.1 Cellule CAEP

Tra i progetti di maggior rilievo del Laboratorio di Farmacologia Preclinica dell'IRCCS-IRST di Meldola (FC), vi è lo studio morfologico e funzionale delle colture tridimensionali di tumore del polmone. Questi aggregati multicellulari a forma sferica vengono creati in laboratorio a partire da una sospensione di cellule di una linea stabilizzata di tumore del polmone di tipo squamoso. L'isolamento di questa linea stabilizzata è stato effettuato all'interno dei laboratori dell'IRST a partire da una lesione metastatica cutanea di un uomo di 68 anni di razza caucasica, mediante toracotomia. Tali cellule furono denominate CAEP, partendo dalle iniziali delle parole CArcinoma EPidermoidale [Gasperi-Campani A. 1998].

Il carcinoma polmonare viene suddiviso dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) in due differenti classi:

1. SCLC (*small cell lung cancer* o carcinoma polmonare a piccole cellule) caratterizzato da cellule di piccola taglia che frequentemente sono accompagnate da metastasi diffuse. Tumore estremamente maligno con elevatissima mortalità.
2. NSCLC (*non small cell lung cancer* o carcinoma polmonare non a piccole cellule) è causa di circa 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 1.1).

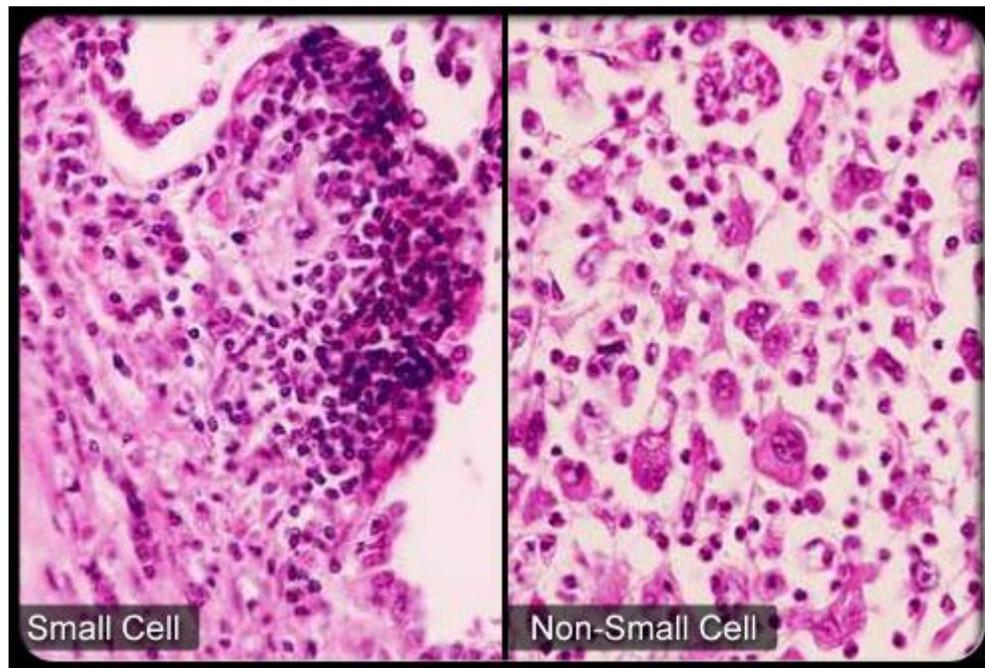


Figura 1.1: confronto istologico tra Carcinoma Polmonare a Piccole Cellule (SCLC) e Carcinoma Polmonare Non a Piccole Cellule (NSCLC) – Tratta da www.emedicinehealth.com.

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 1.2).

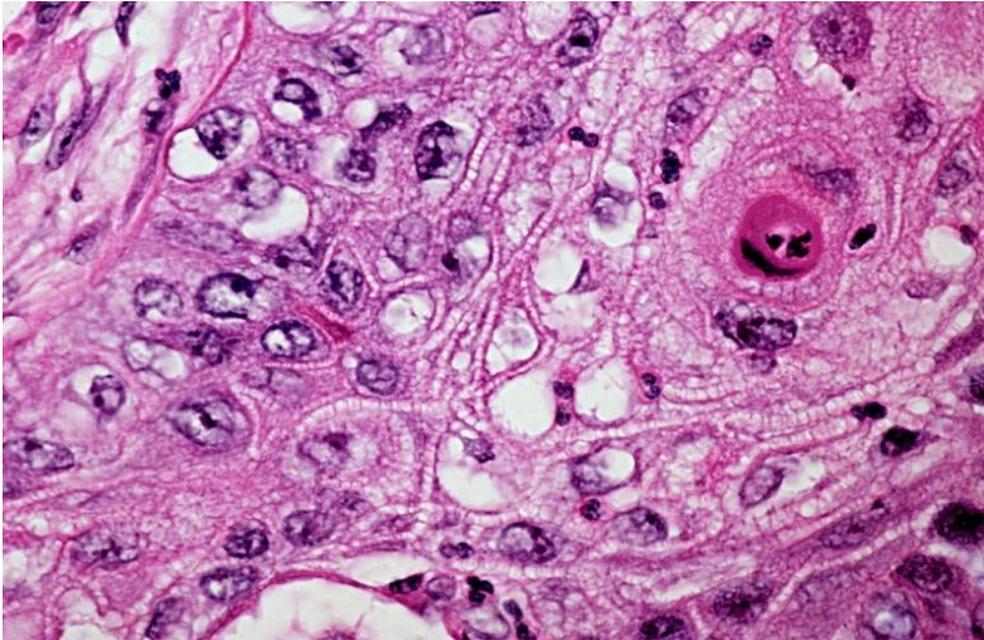


Figura 1.2: sezione istologica di un carcinoma polmonare a cellule squamose - Tratta da Wikipedia.

1.2 Produzione di sferoidi multicellulari tumorali

La linea cellulare CAEP ha mostrato una buona propensione alla formazione di sferoidi di dimensioni considerevoli (fino a 2 mm di diametro).

Per permettere la proliferazione delle cellule *in-vitro* è necessario che le condizioni risultino il più simile possibile a quelle *in-vivo*. Pertanto, risultano fondamentali, fattori quali la temperatura e la composizione del terreno di coltura. A questo scopo le colture cellulari di CAEP vengono mantenute in incubatore a 37°C di temperatura e con una percentuale di CO₂ del 5%. Questi valori sono stati scelti 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 una sospensione monocellulare: il bioreattore (Figura 1.3). 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). Per ottenere questo processo, le cellule sono poste in apposite camere di coltura, vengono fatte ruotare, generando una forte accelerazione centripeta che favorisce l'adesione cellulare tra diverse cellule inizialmente distribuite nel liquido e 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 di assenza di gravità nell'atmosfera terrestre [Botchwey E.A. 2004]. Il bioreattore è sostanzialmente una camera incubatore composta da tre parti:

1. camera di 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 1.3: immagine di un bioreattore – Tratta da www.Synthecon.com.

Per poter creare sferoidi dalla linea cellulare CAEP, le cellule vengono fatte proliferare in fiasca fino al raggiungimento di una condizione di semiconfluenza. 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 sferoidi multicellulari mediante adesione delle cellule madri alle cellule figlie, nate durante il processo di mitosi.

Le fasi che determinano la creazione di sferoidi tumorali multicellulari possono essere riassunte nei seguenti processi:

1. il primo passo consiste nell'attivazione della membrana della camera di coltura, in modo da impedirne l'adesione delle cellule presenti nella sospensione di inoculo iniziale. Per l'attivazione si aggiungono 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;
2. 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 1.4);

3. nel frattempo si è provveduto a staccare le cellule dalle fiasche di coltura e a porle in una provetta sospese nel loro terreno di coltura. Viene effettuata una centrifugazione per rimuovere la tripsina dal terreno di coltura. La centrifugazione infatti consente 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;
4. si prelevano le cellule dal fondo della provetta mediante l'utilizzo di una pipetta automatica con puntale sterile. Si effettua una conta per avere una densità di inoculo ottimale (circa un milione per millilitro, valore stimato sperimentalmente dai biologi dell'IRST per ottenere un numero significativo di sferoidi) e successivamente si introducono nelle rispettive camere di coltura del bioreattore;
5. si aggiunge 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;
6. 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'area residua non fuoriesca completamente, entrando nella siringa vuota posta nel rubinetto d'aspirazione;
7. vengono serrati i rubinetti dei contenitori per evitare la fuoriuscita del materiale e si introducono all'interno degli appositi alloggiamenti del bioreattore;
8. 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;
9. 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.

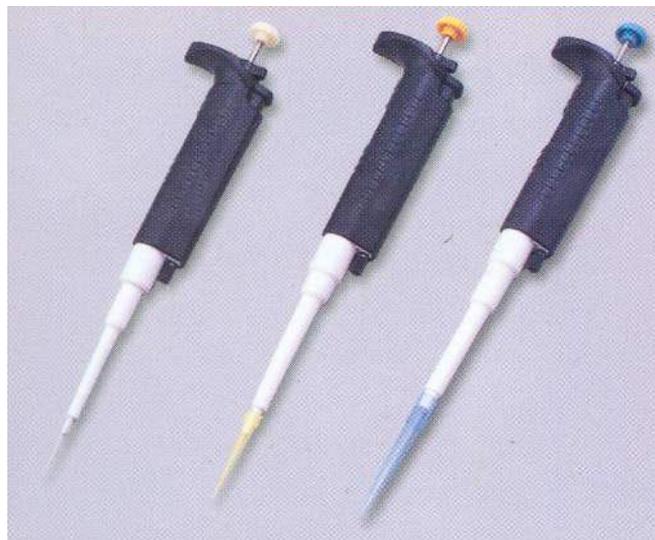


Figura 1.4: pipette.

Il terreno di coltura nelle camere del bioreattore viene sostituito ogni 48 ore con terreno fresco, in modo da permettere alle cellule di avere il nutrimento necessario per il corretto sviluppo cellulare.

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. 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 1.5b) partendo da una sospensione di cellule della stessa linea cellulare (Figura 1.5a). Nel periodo successivo (circa 2-5 giorni), gli sferoidi diventano strutture sferiche composte da numerose strutture tridimensionali compattate in cui è difficile distinguere le singole cellule (Figura 1.5c).

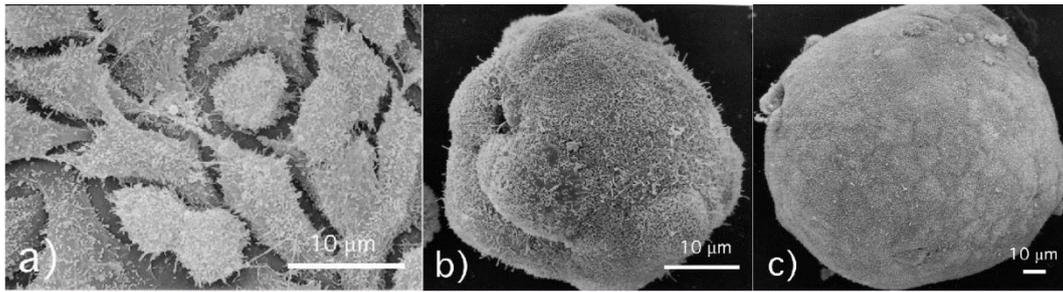


Figura 1.5: microscopia elettronica a scansione di cellule MG-63 (osteosarcoma umano) cresciute in monostrato per 24 ore (a), e come sferoidi di 72 ore (b) e di cinque giorni (c) – Tratta da [Santini M.T. 2005].

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 R.M. 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 1.6).

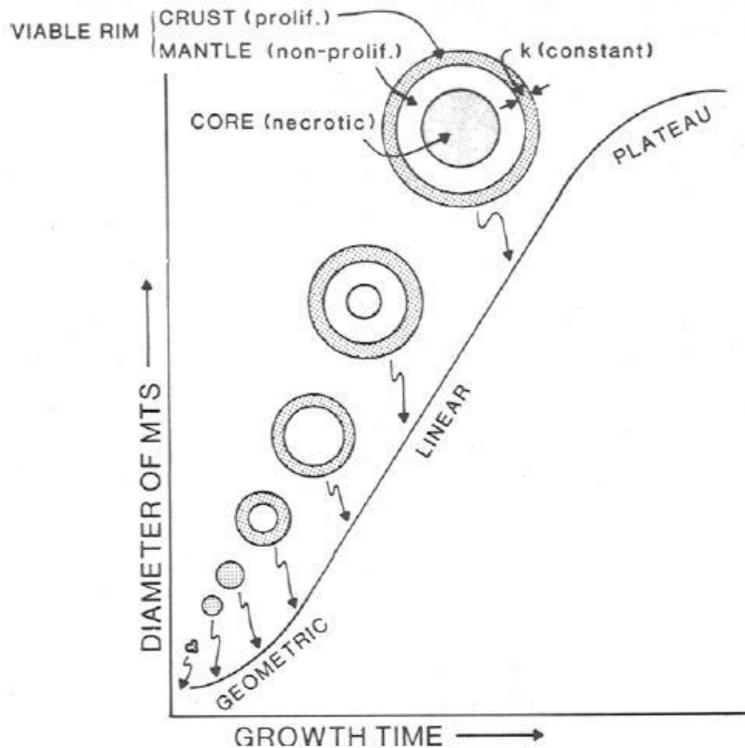


Figura 1.6: curva rappresentante le fasi di crescita di MTS (*Multicellular Tumor Spheroids*) *prolif.*, proliferativo; *non-prolif.*, non proliferativo – Tratta da [Conger S.D. 1983].

Da tali studi emerge, quindi, che gli sferoidi multicellulari tumorali 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.

1.3 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 1.7) che verrà successivamente posto in uno dei 96 pozzetti di una piastra *multi-well* (Figura 1.8).

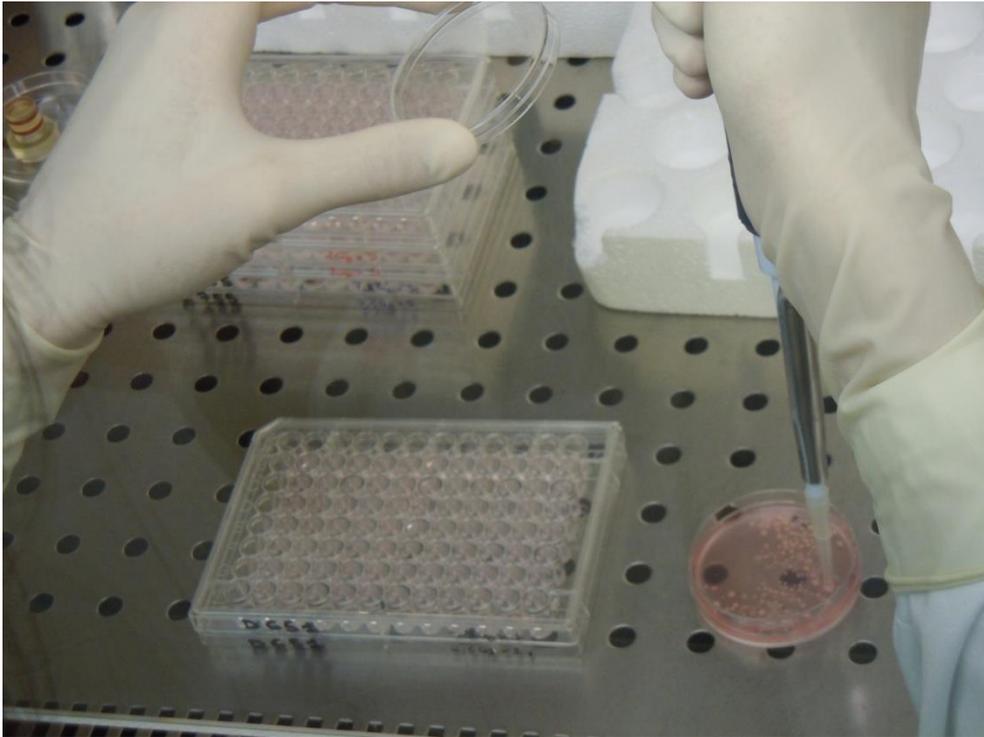


Figura 1.7: prelievo degli sferoidi dal contenitore del bioreattore mediante pipetta automatica con puntale sterile.

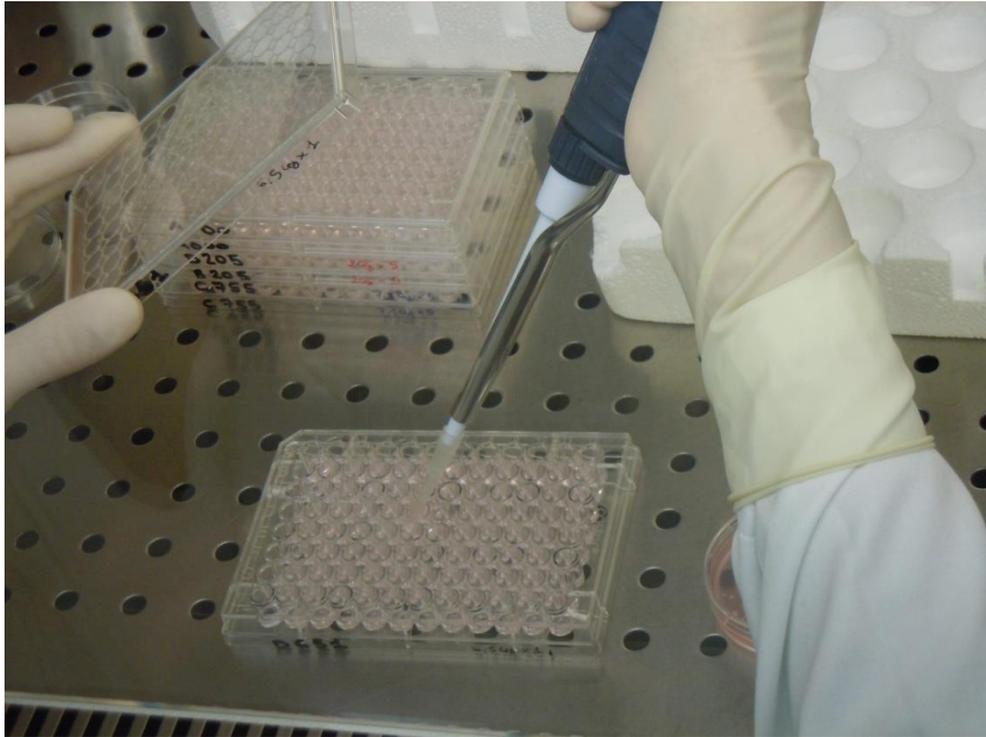


Figura 1.8: posizionamento degli sferoidi nei rispettivi pozzetti di una piastra *multi-well* da 96.

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 (50% del volume), sostituendolo con altrettanta quantità di terreno nuovo. Questo per evitare di aspirare con la pipetta automatica anche del materiale cellulare. In particolare, tipicamente si procede con la sostituzione del terreno di coltura con una cadenza di 5 volte a settimana (tutti i giorni esclusi sabato e domenica) 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. Vediamo alcuni dettagli sul 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

[Friedrich J. 2007]. Se le cellule sono vitali e sono di tipo tumorale, si riscontra una 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 disagregazione 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-streptomicina) 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-streptomicina. 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].

1.4 Trattamenti radioterapici

Facendo riferimento al protocollo ufficiale del centro IRCCS-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 IRCCS-IRST il protocollo seguito nel caso di NSCLC non operabile è un trattamento sequenziale concomitante descritto in seguito.

1. 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. 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. 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.

1.4.1 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 1.9).

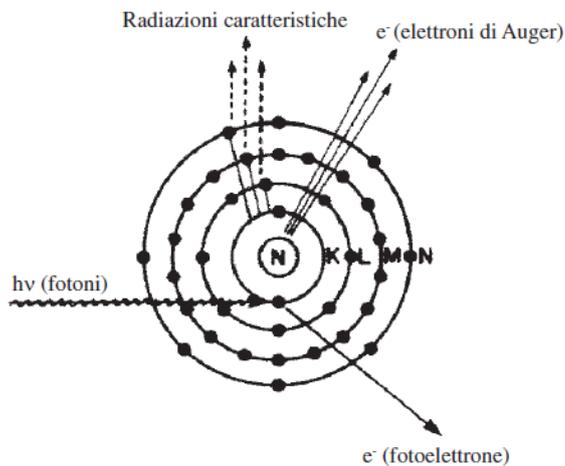


Figura 1.9: rappresentazione schematica dell'effetto fotoelettrico – Tratta da [Arcangeli G. 2010].

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 1.10).

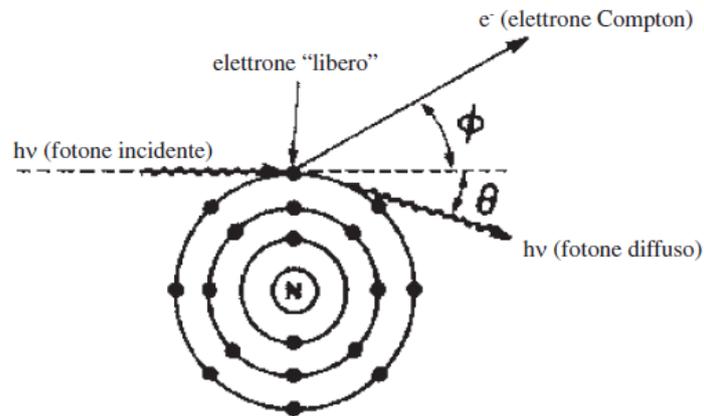


Figura 1.10: rappresentazione schematica dell'effetto Compton – Tratta da [Arcangeli G. 2010].

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 1.11).

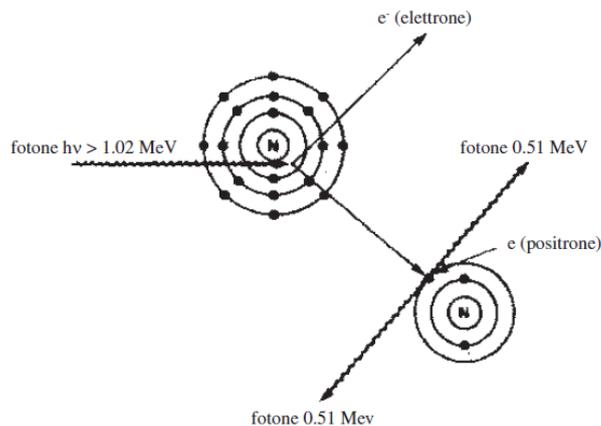


Figura 1.11: rappresentazione schematica dell'effetto di coppia – Tratta da [Arcangeli G. 2010].

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.

1.4.2 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 1.12).

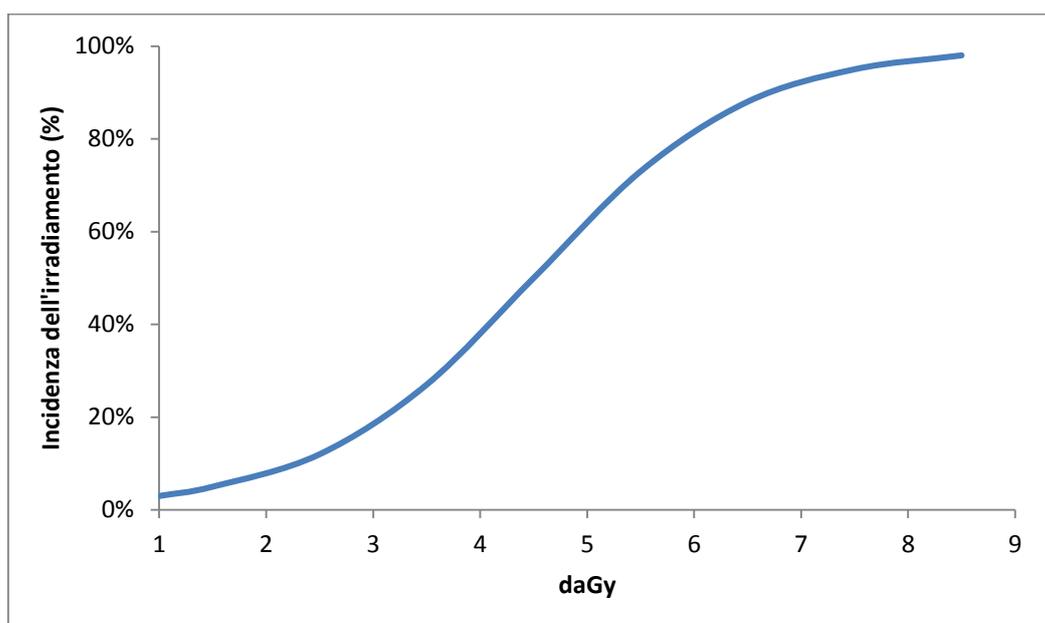


Figura 1.12: curva sigmoidale dose-risposta.

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.

1.4.3 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.

1.4.4 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 1.13. La distribuzione di dose totale prevista nel tumore per questo tipo di trattamento è di 25-40 Gy [IRST 2008] e attraverso l'IMRT siamo riusciti ad ottenere una distribuzione di questo tipo.

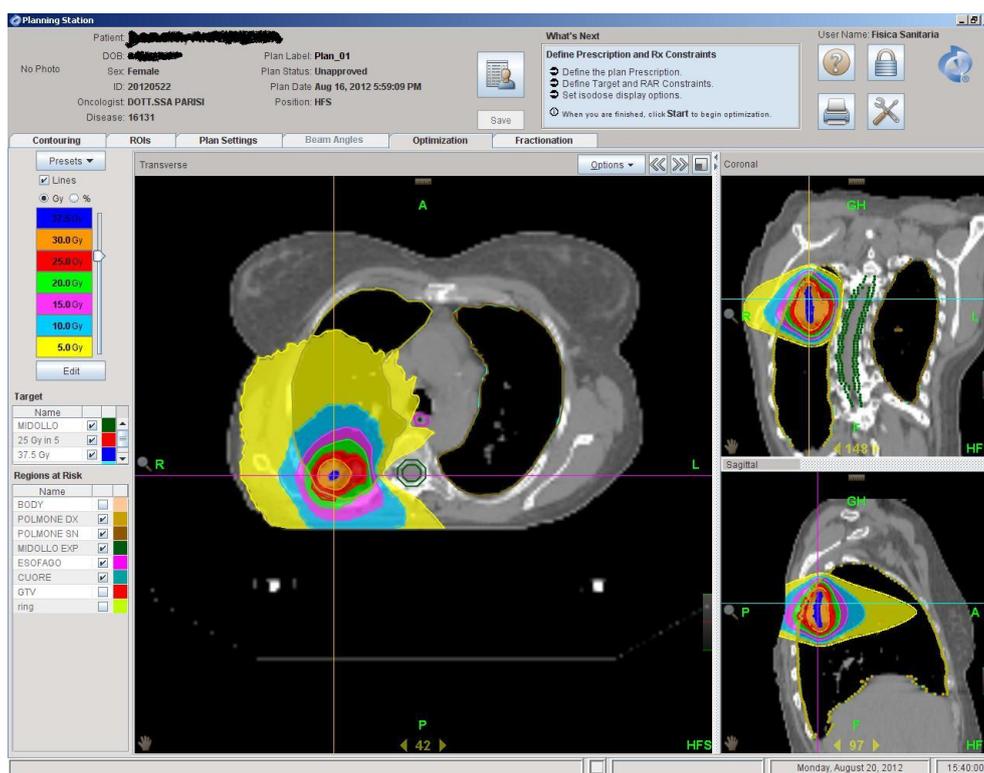


Figura 1.13: print screen di un piano di trattamento per tumore al polmone.

Con i parametri così impostati, il punto centrale del tumore riceverà alla fine delle sedute un irradiamento complessivo pari a 37,5 Gy molto vicino al limite superiore utilizzato in questa tipologia di cura. I tessuti circostanti riceveranno una dose che andrà in modo graduale ad attenuarsi. In particolare si può notare che, attraverso l'IMRT, è stato possibile preservare completamente la struttura seriale del midollo spinale semplicemente assegnando un peso adeguato nella funzione costo. Buoni risultati con un trattamento radioterapico di questo tipo sono stati ottenuti in letteratura da Kwang-Won Roh e altri che hanno trattato un campione di 36 pazienti affetti da tumore alla testa o al collo con un trattamento radioterapico nel range 18-40 Gy in 3-5 frazioni per 3-5 giorni consecutivi. I risultati sono stati che il 42,9% dei tumori hanno dato una risposta completa, il 37,1% hanno dato una risposta parziale, l'8,6% si sono mantenuti stabili e l'11,4% hanno mostrato una progressione del tumore [Roh K.W. 2009].

1.4.5 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 1.14), è stato progettato *ad hoc* per gli esperimenti di radiobiologia dal Dott. Rolando Polico, Direttore dell' U.O. di Radioterapia dell'IRCCS-IRST di Meldola.

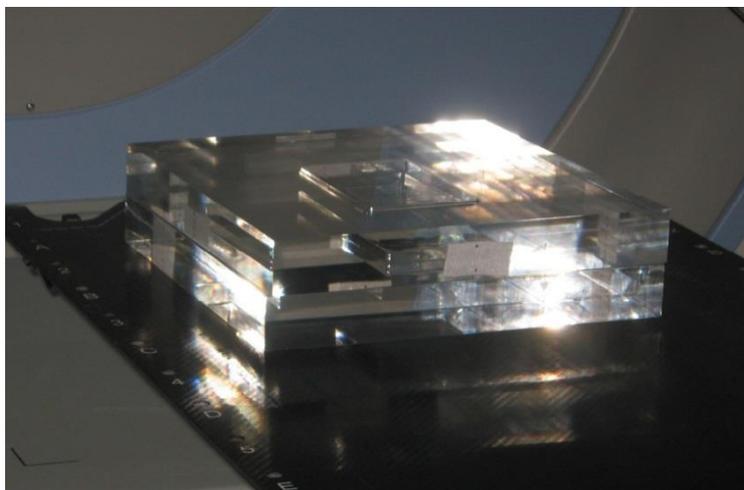


Figura 1.14: fantoccio utilizzato per simulare i trattamenti effettuati sui pazienti.

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 1.15) che favoriscono l'allineamento manuale coperchio-base.

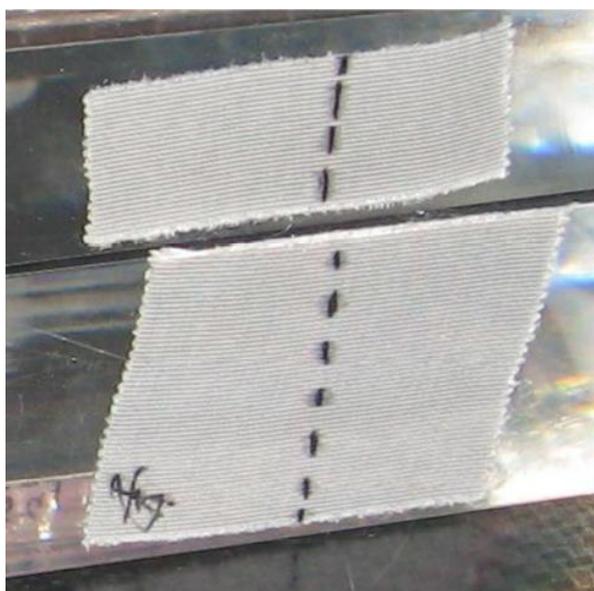


Figura 1.15: riferimenti ottici applicati sul fantoccio.

Acceleratore lineare

L'acceleratore lineare utilizzato per l'esperimento è stato l'ElektaSynergy prodotto da Elekta Limited ed entrato in commercio nel 2008 (Figura 1.16). 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 l'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'area 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.

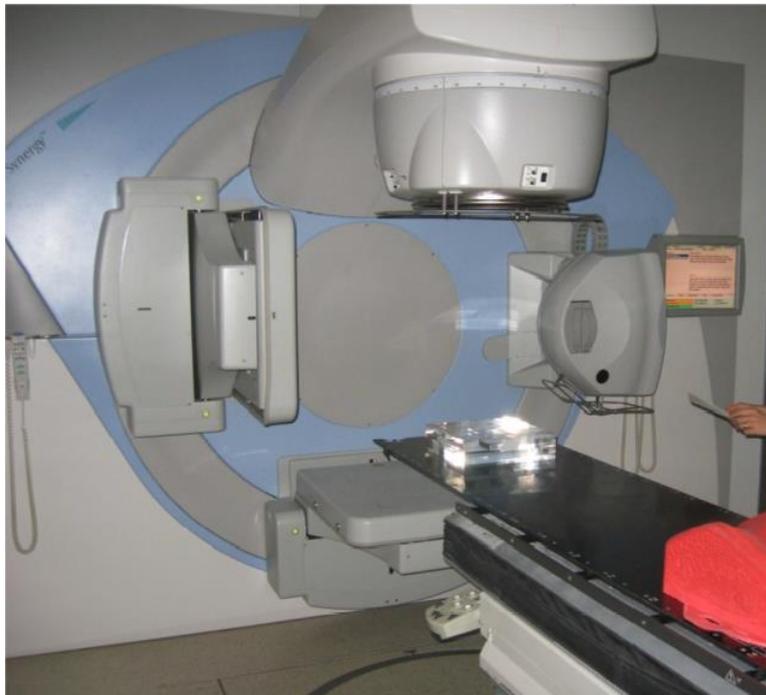


Figura 1.16: ElektaSynergy.

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 1.17.

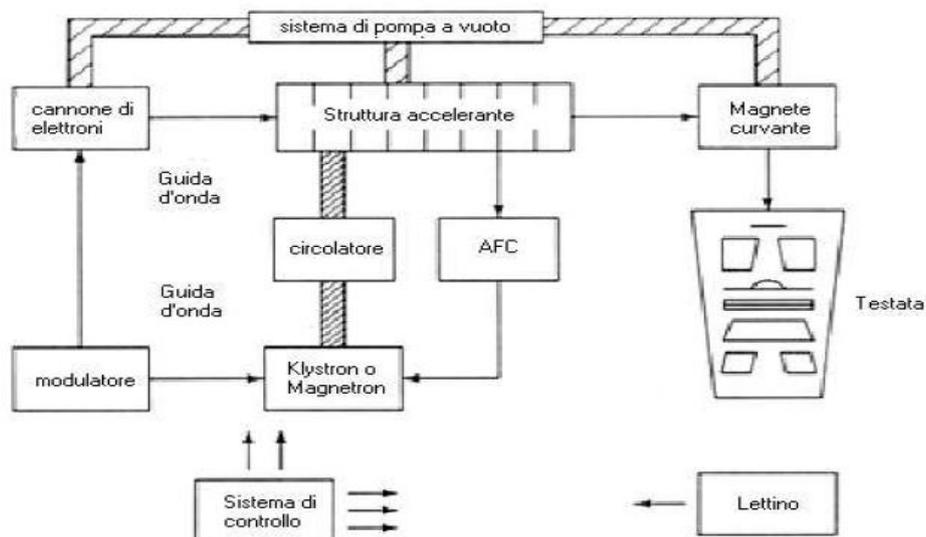


Figura 1.17: schema a blocchi acceleratore lineare – Tratta da [Fogli J. 2005].

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*).

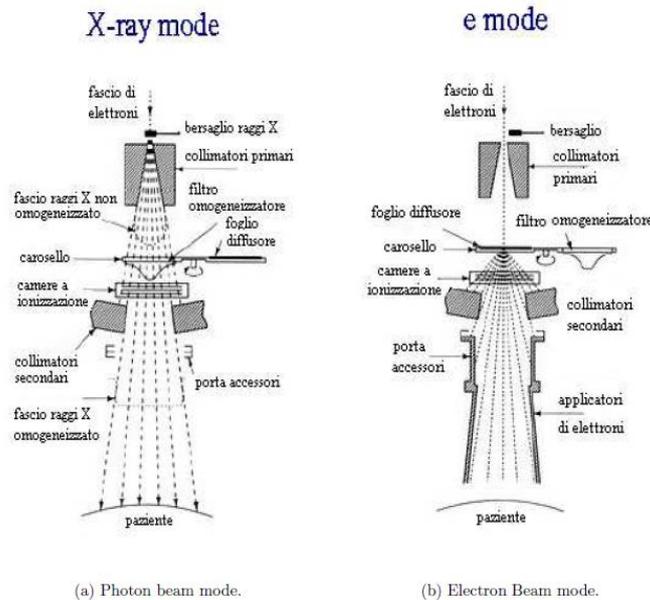


Figura 1.18: schema della testata di un acceleratore lineare di elettroni nel caso di un fascio di fotoni e in quello di un fascio di elettroni – Tratta da [Fogli J. 2005].

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 0×0 cm² fino a un massimo di 40×40 cm² 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 1.19), [Fogli J. 2005].

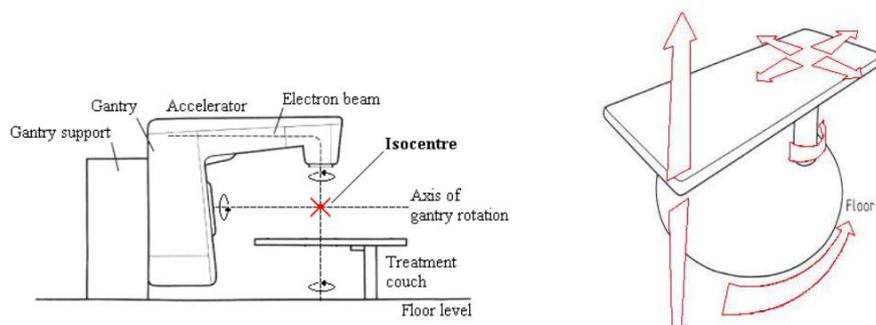


Figura 1.19: definizione di isocentro e supporto del paziente – Tratta da [Fogli J. 2005].

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 1.20.

Nel nostro caso il paziente è stato chiamato "PHANTOM_CELL".

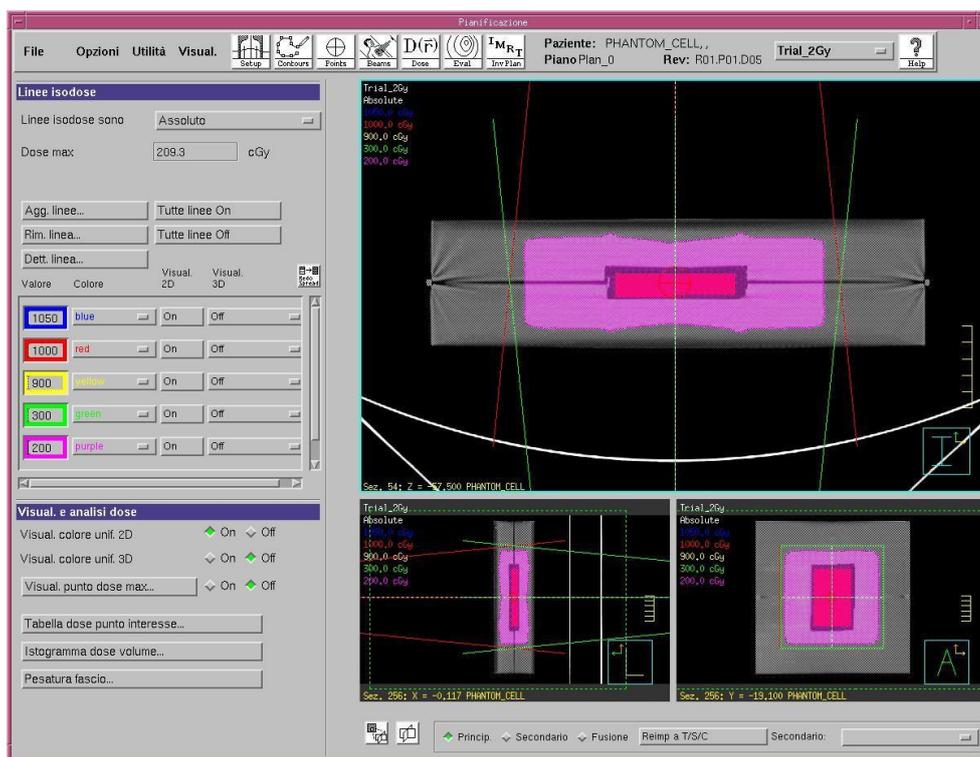


Figura 1.20: piano di trattamento per piastre contenenti broncosfere.

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 1.21:

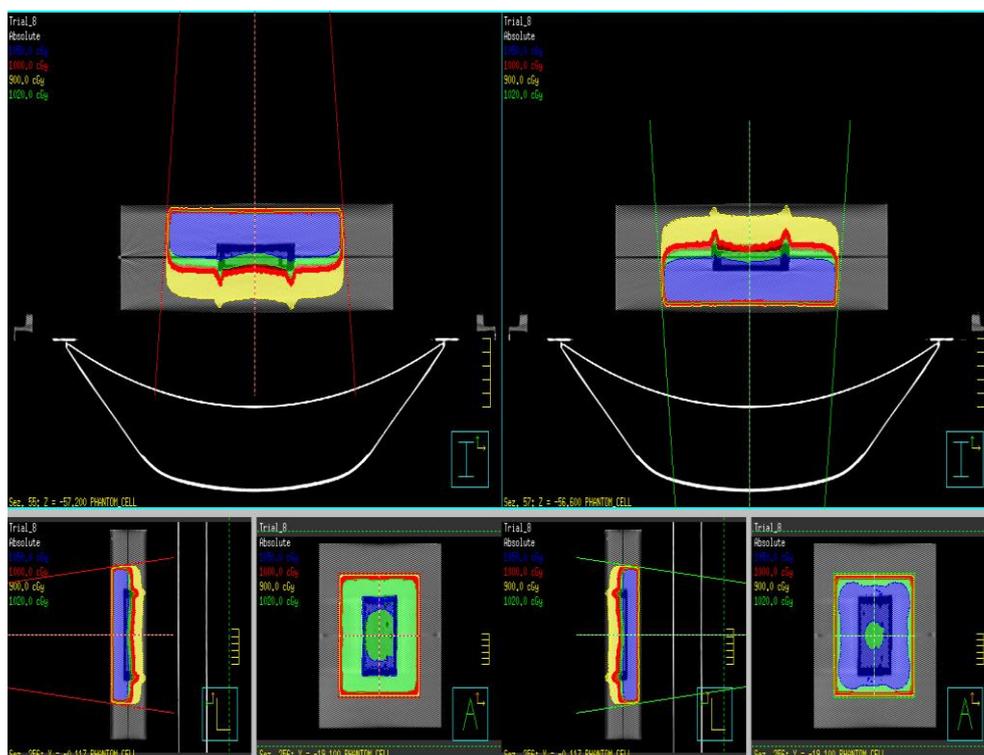


Figura 1.21: trattamento Antero-Posteriore e Postero-Anteriore per piastre contenenti sferoidi.

Il campo totale generato dai trattamenti è un campo quadrato 20×20 cm che va a colpire 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.

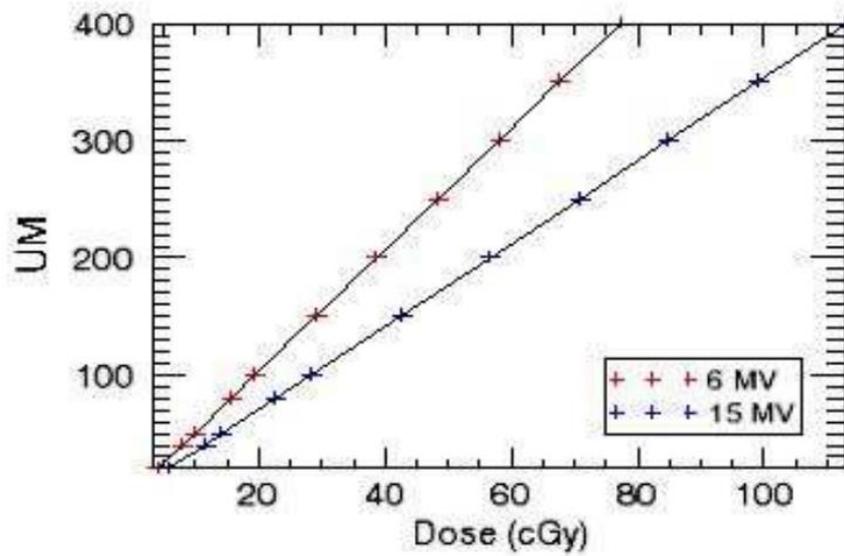


Figura 1.22: relazione lineare tra UM e dose.

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

Capitolo 2

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, inter e intra esperimento e di renderlo inoltre il più possibile operatore indipendente. In questo capitolo vengono descritti i dettagli del 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.

2.1 Set-up strumenti utilizzati

Gli sferoidi sono stati posizionati in piastre *multi-well*, in modo da monitorare l'evoluzione morfologica di ogni singolo sferoide. In particolare, le piastre utilizzate in questo esperimento sono piastre da 96 pozzetti (modello *Corning 96 wells*) 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 2.1).

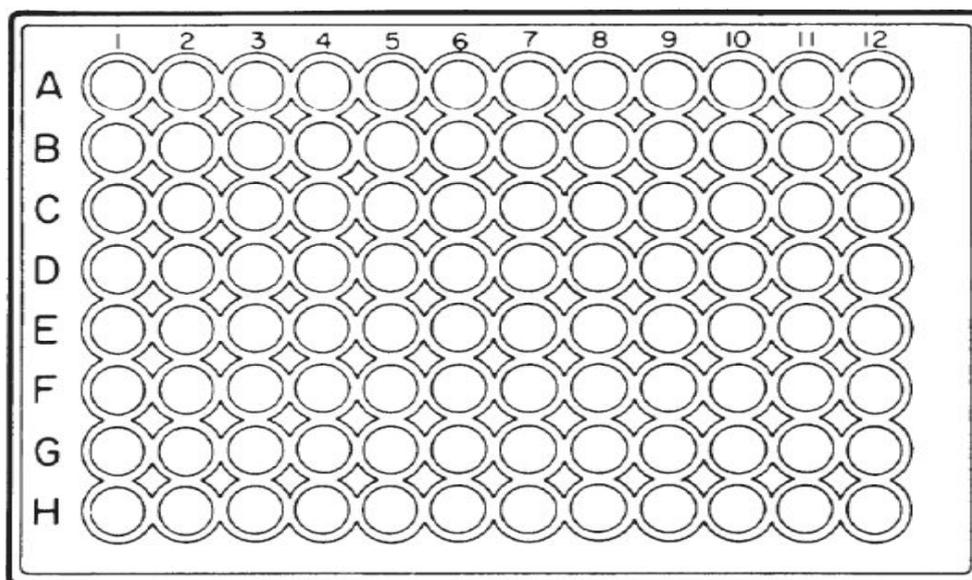


Figura 2.1: esempio dello schema di una piastra *multi-well* da 96 – Tratta da www.internationalpbi.it.

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 2.2).

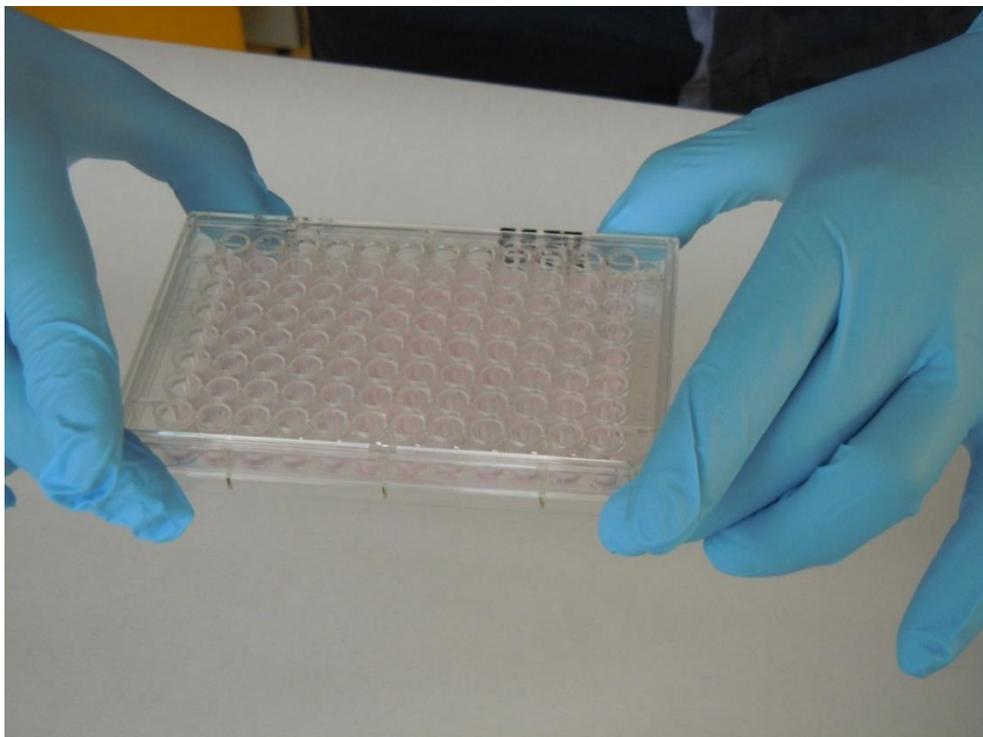


Figura 2.2: immagine che mostra la corretta tenuta delle piastre *multi-well* contenenti sferoidi.

Ad ogni piastra è stato assegnato un codice distintivo, rappresentativo dell'intensità del trattamento e del numero di trattamenti effettuati. L'intensità di radiazione assorbita viene misurata tipicamente in *gray* (simbolo Gy) e corrisponde ad una radiazione che deposita un joule per chilogrammo di materia. In particolare, 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 1 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 2.3).

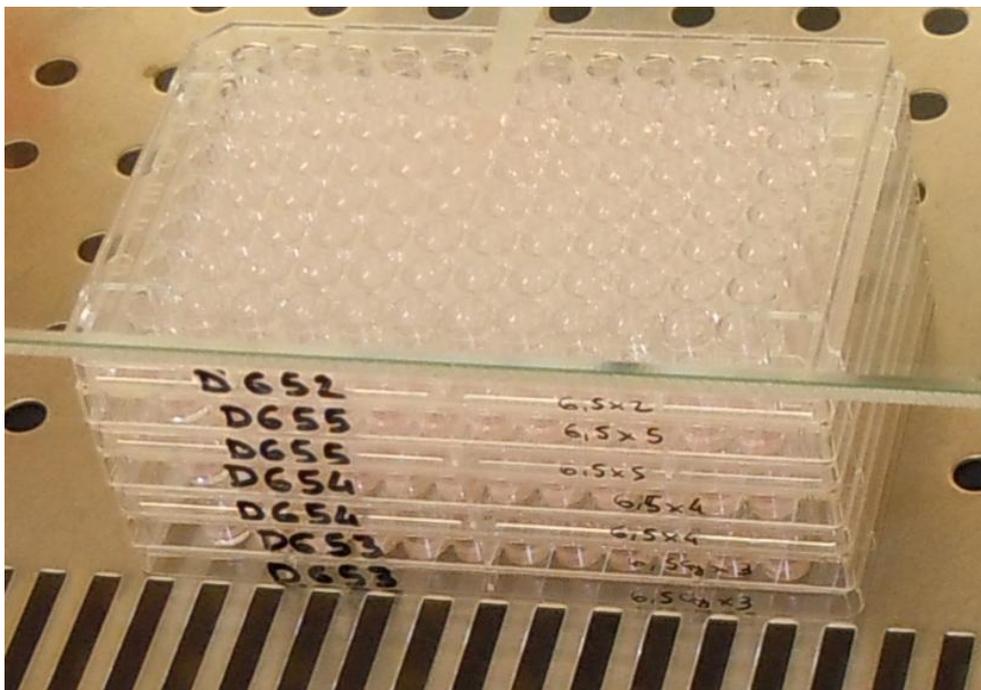


Figura 2.3: immagine di piastre marcate con intensità e numero di trattamenti radioterapici.

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 campo chiaro (*brightfield* - BF) con obiettivi 4× o 10×. Nessun particolare filtro è stato inserito nel percorso ottico (Figura 2.4). 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 collocati 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 2.5). 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 appositi regolatori a vite posti sul fianco del microscopio. La messa a fuoco di ogni campione viene ottenuta invece mediante altri due regolatori (posti lateralmente in basso nel microscopio) che impostano rispettivamente lo spostamento macro-metrico e micro-metrico, alzando o abbassando il piano contenente gli obiettivi. Per impostare l'intensità luminosa è presente un selettore analogico, che controlla la lampada, regolando il grado di luminosità secondo una scala rappresentata mediante alcune tacche (per tale esperimento è stato fissato il livello di luminosità al livello due dal minimo).



Figura 2.4: microscopio *OLYMPUS IX51*.



Figura 2.5: 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 2.6). 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. Per agevolare un successivo utilizzo di configurazioni di parametri bene definite, è possibile creare dei "profili". Questi permettono il salvataggio e il caricamento dei parametri desiderati senza reimpostarli ogni volta. Per tale esperimento sono stati creati due profili denominati rispettivamente *CVG4x* e *CVG10x*, utilizzati corrispondentemente con gli obiettivi 4× e 10×.

Un parametro di fondamentale importanza risulta l'*exposure-time*, ovvero il tempo effettivo in cui lo *shutter* della fotocamera risulta aperto. Ricordando che lo *shutter* è il dispositivo che permette il passaggio della luce per un determinato periodo di tempo, si può immediatamente comprendere che se il tempo di apertura dello *shutter* risulta sbagliato si ottengono o delle immagini sovraesposte con molti *pixels* che raggiungono il limite superiore (255 *gray levels*) o delle immagini sottoesposte con altrettanti *pixels* che raggiungono il limite inferiore (0 *gray levels*). Questo risulterebbe disastroso, in quanto andrebbe persa parte dell'informazione contenuta all'interno dell'immagine. Per monitorare il problema, il *software* permette di

osservare in tempo reale l'istogramma (comando *Histogram*, Figura 2.7) riuscendo così a visionare possibili variazioni di luminosità.

L'istogramma di un'immagine è la rappresentazione grafica della quantità di *pixels* 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 *pixels* per ogni livello. L'istogramma fornisce una rappresentazione sintetica delle caratteristiche di luminosità dell'immagine, trascurando però ogni informazione relativa alla posizione dei singoli *pixels*. 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*).

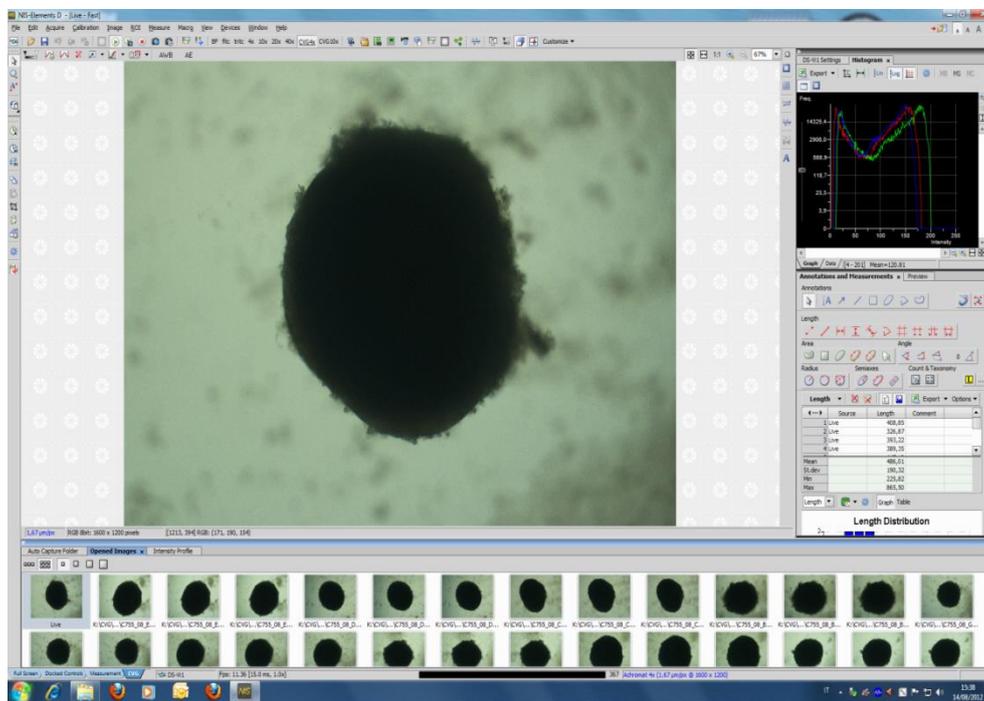


Figura 2.6: immagine relativa al software *Nis-Elements* utilizzato per l'acquisizione delle immagini.

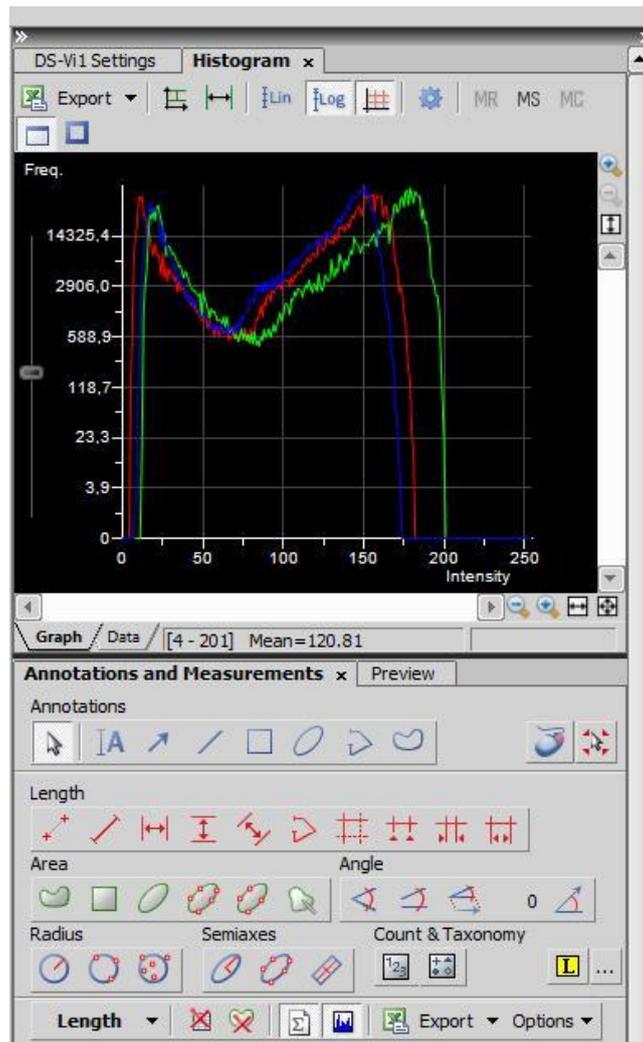


Figura 2.7: esempio di istogramma di uno sferoide acquisito.

2.2 Motivazioni

Il lavoro svolto in questa Tesi ha come scopo principale il voler indagare su eventuali correlazioni che possono esistere tra informazioni morfometriche e stato biologico di sferoidi tumorali a determinati stadi di differenti trattamenti radioterapici. I trattamenti effettuati risultano, infatti, quelli tipicamente utilizzati in

clinica, e correlare informazioni morfometriche con essi porterebbe ad un migliore conoscenza dell'interazione tumore-trattamento.

La scelta della tipologia di modello utilizzato *in-vitro* per l'esperimento non è banale, ma deriva dalla conoscenza del tumore *in-vivo*. 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 [Friedrich J. 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 2.8). 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]. Come già discusso in precedenza, dunque, verranno utilizzati sferoidi ottenuti a partire da cellule CAEP scelte per la loro caratteristica di riuscire ad assumere facilmente una struttura tridimensionale *in-vitro*, fornendo un valido modello confrontabile con i tessuti reali [Tesei A. 2009].

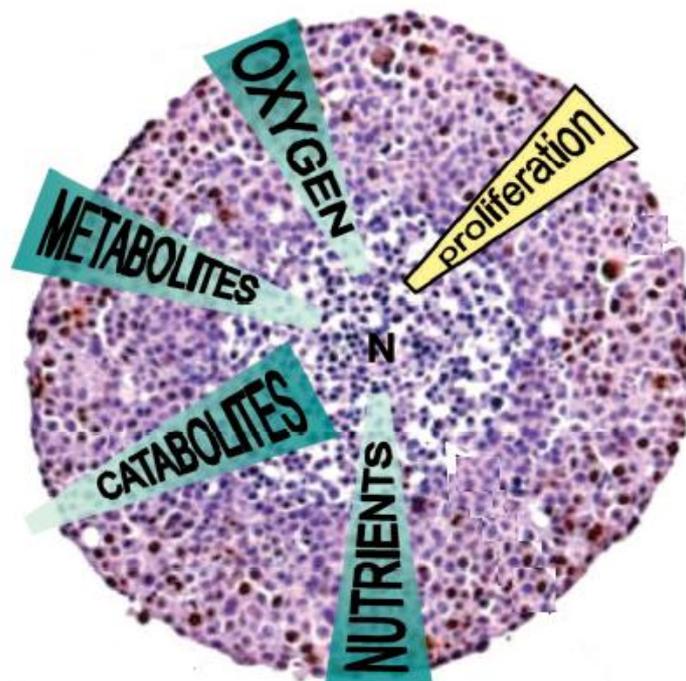


Figura 2.8: sferoide multicellulare tumorale – Tratta da [Juergen F. 2007].

Anche la scelta del trattamento non risulta casuale, infatti si cerca di indagare sul funzionamento di un range di trattamenti usualmente utilizzati nella pratica clinica. Inoltre confrontandoli in maniera selettiva è possibile analizzare un parametro di

trattamento alla volta, favorendo la comprensione dei loro effetti sul trattamento. Difatti:

- mantenendo fisso il numero di sedute di trattamento e facendo variare l'intensità: si confrontano le caratteristiche morfometriche degli sferoidi contenuti nelle piastre B205, C755 e D655 riferite alla piastra di controllo A000;
- variando il numero di sedute di trattamento e tenendo fissa l'intensità: si confrontano le caratteristiche morfometriche degli sferoidi contenuti nelle piastre D651, D652, D653, D654 e D655 riferite alla piastra di controllo A000.

Per confronto delle caratteristiche morfometriche si intende l'analisi dell'evoluzione temporale di alcuni aspetti osservabili dello sferoide. Tra gli aspetti osservabili sono stati scelti quelli che a livello intuitivo potrebbero essere correlati con i vari trattamenti effettuati, ma senza avere informazioni biologiche esatte in merito. Quindi ogni pozzetto avrà una storia temporale di variazione di queste caratteristiche morfometriche che potranno essere confrontate al variare del numero di trattamenti o al variare dell'intensità di trattamento.

I primi risultati sperimentali sull'evoluzione delle caratteristiche morfometriche degli sferoidi sono stati individuati mediante un esperimento pilota preliminare. Questo aveva lo scopo principale di fornire informazioni sull'andamento temporale delle caratteristiche morfometriche di:

- **integrità dello sferoide:** definita come lo stato di disgregazione in singole cellule o divisione in più strutture di uno sferoide. Uno sferoide integro è uno sferoide che non genera altri sferoidi e non si disgrega nelle singole cellule che lo formano;
- **area dello sferoide:** definita come la superficie della proiezione 2D dello sferoide.

Per quanto riguarda l'integrità dello sferoide sono state tratte le seguenti conclusioni:

1. gli sferoidi non trattati relativi alla piastra A000 non hanno mai evidenziato effetti di disgregazione o scissione: 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, prima non si osserva alcun segno evidente di

disgregazione o scissione degli sferoidi. Questo fortifica le considerazioni dei Radioterapisti i quali 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 hanno evidenziato una netta maggior disgregazione degli sferoidi rispetto alle altre piastre;
4. le rimanenti piastre che hanno ricevuto un numero di trattamenti minore di 5 presentano il numero massimo di sferoidi integri, dimostrando la necessità di 5 trattamenti radioterapici.

Per quanto concerne l'area degli sferoidi l'esperimento ha prodotto seguenti risultati:

1. analizzando le variazioni dell'aria degli sferoidi al variare dell'intensità del trattamento e a pari numero di sedute si nota che questa diminuisce all'aumentare dell'intensità. Il grafico sperimentale rappresentativo di questa variazione è riportato in Figura 2.9;

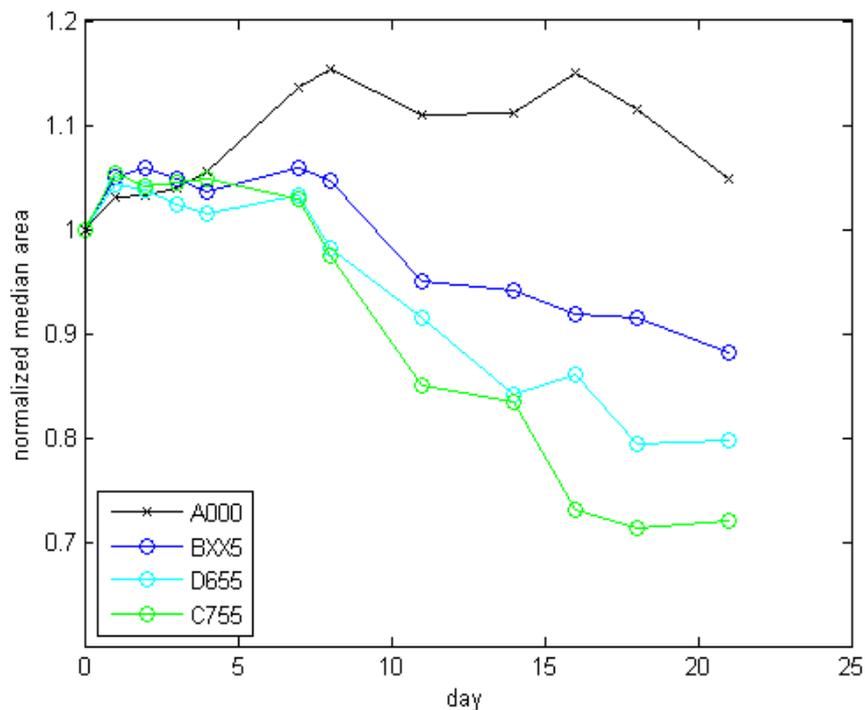


Figura 2.9: confronto dell'area normalizzata al primo giorno degli sferoidi tra i diversi trattamenti a pari numero di sedute.

2. analizzando le variazioni dell'aria degli sferoidi al variare dell'numero di trattamenti e a pari intensità di radiazione si nota che questa diminuisce all'aumentare del numero di trattamenti. Il grafico sperimentale rappresentativo di questa variazione è riportato in Figura 2.10.

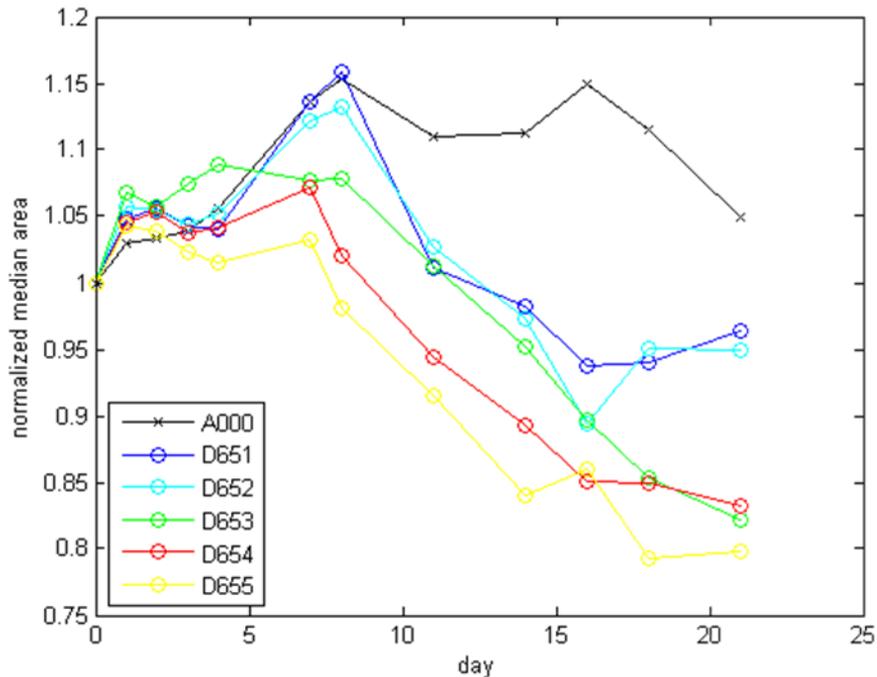


Figura 2.10: confronto dell'area normalizzata al primo giorno degli sferoidi tra i diversi trattamenti a pari intensità di radiazione.

I grafici presentano tre regioni distinte:

- la prima regione che va dal giorno 0 al giorno 4 dove non si verificano grossi cambiamenti;
- la seconda regione che va dal giorno 5 al giorno 17 dove le curve sono molto differenti al variare del trattamento;
- la terza regione che va dal giorno 18 al giorno 21 dove si raggiunge una sorta di plateau.

Si può notare che l'area media degli sferoidi nella piastra A000 rimane pressoché costante o al massimo tende ad aumentare, mentre in tutte le altre piastre l'area media diminuisce in maniera più rapida:

- nelle piastre trattate ad un'intensità più alta mantenendo costante il numero di sedute;

- nelle piastre trattate con un maggior numero di trattamenti mantenendo costante l'intensità di radiazione.

Quanto detto dimostra che i parametri intensità di radiazione e numero di trattamenti sono di fondamentale importanza per eseguire una cura sensata sul paziente. Quindi analizzare più a fondo l'interazione tra tumore e parametri radioterapici risulta di primario interesse.

Dall'osservazione dello stato morfologico dello sferoide, inoltre, si potrebbe in futuro, validando lo strumento creato, fornire informazioni biologiche sullo sferoide. Questo sarebbe un grande passo in avanti in quanto, attualmente, tutte le tecniche di analisi biologica utilizzate sono di tipo invasivo.

Inoltre dall'osservazione della storia morfologica di uno sferoide nei primi giorni del trattamento si potrebbe ricostruire lo stato morfologico finale dello sferoide a fine cura. Questo consentirebbe di poter agire sulla cura in maniera anticipata, modificando i parametri radioterapici che, influenzando la terapia, modificherebbero lo stato morfologico finale dello sferoide.

2.3 Correlazioni attese

L'insieme delle caratteristiche morfometriche rappresentative di uno sferoide in quell'istante di tempo, saranno fondamentali per assegnare allo sferoide ad una determinata classe di appartenenza. Lo scopo sarà analizzare i singoli sferoidi nel tempo per ricercare eventuali variazioni di classe indicative di un determinato stato biologico dello sferoide. Una volta definita l'evoluzione delle variazioni di classi sarà possibile identificare possibili correlazioni nascoste con la tipologia di trattamento radioterapico effettuato.

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

1. confrontando sferoidi che hanno subito trattamenti con la stessa intensità di radiazione e diverso numero di sedute, ci si aspetta di individuare successioni di classi differenti al variare del numero delle sedute;
2. confrontando sferoidi che hanno subito trattamenti con lo stesso numero di sedute e diversa intensità di radiazione, ci si aspetta di individuare successioni di classi differenti al variare dell'intensità di radiazione;

3. confrontando sferoidi che hanno subito il medesimo trattamento, ci si aspetta di individuare una variabilità intrinseca tra le successioni di classi tra questi oggetti che sulla carta dovrebbero risultare identici. Questa variabilità, se dimostrata, sarà molto interessante da analizzare, per comprendere meglio a cosa sia dovuta.

Ad esempio analizzando l'evoluzione degli sferoidi della piastra di controllo ci si aspetta che:

1. l'area dello sferoide rimanga pressoché costante o aumenti leggermente;
2. crei piccole strutture sferiche secondarie che potrebbero essere paragonabili alle metastasi;
3. mantenga un bordo abbastanza liscio e privo di anomalie;
4. non si sfaldi nelle sue cellule costituenti.

Analizzando di contro uno sferoide irradiato con un intensità di radiazione elevata ci si aspetta che:

1. la sua area si riduca notevolmente durante il trattamento;
2. il suo bordo si sfaldi presentando anomalie locali correlabili con la perdita di integrità dello sferoide;

Si potrà dunque stabilire che un determinato stato morfologico corrisponde ad un determinato stato biologico dello sferoide.

2.4 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;
- 2 pozzetti contenenti solo terreno di coltura collocati nei seguenti pozzetti: D8 ed E8.

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 2.11); in altre 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 2.12).

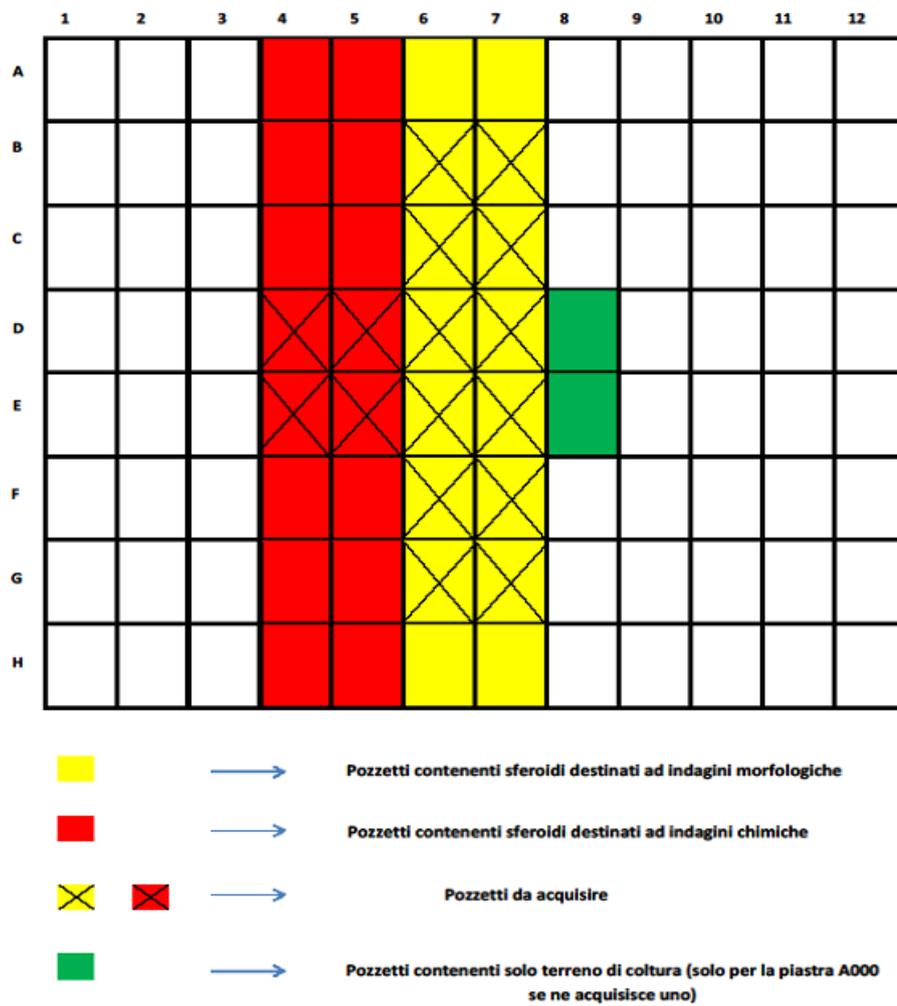


Figura 2.11 esempio dello schema di acquisizione di una piastra secondo il protocollo *standard*.

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 2.13) e si procede con la regolazione longitudinale e laterale per disporsi correttamente sul pozzetto contenente lo sferoide da acquisire.

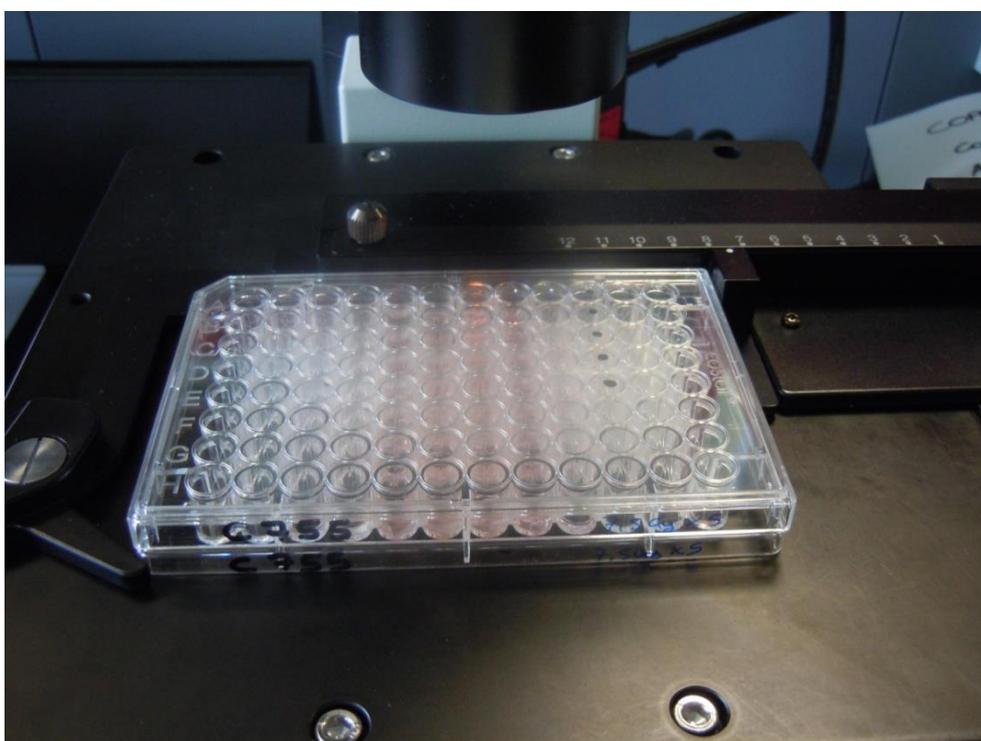


Figura 2.13: piastra da 96 pozzetti posta sul tavolino del microscopio.

Il bilanciamento del bianco (effettuato solo il primo giorno dell'esperimento), risulta necessario per una corretta acquisizione delle immagini e in seguito viene salvato del profilo d'interesse (CVG4x o CVG10x) in modo da garantire gli stessi settaggi per le successive acquisizioni.

In particolare, si procede con l'allineamento dell'obiettivo 4 \times e al posizionamento la piastra A000 sull'*holder* del microscopio. Si mette 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). 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; questo viene salvato insieme agli altri parametri sul profilo con il nome CVG4x.

La stessa procedura viene ripetuta 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 venivano salvate tre immagini:

1. immagine con a fuoco i bordi dello sferoide (Figura 2.14);
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 2.15);
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 2.16).

Nel caso in cui nel pozzetto era comparso più di uno sferoide (ad esempio per 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×. 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 $10\times$ veniva spostata la manopola micrometrica di $10\ \mu\text{m}$ per volta. Infatti, cliccando sulla sezione riguardante le caratteristiche degli obiettivi (*Objectives*), presente nel software di acquisizione utilizzato, si osserva che per l'obiettivo $10\times$, il fuoco di ogni *slice* corrisponde a $16\ \mu\text{m}$ (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 $8\ \mu\text{m}$ (nell'acquisizione dei video è stato approssimato tale valore a $10\ \mu\text{m}$). 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 $10\times$ ad $80\ \mu\text{m}$ (Figura 2.17).

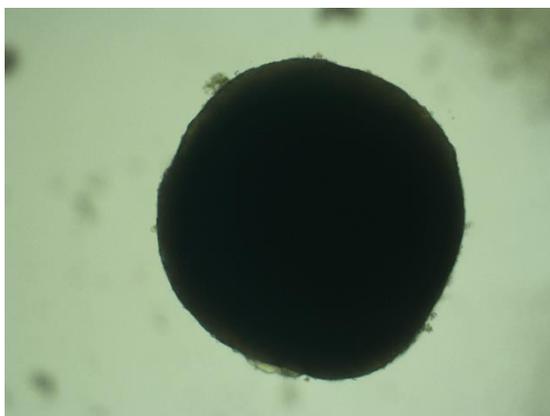


Figura 2.14: immagine di uno sferoide con i bordi a fuoco.

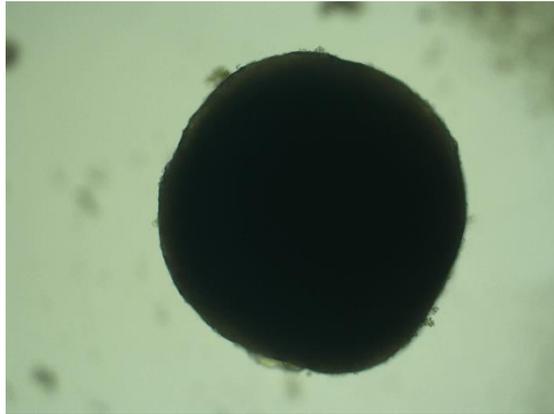


Figura 2.15: immagine dello sferoide acquisito 50 μm sotto rispetto all'immagine con i bordi a fuoco.

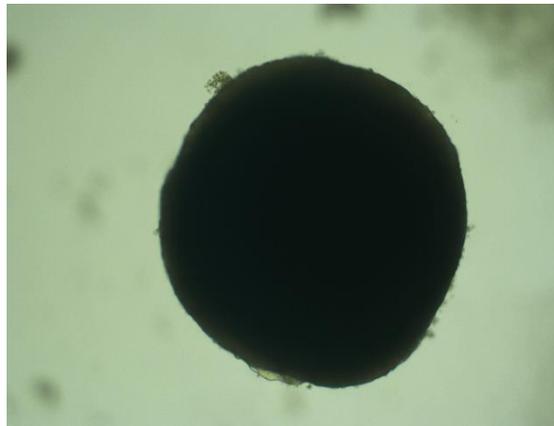


Figura 2.16: immagine dello sferoide acquisito 50 μm sopra rispetto all'immagine con i bordi a fuoco.

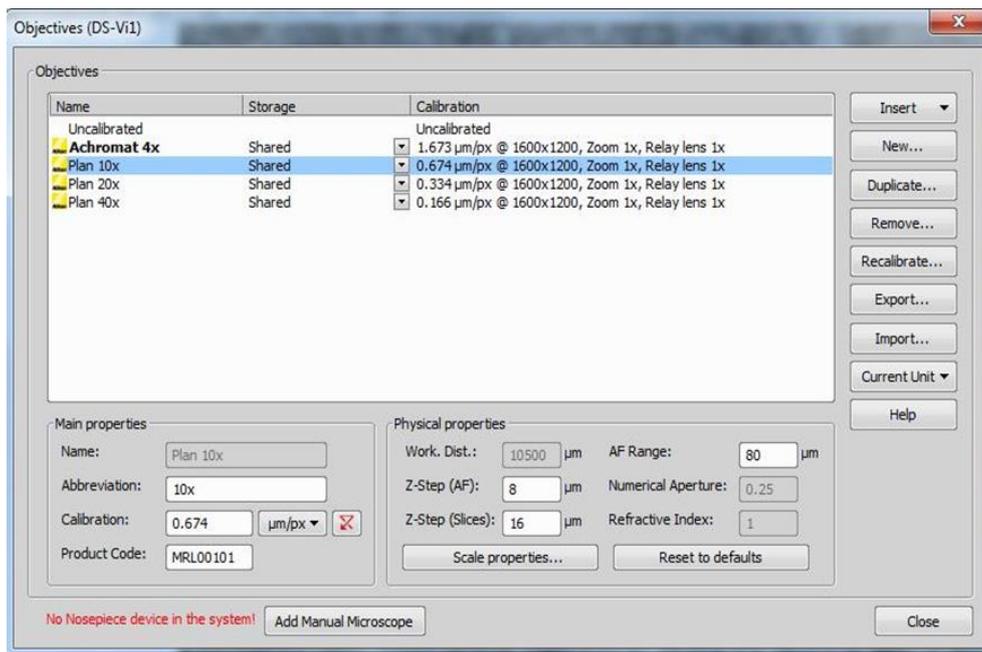


Figura 2.17: immagine relativa alle caratteristiche dell'obiettivo 10 \times presente nella sezione *Objectives* del software di acquisizione Nis-Elements.

2.6 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.

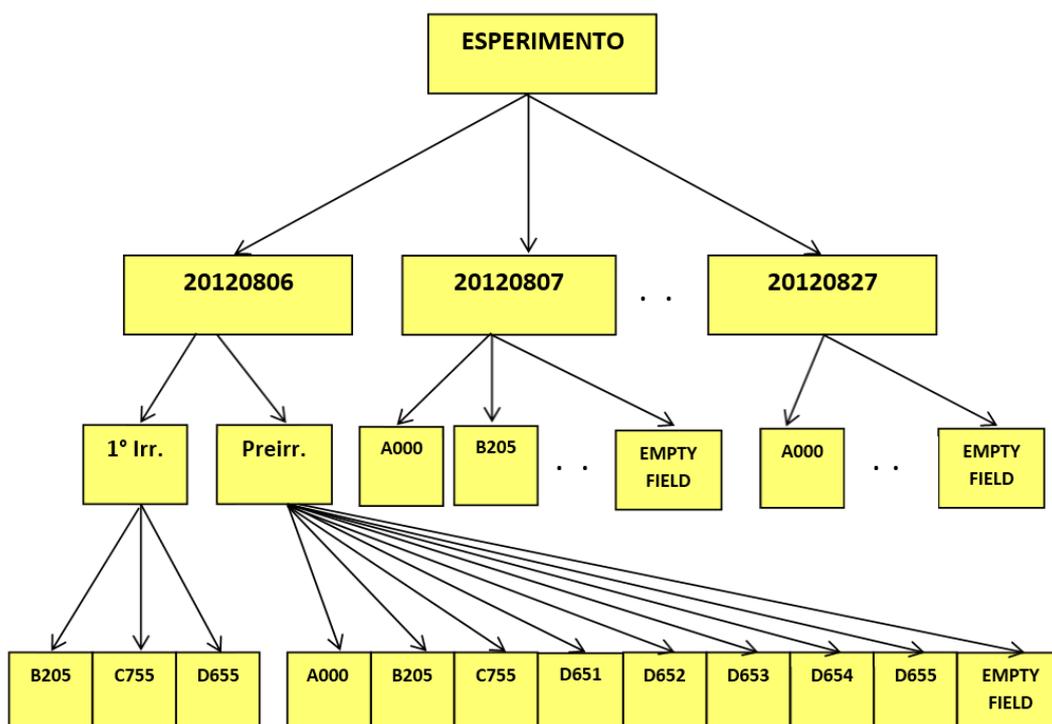


Figura 2.18: schema a blocchi rappresentativo dell'organizzazione gerarchica delle sottocartelle dove andranno salvate le immagini da acquisire.

Come si nota dallo schema in Figura 2.18, 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 piastrine irradiate il primo giorno (contenute nella cartella 1° Irradiazione).

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 **4×**, 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 2.19), difficoltà nell'acquisizione (Figura 2.20), disgregazione completa dello sferoide (Figura 2.21).

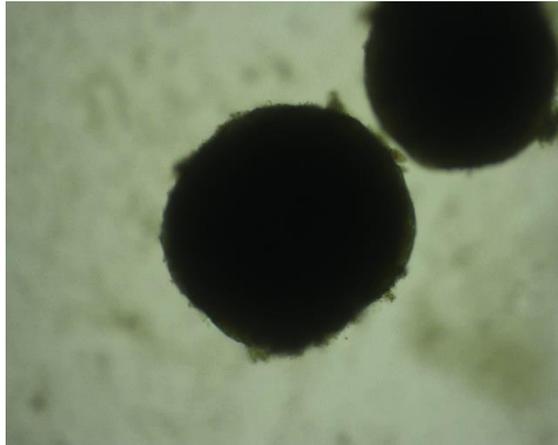


Figura 2.19: immagine relativa al pozzetto E5 della piastra C755, acquisita il terzo giorno, contenente più di uno sferoide.

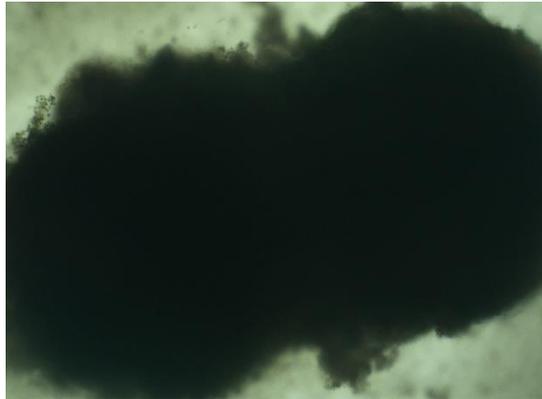


Figura 2.20: immagine relativa al pozzetto F6 della piastra B205, acquisita l'ottavo giorno, contenente uno sferoide fuori dal *field of view*.

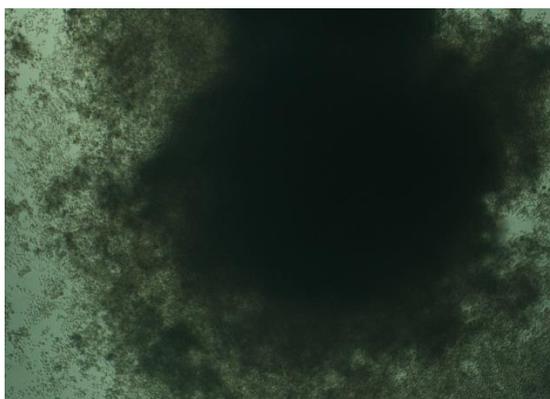


Figura 2.21: immagine relativa al pozzetto E6 della piastra C755, acquisita l'ottavo giorno, contenente uno sferoide completamente disgregato.

2.7 Problemi incontrati

L'esperimento effettuato su questi aggregati multicellulari risulta essere un esperimento pilota per la ricerca in questo settore. Tramite gli esperimenti pilota è possibile individuare punti critici nel protocollo e nell'organizzazione che potranno essere migliorati nei successivi esperimenti, rendendoli il più possibile indipendenti da errori umani.

Le criticità incontrate riguardano diversi settori e sono state causate sia da problemi organizzativi che da problemi di protocollo.

Settaggio della luminosità della lampada

La prima problematica riguarda la ripetibilità dell'esperimento. Infatti essendo il selettore della luminosità di tipo analogico, ed essendo attualmente il microscopio utilizzato da diversi operatori, anche per altre attività, risulta praticamente impossibile ogni giorno ripristinare la quantità di luce del giorno precedente, basandosi esclusivamente sull'allineamento manuale del selettore. Per migliorare la ripetibilità dell'esperimento, sarebbe necessario poter disporre di una postazione dedicata, tale per cui si potesse mantenere inalterato il *setup* del microscopio durante tutto l'esperimento. Come seconda scelta, si potrebbe scegliere il livello di luce basandosi esclusivamente sull'istogramma di un pozzetto vuoto. In questo

modo sarebbe possibile ricostruire in maniera più affidabile la luminosità, in maniera indipendente dall'operatore e dall'utilizzo precedentemente fatto del microscopio.

Test di vitalità

La seconda problematica riguarda i test di vitalità. Questi devono essere in grado di definire se un determinato sferoide, in un determinato momento sia vitale o no. Questi dati sono necessari per completare le caratteristiche degli sferoidi correlando così la vitalità ai vari trattamenti effettuati. Fortunatamente questo esperimento ha consentito di verificare che il test di vitalità basato sulla fosfatasi acidasi è risultato essere non affidabile in termini di riproducibilità del dato, producendo risultati non efficaci al fine di stabilire la vitalità delle cellule CAEP. Questo può essere imputabile alle dimensioni degli sferoidi utilizzati in questi esperimenti che presentano diametri compresi tra 1.5 e 2 mm. Questo è in accordo con quanto segnalato in un lavoro di Friedrich J. et al. [Friedrich J. 2007], dove si sottolinea la perdita di linearità del test quando gli sferoidi utilizzati superano i 650 micron di diametro. Sarà quindi necessario individuare un test che abbia una forte correlazione con la vitalità di queste cellule. Un'idea potrebbe essere quella di dividere le cellule dello sferoide in tre gruppi tramite successive erosioni di strati dello sferoide per mezzo di Tripsina [Freyer J.P. 1980] e verificare in maniera distinta utilizzando Trypan Blue la vitalità delle cellule dei diversi strati dello sferoide.

Trattamento radioterapico

Terza e ultima problematica individuata è inerente il trattamento radioterapico effettuato sulla piastra B205. Questa da protocollo avrebbe dovuto ricevere 5 trattamenti radioterapici di intensità pari a 20 dGy. A causa di un errore, la piastra ha subito 4 trattamenti a 20 dGy e l'ultimo trattamento a 50 dGy. Ciò ha evidenziato una mancanza di "automazione" nel protocollo che può effettivamente lasciare aperte le porte ad errori umani. Per limitare in futuro questa possibilità, sarà opportuno utilizzare "schede paziente" anche per gli sferoidi, in modo da rendere meno probabile il verificarsi di un errore umano sullo stabilire quanti dGy somministrare. In particolare, le schede paziente sono delle raccolte di informazioni che definiscono il numero e la tipologia di trattamento da effettuare ed effettuati su un determinato paziente. Queste hanno proprio lo scopo di minimizzare gli errori

umani, infatti l'operatore, tramite la scheda paziente, non ha bisogno di fornire i vari parametri d'irradiazione della terapia, ma deve solo fornire il nome identificativo del paziente. Da qui in seguito trascureremo tutti i dati raccolti relativi alla piastra denominata B205.

Capitolo 3

Tassonomia sferoidi

Il termine *tassonomia* (dal greco *τάξις*, *taxis*, "ordinamento", e *νόμος*, *nomos*, "regola") è inteso, nel suo significato più generale, come la disciplina della *classificazione*. In questo capitolo verrà presentata una classificazione gerarchica in grado di comprendere le diverse tipologie morfologiche di sferoidi esistenti. Questa tassonomia sarà organizzata su due livelli elencati a seguito.

- **Livello I:** dove verrà classificata la parte principale degli sferoidi, intesa come corpo centrale escludendo protuberanze ed eventuali altri corpi presenti nel pozzetto di semina.
- **Livello II:** dove verranno analizzate le protuberanze dello sferoide principale.

In particolare, le varie classi sono state definite in modo retroattivo dopo una attenta analisi visiva di alcune migliaia di immagini di sferoidi, acquisite utilizzando un microscopio a luce trasmessa. Per rendere la classificazione adeguata alla vasta gamma di sferoidi identificati, sono state definite alcune caratteristiche d'interesse in grado di distinguerli in maniera esaustiva. In particolare, le caratteristiche attualmente definite riguardano il loro aspetto morfologico.

Le caratteristiche analizzate sono le seguenti:

- integrità dello sferoide;

- perimetro analizzato nella sua globalità;
- forma;
- bordo analizzato localmente.

Le specifiche *features* analizzate per le caratteristiche sopra elencate sono riportate a seguito.

- A riguardo dell’“integrità dello sferoide”:
 - presenza di eventuali corpuscoli nel terreno di coltura;
 - presenza di più sferoidi.
- A riguardo del “perimetro globale”:
 - regolarità della curvatura della versione “smussata” dello sferoide.
- A riguardo della “forma”:
 - grado di similitudine con forme regolari;
 - dimensione area;
 - dimensione perimetro.
- A riguardo del “bordo locale”:
 - presenza di frastagliature;
 - presenza di protuberanze.

Nelle prossime sezioni vedremo in dettaglio le proprietà delle *features* considerate nella Tassonomia di Livello I.

3.1 Integrità dello sferoide

La prima caratteristica osservabile all’interno di un pozzetto contenente sferoidi è il numero degli sferoidi presenti e la presenza o assenza di corpuscoli. Per capire meglio di cosa parliamo vediamo alcuni esempi riportati nelle seguenti figure (Figura 3.1, Figura 3.2).

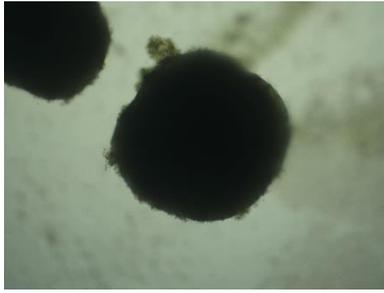


Figura 3.1: pozzetto contenente due sferoidi.

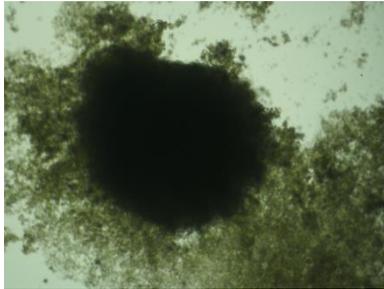


Figura 3.2: pozzetto contenente innumerevoli corpuscoli.

La classificazione basata sull'”integrità dello sferoide” porterà ad avere nell'albero di classificazione tre diversi livelli binari così riassumibili:

- è presente almeno uno sferoide? Si/No;
- sono presenti corpuscoli? Si/No;
- sono presenti più sferoidi? Si/No.

Nel caso limite di assenza di uno sferoide integro e presenza di solo corpuscoli, le diramazioni seguite nell'albero saranno le seguenti: è presente almeno uno sferoide? No. Sono presenti corpuscoli? Si. Sono presenti più sferoidi? No.

3.2 Perimetro globale

La seconda caratteristica presa in considerazione è la “tipologia del perimetro” dello sferoide analizzato nella sua globalità. Il concetto risulta a primo impatto essere di difficile comprensione, ma l'analisi di questa caratteristica risulta importante per

poter distinguere, ad esempio, due sferoidi la cui proiezione bidimensionale risulta sempre di “forma” circolare, ma uno con il perimetro globale regolare e l’altro con il perimetro globale irregolare (come fosse una “nuvoletta” a forma di base “circolare”). Vediamo di chiarire meglio cosa si intende per “tipologia del perimetro”: nell’esempio riportato a seguito vengono mostrati due sferoidi a forma base “circolare”. Il primo presenta perimetro globale regolare, l’altro perimetro globale irregolare (Figura 3.3).

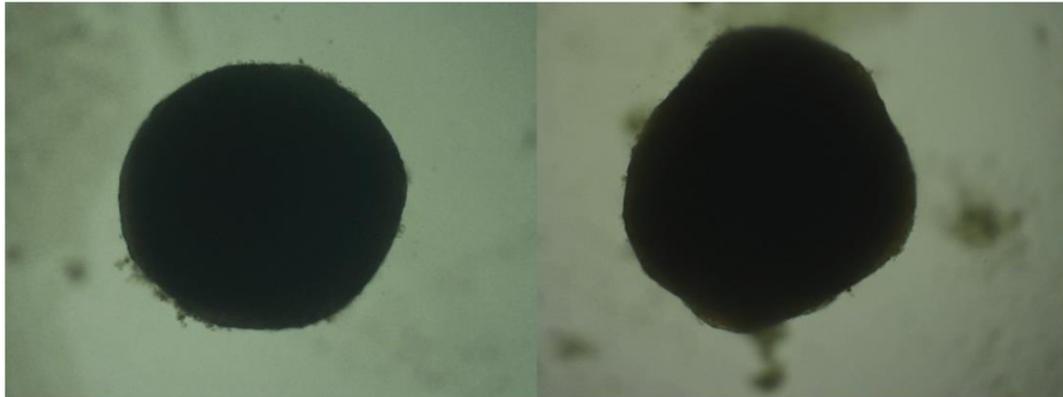


Figura 3.3: sferoidi circolari con perimetro globale regolare (sinistra) e con perimetro globale irregolare (destra).

In termini tecnici, con “regolarità del perimetro globale” intendiamo la regolarità della derivata prima calcolata sulla curvatura del perimetro della versione filtrata della proiezione bidimensionale dello sferoide.

Gli sferoidi, secondo questa *feature*, possono essere classificati in accordo al seguente livello binario:

- il perimetro globale è regolare? Si/No.

3.3 Forma

Gli sferoidi possono assumere diverse “forme di base”. Vediamone alcuni esempi (Figura 3.4).

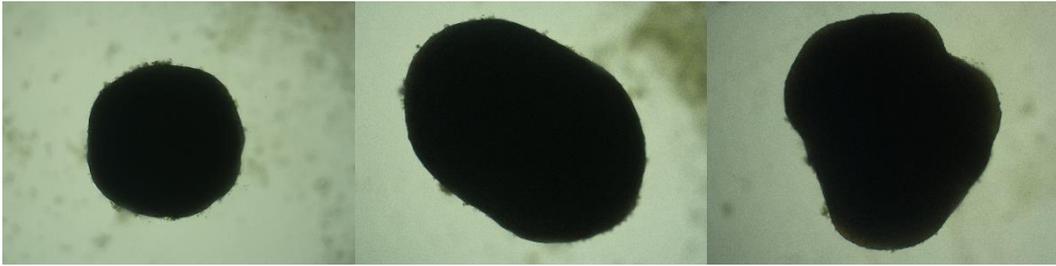


Figura 3.4: sferoidi di forma differente. Da sinistra a destra abbiamo uno sferoide circolare, ellittico e irregolare.

In termini tecnici intendiamo con “forma di base” di uno sferoide la forma della figura inscritta nella versione filtrata della proiezione bidimensionale dello sferoide, trascurando quindi l’analisi della curvatura, già analizzata nella caratteristica “perimetro globale”.

La seconda informazione immediatamente osservabile dal confronto di due immagini dello stesso sferoide, in due giorni d’acquisizione consecutivi, è relativa alla variazione della forma dovuta al suo ridimensionamento, ovvero alla sua diminuzione di area (Figura 3.5).

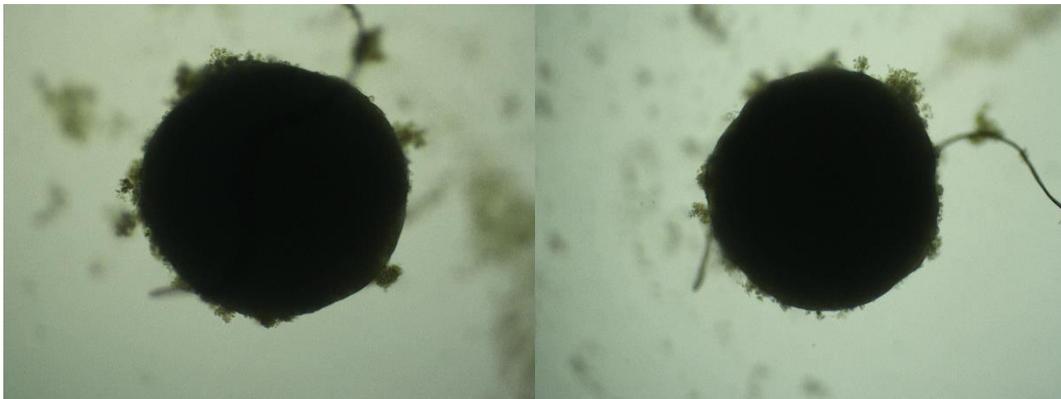


Figura 3.5: due immagini dello stesso sferoide prese in due giorni d’acquisizione consecutivi; è possibile notare l’evidente riduzione dell’area dello sferoide.

Quindi, la classificazione basata sulla forma porterà ad avere nell’albero di classificazione due ulteriori livelli:

- la forma di base è regolare? Si/No;
- l’area dello sferoide si è ridotta? Si/No.

E' importante notare che se la forma di base dello sferoide è regolare allora è tipicamente circolare o ellittica. Se invece la forma di base è irregolare, vuol dire che non esiste una figura geometrica di base (cerchio, ellissi, quadrato, etc.) particolarmente simile. A riguardo delle riduzione dell'area, con precedenti studi, si è dimostrato che questa caratteristica risulta proporzionale al volume.

3.4 Bordo locale

L'ultima caratteristica osservata è il “bordo locale”, inteso come la regolarità della curvatura della proiezione bidimensionale dello sferoide originale. Questo infatti può essere caratterizzato da regioni particolari che chiameremo:

- 1) frastagliature;
- 2) protuberanze;
- 3) rigonfiamenti.

Questi elementi possono essere presenti in maniera separata o simultanea nello sferoide e la loro presenza/assenza è riportata nella classificazione mediante l'utilizzo di marcatori che andranno a formare due ulteriori livelli binari nell'albero delle classi. Nelle immagini seguenti osserviamo alcuni esempi per capire meglio cosa consideriamo all'interno di queste caratteristiche di bordo (Figura 3.6, Figura 3.7, Figura 3.8, Figura 3.9).

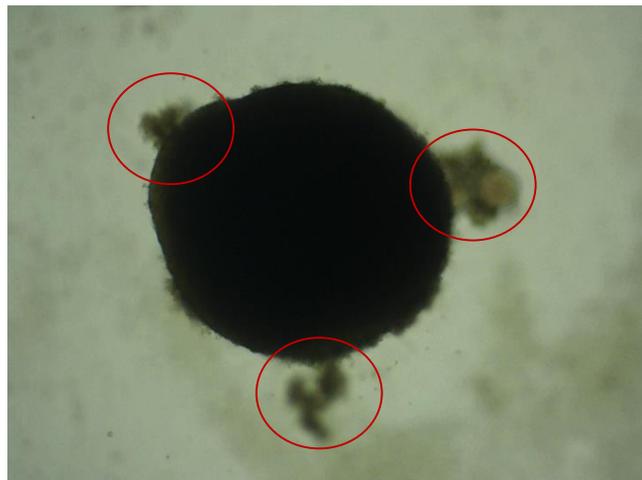


Figura 3.6: sferoide con presenza di protuberanze (cerchiate in rosso).

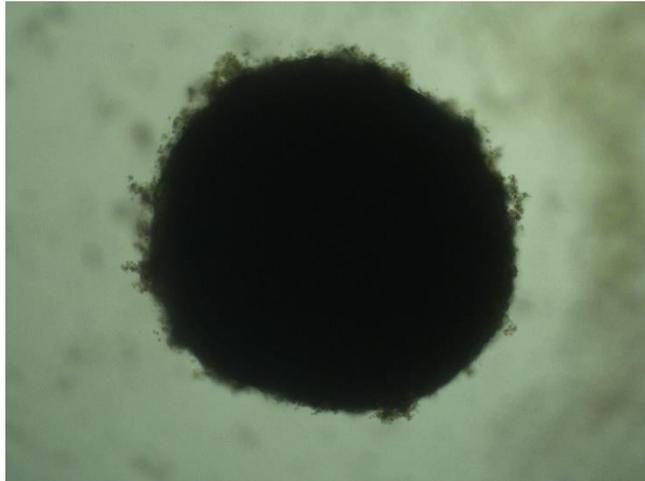


Figura 3.7: sferoide con evidente frastagliatura.

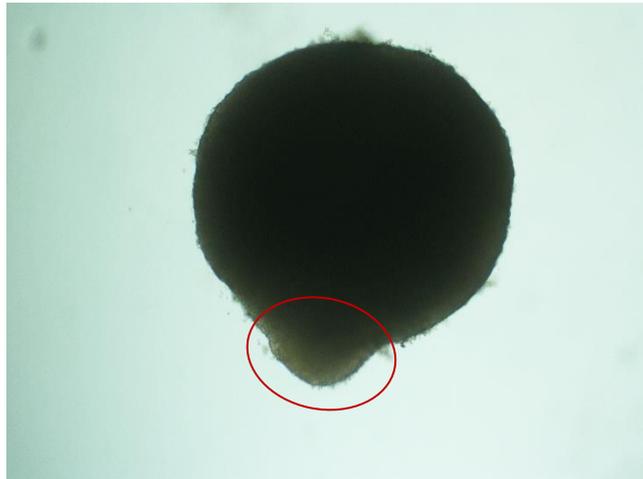


Figura 3.8: sferoide con presenza di un rigonfiamento (cerchiato in rosso).

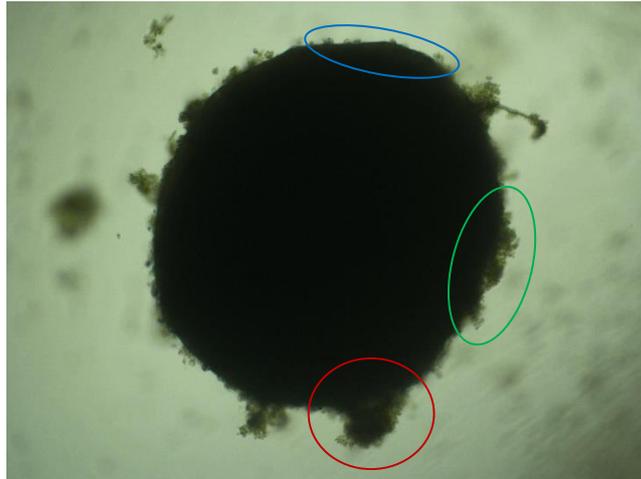


Figura 3.9: sferoide con presenza di protuberanza (cerchiata in rosso), frastagliatura (cerchiata in verde) e regioni regolari (cerchiato in blu).

Definiamo protuberanza una visibile discontinuità nel bordo dello sferoide facilmente isolabile ad occhio e avente dimensioni non trascurabili se rapportata alle dimensioni dello sferoide.

Definiamo invece rigonfiamento locale una visibile discontinuità nel bordo dello sferoide simile a una protuberanza ma non facilmente isolabile ad occhio dal resto dello sferoide. Purtroppo se sono presenti molti rigonfiamenti e uniformemente distribuiti nel perimetro risulta difficile distinguere tra singolo rigonfiamento locale o perimetro globale irregolare.

Definiamo frastagliature quelle irregolarità locali presenti nel bordo che non fanno parte delle anomalie definite precedentemente.

I tre livelli binari così definiti saranno quindi i seguenti:

- presenta frastagliatura? Si/No;
- presenta protuberanze? Si/No;
- presenta rigonfiamenti? Si/No.

3.5 Tassonomia livello II

Il secondo livello della tassonomia riguarda la classificazione delle protuberanze dello sferoide principale. Le caratteristiche analizzate sono le stesse riportate nella sezione “Tassonomia livello I”, con l’unica eccezione di non considerare protuberanze all’interno di protuberanze. Potrebbero inoltre essere introdotte nuove caratteristiche quali l’analisi della *densità*, valutabile utilizzando immagini acquisite con un microscopio a luce grazie alla distribuzione di valori di intensità presenti nelle protuberanze di volume significativamente ridotto rispetto a quello del corpo principale dello sferoide.

3.6 Possibili correlazioni biologiche

Non conoscendo il significato biologico delle differenti manifestazioni delle caratteristiche morfologiche sopra elencate, possiamo solo fare alcune supposizioni.

Integrità dello sferoide

La presenza di più sferoidi (generati dall’unico sferoide inizialmente collocato nel pozzetto) o di corpuscoli in sospensione all’interno del pozzetto è una situazione che si distacca dalla “normalità” attesa, ovvero singolo sferoide con assenza di corpuscoli. La loro presenza rappresenta un’anomalia che potrebbe essere correlata allo “stato di vitalità” dello sferoide: uno sferoide in grado di generare un nuovo sferoide potrebbe essere considerato come uno sferoide particolarmente “vitale” in grado di generare “metastasi”. Invece, la presenza di corpuscoli potrebbe avere due significati contrastanti. Il primo potrebbe essere correlato in maniera positiva alla vitalità dello sferoide, considerando i corpuscoli come materiale di scarto utilizzato ed espulso da una “città vivente”. Invece, nel secondo caso i corpuscoli potrebbero essere parti di cellule di bordo che si stanno disintegrando.

Forma

Anche la forma potrebbe essere un indicatore dello stato di vitalità dello sferoide. Infatti, osservando uno sferoide perfettamente sferico è possibile supporre che questo abbia caratteristiche perfettamente isotrope in ogni direzione dello spazio, con un buon stato di adesione tra le singole cellule componenti. Uno sferoide invece la cui proiezione bidimensionale ha un aspetto ellissoidale (allungato lungo una direzione principale) lascia presagire un comportamento anisotropo e quindi un differente stato di vitalità delle sue parti componenti. Quest'anisotropia diventa massima in sferoidi di forme irregolari, dove già ad occhio siamo portati a percepire lo sferoide come se fosse composto da più ammassi multicellulari con attività scorrelata tra loro. Il secondo parametro preso in considerazione è la dimensione della forma ovvero la sua area. Una significativa diminuzione di area può essere correlata ad importanti parametri biologici quali perdita di cellule di bordo o diminuzione del volume delle singole cellule ad esempio in caso di apoptosi. Quindi è di fondamentale importanza per la descrizione dello stato di uno sferoide in un determinato istante di tempo.

Perimetro globale

Seguendo gli stessi ragionamenti, l'irregolarità del "perimetro globale" fa supporre nuovamente un certo grado di anisotropia dello sferoide: un perimetro ondulato risulterà essere "anomalo" rispetto alla attesa teorica e quindi potrebbe essere di particolare interesse per dedurre un particolare stato biologico dello sferoide.

Bordo locale

Per quanto concerne la caratteristica "bordo locale" si potrebbe ipotizzare che frastagliature e protuberanze risultino essere l'effetto del metabolismo dello sferoide, mentre per quanto concerne i rigonfiamenti questi risulterebbero effetto della vitalità dello sferoide, che se poco trattato è in grado di generare metastasi. Infatti, considerando normale un bordo locale perfettamente liscio, la presenza di frastagliature o protuberanze potrebbe essere nuovamente correlata con la produzione di scarti o disintegrazione cellulare, la produzione di rigonfiamenti è un indice di salute dello sferoide che sarà in grado di generare nuovi ammassi multicellulari.

Protuberanze e rigonfiamenti analizzati singolarmente

La motivazione che ha spinto a prevedere un “livello II” nella tassonomia è quella di indagare sulle caratteristiche delle protuberanze e dei rigonfiamenti. Analizzando infatti le protuberanze si possono trarre informazioni sulla tipologia “di scarto” che lo sferoide effettua in un determinato momento. Infatti, come un medico dall’analisi delle feci e delle urine di un paziente è in grado di comprendere alcuni parametri fisiologici dello stesso, l’analisi delle protuberanze dello sferoide potrebbe informare sullo stato di vitalità dello sferoide. Quindi, a riguardo delle protuberanze, nel “livello I” della tassonomia prevista si fornisce semplicemente informazioni sulla presenza/assenza di protuberanze, mentre nel “livello II” si passa ad analizzarle. Allo stesso modo ci si potrebbe informare sulla tipologia di rigonfiamenti in modo da interpretare lo stato di salute di uno sferoide. Infatti anche solo andando ad analizzare la quantità e le dimensioni di rigonfiamenti si potrebbero evidenziare degli indici in grado di rappresentare il livello di salute dello sferoide.

3.7 Albero delle classi

Dall’analisi di tutte le *features* elencate in precedenza, possiamo passare alla definizione delle varie classi di sferoidi presi in esame. L’albero delle classi così formato conterrà tutte le possibili combinazioni delle *features* sopra elencate. Partendo dalla tassonomia di livello I possiamo così definire l’albero delle classi (Figura 3.10).

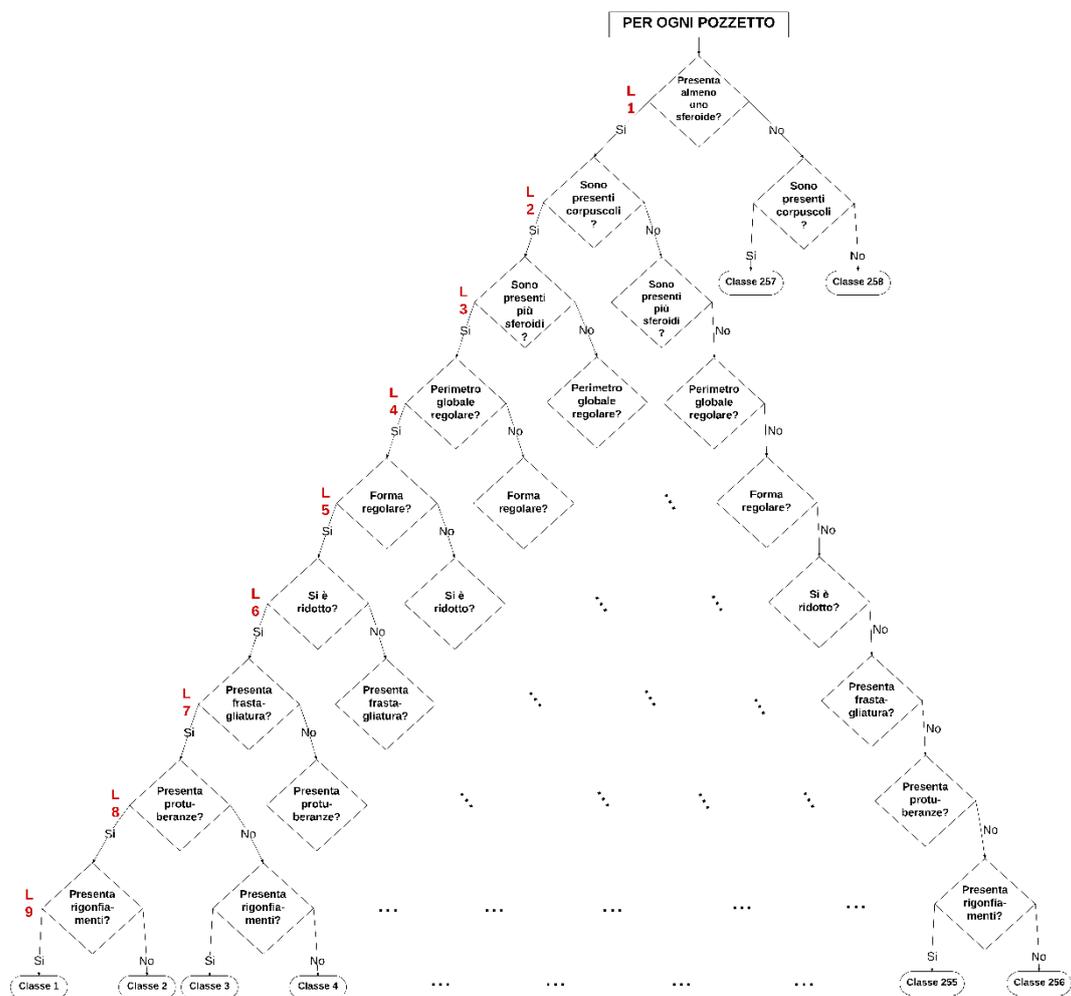


Figura 3.10: albero delle classi per classificare il contenuto di ogni pozzetto.

Le classi finali di un albero sono pari al numero di nodi foglia (ovvero i nodi che non presentano archi uscenti) e per essere calcolate, in caso di albero uniforme (albero con fattore di ramificazione costante), basta elevare il fattore di ramificazione al numero di livelli dell'albero. Quindi un albero con fattore di ramificazione 2 e numero di livelli pari a 9 possiede $2^9=512$ classi. Nel caso analizzato l'albero delle classi, pur possedendo fattore di ramificazione pari a 2 e numero di livelli pari a 7 possiede solo 258 classi, in quanto se al primo livello la risposta al quesito "E' presente almeno uno sferoide?" è No, abbiamo come foglie solo due classi a seconda se sono presenti o meno corpuscoli.

Nel nostro specifico caso, pur avendo previsto due livelli di tassonomia, ci siamo soffermati al Livello I. Ma la classificazione potrebbe essere fatta anche per ogni

protuberanza dello sferoide principale seguendo la tassonomia di Livello II. L'albero delle classi relative ad ogni protuberanza è lo stesso riportato in Figura 3.10 dove però non vengono considerate le protuberanze nelle protuberanze e le *features* considerate sono solo quelle dei livelli 4, 5, 6 e 7. Eventualmente potrebbe essere considerata anche la *densità*.

Vediamo alcuni esempi di classificazione.

Esempio 1:

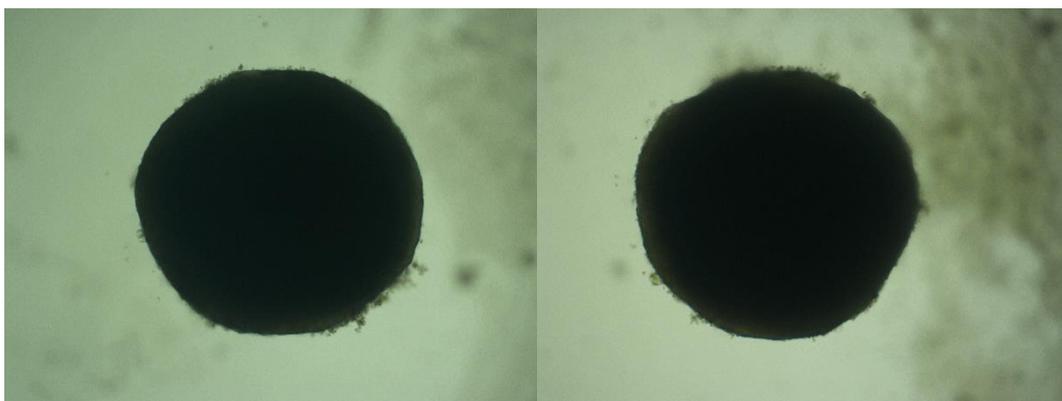


Figura 3.11: sferoide singolo di forma circolare e perimetro regolare catturato in due giorni consecutivi d'acquisizione.

Per eseguire una corretta classificazione è necessario osservare lo sferoide nell'acquisizione precedente, in modo da stabilire se le sue dimensioni sono diminuite o rimaste invariate. Seguendo l'albero delle classi lo sferoide a destra in Figura 3.11 risulterebbe avere la seguente tassonomia:

- è presente almeno uno sferoide? Si;
- sono presenti corpuscoli? No;
- sono presenti più sferoidi? No;
- il perimetro globale è regolare? Si;
- la forma di base è regolare? Si;
- l'area dello sferoide si è ridotta? No;
- presenta frastagliature? No;
- presenta protuberanze? No;
- presenta rigonfiamenti? No.

Esempio 2:

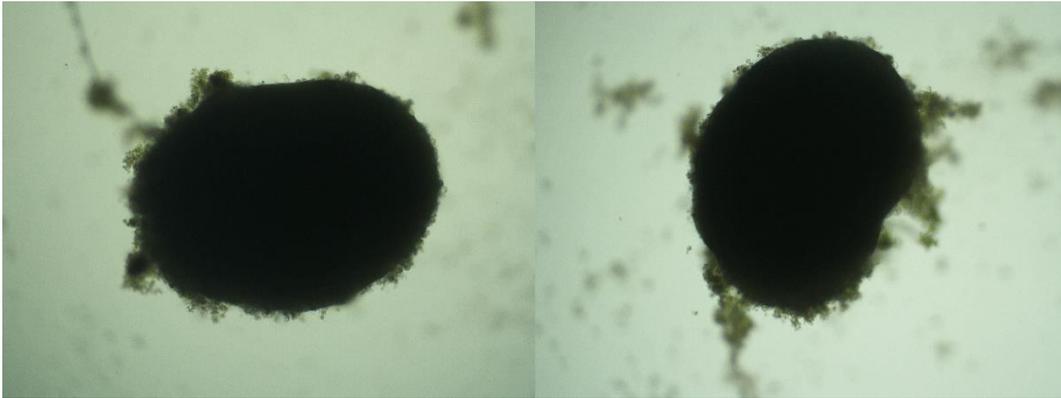


Figura 3.12 Sferoide di forma ellittica con presenza di frastagliature e protuberanze catturato in due giorni consecutivi d'acquisizione.

Lo sferoide a destra in Figura 3.12 verrebbe invece classificato nel seguente modo:

- è presente almeno uno sferoide? Si;
- sono presenti corpuscoli? Si;
- sono presenti più sferoidi? No;
- il perimetro globale è regolare? Si;
- la forma di base è regolare? Si;
- l'area dello sferoide si è ridotta? Si;
- presenta frastagliature? Si;
- presenta protuberanze? Si;
- presenta rigonfiamenti? No.

3.8 Tassonomia semplificata

Una volta individuata una tassonomia completa atta a classificare i diversi tipi di sferoide, abbiamo valutato la possibilità di effettuare una riduzione di complessità dell'albero delle classi. Questa riduzione è necessaria per concentrare il *focus* esclusivamente su quelle poche *features* che si pensa essere realmente indicative di parametri biologici degli sferoidi. Grazie a questa semplificazione risulterà più semplice iniziare a comprendere l'approccio di classificazione ideato, e quindi cercare di correlare le varie caratteristiche morfologiche osservate ai vari trattamenti radioterapici subiti dai differenti sferoidi. Nulla vieta in seguito di

ripristinare *features* ora tralasciate. Le *features* identificate per effettuare questo studio pilota saranno quindi quelle che si presuppone essere “più correlate” a parametri biologici d’interesse.

La semplificazione studiata porta al seguente albero delle classi (Figura 3.13):

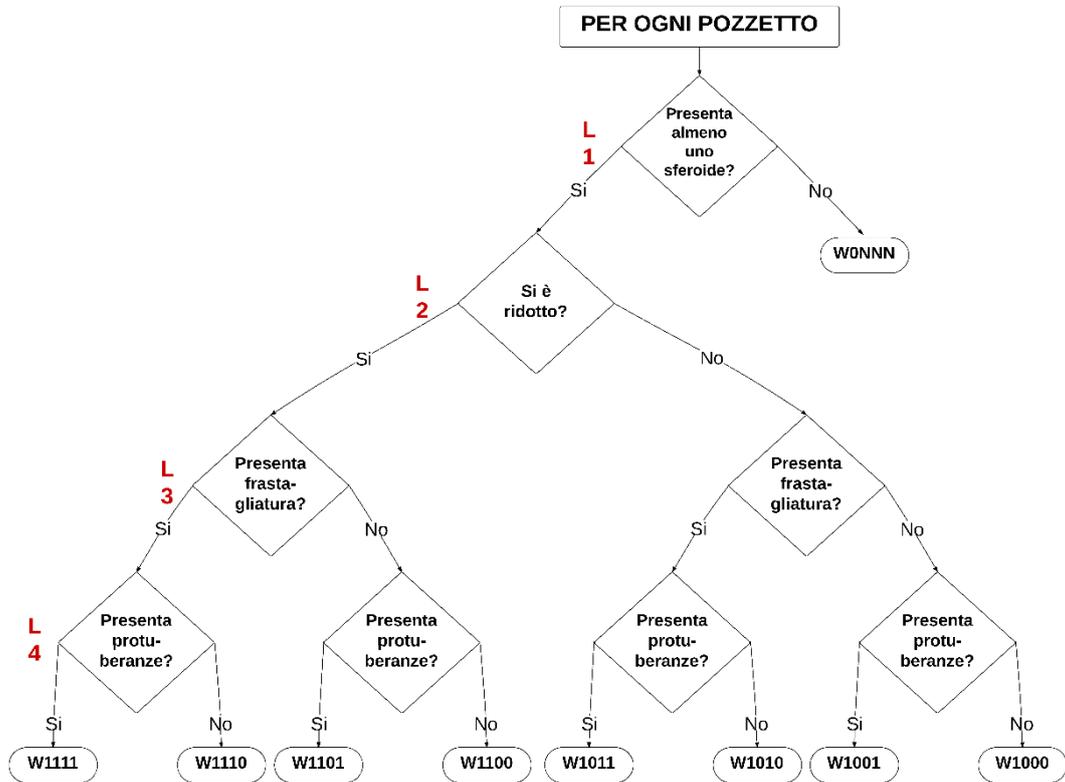


Figura 3.13: albero delle classi in versione semplificata. Per ogni classe è riportato il nome definito seguendo specifica nomenclatura.

Le caratteristiche scelte nella tassonomia semplificata possono essere osservate in Figura 3.13. L’unica anomalia rispetto all’albero precedente riguarda le protuberanze. All’interno della categoria “protuberanza” infatti sono stati inclusi anche i rigonfiamenti di grossa entità. I rigonfiamenti più piccoli sono stati trascurati dallo studio.

Per identificare in maniera sintetica le varie classi abbiamo definito una nomenclatura compatta per denominare le singole classi, riassuntiva delle caratteristiche prese in considerazione. La nomenclatura proposta è stata generata nel seguente modo per includere anche una eventuale futura estensione dell’albero ripristinando altre *features* attualmente trascurate.

- La prima posizione è occupata da una lettera rappresentativa di cosa viene analizzato. Attualmente si riporta una lettera W per indicare che ci si riferisce ad un pozzetto (in inglese *Well*) nella sua generalità. In futuro, a seconda di cosa viene analizzato, la lettera potrà essere specificata in:
 - S sferoide principale;
 - P protuberanza.
- Il successivo carattere è un *bit* che indica se nel pozzetto è presente almeno uno sferoide. Nel caso di assenza di sferoide la classe è definita come W0NNN (si è scelta la lettera “N” per indicare che è un *bit* di valore “Non definito”).
- I successivi tre *bit* vengono utilizzati per indicare le combinazioni delle altre *features* analizzate, considerando il caso più normale di sferoide che riduce le sue dimensioni rispetto all’acquisizione precedente, con assenza di frastagliature e protuberanze come lo sferoide W1100 e al contrario il più anomalo, ovvero quello che rimane di dimensioni invariate e che possiede frastagliatura e protuberanze come lo sferoide W1011.
- A seguito potranno essere aggiunti altri tre *bit* nell’ipotesi di uno studio completo seguendo tassonomia estesa.

Nell’albero delle classi in Figura 3.13 sono riportati i nomi codificati delle 9 classi realmente utilizzate in questo studio pilota.

Capitolo 4

Image processing

Con il termine inglese “*Image Processing*” si considerano tutti quei processi di elaborazione dati che partendo da un’immagine ricevuta in ingresso, restituiscono in uscita una o più immagini correlate alla prima, ma con caratteristiche modificate in base allo scopo dell’algoritmo applicato. Nel caso in questione, è stato sviluppato un algoritmo che, partendo da un’immagine grezza raffigurante uno sferoide multicellulare acquisito utilizzando un microscopio a luce, fornisce in uscita un’immagine binaria (“*Black and White*” - BW) risultato della segmentazione e identificazione dei singoli *pixels* facenti parte dello sferoide principale (rappresentati in nero). L’algoritmo in questione è in grado di creare maschere BW sia relative allo sferoide principale, sia alle eventuali protuberanze presenti. Tutti gli algoritmi realizzati per questo studio sono stati creati mediante il linguaggio di programmazione Matlab.

In Figura 4.1 è riportato lo schema a blocchi degli *step* principali dell’algoritmo.

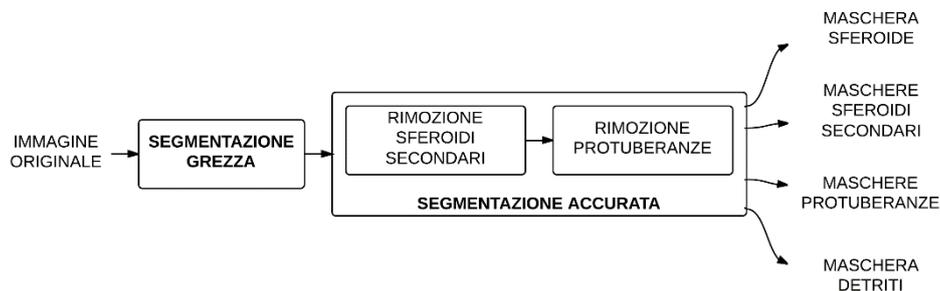


Figura 4.1: schema a blocchi dell’algoritmo di segmentazione.

4.1 Segmentazione grezza

In questa fase alcune tecniche *standard* tipiche dell’elaborazione delle immagini sono utilizzate allo scopo di individuare i *pixels* dello sferoide principale, segmentando in maniera “grezza” il corpo principale dello sferoide dallo sfondo (*background*). In uscita si ottiene una maschera BW grezza che sovrastima le dimensioni reali dello sferoide. In particolare, è stato utilizzato il metodo di segmentazione globale di Otsu [Otsu N. 1975] per individuare i *pixels* del *background*, tipicamente particolarmente luminosi nelle immagini acquisite con un normale microscopio a luce trasmessa. Nel metodo di segmentazione di Otsu l’immagine viene segmentata globalmente analizzando l’istogramma. Esso viene considerato formato da due curve gaussiane sovrapposte, una relativa al *background* e una relativa allo sferoide (*foreground*). Per poter funzionare correttamente occorre quindi che l’istogramma sia effettivamente di tipo bimodale con l’immagine di conseguenza formata da due classi distinte di *pixels* facenti parte del *foreground* e del *background*. Il valore globale di soglia viene identificato in modo da minimizzare la varianza intraclassa.

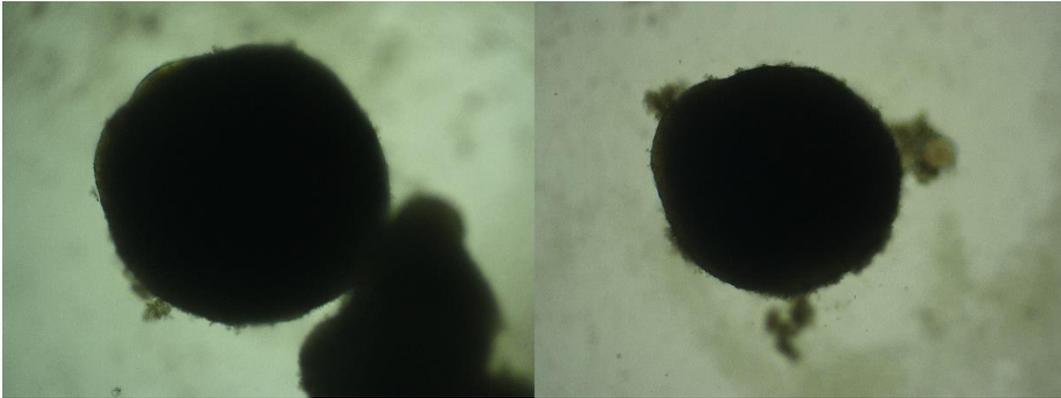


Figura 4.2: esempi di alcune immagini di sferoidi acquisiti con un microscopio a luce.

Ad esempio partendo dalle immagini in Figura 4.2 applicando il metodo di segmentazione di Otsu, si ottengono le maschere riportate in Figura 4.3.

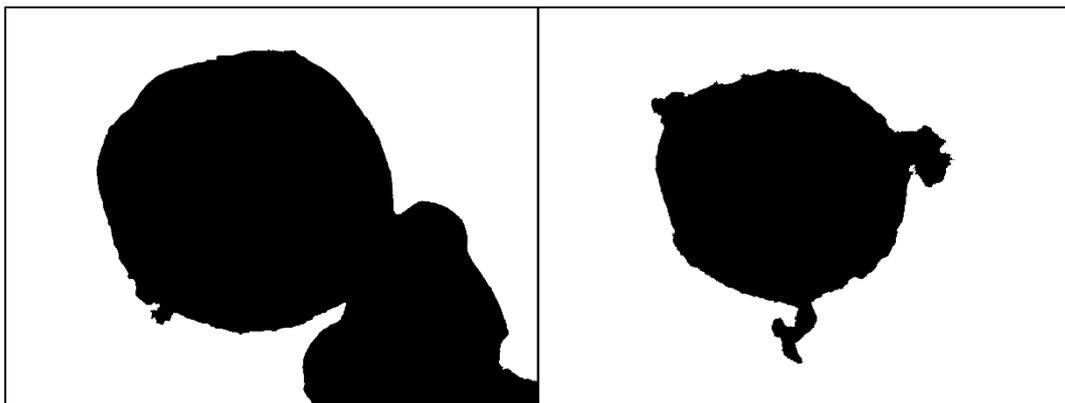


Figura 4.3: esempi di maschere ottenute mediante il metodo di segmentazione di Otsu.

Come è possibile apprezzare, la segmentazione così ottenuta fornisce dunque in uscita una maschera che sovrastima le reali dimensioni dello sferoide in quanto nella regione nera vengono inclusi tutti i *pixels*:

- dello sferoide principale;
- eventuali sferoidi secondari attaccati;
- eventuali protuberanze.

Partendo dalla maschera “grezza” così ottenuta, lo scopo principale dei passaggi successivi sarà raffinare la maschera individuando ed eliminando i *pixels*:

- degli sferoidi secondari;

- delle protuberanze, al fine di consentire una buona valutazione della frastagliatura dello sferoide principale e poterle classificare in seconda istanza.

4.2 Segmentazione accurata

Individuare ed eliminare dalla maschera dello sferoide principale eventuali sferoidi secondari e protuberanze è di fondamentale importanza al fine di valutare con precisione caratteristiche morfometriche d'interesse. Infatti queste, se prese in considerazione insieme al resto della struttura, porterebbero ad una analisi sbagliata di alcune caratteristiche quali forma e bordo, inficiando il resto della classificazione.

Nelle prossime sezioni verranno illustrati i processi utilizzati per identificare e eliminare queste strutture definite come “secondarie”.

4.2.1 Corona di bordo

Al fine di identificare sferoidi secondari o protuberanze, il primo passo consiste nel definire ed analizzare la corona di bordo dello sferoide principale. Per identificare la corona del bordo dello sferoide principale è stata eseguita un'operazione di *opening* partendo dalla maschera BW ottenuta mediante il metodo di Otsu. L'*opening* è definito come un unico operatore morfologico che prevede in sequenza l'esecuzione dei due operatori morfologici di base erosione e dilatazione.

$$A \circ B \equiv (A \oplus B) \ominus B \quad 4.1$$

A è la maschera BW ottenuta tramite il metodo di segmentazione di Otsu. B è l'elemento strutturale (*kernel*) utilizzato per eseguire in cascata l'erosione e la dilatazione.

Nel caso in questione, per ricavare la corona di bordo devo eliminare tutto ciò che non è incluso nel “nucleo” dello sferoide principale, che in seguito verrà definito

appunto come “nucleo”. Per farlo è stata impostata la dimensione dell’elemento strutturale al 60% della massima dimensione di tutto lo sferoide. In questo modo si è quasi certi di ottenere esclusivamente il “nucleo” dello sferoide privato delle sue anomalie di bordo (Figura 4.4).

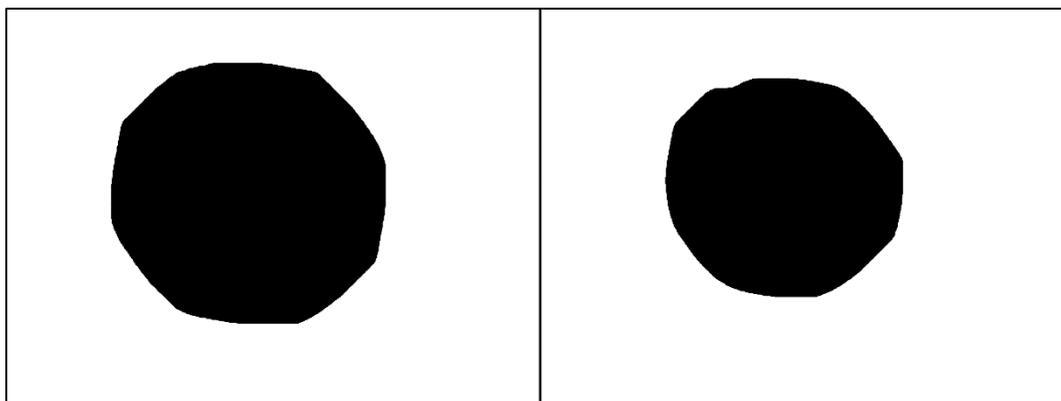


Figura 4.4: versione modificata tramite *opening* delle maschere in Figura 4.3.

La maschera BW ottenuta mediante l’algoritmo di segmentazione Otsu viene quindi confrontata con l’immagine del “nucleo” ottenendo tramite differenza un’immagine rappresentativa delle sottostrutture eliminate lungo il bordo. Da ora in avanti chiameremo questa maschera “corona di bordo”.

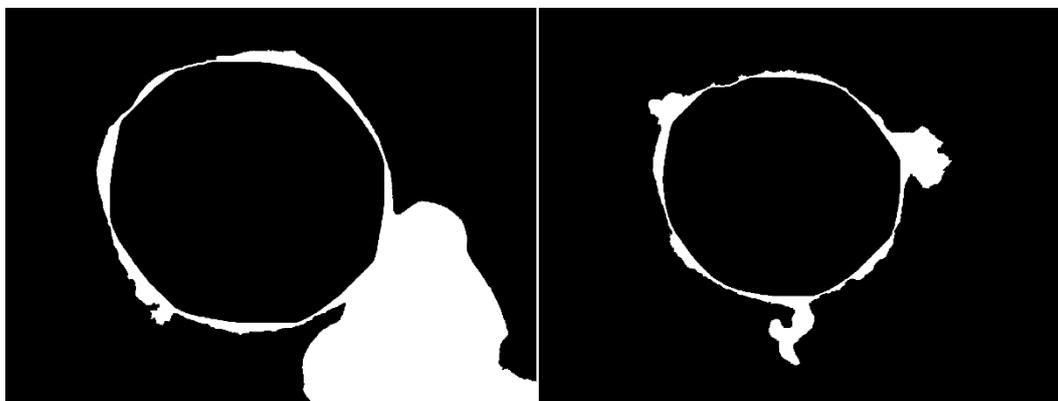


Figura 4.5: corona di bordo rappresentativa delle anomalie identificate lungo il bordo dello sferoide principale.

4.2.2 Direzioni d'interesse

La principale caratteristica della “corona di bordo” è mettere in risalto le strutture anomale identificate lungo il bordo dello sferoide principale. Queste potranno essere analizzate andando a quantificare il numero di *pixels* bianchi presenti in ciascuna direzione radiale. L'algoritmo di quantificazione realizzato segue i seguenti passi principali:

- individuare il centro dell'immagine “nucleo” denominato $C(I,J)$;
- costruire una “*struct*” di Matlab di 360 elementi, uno per ogni angolo, dove ogni elemento è costituito da una coppia di punti (x,y) . Queste coppie contengono le coordinate dell'ultimo *pixel* bianco appartenente all'immagine “corona di bordo” controllando tutte le “direzioni radiali” dell'immagine variando l'angolo di analisi del raggio dello sferoide principale con fulcro in $C(I,J)$;
- contare il numero di *pixels* bianchi presenti su ciascuna direzione radiale all'interno della “corona di bordo”;
- individuare le direzioni radiali con più alto valore di *pixels* bianchi, confrontandoli con il valore medio di *pixels* bianchi presenti in tutte le direzioni radiali;
- segnalare le direzioni radiali che superano la soglia denominandole “direzioni d'interesse”.

Saranno proprio queste direzioni d'interesse le candidate a contenere il punto di contatto tra sferoide principale e sferoidi secondari o protuberanze. (Figura 4.6).

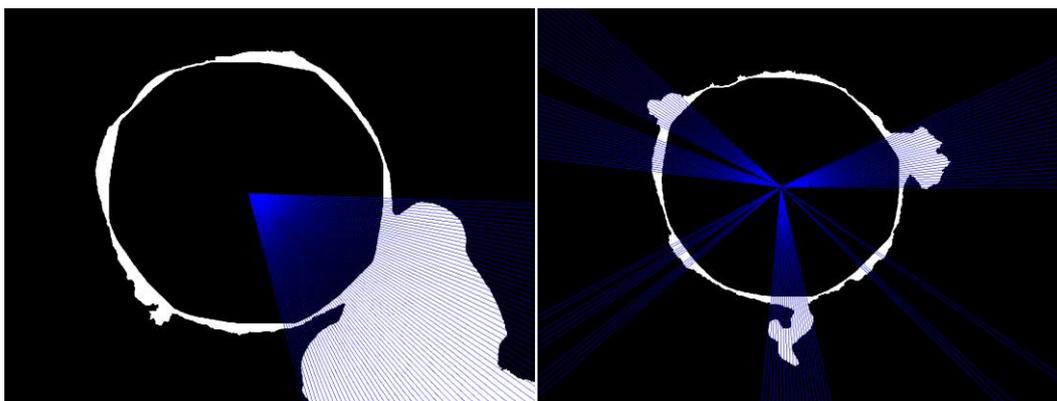


Figura 4.6: in blu sono rappresentate le direzioni d'interesse individuate. Queste potrebbero contenere delle anomalie da eliminare.

4.2.3 Stima dei raggi

Le anomalie contenute sul bordo dello sferoide primario, nelle direzioni d'interesse, se riconosciute tali, dovranno essere rimosse dalla maschera finale dello sferoide principale. Per farlo si dovrà letteralmente “tagliare” la maschera in oggetti distinti ed eliminare tutti gli oggetti non desiderati a partire dalla maschera ottenuta tramite il metodo di Otsu.

Per farlo bisogna prima di tutto definire cos'è il “raggio dello sferoide”. Si definisce “raggio dello sferoide” la distanza tra il centro e l'ultimo *pixel* appartenente allo sferoide, in una determinata direzione radiale. Logicamente non essendo gli “sferoidi” realmente di forma sferica (infatti sarebbe più adeguato denominare queste strutture semplicemente aggregati multicellulari) la loro proiezione 2D spesso non risulta essere una circonferenza e di conseguenza il raggio varia al variare dell'angolo.

Nelle direzioni d'interesse il raggio così definito terrebbe conto anche della presenza di sferoidi secondari e di protuberanze. Diventa quindi necessario modificarlo, in modo da “ricostruire” il raggio che lo sferoide avrebbe in assenza delle strutture precedentemente citate.

Individuando così il presunto raggio reale dello sferoide nelle direzioni d'interesse, si potrà passare al taglio delle anomalie lungo il bordo.

I raggi dello sferoide in ogni direzione verranno così individuati:

- nelle direzioni radiali non selezionate tra quelle d'interesse il raggio dello sferoide verrà trovato semplicemente seguendo la definizione precedentemente data;
- nelle direzioni d'interesse il raggio verrà ricostruito a partire dai due raggi presenti subito prima e subito dopo l'anomalia tramite una semplice formula:

$$\forall r_i \in \theta, \quad r_i = r_{i-1} + \frac{r_2 - r_1}{\theta} \quad 4.2$$

dove r_1 e r_2 rappresentano i raggi dello sferoide subito prima e subito dopo l'anomalia, r_i rappresenta l' i -esimo raggio da ricostruire e θ rappresenta l'angolo che racchiude le direzioni dell'anomalia. In Figura 4.7 è rappresentato un esempio di ricostruzione del raggio nelle direzioni d'interesse.

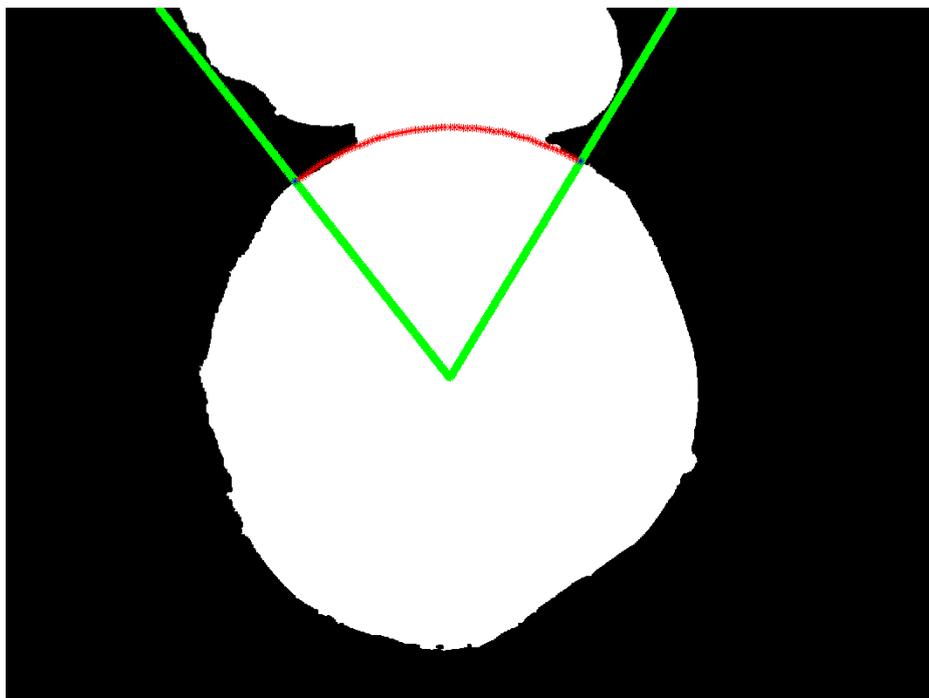


Figura 4.7: esempio di ricostruzione del raggio nelle direzioni d'interesse. In verde sono rappresentate le direzioni subito prima e subito dopo l'anomalia, i due punti in blu rappresentano i raggi in queste direzioni e i punti in rosso rappresentano i raggi ricostruiti nella direzione d'interesse.

Alla fine del processo si ottiene, in ogni direzione radiale, il probabile raggio che individua l'ultimo *pixel* appartenente allo sferoide principale (Figura 4.8).

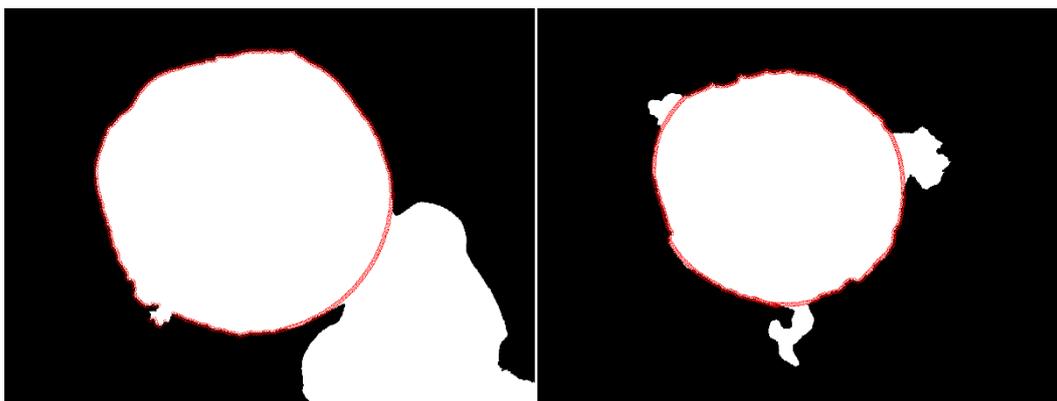


Figura 4.8: in rosso è rappresentato il probabile raggio che individua l'ultimo pixel appartenente allo sferoide principale.

4.2.4 Sferoidi secondari

Partendo dalla conoscenza delle direzioni d'interesse e avendo messo a punto uno strumento per isolare le "anomalie" in caso di necessità, si cerca di individuare ed eliminare i *pixels* facenti parte di eventuali sferoidi secondari. Questi, se presenti e non eliminati, potrebbero eventualmente essere confusi come "protuberanze", generando una erronea analisi. Lo schema seguito per analizzare le anomalie sarà quello di isolarle a prescindere, in modo da poterle analizzare e successivamente, se risulteranno essere etichettate come sferoidi secondari (vedi caratteristiche elencate a seguito), archivarle come tali ed eliminarle dal bordo dello sferoide principale. Il controllo viene effettuato andando ad analizzare le seguenti semplici caratteristiche:

- rapporto tra area dell'anomalia e area dello sferoide principale, prendendo in considerazione solo strutture di dimensione paragonabile a quella dello sferoide principale;
- confronto tra perimetro anomalia e lunghezza dell'arco di approssimazione che la interessa, ricercando così strutture che si differenziano sostanzialmente da un bordo regolare.

Analizzando queste caratteristiche, si ricercano quindi strutture di dimensioni non trascurabili, sostanzialmente differenti dal perimetro regolare dello sferoide che, come detto in precedenza, verranno archiviate e rimosse dal bordo. Esempi della segmentazione appena descritta sono riportati nelle figure seguenti, da confrontare con le maschere precedentemente presentate.

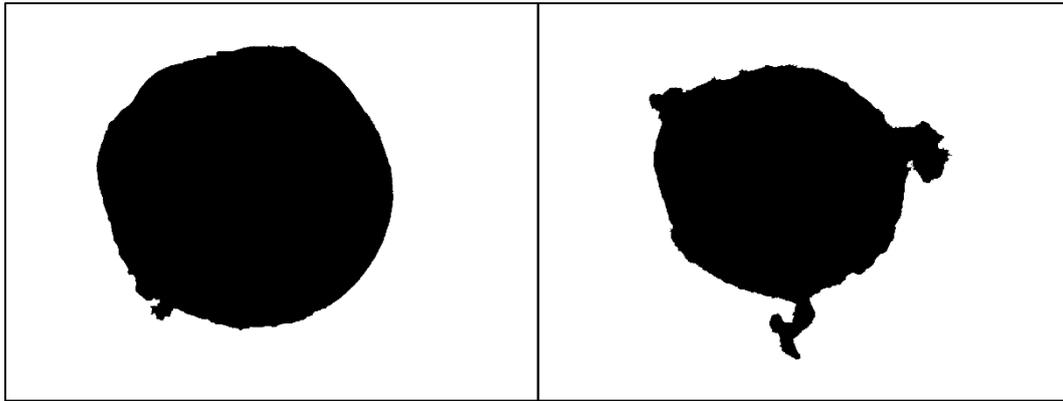


Figura 4.9: maschera ottenuta eliminando gli sferoidi secondari.

Come possiamo notare dalla Figura 4.9 gli sferoidi secondari vengono rimossi correttamente mentre le protuberanze sono mantenute inalterate.

4.2.5 Protuberanze

Un simile processo di segmentazione viene eseguito anche per individuare eventuali protuberanze presenti. Anche queste vengono individuate analizzando caratteristiche locali del bordo nelle direzioni d'interesse, ma solo in quelle direzioni non già analizzate nel corso della ricerca degli sferoidi secondari. Questa segmentazione viene eseguita sulla base di semplici regole:

- confronto tra perimetro anomalia e lunghezza dell'arco di approssimazione che la interessa, individuando anomalie che si differenziano sostanzialmente dal bordo regolare;
- *chain-code* dell'anomalia controllando che le “transizioni brusche” avvengano con una certa frequenza dove le transizioni brusche sono delle repentine modifiche nella direzione del perimetro.

Il *chain-code* è un algoritmo *standard* tipicamente utilizzato per rappresentare il perimetro di un oggetto tramite una sequenza numerica. Quest'algoritmo riceve in ingresso il perimetro ricavato mediante la *function* di Matlab “*bwboundaries*” che estrae il perimetro esterno di un immagine binaria a partire dal *pixel* più vicino al *pixel* (0,0) e si muove in senso orario. Quindi il *chain-code*, a partire da questa sequenza ordinata di punti contigui sul perimetro dell'oggetto, ricava una sequenza numerica rappresentativa della “direzione” da seguire per spostarsi tra due *pixels*

adiacenti sul perimetro. Le direzioni possibili, corrispondono a tutti i possibili spostamenti effettuabili da un punto ad un altro all'interno dell'immagine. Essendo quindi tipicamente un'immagine in 2 dimensioni questi spostamenti risultano 8. Ad ogni direzione viene assegnato un caratteristico valore identificativo osservabile in Figura 4.10.

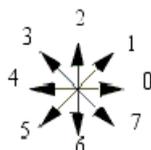


Figura 4.10: valore delle 8 direzioni quantizzate necessarie per rappresentare il perimetro tramite *chain-code* – Tratta da Wikipedia.

Quindi si definisce:

- “direzione”: uno degli 8 spostamenti effettuabili muovendosi da un *pixel* ad un altro (nel caso bidimensionale);
- “direzioni contigue”: due direzioni limitrofe rappresentate in Figura 4.10;
- “transizione”: una sequenza ordinata di due direzioni presenti nel *chain-code*;
- “distanza di una transizione”: il numero minimo di direzioni che include la transizione, immaginando di potersi spostare esclusivamente tramite direzioni contigue (escludendo la direzione di partenza).

Quindi una transizione $7 \rightarrow 6$ ha una distanza pari a 1, così come una transizione $7 \rightarrow 0$; mentre una transizione $7 \rightarrow 5$ ha una distanza pari a 2. Si definiranno quindi “transizioni brusche” tutte le transizioni a distanza maggiore di 1, dove il massimo è rappresentato dalla distanza 4. Ad esempio in un *chain-code* rappresentato dalla seguente sequenza *77767074757* si hanno le seguenti transizioni:

- $7 \rightarrow 7$, $7 \rightarrow 6$, $6 \rightarrow 7$, $7 \rightarrow 0$, $0 \rightarrow 7$ che vengono considerate transizioni non brusche in quanto a distanza 1;
- $7 \rightarrow 4$, $4 \rightarrow 7$, $7 \rightarrow 5$, $5 \rightarrow 7$ vengono considerate transizioni brusche in quanto a distanza maggiore di 1. Logicamente queste transizioni peseranno in modo proporzionale alla loro distanza nell'individuare la frastagliatura di un oggetto.

L'algoritmo del *chain-code* può essere utilizzato, quindi, come una sorta di “indice di frastagliatura” del perimetro di un oggetto. Questo indice può essere ricostruito

andando a ricercare all'interno del *chain-code* le “transizioni brusche” pesate in base alla loro distanza.

La differenza sostanziale tra protuberanza e sferoide secondario infatti risiede, oltre che nella dimensione, anche nelle caratteristiche locali del bordo: il bordo delle protuberanze di solito risulta più frastagliato del bordo degli sferoidi secondari.

Le anomalie presenti nelle direzioni d'interesse che avranno queste caratteristiche verranno archiviate come protuberanze e quindi rimosse dal bordo dello sferoide principale.

4.2.6 Detriti

Per ottenere la maschera BW dei detriti bisogna partire dall'immagine originale ed eliminare la regione inerente lo sferoide e le sue strutture attaccate al bordo (utilizzando la maschera BW in uscita dalla segmentazione grezza). Questo processo è necessario per porre in risalto le strutture presenti nel terreno di coltura, che eliminando le regioni appartenenti allo sferoide risulteranno immediatamente isolabili mediante semplice sogliatura.

Quindi a partire dall'immagine della segmentazione grezza (Figura 4.11), ottengo mediante semplice prodotto l'immagine in Figura 4.12.

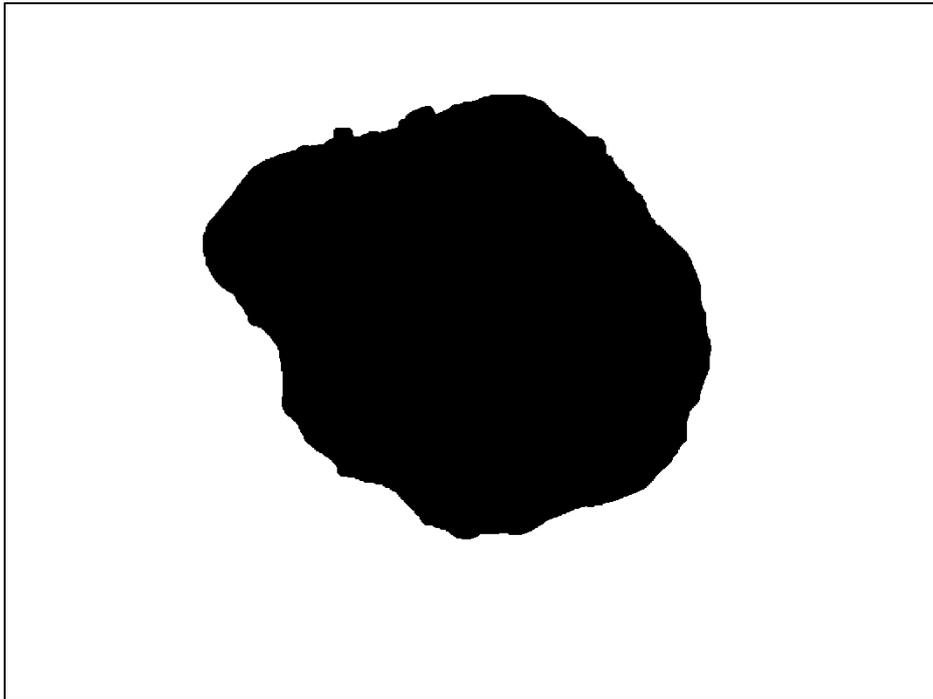


Figura 4.11: maschera BW della segmentazione grezza di uno sferoide.

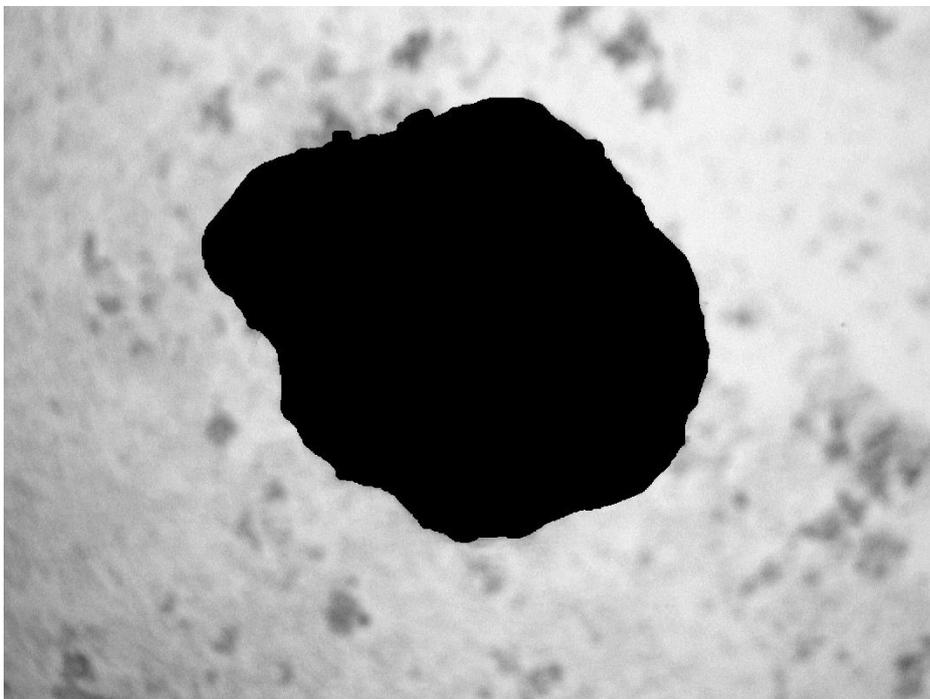


Figura 4.12: immagine ottenuta tramite semplice prodotto *pixel a pixel* tra l'immagine originaria e la maschera BW inerente la segmentazione grezza.

In questo modo a partire dall'immagine in Figura 4.12 si può stabilire il color medio del *foreground* escludendo dall'analisi i *pixels* neri presenti. Successivamente tramite una semplice sogliatura, effettuata a partire dal valor medio del colore presente nel *foreground* si ottiene l'immagine in Figura 4.13.

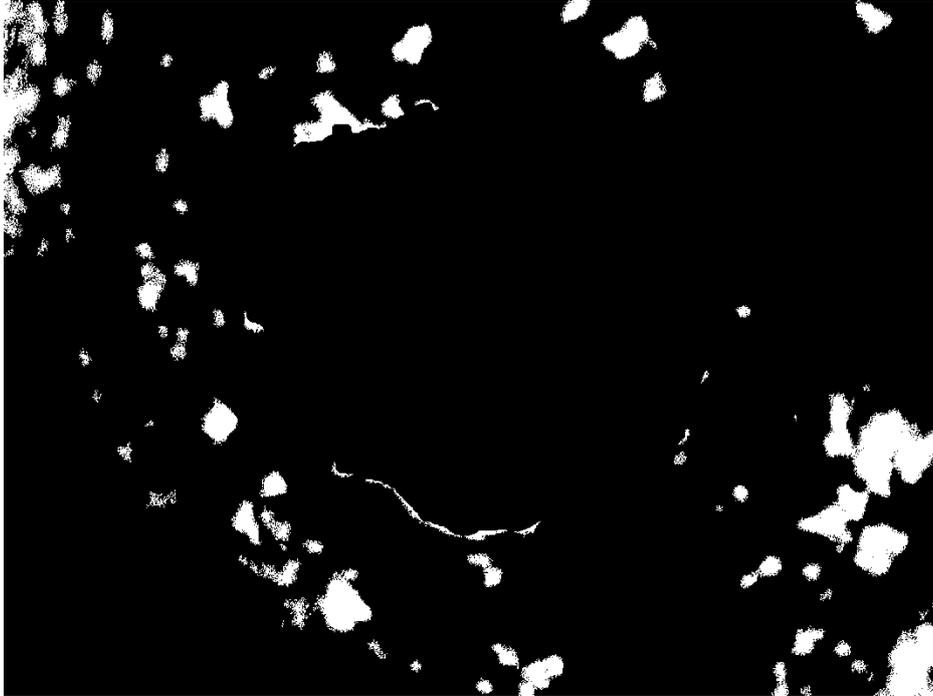


Figura 4.13: maschera BW rappresentante i detriti (*pixels* bianchi).

4.3 Salvataggio delle maschere

In questo ultimo passaggio vengono salvate singolarmente tutte le maschere d'interesse create ottenendo tre tipi diversi di maschere:

1. maschera dello sferoide principale;
2. tutte le singole maschere degli eventuali sferoidi secondari presenti;
3. tutte le singole maschere delle eventuali protuberanze presenti;
4. maschera dei detriti presenti nel *foreground*.

In Figura 4.15, Figura 4.16, Figura 4.17 e Figura 4.18 sono rappresentate le maschere realmente salvate quando viene ad esempio segmentata l'immagine riportata come esempio in Figura 4.14.

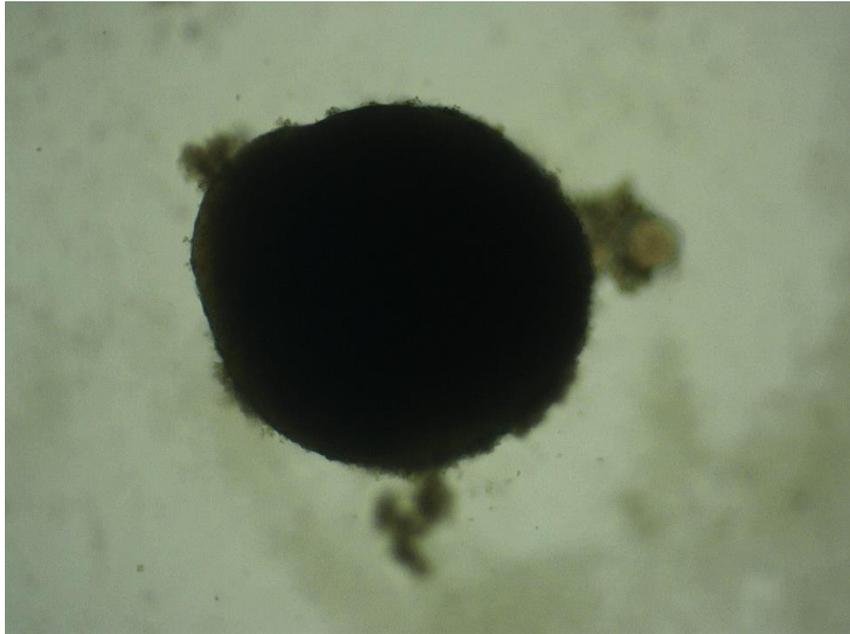


Figura 4.14: esempio di sferoide in ingresso.

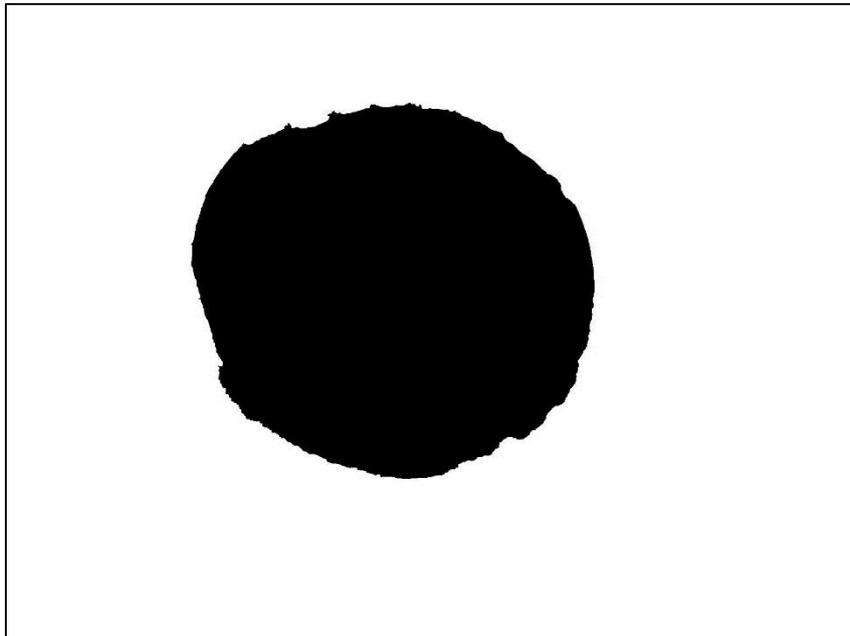


Figura 4.15: esempio di maschera dello sferoide principale in uscita dall'algoritmo, riferita all'ingresso in Figura 4.14.

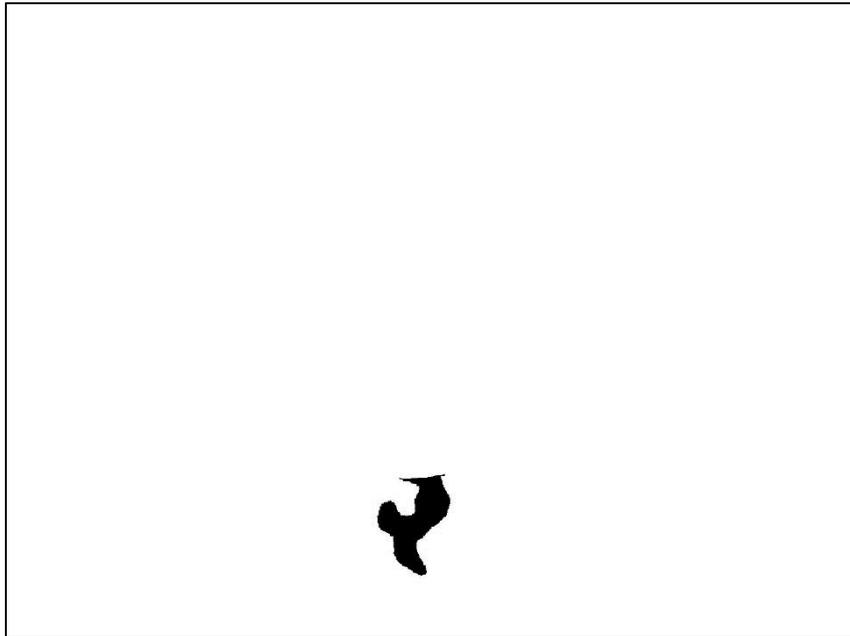


Figura 4.16: esempio di maschera di una protuberanza in uscita all' algoritmo estratta dall'immagine in Figura 4.14.

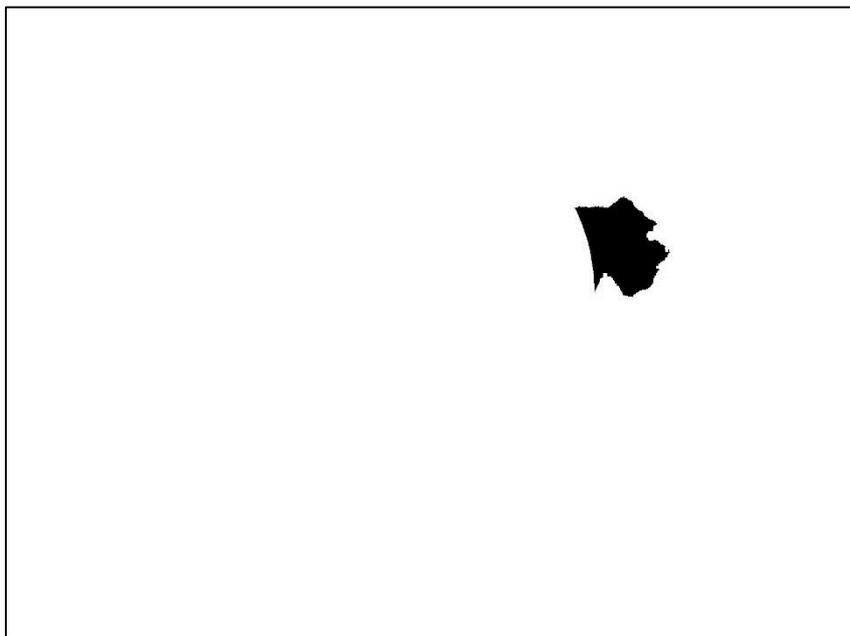


Figura 4.17: esempio di maschera di una protuberanza in uscita all' algoritmo estratta dall'immagine in Figura 4.14.

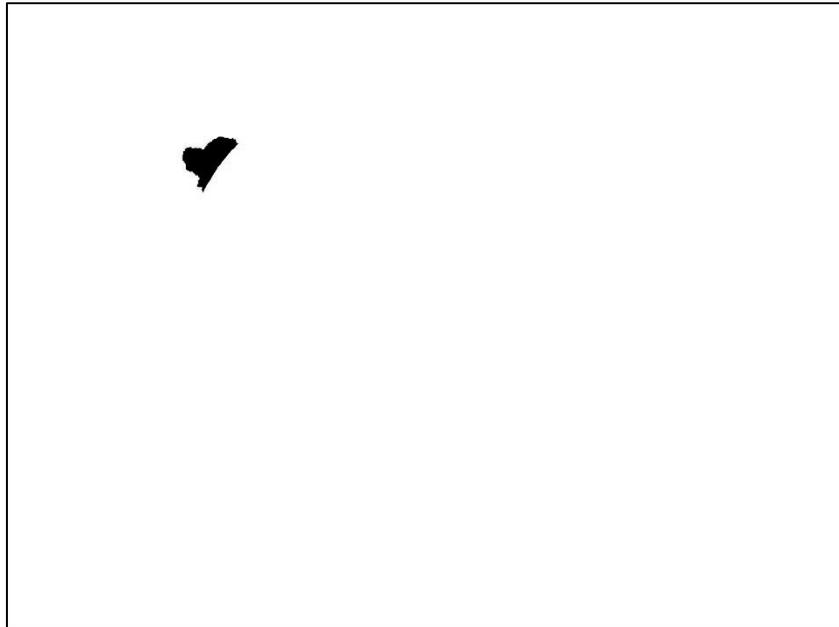


Figura 4.18: esempio di maschera di una protuberanza in uscita all' algoritmo estratta dall'immagine in Figura 4.14.

Come possiamo notare non verrà salvata alcuna maschera inerente i detriti in quanto essi non sono presenti nel *foreground* dell'immagine originaria.

L'algoritmo quindi verrà eseguito su tutto un *set* di immagini da analizzare e le maschere create saranno salvate in maniera automatica all'interno di una cartella, riportando nel nome delle maschere il nome dell'immagine in ingresso. In caso di maschere multiple riferite alla stessa immagine, verrà attribuita una numerazione aggiuntiva sequenziale per distinguerle.

Capitolo 5

Image analysis

Si definiscono algoritmi di “*image analysis*” tutti quegli algoritmi in grado di estrarre informazioni d’interesse partendo da un’immagine (grezze o già precedentemente processata). Le informazioni estratte vengono tipicamente utilizzate per compiere studi approfonditi su caratteristiche dell’immagine originale in analisi.

Nel nostro caso specifico, l’algoritmo riceve in *input* le maschere BW degli sferoidi principali (ottenute come descritto nel Capitolo 4) e fornisce in *output* una “scheda paziente” compilata per ogni sferoide analizzato, contenente indici numerici relativi a caratteristiche d’interesse come dimensione dell’area, lunghezza del perimetro, etc.

In particolare, questi indici estratti analizzando le maschere degli sferoidi, sono rappresentativi delle caratteristiche elencate nel Capitolo 3, in modo da riuscire a classificare correttamente gli sferoidi in classi definite sulla base di queste caratteristiche d’interesse.

In Figura 5.1 è riportato lo schema a blocchi rappresentativo dell’algoritmo utilizzato per estrarre informazioni sulle caratteristiche di interesse.

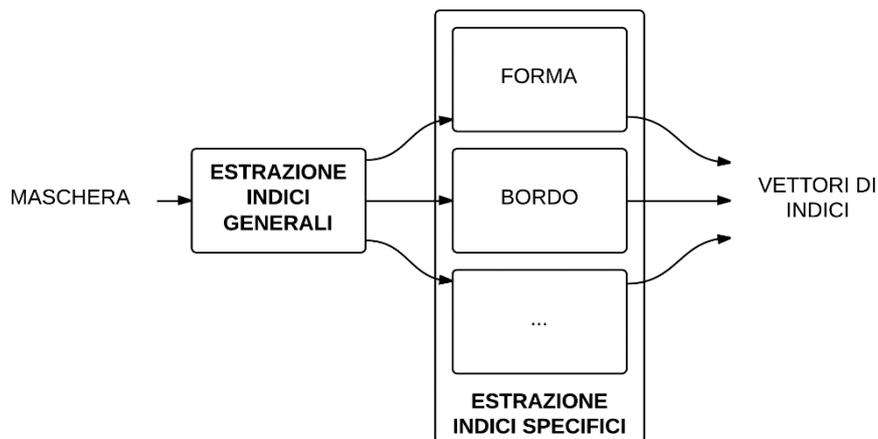


Figura 5.1: schema a blocchi dell'algoritmo di *Image Analysis*.

In questo studio abbiamo analizzato le maschere relative agli sferoidi principali. Eventualmente si potrebbero analizzare anche le protuberanze, e la struttura dell'algoritmo risulterebbe molto simile.

Delle caratteristiche riportate nel Capitolo 3, analizzeremo esclusivamente quelle riportate di seguito.

- La forma dello sferoide, definita semplicemente come:
 - regolare;
 - irregolare.
- Il perimetro dello sferoide che può contenere o non contenere:
 - protuberanze;
 - frastagliatura.
- L'area:
 - dello sferoide;
 - dei corpuscoli in sospensione.

Per poter classificare gli sferoidi sulla base di queste caratteristiche occorre individuare indici rappresentativi di forma e perimetro, in modo da consentire nella fase successiva una buona classificazione. Per quanto concerne l'area non vi è bisogno di caratterizzare un indice particolare in quanto la sua semplice misura rappresenta già la caratteristica d'interesse.

5.1 Estrazione di indici generali

In una prima fase, alcuni indici su caratteristiche generali dello sferoide sono stati estratti semplicemente utilizzando la funzione *regionprops* di Matlab. Gli indici riguardano:

- dimensione dell'area;
- posizione del centroide;
- lunghezza del perimetro;
- eccentricità;
- angolo tra asse maggiore dello sferoide e asse orizzontale dell'immagine;
- lunghezza dell'asse minore dello sferoide.

Queste caratteristiche generali sono state utilizzate per stimare alcuni indici specifici a seguito elencati.

5.2 Estrazione di indici specifici

5.2.1 Forma

Mentre risulta semplice stabilire la dimensione dell'area di un oggetto, il descrivere la sua forma risulta essere un compito più complesso. Nel nostro specifico caso, l'interesse non era il definire la specifica forma dell'oggetto in esame, ma il determinare se la forma è regolare (cerchio, ellisse) o meno. Per riuscire nello scopo sono state analizzate alcune proprietà a seguito elencate.

Eccentricità

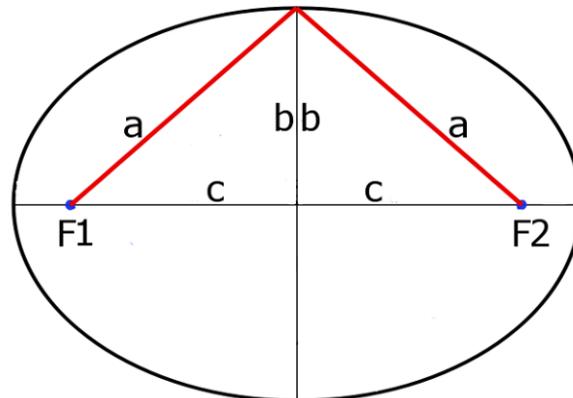


Figura 5.2: immagine di un'ellisse dove F1 e F2 rappresentano i fuochi, a il semiasse maggiore, b il semiasse minore e c la distanza del centro da uno dei due fuochi – Tratta da Wikipedia.

L'eccentricità è tipicamente definita prendendo come riferimento un'ellisse. Si definisce eccentricità di un'ellisse il rapporto:

$$e = \frac{c}{a} \quad 5.1$$

Dove c rappresenta la distanza del centro dai fuochi e a rappresenta la metà dell'asse maggiore (per proprietà geometrica dell'ellisse).

e varrà:

- 1 se l'ellisse degenera in una circonferenza perfetta;
- 0 se l'ellisse degenera in una retta.

Il valore dell'eccentricità varia quindi nel *range* [0,1] e viene automaticamente determinato per ogni sferoide tramite la funzione *regionprops* di Matlab .

Divergenza dall'ellisse regolare equivalente:

Il secondo indice è rappresentativo della differenza tra l'oggetto in analisi e l'ellisse regolare equivalente. Infatti conoscendo l'eccentricità media dello sferoide,

l'orientazione dell'asse maggiore e la dimensione dell'asse minore è possibile individuare l'ellisse regolare "equivalente" nel seguente modo.

Ponendo a sistema le seguenti equazioni:

$$\begin{cases} e = \frac{c}{a} \\ a^2 = b^2 + c^2 \end{cases}; \quad 5.2$$

dove e è l'eccentricità media e b la lunghezza dell'asse minore; si ricava la lunghezza del semiasse maggiore a .

Quindi, dalla conoscenza del semiasse maggiore e del semiasse minore si ricava l'equazione parametrica dell'ellisse:

$$\begin{cases} x = a \cos \theta \\ y = b \sin \theta \\ 0 < \theta < 2\pi \end{cases} \quad 5.3$$

Dove x, y sono le coordinate dei punti facenti parte dell'ellisse nel piano cartesiano e θ definisce l'angolo tra la semiretta con origine in O passante per P e l'asse x del piano cartesiano (Figura 5.3).

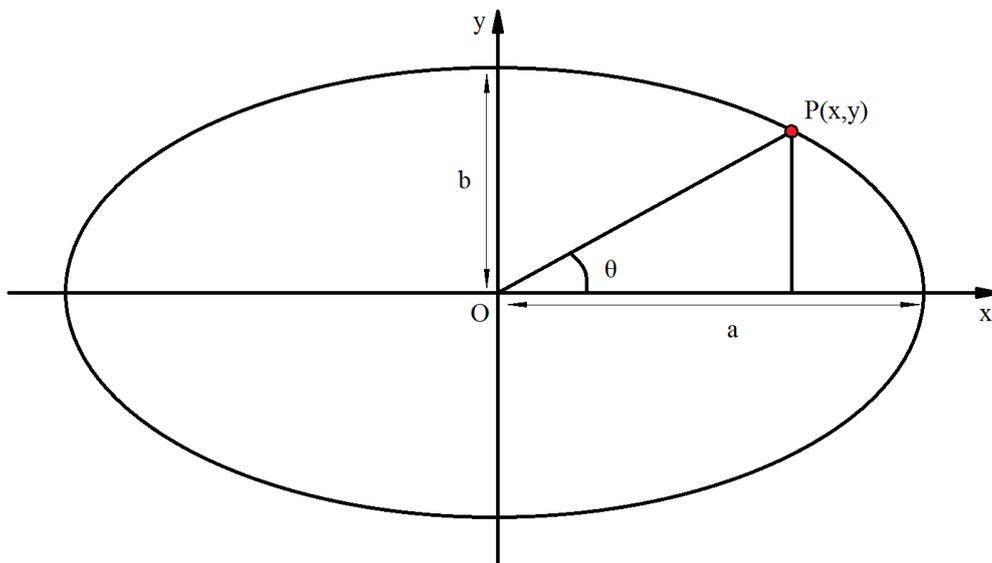


Figura 5.3: rappresentazione parametrica di un ellisse.

L'ultimo passaggio da effettuare, per sovrapporre l'ellisse trovata con lo sferoide di partenza, riguarda:

- una rotazione di un angolo φ definito come l'angolo tra l'asse maggiore dello sferoide e l'asse orizzontale dell'immagine;
- una traslazione in modo da far coincidere il centro dell'ellisse con il centro dello sferoide. Il centro dello sferoide è stato definito in precedenza come $C = (I, J)$.

L'equazione parametrica viene in questo modo ruotata e traslata:

$$\begin{cases} x^* = I + (y \cos \varphi - x \sin \varphi) \\ y^* = J + (y \sin \varphi + x \cos \varphi) \end{cases} \quad 5.4$$

Il risultato ottenuto è il seguente (Figura 5.4):

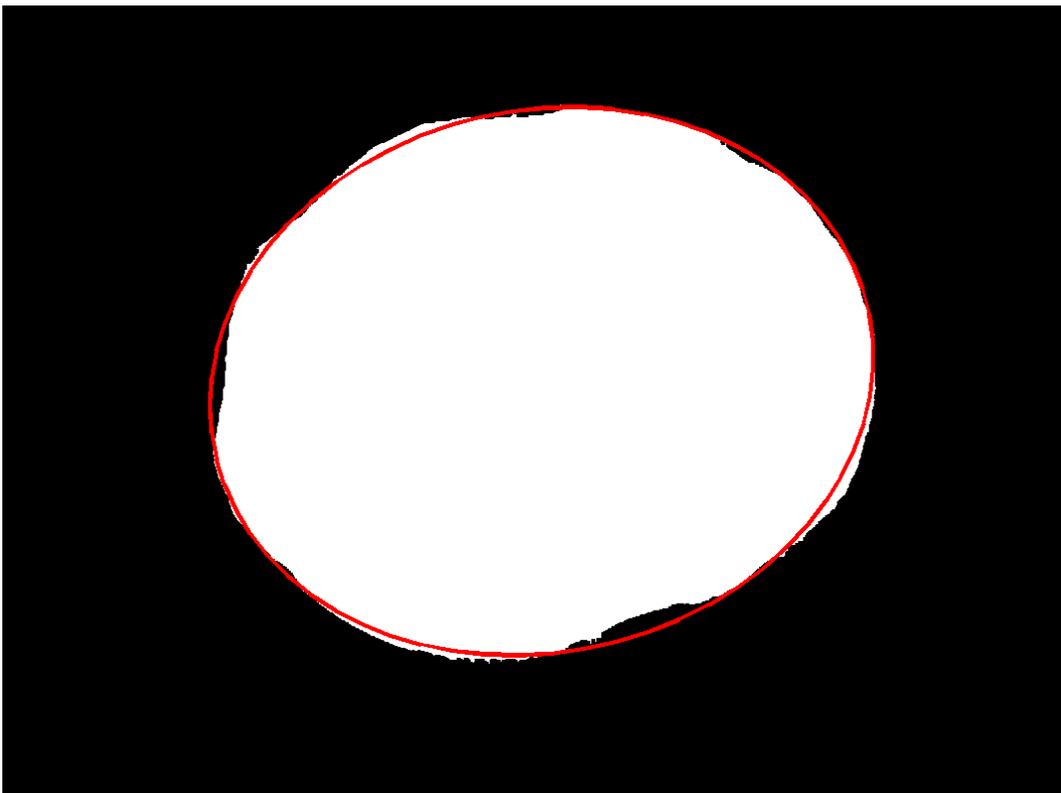


Figura 5.4: esempio di *matching* tra la maschera dello sferoide principale e l'ellissi equivalente.

Per costruire un indice di differenza tra le due strutture è stata considerata la somma delle differenze prese in valore assoluto dei raggi in ogni direzione radiale normalizzati alla media dei raggi dello sferoide (indice tipicamente denominato MAE - *Mean Absolute Error*).

$$Irregularity = \frac{\sum_i |r_{ie} - r_{is}|}{\frac{1}{360} \sum_i r_{ie}} \quad 5.5$$

dove r_{ie} è il raggio i -esimo dell'ellisse e r_{is} è il raggio i -esimo dello sferoide.

5.2.2 Bordo

Per quanto riguarda il bordo bisogna estrarre caratteristiche distintive delle anomalie presenti su di esso. Queste come detto sono le protuberanze e la frastagliatura. Vediamole nel dettaglio.

Protuberanze

Per quanto riguarda le protuberanze semplicemente si controlla se in fase di segmentazione sono state salvate maschere specifiche per protuberanze. In caso affermativo si individua l'area relativa ad ogni protuberanza e si ottiene una *feature* rappresentativa della quantità di protuberanze di un determinato sferoide come somma delle aree delle diverse protuberanze.

Frastagliatura

Per individuare un indice rappresentativo della frastagliatura si è ricorsi ai raggi individuati nel Capitolo 4. Questi individuavano per ogni posizione angolare la distanza dal centro dell'ultimo *pixel* appartenente allo sferoide. Logicamente uno sferoide che presenta un'elevata frastagliatura, possiede una variazione tra due raggi, appartenenti a due direzioni radiali contigue, molto ampia. Sulla base di quest'osservazione è stato individuato come indice rappresentativo della

frastagliatura di uno sferoide, la somma di tutte le variazioni tra i raggi contigui prese in valore assoluto.

5.2.3 Area

La caratteristica di area può essere estratta banalmente attraverso la sua misura. Per quanto concerne l'area dello sferoide, il dato era già precedentemente estratto all'interno della sezione "Estrazione di indici generali". Dunque basterà recuperare quel dato per ottenere l'area dello sferoide.

Per ricavare invece l'area dei detriti in sospensione basterà recuperare la maschera inerente i detriti salvata nella fase di *Image Processing* e attraverso il comando *regionprops* di Matlab recuperare l'informazione sulla loro area. L'informazione finale archiviata sarà relativa alla somma di tutte le aree dei detriti presenti nel pozzetto.

Capitolo 6

Algoritmo di clustering

6.1 Descrizione generale classificatori

Con il termine classificazione si intendono quelle procedure statistiche che permettono di associare uno (o più) oggetto (che potrebbe essere un'immagine, un *pattern*, un dato numerico, etc.), appartenente a un generico spazio multidimensionale, a una (o più) specifica classe. La classificazione può essere:

- **esclusiva** (o *hard*) quando ciascun oggetto può appartenere solo ad un'unica classe;
- **continua** (o *fuzzy*) se un oggetto può appartenere, con un certo grado di probabilità, a più classi.

Per associare gli oggetti in analisi ad una o più classi si parte prendendo in considerazione dati riguardanti caratteristiche degli oggetti in esame. I dati dell'oggetto specifico in analisi vengono poi confrontati in un apposito spazio multidimensionale con quelli precedentemente stimati usando un adeguato *training set*. In particolare:

- se le possibili differenti classi sono note a priori e ogni campione del *training set* è associato ad una determinata classe di appartenenza, si parla di **apprendimento supervisionato**;
- in caso contrario, cioè quando le possibili classi vengono ricavate a partire dai dati stessi, ci si riferisce ad un **apprendimento non supervisionato**.

Tipicamente, i metodi di classificazione possono basarsi su due approcci che verranno analizzati a seguito.

- **Approccio statistico:** cerca in genere di massimizzare la probabilità a posteriori, cioè la probabilità che un campione appartenga a una data classe, che sarà quindi la classe identificata per quel campione: ad esempio a partire dalle stime (ottenute dal *training set*) delle probabilità a priori delle classi (Figura 6.1) e delle probabilità condizionali (Figura 6.2) è possibile stabilire, ottimizzando una determinata funzione costo, l'appartenenza del *pattern x* ad una determinata classe C .

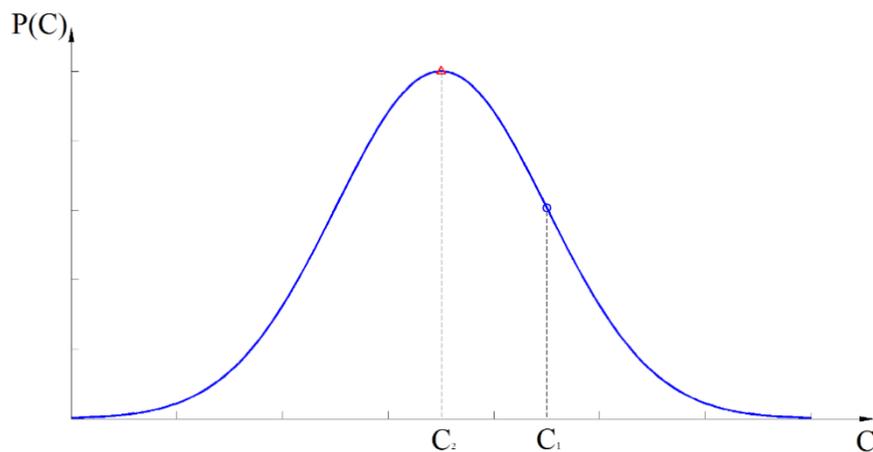


Figura 6.1: probabilità a priori delle classi C ottenuta mediante il *training set* dove C_1 e C_2 rappresentano due esempi di possibili classi.

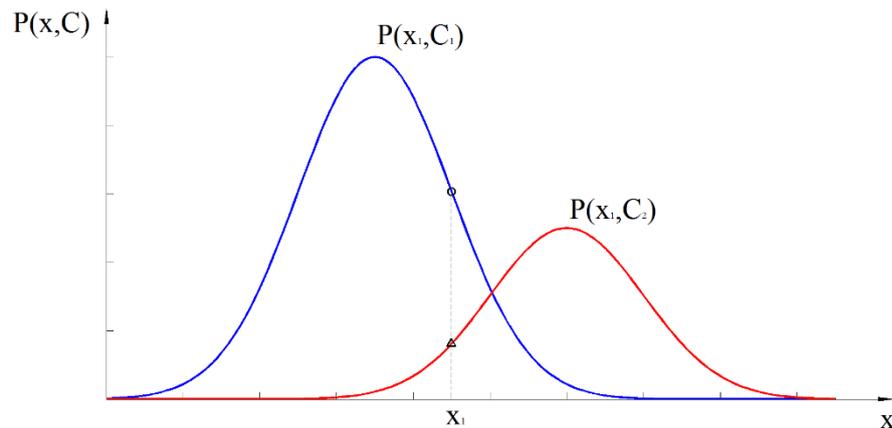


Figura 6.2: probabilità condizionali di un determinato *pattern* x di appartenere ad una determinata classe C .

Negli esempi riportati in Figura 6.2 è possibile notare che, il pattern x_1 appartiene alla classe C_1 con una probabilità condizionale superiore a quella per la classe C_2 . Nonostante ciò, analizzando la Figura 6.1 notiamo che la classe C_2 possiede una frequenza molto più alta. Queste due informazioni dovranno quindi essere unite e pesate, tramite una funzione costo. Questa tecnica è utilizzata all'interno del classificatore *Bayesiano*.

- **Approccio sintattico:** molto più pragmatico, dato che si concentra sull'analisi delle *features* dei *pattern* da classificare trattandole in uno spazio multidimensionale appositamente costruito. Questo tipo di classificazione comporta il confronto tra le caratteristiche strutturali delle *features* del campione da testare e di quelle del *training set*, sia con un apprendimento supervisionato (ad esempio l'algoritmo *Nearest Neighbor*) che non supervisionato (come nel caso del *Clustering*). Quindi si estraggono delle *features* rappresentative dal campione e si divide il campione in classi sulla base delle differenze sulle *features* estratte.

6.2 Clustering

Gli algoritmi di classificazione non supervisionata prendono il nome di “algoritmi di *clustering*”. Questi algoritmi sono in grado di individuare raggruppamenti

intrinseci (*cluster*) tra i dati nello spazio multidimensionale, e di creare in corrispondenza di tali raggruppamenti specifiche classi distinte. Queste classi sono inizialmente incognite e a volte non è noto nemmeno il loro numero (cosa che rende il problema più complesso). I metodi di *clustering* principalmente possono essere ricondotti a due famiglie:

- **clustering gerarchico**: dove attraverso operazioni di tipo *bottom-up* o *top-down* si organizzano i dati in una sequenza innestata di gruppi che possono essere visualizzati come un albero, definendo quindi una gerarchia tra le classi;
- **clustering partizionale**: dove mediante algoritmi iterativi i dati vengono assegnati ai vari gruppi che, al contrario di quanto avviene nel *clustering gerarchico*, appartengono tutti allo stesso livello, quindi non esistono classi che sono sottoinsiemi di altre classi.

6.2.1 Criteri di clustering

Sia nel *clustering* gerarchico che in quello partizionale vengono utilizzati i così detti “criteri di *clustering*”, ovvero le tecniche utilizzate per identificare, ad ogni iterazione, il grado di accuratezza di una soluzione. Al variare di questo criterio, inoltre, varierà la tipologia di algoritmo dato che cambierà la procedura per ottimizzare la soluzione trovata. La maggior parte dei “criteri di *clustering*” sono definiti sulla base delle due osservazioni seguenti:

- i *pattern* all'interno dello stesso *cluster* devono essere tra loro “più simili” rispetto a *pattern* appartenenti a *clusters* diversi;
- i *clusters* sono costituiti da nuvole di punti a densità relativamente elevata, separate da zone dove la densità è più bassa.

Tra i diversi criteri possibili troviamo:

- somma dei quadrati degli errori: minimizza i quadrati delle distanze dai centri delle classi (detto anche criterio di minima varianza);
- altri criteri basati su varianza intraclasse: si tratta di una famiglia di metodi indirizzati a minimizzare la varianza all'interno delle classi;
- criteri basati su *scattering*: tendono a minimizzare la varianza intraclasse e allo stesso tempo a massimizzare quella inter-classe.

In questo studio si tralascerà, d'ora in poi, il *clustering* gerarchico e ci si riferirà al *clustering* inteso come *clustering* partizionale.

6.2.2 Dati di ingresso

Gli algoritmi di *clustering* possono essere applicati a dati:

- quantitativi (numeri);
- qualitativi (categorie);
- misti.

I dati in ingresso di un algoritmo di *clustering* tipicamente derivano dall'osservazione di un processo fisico. Quest'osservazione consiste in n variabili appartenenti tutte ad un unico oggetto (*pattern*), raggruppate in un vettore riga n -dimensionale

$$x_k = [x_{k1}, x_{k2}, \dots, x_{kn}]^T, \quad x_k \in \mathbf{R}^n \quad 6.1$$

tutto ciò ripetuto per gli N oggetti. Possiamo riassumere le informazioni all'interno di una matrice $n \times N$

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{N1} & x_{N2} & \dots & x_{Nn} \end{bmatrix} \quad 6.2$$

Questa matrice presenta nelle righe i *pattern* ovvero tutte le n variabili legate ad un oggetto, mentre le colonne sono rappresentative delle *features* ovvero la stessa variabile osservata sugli N oggetti. X prende il nome di “*pattern matrix*”. Logicamente le righe e le colonne di X assumeranno un significato diverso in base al contesto. Nella diagnosi medica, per esempio, le righe di X tipicamente rappresentano i diversi pazienti, mentre le colonne rappresentano i sintomi o le misure di laboratorio effettuate. Quando invece l'algoritmo di *clustering* è applicato alla modellazione e all'identificazione di sistemi dinamici, le righe di X contengono esempi di segnali nel tempo, mentre le colonne sono, ad esempio, variabili fisiche

differenti osservate nel sistema (posizione, velocità, accelerazione, etc.). Lo scopo di questi sistemi di classificazione è trovare correlazioni nascoste tra variabili indipendenti o tra variabili dipendenti future al fine di identificare classi d'interesse in cui possono essere collocati oggetti a seguito considerati "simili". Si dovrebbe tuttavia comprendere che le relazioni rivelate dal *clustering* sono solo associazioni causali tra i vettori di dati, e come tali non costituiscono ancora un modello predittivo del sistema.

6.2.3 I clusters

La definizione di *cluster* può essere formulata in base all'obiettivo del *clustering* stesso, ma generalmente la più usata prevede che un *cluster* sia inteso come un gruppo di oggetti che sono più simili tra loro rispetto ai membri presenti in altri *clusters*. La similitudine dovrebbe essere intesa come similitudine matematica, misurata attraverso una metrica ben definita. Negli spazi metrici, la similitudine è spesso definita attraverso una regola di distanza. La distanza può essere misurata tra il vettore di dati stesso o tra il vettore e un prototipo. Questi prototipi non sono noti a priori, ma vanno ricercati all'interno dei dati dall'algoritmo di *clustering* in modo parallelo alla frammentazione dei dati stessi. I prototipi possono essere vettori della stessa dimensione degli oggetti dati, ma possono anche essere definiti come oggetti geometrici di "livello superiore", come sottospazi lineari o non lineari o come funzioni.

Rappresentando i dati nell'apposito spazio multidimensionale delle *features*, possono rivelare *clusters* di forme geometriche, dimensioni e densità diverse, come dimostrato in Figura 6.3

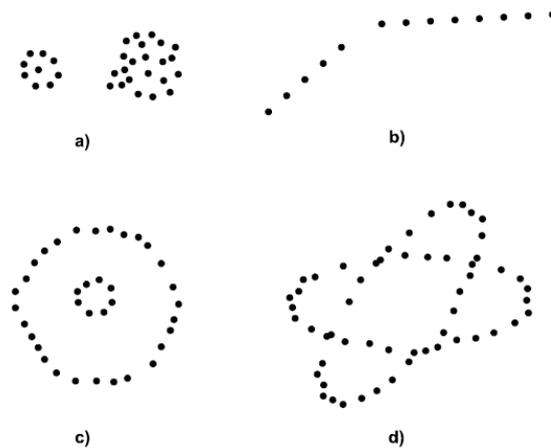


Figura 6.3: *clusters* di differenti forme e dimensioni in uno spazio \mathbf{R}^2 .

6.2.4 Suddivisione in clusters

Come detto in precedenza la suddivisione in *clusters* può essere *hard* o *fuzzy*. I metodi di *hard clustering* sono basati sulla teoria degli insiemi classica, ovvero un partizionamento dei dati in un numero specificato di sottoinsiemi di X che si escludono a vicenda. Il numero di sottoinsiemi di X (*cluster*) è indicato con c . Il metodo di *fuzzy clustering* consente agli oggetti di appartenere a più gruppi contemporaneamente, con diversi gradi di appartenenza. Il *set* di dati X viene così suddiviso in c sottoinsiemi *fuzzy*. In molte situazioni reali, il *fuzzy clustering* è più “naturale” rispetto all’*hard clustering*, in questo modo infatti oggetti sui confini tra diverse classi non sono costretti ad appartenere in maniera esclusiva a una delle classi, ma piuttosto vengono assegnati diversi gradi di appartenenza (valori tipicamente tra 0 e 1) che indicano la parziale appartenenza di ogni oggetto ad ogni specifica classe. La natura discreta dell’*hard clustering* causa anche l’intrattabilità analitica e algoritmica di algoritmi basati su funzionali analitici, dal momento che questi non sono funzionali differenziabili.

La struttura della matrice di suddivisione $U = [\mu_{ik}]$:

$$U = \begin{bmatrix} \mu_{11} & \mu_{12} & \dots & \mu_{1c} \\ \mu_{21} & \mu_{22} & \dots & \mu_{2c} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \mu_{N1} & \mu_{N2} & \dots & \mu_{Nc} \end{bmatrix} \quad 6.3$$

Suddivisione hard

L'obiettivo è dividere l'insieme di dati X in c *clusters*. Per il momento consideriamo c noto, basandoci su una conoscenza a priori delle classi o sulla base di un valore di prova che va in seguito validato. Usando la teoria degli insiemi classica, la suddivisione *hard* è definita come i sottoinsiemi $\{A_i \mid 1 \leq i \leq c \subset P(X)\}$ con le seguenti proprietà:

$$\bigcup_{i=1}^c A_i = X, \quad 6.4$$

$$A_i \cap A_j = \emptyset, \quad 1 \leq i \neq j \leq c, \quad 6.5$$

$$\emptyset \subset A_i \subset X, \quad 1 \leq i \leq c \quad 6.6$$

Tali condizioni significano che i sottoinsiemi A_i contengono tutti i dati in X , devono essere disgiunti e nessuno di essi è vuoto né contiene tutti i dati in X .

$P(X)$ costituisce l'insieme delle parti di X che per definizione è l'insieme di tutti i sottoinsiemi di X (compreso l'insieme vuoto). Possiamo così definire la funzione di appartenenza $\mu_{A_i}: X \rightarrow \{0,1\}$ tale che $\mu_{A_i}(x)$ definisca l'appartenenza di x a A_i :

$$\mu_{A_i}(x) = \begin{cases} 1, & x \in A_i \\ 0, & x \notin A_i \end{cases} \quad 6.7$$

Espresso in termini di funzioni di appartenenza diventano:

$$\bigvee_{i=1}^c \mu_{A_i} = 1, \quad 6.8$$

$$\mu_{A_i} \vee \mu_{A_j} = 0, \quad 1 \leq i \neq j \leq c, \quad 6.9$$

$$0 < \mu_{A_i} < 1, \quad 1 \leq i \leq c. \quad 6.10$$

Qui μ_{A_i} è la caratteristica funzione del sottoinsieme A_i e questo valore può essere compreso tra zero e uno. Per semplicità di notazione useremo μ_i invece di μ_{A_i} e rappresenteremo $\mu_i(x_k)$ come μ_{ik} ; le partizioni possono essere così rappresentate in notazione matriciale. Una matrice $U = [\mu_{ik}]$ di dimensioni $N \times c$ rappresenta la suddivisione *hard* se e solo se i suoi elementi soddisfano le seguenti condizioni:

$$\mu_{ij} \in 0,1, 1 \leq i \leq N, \quad 1 \leq k \leq c, \quad 6.11$$

$$\sum_{k=1}^c \mu_{ik} = 1, \quad 1 \leq i \leq N, \quad 6.12$$

$$0 < \sum_{i=1}^N \mu_{ik} < N, \quad 1 \leq k \leq c. \quad 6.13$$

Suddivisione fuzzy

La suddivisione *fuzzy* può essere vista come una generalizzazione della suddivisione *hard*, consente a μ_{ik} di assumere valori reali compresi tra $[0,1]$.

Una matrice $U = [\mu_{ik}]$ di dimensioni $N \times c$ rappresenta la suddivisione *fuzzy* se sono valide le seguenti condizioni:

$$\mu_{ij} \in [0,1], 1 \leq i \leq N, \quad 1 \leq k \leq c, \quad 6.14$$

$$\sum_{k=1}^c \mu_{ik} = 1, \quad 1 \leq i \leq N, \quad 6.15$$

$$0 < \sum_{i=1}^N \mu_{ik} < N, \quad 1 \leq k \leq c. \quad 6.16$$

La i -esima riga di U contiene il valore della funzione di appartenenza all' k -esimo sottoinsieme *fuzzy* di X costringendo la somma di ogni colonna a 1, e quindi l'appartenenza totale di ogni x_k in X è uno. La distribuzione dell'appartenenza tra i c sottoinsiemi *fuzzy* non è vincolata.

6.3 Fuzzy Clustering and Data Analysis Toolbox

Quanto segue è la descrizione tratta dal “*Fuzzy Clustering and Data Analysis Toolbox*” di alcuni algoritmi di *Clustering* [Balasko B. 2005]. Questo Toolbox è realizzato in ambiente Matlab ed è stato utilizzato in questo lavoro per realizzare tecniche di *clustering*.

6.3.1 Algoritmi K-means e K-medoid

I metodi di partizionamento *hard* sono semplici e popolari, anche se i loro risultati non sono sempre affidabili e hanno inoltre problemi di tipo numerico. A partire da un insieme di dati $N \times n$ gli algoritmi *K-means* e *K-medoid* assegnano ogni punto

nei dati ad uno dei *cluster* c cercando di minimizzare la somma dei quadrati all'interno di un *clusters*, ovvero:

$$\sum_{i=1}^c \sum_{k \in A_i} \|x_k - v_i\|_2 \quad 6.17$$

Dove A_i è un set di oggetti (punti) nell' i -esimo *cluster* e v_i è la media eseguita sui punti del medesimo *cluster*. La formula scritta sopra denota la distanza euclidea. Nell'algoritmo *K-means* v_i è chiamata *cluster* prototipo o meglio centro del *cluster*:

$$v_i = \frac{\sum_{k=1}^{N_i} x_k}{N_i}, x_k \in A_i, \quad 6.18$$

con N_i che rappresenta il numero di oggetti in A_i .

In *K-medoid* il centro del *cluster* sono gli oggetti più vicini alla media dei dati in un *cluster* $V = \{v_i \in X \mid 1 \leq i \leq c\}$. Ciò è utile per esempio, quando ogni punto nei dati indica la posizione di un sistema discontinuo, quindi scegliere la media dei punti potrebbe portare ad un punto che non fa parte del dominio del sistema.

6.3.2 Algoritmo fuzzy C-means

L'algoritmo di *clustering fuzzy C-means* è basato sulla minimizzazione di una funzione obiettivo chiamata funzionale *C-means*. Essa è stata definita da Dunn come:

$$J(X; U, V) = \sum_{i=1}^c \sum_{k=1}^N (\mu_{ik})^m \|x_k - v_i\|_A^2 \quad 6.19$$

Dove

$$V = [v_1, v_2, \dots, v_c], v_i \in \mathbf{R}^n \quad 6.20$$

è vettore dei centri dei *clusters*, che devono essere determinati e

$$D_{ikA}^2 = \|x_k - v_i\|_A^2 = (x_k - v_i)^T A (x_k - v_i) \quad 6.21$$

è il quadrato del prodotto scalare della norma euclidea.

Statisticamente, può essere visto come una misura della varianza totale di x_k da v_i . La minimizzazione del funzionale *C-means* rappresenta un problema di ottimizzazione non lineare che può essere risolto utilizzando una varietà di metodi disponibili, che vanno dalla “*grouped coordinate minimization*”, al “*simulated annealing*” agli “*genetic algorithm*”. Il metodo tuttavia più popolare è una semplice *iterazione di Picard* per le condizioni del primo ordine per i punti di stazionarietà, noto come algoritmo *fuzzy C-means* (FCM).

I punti stazionari della funzione obiettivo possono essere trovati utilizzando il metodo dei moltiplicatori di Lagrange aggiungendo il vincolo posto nell’Equazione 7.15 all’equazione 6.19:

$$\bar{J}(X; U, V, \lambda) = \sum_{i=1}^c \sum_{k=1}^N (\mu_{ik})^m D_{ikA}^2 + \sum_{k=1}^N \lambda_k \left(\sum_{i=1}^c \mu_{ik} - 1 \right) \quad 6.22$$

e impostando i gradienti di \bar{J} rispetto a U , V e λ a zero. Se la distanza $D_{ikA}^2 > 0$, $\forall i, k$, la norma adottata nello spazio delle *features* $m > 1$ e i vettori $(U, V) \in M_{fc} \times \mathbf{R}^{n \times c}$ dove M_{fc} rappresenta lo spazio di partizionamento fuzzy in cui valgono le condizioni rappresentate della Equazioni 6.14, 6.15 e 6.16, allora posso ridurre l’Equazione 6.22 a:

$$\mu_{ik} = \frac{1}{\sum_{j=1}^c (D_{ikA}/D_{jkA})^{2/(m-1)}}, \quad 1 \leq i \leq c, 1 \leq k \leq N, \quad 6.23$$

$$v_i = \frac{\sum_{k=1}^N \mu_{ik}^m x_k}{\sum_{k=1}^N \mu_{ik}^m}, \quad 1 \leq i \leq c, \quad 6.24$$

Si noti che l'Equazione 6.24 considera v_i come la media ponderata degli elementi che appartengono ad un *cluster*, ponderata in base al grado di appartenenza. In questo senso gli elementi più certi di appartenere ad un determinato *cluster* saranno quelli che pesano di più nell'indicare il centro del *cluster* stesso. Questo è il motivo per il quale l'algoritmo FCM è una semplice iterazione tra l'Equazione 6.23 e l'Equazione 6.24.

L'algoritmo FCM utilizza come indicatore della distanza la norma della distanza euclidea *standard*. Questo induce *clusters* di tipo ipersferico, quindi l'algoritmo sarà in grado di rilevare *clusters* con la stessa forma e orientamento. Infatti la scelta comune per la matrice A è:

- $A = I$ dove I indica la matrice identità;
- $A = D$ dove D è una matrice diagonale $n \times n$ che rappresenta varianze differenti in diverse direzioni degli assi

$$A_D = \begin{bmatrix} (1/\sigma_1)^2 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (1/\sigma_1)^2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & (1/\sigma_1)^2 \end{bmatrix}; \quad 6.25$$

- $A = F^{-1}$ ovvero l'inversa della matrice di covarianza

$$F = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (x_k - \bar{x})(x_k - \bar{x})^T. \quad 6.26$$

dove \bar{x} rappresenta la semplice media dei dati. In questo caso. A è la norma di *Mahalanobis* su R^n e la tipologia di *cluster* ricercato diventa di forma ellissoidale, *cluster* di forma adatta a trattare dati reali.

6.3.3 Algoritmo Gustafson-Kessel

L'algoritmo di Gustafson e Kessel (GK) estende lo *standard fuzzy C-means* implementando una norma della distanza adattiva, al fine di rilevare i *clusters* di forme geometriche diverse in un set di dati. Ogni gruppo ha la sua matrice A_i , da cui si ricava il seguente norma:

$$D_{ikA}^2 = (x_k - \bar{x})^T A_i (x_k - \bar{x}), \quad 1 \leq i \leq c, 1 \leq k \leq N. \quad 6.27$$

Le matrici A_i sono usate come variabili di ottimizzazione del funzionale *C-means*, consentendo così a ciascun *cluster* di adattare la norma della distanza alla topologica locale della struttura dati. Siano A le c -tuple della matrice indotta: $A = (A_1, A_2, \dots, A_c)$. Il funzionale obiettivo dell'algoritmo GK è definito attraverso:

$$J(X; U, V, A) = \sum_{i=1}^c \sum_{k=1}^N (\mu_{ik})^m D_{ikA_i}^2. \quad 6.28$$

Per un A fissato le condizioni riportate nelle Equazioni 6.14, 6.15 e 6.16 possono essere applicate direttamente. Tuttavia, la funzione obiettivo 6.28 non può essere direttamente minimizzata rispetto ad A_i , in quanto è lineare in A_i . Ciò significa che J può essere reso il più piccolo possibile semplicemente rendendo A_i semidefinita positiva. Per ottenere una soluzione accettabile, A_i deve essere vincolata in qualche modo. Il solito modo di risolvere questo problema è quello di limitare il determinante di A_i . Permettere alla matrice A_i di variare con il suo determinante fissato corrisponde ad ottimizzare la forma del *cluster* mentre il volume rimane costante:

$$\|A_i\| = \rho_i, \quad \rho_i > 0. \quad 6.29$$

dove ρ_i è fissato per ogni *cluster*. Usando il metodo dei moltiplicatori di Lagrange, si ottiene la seguente espressione per A_i :

$$A_i = [\rho_i \det(F_i)]^{1/n} F_i^{-1} \quad 6.30$$

dove F_i è la matrice di covarianza *fuzzy* dell' i -esimo *cluster* definita nel seguente modo:

$$F_i = \frac{\sum_{k=1}^N (\mu_{ik})^m (x_k - v_i)(x_k - v_i)^T}{\sum_{k=1}^N (\mu_{ik})^m} \quad 6.31$$

Notare che la sostituzione dell'Equazioni 6.30 e 6.31 nell'Equazione 6.27 porta ad ottenere una generalizzazione della norma della distanza di *Mahalanobis* al quadrato tra x_k e la media del *cluster* v_i , dove la covarianza viene ponderata in base al grado di appartenenza nella matrice U .

L'algoritmo appena descritto è proprio l'Algoritmo utilizzato per effettuare il *clustering* dei dati estratti dagli aggregati multicellulari. Volendo fare un breve riassunto delle sue caratteristiche si potrebbe descrivere in maniera sintetica in questo modo:

- è un algoritmo di classificazione non supervisionato;
- effettua una classificazione di tipo partizionale utilizzando un approccio sintattico;
- applica sui campioni delle etichette di tipo *fuzzy* (ovvero assegna a ogni campione il grado di appartenenza ad ogni classe);
- utilizza come criterio di *clustering* la distanza di *Mahalanobis* ricercando dei *clusters* di forma ellittica, diversi per ogni *cluster*.

La scelta di questo algoritmo è stata effettuata per diverse motivazioni. Vediamo il dettaglio:

- essendo un algoritmo non supervisionato è in grado di classificare oggetti di cui non si conosce l'appartenenza ad una determinata classe;
- la classificazione partizionale è stata scelta per poca conoscenza del set di dati. Infatti sarebbe stato uno *step* troppo avanzato chiedere di individuare delle classi non note ed organizzarle in maniera gerarchica;
- le etichette di tipo *fuzzy* sono state scelte perché più efficaci in situazioni di conflitto. Alcune volte, infatti, è meglio far scegliere manualmente la classe di appartenenza, piuttosto che compiere errori madornali;

- l'utilizzo della distanza di *Mahalanobis* come metrica, consente al *cluster* di possedere una varianza differente nelle diverse direzioni e quindi pesare la distanza di un dato *pattern* dal centroide del *cluster*, in maniera inversamente proporzionale alla varianza in quella direzione. Inoltre l'algoritmo prevede l'utilizzo di una tipologia di ellisse differente per ogni *cluster* adattandolo alla topologia locale dello spazio multidimensionale.

6.4 Validazione della classificazione

Il problema di validazione cerca di rispondere alla seguente domanda: tutti i dati si adattano ad una determinata partizione? L'algoritmo di *clustering* cerca sempre di trovare la soluzione migliore per un numero fisso di *clusters* di forma parametrizzata. Tuttavia questo non significa che il migliore adattamento trovato risulta sempre significativo. Infatti potrebbe risultare errato sia il numero di *clusters*, sia la loro forma. Ci sono due principali approcci per determinare il numero appropriato di *clusters* nei dati:

1. partire da un numero sufficientemente ampio di *clusters*, e successivamente ridurre questo numero unendo *clusters* che sono simili (compatibili) rispetto ad alcuni criteri predefiniti. Questo approccio è chiamato fusione di *clusters* compatibili;
2. effettuare il *clustering* dei dati per diversi valori di c , utilizzando successivamente misure di validità per valutare la bontà delle partizioni ottenute. Questo può essere fatto in due modi:
 - il primo approccio è quello di definire una funzione che valuta la validità di una partizione completa. Successivamente viene stabilito tramite stima un limite superiore per il numero di *clusters* (c_{max}), e gli algoritmi devono essere eseguiti con ogni $c \in \{2, 3, \dots, c_{max}\}$. Per ogni partizione, la funzione validità fornisce un valore tale che i risultati dell'analisi possono essere paragonati indirettamente;
 - il secondo approccio consiste nella definizione di una funzione che valuta singoli *cluster* di una partizione di *clusters*. Ancora una volta, c_{max} deve essere stimato e l'analisi dei *clusters* deve essere effettuata per c_{max} . I *clusters* sono confrontati tra loro sulla base della funzione di validità. Gruppi simili sono raccolti in un *cluster*, i *clusters* inutili vengono eliminati in modo da ridurre il numero di

clusters. La procedura può essere ripetuta finché ci sono *cluster* inutili.

Diverse misure scalari di validità sono state proposte in letteratura, ma nessuna di queste è in grado di risolvere a livello generale il problema. In accordo, tipicamente vengono utilizzate più misure contemporaneamente. Vediamone alcune:

1. *Partition Coefficient* (PC): misura la sovrapposizione tra i *clusters* ed è definita nel seguente modo:

$$PC(c) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^N (\mu_{ij})^2 \quad 6.32$$

dove μ_{ij} è il grado di appartenenza del pattern j al *cluster* i . Lo svantaggio della *PC* è la mancanza di collegamento diretto ad alcune proprietà dei dati stessi;

2. *Classification Entropy* (CE): è la misura della *fuzzyness* di un *cluster* (molto simile al PC).

$$CE(c) = -\frac{1}{N} \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^N (\mu_{ij}) \log(\mu_{ij}) \quad 6.33$$

Capitolo 7

Analisi evoluzione temporale

Una volta identificate le possibili *features* morfologiche significative per caratterizzare le immagini dei vari sferoidi, abbiamo analizzato l'evoluzione temporale delle singole *features* per identificare se per ogni trattamento esistessero correlazioni legate al tempo e agli stati precedenti. A tal fine abbiamo analizzato le sequenze temporali di immagini dei singoli sferoidi. In particolare abbiamo cercato di identificare tra le diverse sequenze, classi di evoluzioni temporali simili. Per farlo abbiamo allineato temporalmente le varie immagini dei singoli pozzetti delle varie piastre creando per ogni sferoide una sequenza di immagini, e abbiamo cercato di raggruppare per ogni piastra le varie sequenze in classi di evoluzioni temporali che a prima vista risultavano essere simili. Una volta identificate le classi di evoluzioni temporali abbiamo cercato di definire quali singole *features* influivano particolarmente il sistema visivo umano nel classificare come simili le sequenze presenti in una singola classe e come diverse le sequenze appartenenti a due diverse classi.

In particolare, grazie a questa analisi abbiamo identificato alcune *features* più significative per l'analisi visiva, al fine di considerare simili o differenti due sequenze temporali:

- l'entità della diminuzione di area;
- la presenza di protuberanze o rigonfiamenti;
- la presenza di corpuscoli nel terreno di coltura;
- la frastagliatura dello sferoide.

Grazie all'analisi congiunta delle *features* sopra elencate, per ogni trattamento si è in grado di catalogare in una determinata classe temporale una sequenza di immagini relativa ad un preciso sferoide.

7.1 Classi di evoluzioni temporali

Dopo aver creato e analizzato (singolarmente e insieme) le varie sequenze temporali, abbiamo notato che per ogni piastra potevano essere facilmente identificate almeno due classi ben distinte, con caratteristiche ben precise:

- **Classe A:** sequenze temporali dove lo sferoide mantiene pressoché costante nel tempo l'area, con mancanza di grosse percentuali di corpuscoli presenti nel terreno di coltura. Abbiamo supposto che questi sferoidi fossero quelli sui quali, per motivi ignoti, le radiazioni subite non avessero prodotto alcun tipo di effetto.
- **Classe B:** sequenze temporali dove lo sferoide presenta una forte riduzione di area, con un alto gradiente tra il giorno 7 (3 giorni dopo l'ultimo trattamento subito) e il giorno 11, ed un'enorme quantità di corpuscoli dispersi nel terreno di coltura, in particolare dal giorno 11 in poi. Abbiamo supposto che questi sferoidi fossero quelli sui quali le radiazioni subite o altre agenti non definiti (la piastra A000 non è sottoposta a radiazioni) avessero avuto come effetto la morte cellulare del tumore o di una parte di esso.

Abbiamo infine definito una **Classe C** contenente le varie sequenze temporali che per vari motivi visivamente non erano riconducibili né alla Classe A né alla Classe B. E' importante sottolineare che le Classi A e B non sono classi completamente separate e non sono complementari.

Tenendo presenti le Classi A e B sopra definite, abbiamo analizzato le singole sequenze temporali di ogni classe al fine di identificare se le sequenze all'interno presentassero caratteristiche differenti dalle sequenze delle stesse classi, ma relative

ad altre piastre. Abbiamo quindi suddiviso le varie piastre in due sottogruppi distinti:

- **Trattamento assente o con basso numero di frazioni:** piastra di controllo A000 e piastra D651;
- **Trattamento ad alto numero di frazioni:** piastre D655 e C755.

Abbiamo tralasciato in questa prima fase l'analisi delle piastre D654, D653 e D652.

Trattamento assente o con basso numero frazioni

Le piastre A000 e D651 presentano un numero elevato di sequenze riconducibili alla Classe A (vedi Figura 7.1, Figura 7.2, Figura 7.3 e Figura 7.4).

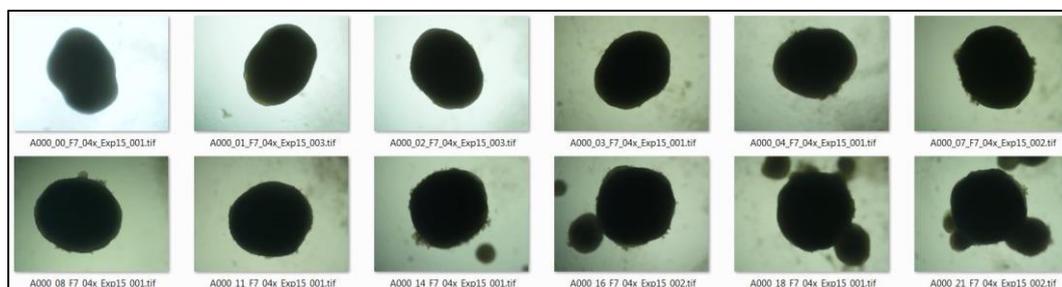


Figura 7.1: sequenza temporale sferoide piastra A000 pozzetto F7.

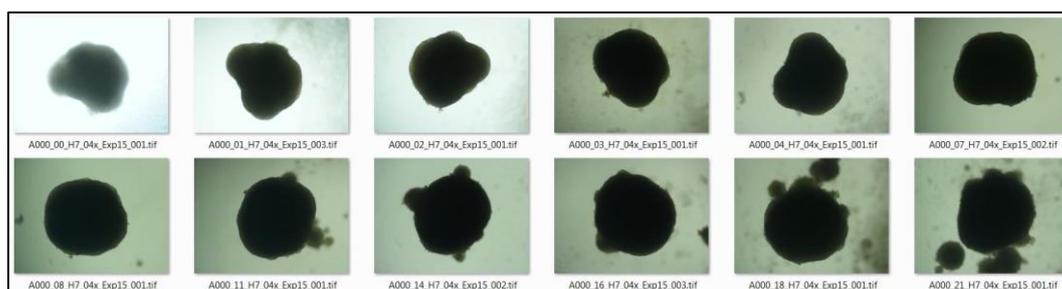


Figura 7.2: sequenza temporale sferoide piastra A000 pozzetto H7.

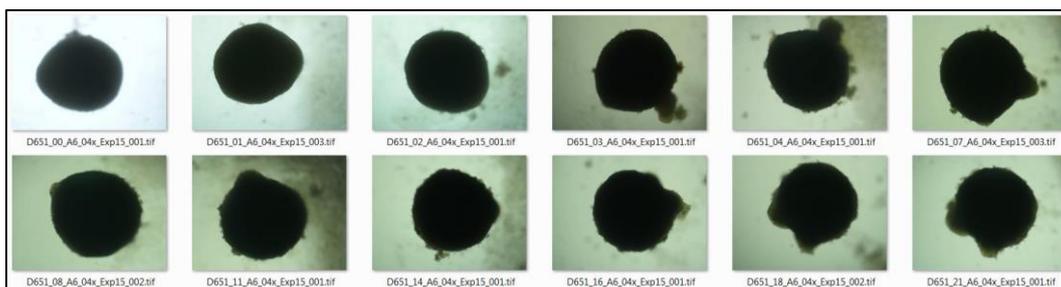


Figura 7.3: sequenza temporale sferoide piastra D651 pozzetto A6.

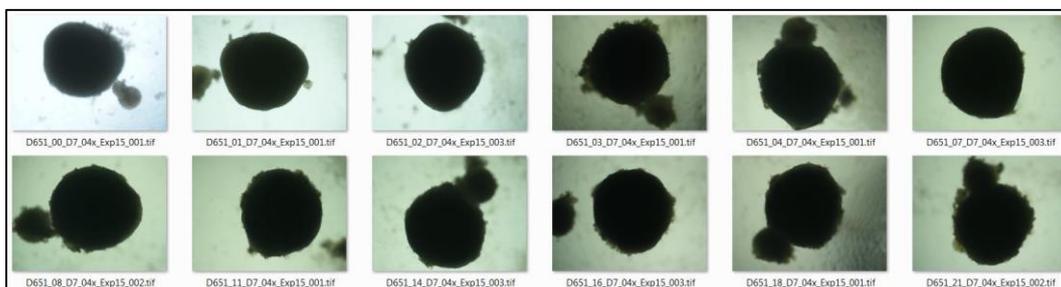


Figura 7.4: sequenza temporale dello sferoide nella piastra D651 pozzetto D7.

Sequenze del tipo in Figura 7.5, Figura 7.6, Figura 7.7 e Figura 7.8 possono invece essere ricondotte alla Classe B.

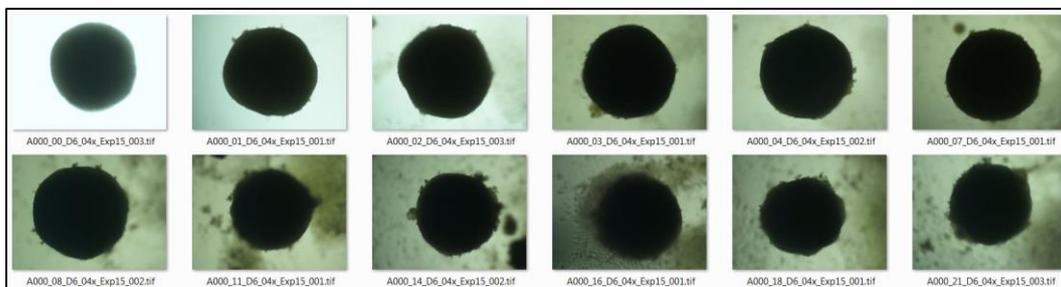


Figura 7.5: sequenza temporale sferoide piastra A000 pozzetto D6.

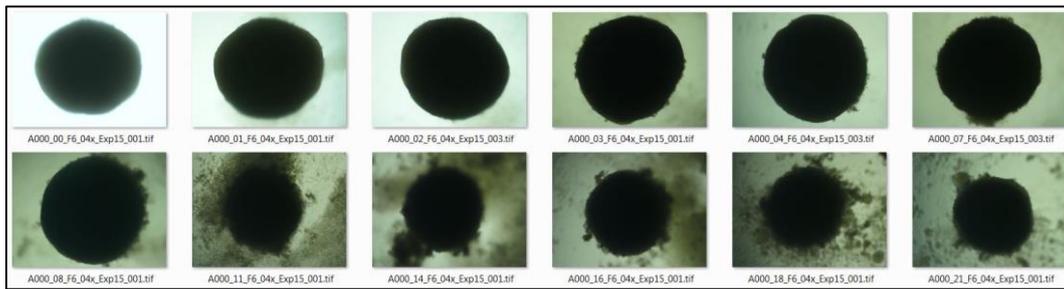


Figura 7.6: sequenza temporale sferoide piastra A000 pozzetto F6.

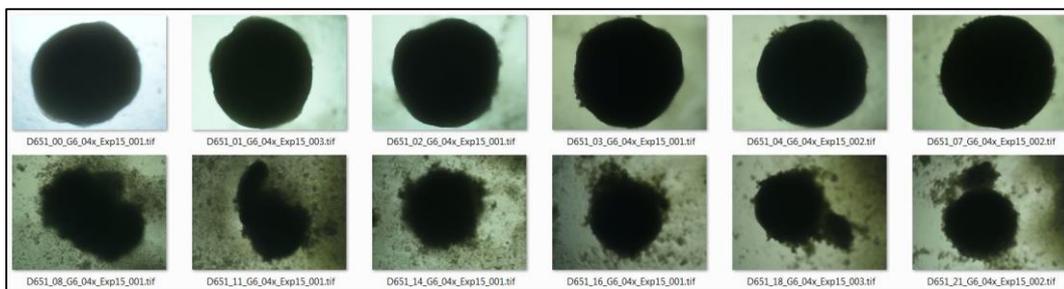


Figura 7.7: sequenza temporale sferoide piastra D651 pozzetto G6.

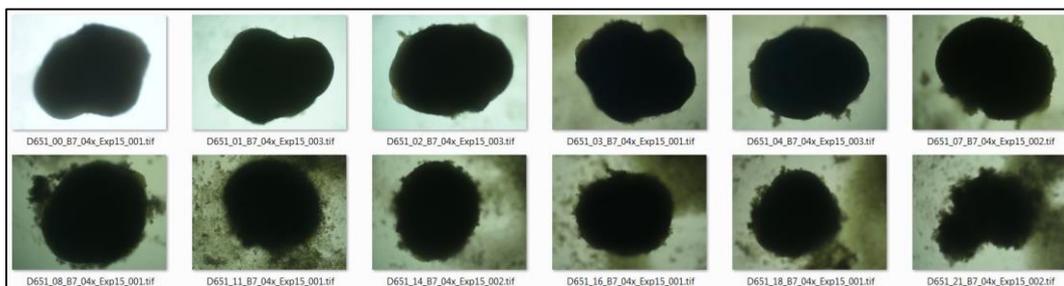


Figura 7.8: sequenza temporale sferoide piastra D651 pozzetto B7.

Come possiamo notare dalle sequenze mostrate esse risultano essere visivamente simili quando considerate all'interno della stessa classe e sostanzialmente diverse tra le varie classi. Dal loro confronto possiamo provare a trarre delle conclusioni specifiche valide per le sequenze di piastre trattate con un basso numero di frazioni:

- Classe A, per piastre non trattate o con basso numero di frazioni:
 - 1) l'area nel tempo non si riduce molto e anzi in alcuni casi aumenta;

- 2) non vi è un'elevata percentuale di corpuscoli in sospensione;
 - 3) "spesso" gli sferoidi producono protuberanze e rigonfiamenti di area non trascurabile.
- Classe B, per piastre non trattate o con basso numero di frazioni:
 - 1) forte riduzione percentuale di area tra il giorno 7° e 11°;
 - 2) comparsa dall'11° giorno di una grande percentuale di corpuscoli dispersi nel terreno di coltura;
 - 3) assenza di protuberanze, rigonfiamenti, secondi sferoidi generati.

Trattamento ad alto numero frazioni

Come precedentemente accennato, anche per le piastre trattate con un alto numero di frazioni possiamo facilmente classificare le sequenze di immagini in due classi ben distinte. Alcune sequenze temporali incluse nella Classe A sono quelle mostrate in Figura 7.9, Figura 7.10, Figura 7.11, Figura 7.12 e Figura 7.13.

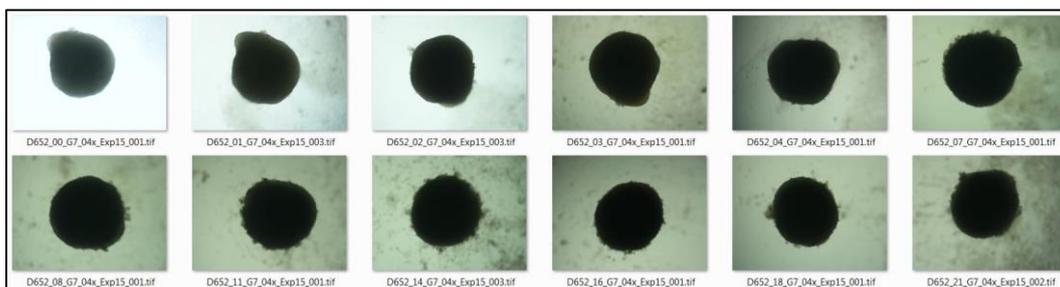


Figura 7.9: sequenza temporale sferoide piastra D652 pozzetto G7.

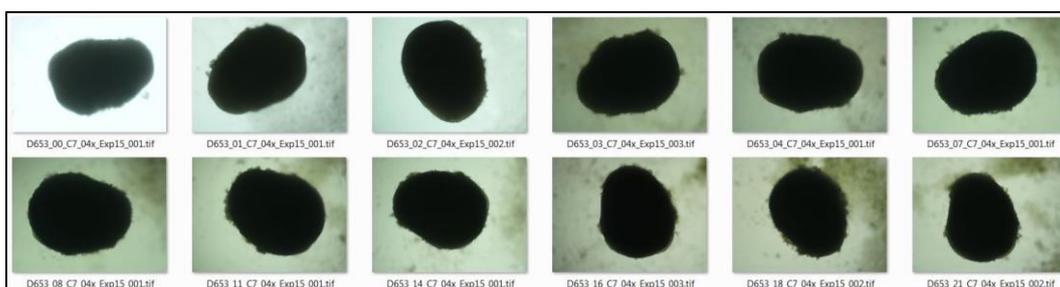


Figura 7.10: sequenza temporale sferoide piastra D653 pozzetto C7.

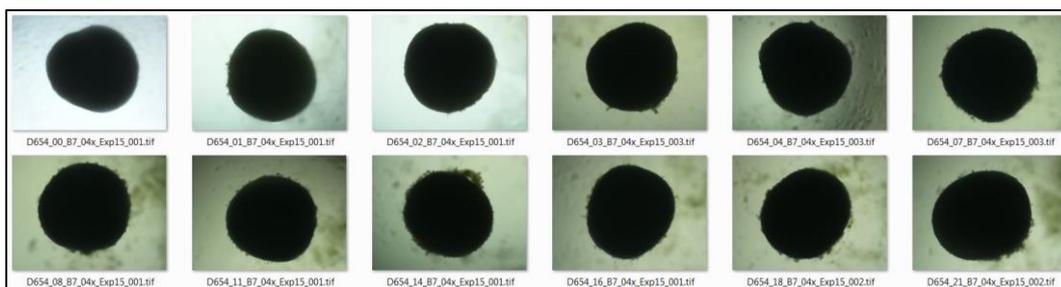


Figura 7.11: sequenza temporale sferoide piastra D654 pozzetto B7.

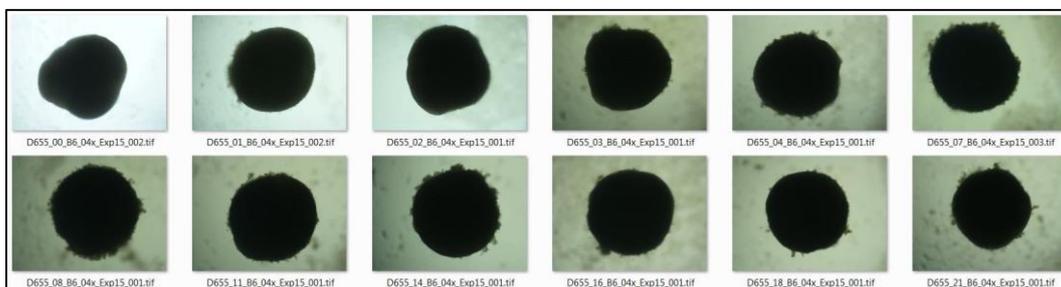


Figura 7.12: sequenza temporale sferoide piastra D655 pozzetto B6.

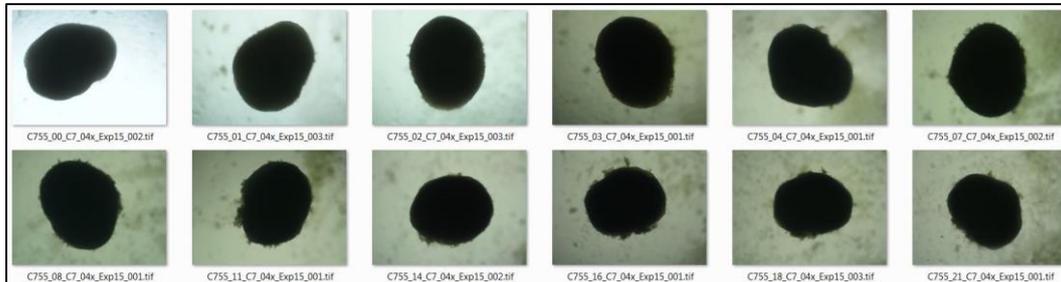


Figura 7.13: sequenza temporale sferoide piastra C755 pozzetto C7.

Le sequenze temporali in Figura 7.14, Figura 7.15, Figura 7.16, Figura 7.17 e Figura 7.18 sono invece riconducibili alla classe B.

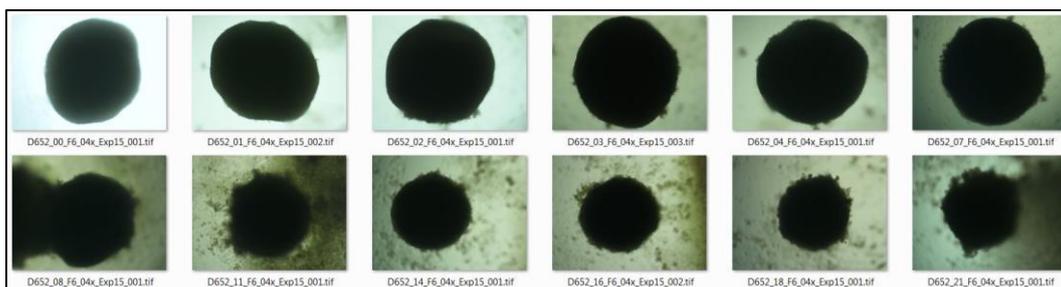


Figura 7.14: sequenza temporale sferoide piastra D652 pozzetto F6.

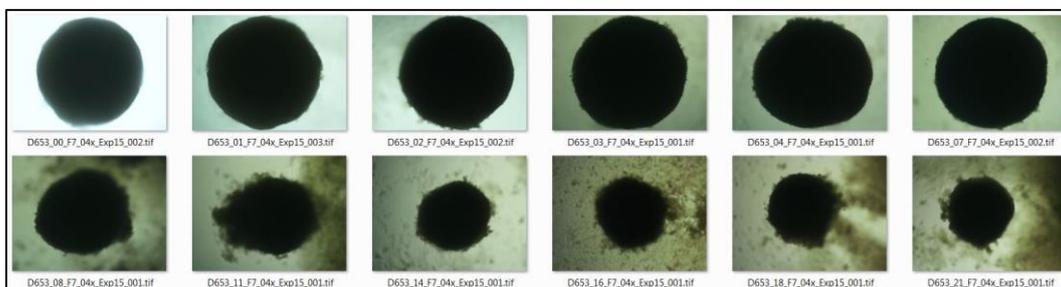


Figura 7.15: sequenza temporale sferoide piastra D653 pozzetto F7.

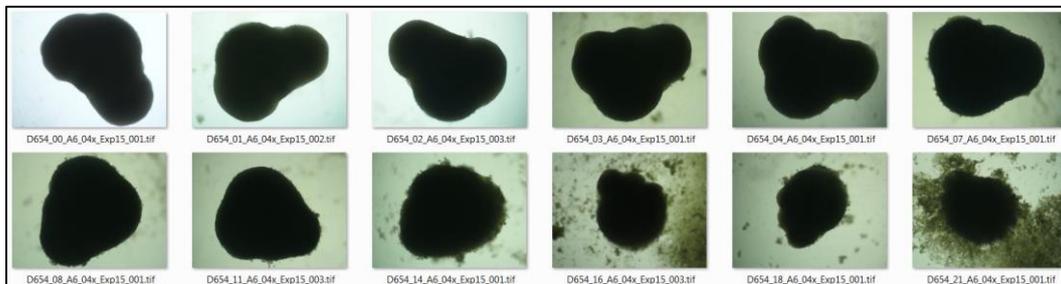


Figura 7.16: sequenza temporale sferoide piastra D654 pozzetto A6.

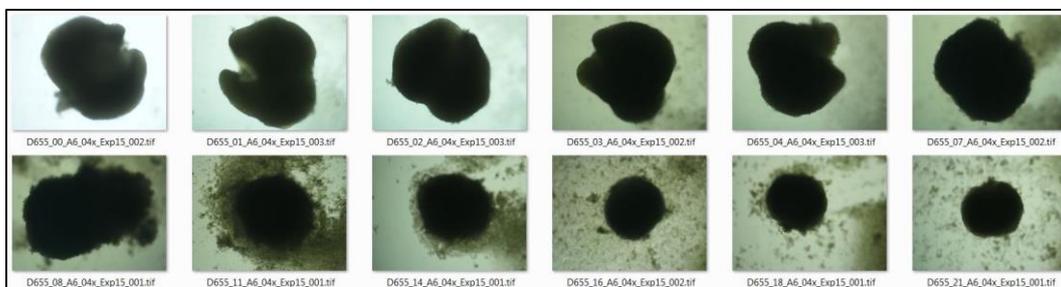


Figura 7.17: sequenza temporale sferoide piastra D655 pozzetto A6.

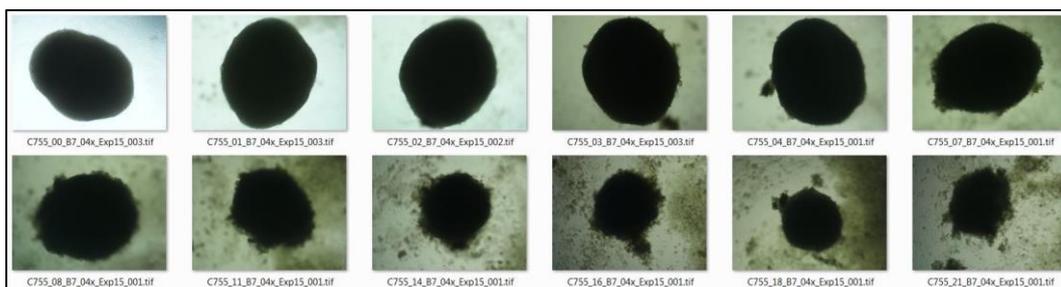


Figura 7.18: sequenza temporale sferoide piastra C755 pozzetto B7.

Alla sequenza temporale della Classe C fanno parte i seguenti pozzetti (Figura 7.19, Figura 7.20, Figura 7.21, Figura 7.22 e Figura 7.23).

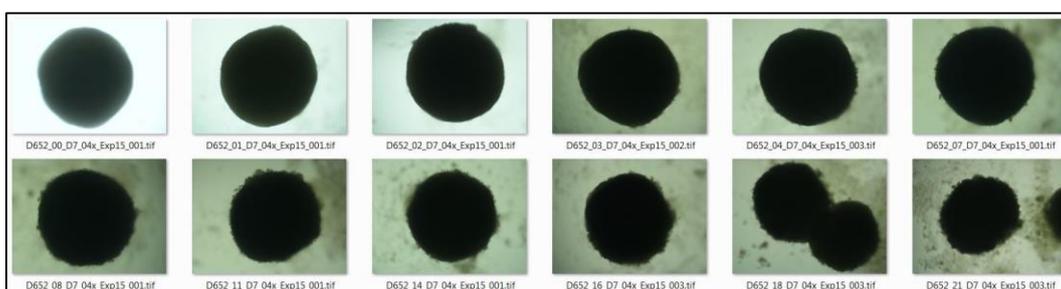


Figura 7.19: sequenza temporale sferoide piastra D652 pozzetto D7.

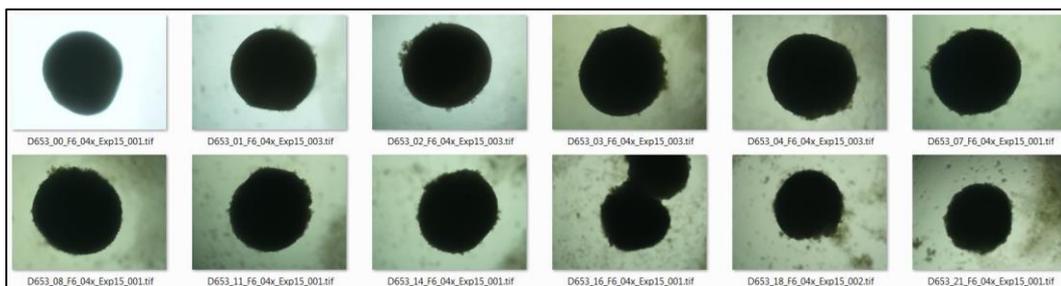


Figura 7.20: sequenza temporale sferoide piastra D653 pozzetto F6.

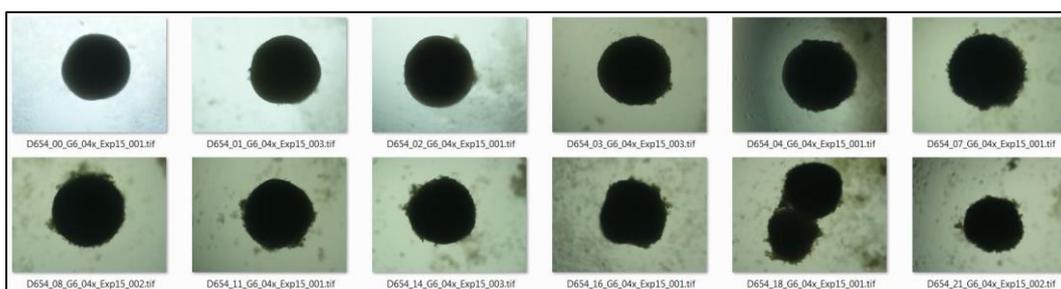


Figura 7.21: sequenza temporale sferoide piastra D654 pozzetto G6.

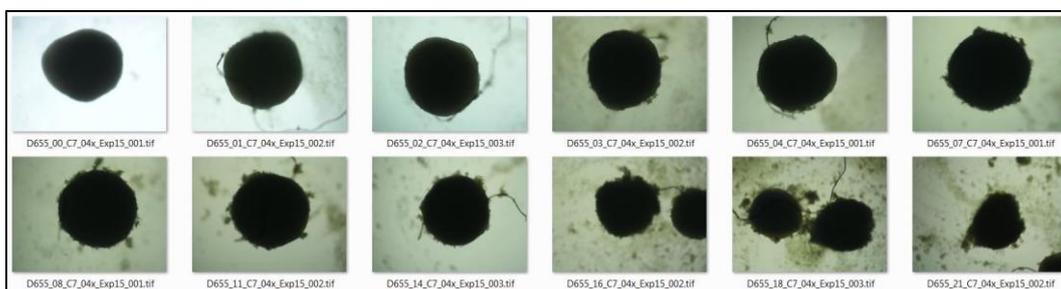


Figura 7.22: sequenza temporale sferoide piastra D655 pozzetto C7.

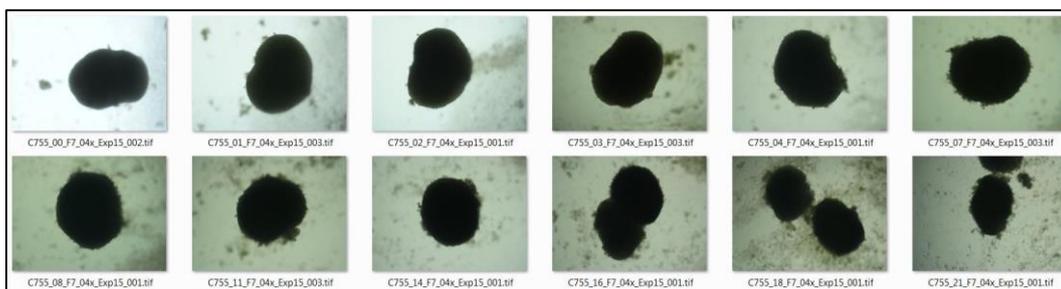


Figura 7.23: sequenza temporale sferoide piastra C755 pozzetto F7.

Osservando attentamente le sequenze mostrate relative alle piastre D655 e C755 possiamo affermare alcune conclusioni specifiche per sequenze di piastre trattate ad alto numero di frazioni:

- Classe A, per piastre trattate ad alto numero di frazioni:
 - 1) l'area nel tempo non si riduce molto;
 - 2) non vi è un'elevata percentuale di corpuscoli in sospensione;
 - 3) le sequenze sono relative a sferoidi di area generalmente piccola.
- Classe B, per piastre trattate ad alto numero di frazioni:

- 1) forte riduzione percentuale di area tra il giorno 7° e 11°;
 - 2) comparsa dall'11° giorno di una grande percentuale di corpuscoli dispersi nel terreno di coltura;
 - 3) assenza nel terreno di coltura di protuberanze, rigonfiamenti, secondi sferoidi generati.
- Classe C, per le piastre trattate ad un numero elevato di frazioni:
 - 1) esistono un numero notevole di sequenze identificate in Classe C. Ad esempio, le Figura 7.19 e Figura 7.20 presentano sequenze che potrebbero essere inclusa in Classe B ma dopo un certo numero di giorni presentano due sferoidi. Figura 7.21, Figura 7.22 e Figura 7.23 presentano sequenze che potrebbero essere incluse in Classe A ma con un numero elevato di corpuscoli nel terreno di coltura;
 - 2) il fattore comune è sicuramente lo sdoppiamento durante gli ultimi giorni;
 - 3) la riduzione di area è dovuta soprattutto allo sdoppiamento.

7.2 Conclusioni generali sull'analisi visiva

Oltre alle conclusioni specifiche precedentemente elencate come diverse caratteristiche delle Classi A e B a seconda del numero di frazioni di trattamento, dall'analisi visiva effettuata si possono trarre delle conclusioni generali, trasversali ai vari tipi di trattamento.

La prima conclusione molto importante è che gli sferoidi sembrano giacere su di un piano di equilibrio e con il passare del tempo sembra che non compiano movimenti rotatori sull'asse orizzontale al terreno: si limitano a traslare e a girare intorno all'asse perpendicolare alla piastra. Questa conclusione nasce dalla facilità di ritrovare nel tempo, osservando le sequenze dei singoli sferoidi, le eventuali protuberanze e rigonfiamenti e le caratteristiche del perimetro. Il fatto che la rotazione sull'asse orizzontale al terreno sia fortemente limitata è di fondamentale importanza in quanto una caratteristica come l'area bidimensionale è influenzata dall'angolo di proiezione dello sferoide (a meno che non sia di forma sferica perfetta).

La Classe A e la Classe B di ogni trattamento sembrano poter essere correlate ad uno specifico "stato di vitalità" dello sferoide. A prima vista, uno sferoide che non subisce danni continuerà ad essere uno sferoide vitale, con il caso estremo degli

sferoidi delle piastre o non trattate o con basso numero di trattamenti che iniziano a “figliare”. Invece, uno sferoide che subisce danni (o a causa di radiazioni o a causa di altri agenti non identificati) riduce la sua area ed espelle al suo esterno parte delle sue cellule costituenti (*probabilmente* morte).

L’ultima, ma importantissima conclusione, riguarda la capacità di predizione data dalla attenta osservazione di alcune caratteristiche degli sferoidi. In particolare, osservando la riduzione di area o la presenza di corpuscoli e detriti nel terreno di coltura nelle immagini al 7° e 11° giorno delle varie sequenze, è possibile prevedere quello che succederà allo sferoide al 21° giorno. Questa risulta essere una fantastica scoperta in quanto poter predire, osservando lo sferoide immediatamente nella settimana dopo i trattamenti, cosa succederà allo sferoide nelle settimane seguenti è di fondamentale interesse. Questa possibilità accorcia i tempi necessari per comprendere l’effetto di un trattamento, e quindi procedere in maniera repentina ad eventuali aggiustamenti del protocollo radioterapico, minimizzando future possibili ricadute cliniche. Inoltre ciò potrebbe costituire uno strumento per avere indicazioni sul come eventualmente modificare alcuni parametri del trattamento al fine di guidare lo sferoide nel raggiungere un determinato stato finale.

Capitolo 8

Analisi automatica per validazione analisi visiva

Allo scopo di validare in maniera automatica le conclusioni emerse dall'analisi visiva (riassunte nel Capitolo 7), abbiamo estratto in maniera automatica ed analizzato determinate *features* morfologiche in modo da verificare se esse siano effettivamente rappresentanti di variazioni significative tra gli sferoidi precedentemente classificati in Classe A e Classe B.

A tal fine abbiamo sfruttato il software Matlab realizzato per estrarre in maniera automatica *features* partendo dalle immagini di sferoidi.

L'analisi delle *features* è condotta nel seguente modo:

- si carica mediante il comando *load* il file “SchedaSferoidi” estratto tramite gli Algoritmi di *Image Processing* e *Image Analysis*; questo risulta essere una *struct* che contiene tanti elementi quanti sono gli sferoidi analizzati e all'interno di ogni elemento sono archiviati i valori numerici delle *features* considerate;
- si interroga la *struct* mediante un algoritmo appositamente creato:

```
y=ExtractDataSchedaSferoidi(SchedaSferoide,'piastra','pozzetto','feature');
```

in questo modo si ottiene l'andamento temporale y di una singola *feature* di interesse analizzando le immagini di un determinato *pozzetto* di una determinata *piastra*;

- si grafica la *feature* considerata nell'asse delle ordinate utilizzando come ascissa la Classe di appartenenza dell'evoluzione temporale.

Una volta estratte le *features* di interesse, analizzando l'andamento temporale o la correlazione tra più *features* sarà possibile stabilire se e quali *features* sono in grado o meno di essere indicative per classificare univocamente uno sferoide in Classe A o Classe B. In particolare, analizzando quantitativamente le *features* specifiche identificate visivamente come indicative della Classe A o B e sfruttando la classificazione manuale precedentemente condotta, saremo in grado di capire se le due Classi sono realmente separabili e se l'analisi automatica può essere usata in sostituzione all'analisi visiva.

Le *features* di interesse verranno ancora una volta analizzate in maniera separata dividendo i dati degli sferoidi in due gruppi:

1. sferoidi non trattati (A000) o trattati con un basso numero di frazioni (D651);
2. sferoidi trattati ad un alto numero di frazioni (D655 e C755).

Ancora una volta abbiamo trascurato i dati relativi alle piastre D652, D653 e D654. Partiamo ad analizzare l'andamento e la correlazione delle varie *features* identificate come significative durante l'analisi visiva.

8.1 Rapporto area 11° e 7° giorno (piastre A000, D651)

In Figura 8.1 possiamo osservare la distribuzione dei valori del rapporto tra l'area all'11° e al 7°giorno (relativi alle piastre A000 e D651) degli sferoidi precedentemente classificati ad occhio in Classe A, B o C.

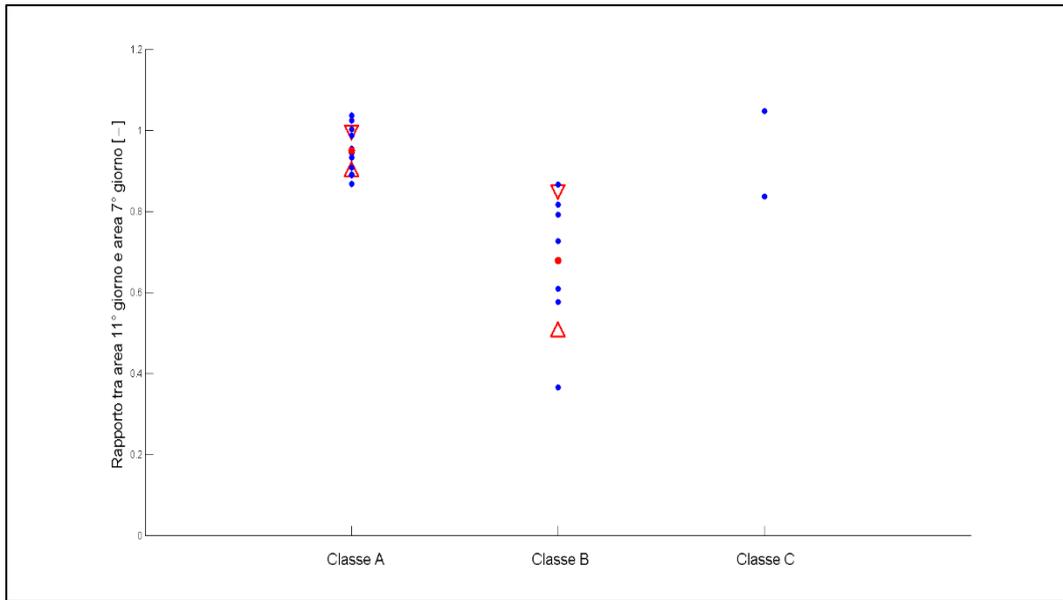


Figura 8.1: rapporto di area tra giorno 11 e giorno 7 suddividendo i dati (piastre A000 e D651) nei tre gruppi di sferoidi precedentemente classificati visivamente in Classe A, B o C.

Le distribuzioni del rapporto di area tra il giorno 11 e il giorno 7 risultano essere facilmente separabili: tranne pochi campioni a bordo del *range* le distribuzioni risultano completamente separabili. Questo indica che la *feature* “rapporto di area tra giorno 11 e giorno 7” può essere utilizzata per classificare in maniera automatica uno sferoide in classe A o B. La Classe C in questo caso è composta da solo due campioni quindi non è possibile motivare qualsiasi analisi statistica. Confermiamo quindi che anche per mezzo di una analisi automatica (in questo caso di una singola *feature*) si evince che realmente gli sferoidi classificati in Classe A sono caratterizzati da un rapporto tra l’area all’11° e l’area al 7° giorno mediamente (vedi Tabella 8.1) più alto rispetto a quelli classificati in Classe B.

	CLASSE A	CLASSE B	CLASSE C
MEDIA [-]	0.95	0.68	-
DEV.ST [-]	0.05	0.18	-

Tabella 8.1: Media e deviazione standard calcolate a riguardo della *feature* “rapporto area tra 11 giorno e 7 giorno”, a riguardo degli sferoidi nelle piastre A000 e D651.

8.2 Quantità di detriti presenti (piastre A000, D651)

Sempre a riguardo delle piastre A000 e D651, per ogni sferoide abbiamo analizzato la quantità di detriti presenti nel pozzetto. In particolare, la *feature* definita è la somma dei detriti presenti nel pozzetto analizzando tutte le immagini di ogni pozzetto, ovvero dal giorno 0 al giorno 21.

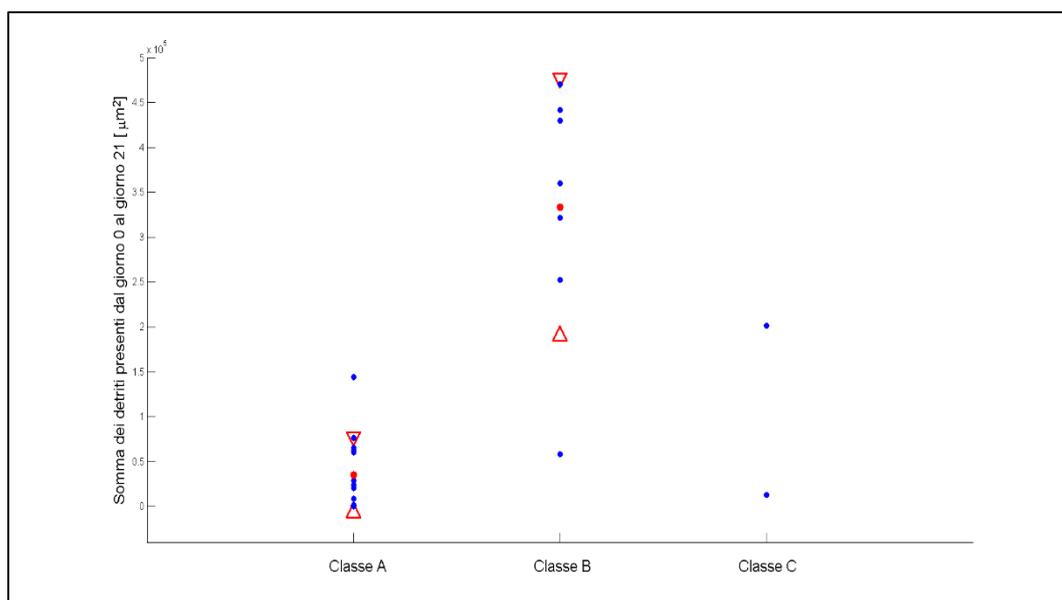


Figura 8.2: somma dei detriti presenti nel pozzetto dal giorno 0 al giorno 21 suddividendo i dati (piastre A000 e D651) nei tre gruppi di sferoidi precedentemente classificati visivamente in Classe A, B o C.

Anche in questo caso le distribuzioni relative alla somma dei detriti risultano essere facilmente separabili: tranne un paio di campioni a bordo del *range* le distribuzioni risultano completamente separabili. Questo indica che anche la *feature* “somma di detriti” può essere utilizzata per classificare in maniera automatica uno sferoide in classe A o B. Confermiamo quindi che anche per mezzo di una analisi automatica (in questo caso di una singola *feature*) si evince che realmente gli sferoidi classificati in Classe A sono caratterizzati mediamente da un valore basso di detriti (vedi Tabella 8.2) rispetto a quelli classificati in Classe B.

	CLASSE A	CLASSE B	CLASSE C
MEDIA [µm²]	3.51×10^4	3.33×10^5	-

DEV.ST [μm^2] | 4.20×10^4 1.43×10^5 -

Tabella 8.2: Media e deviazione standard calcolate a riguardo della *feature* “*somma dei detriti presenti nel pozzetto dal giorno 0 al giorno 21*”, a riguardo degli sferoidi nelle piastre A000 e D651.

8.3 Rapporto area 11° e 7° giorno (piastre D655, C755)

Abbiamo studiato la distribuzione delle *features* analizzate a riguardo degli sferoidi presenti nelle piastre A000 e D651 anche per le piastre D655 e C755, ovvero quelle trattate con 5 frazioni.

In Figura 8.3 sono riportati i valori relativi al rapporto tra le aree all'11° e al 7° giorno.

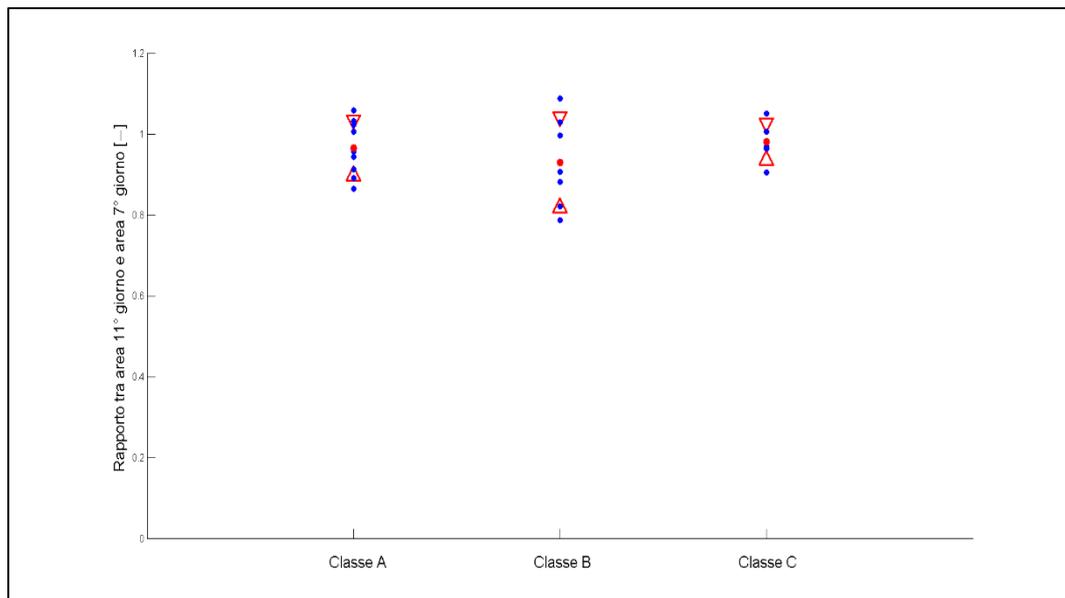


Figura 8.3: rapporto di area tra giorno 11 e giorno 7 suddividendo i dati (piastre D655 e C755) nei tre gruppi di sferoidi precedentemente classificati visivamente in Classe A, B o C.

Questa volta le distribuzioni non risultano facilmente separabili, al contrario di quanto avveniva in precedenza. Questo potrebbe essere dovuto al diverso modo di

evolversi dell'area dello sferoide che magari non subirà più una repentina diminuzione nei due giorni citati, ma potrebbe ridursi in maniera più graduale. Per verificare quest'ipotesi abbiamo modificato l'analisi considerando come *feature* non il semplice rapporto di area tra l'11° giorno e il 7°, ma la somma di tutte le variazioni delle aree considerando sempre il rapporto tra il giorno n e in giorno $n-1$ (dati riportati in Figura 8.4).

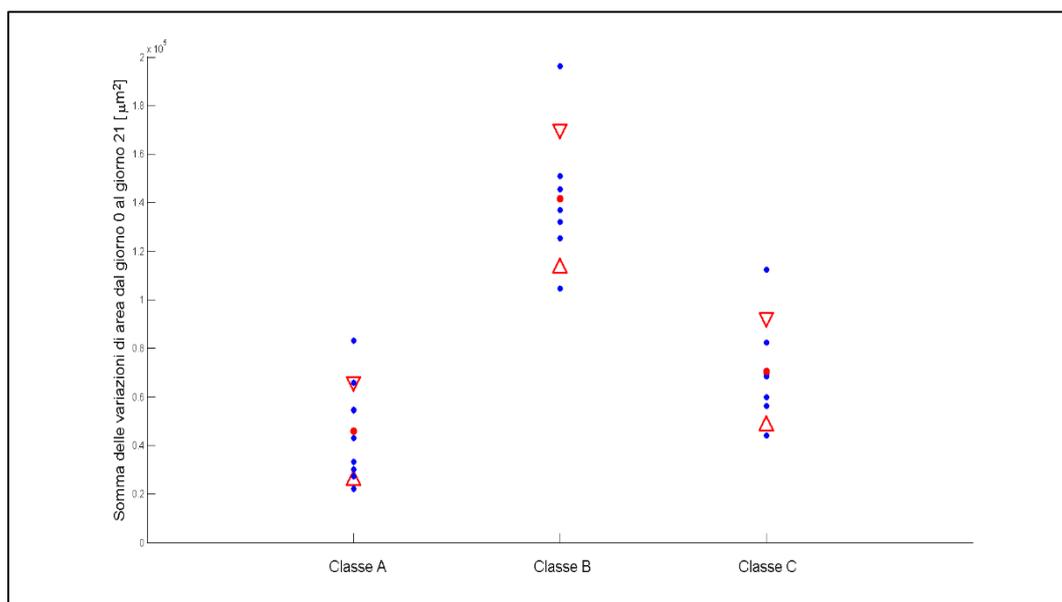


Figura 8.4: somma di tutte le variazioni di area dal giorno 0 al giorno 21 suddividendo i dati (piastre D655 e C755) nei tre gruppi di sferoidi precedentemente classificati visivamente in Classe A, B o C.

Effettivamente modificando in questo modo la *feature* si riesce ad ottenere una buona separazione tra le classi A e B, validando quindi l'affermazione che indicava la Classe A come una classe dove mediamente (vedi Tabella 8.3) l'area dello sferoide si conserva di più nel tempo e la Classe B come una Classe più dinamica. La Classe C si colloca in posizione intermedia come a rappresentare un collante tra le due classi.

	CLASSE A	CLASSE B	CLASSE C
MEDIA [µm²]	4.60×10^4	1.42×10^5	7.04×10^4
DEV.ST [µm²]	2.02×10^4	2.84×10^4	2.21×10^4

Tabella 8.3: Media e deviazione standard calcolate a riguardo della *feature* "somma di tutte le variazioni di area dal giorno 0 al giorno 21", a riguardo degli sferoidi nelle piastre D655 e C755.

8.4 Quantità di detriti presenti (piastre D655, C755)

Anche per gli sferoidi delle piastre D655 e C755 abbiamo analizzato la distribuzione della *feature* “somma di detriti e corpuscoli presenti nel terreno di coltura” prendendo in considerazione l’area dei corpuscoli presenti in tutte le immagini della sequenza temporale di un determinato sferoide (Figura 8.5).

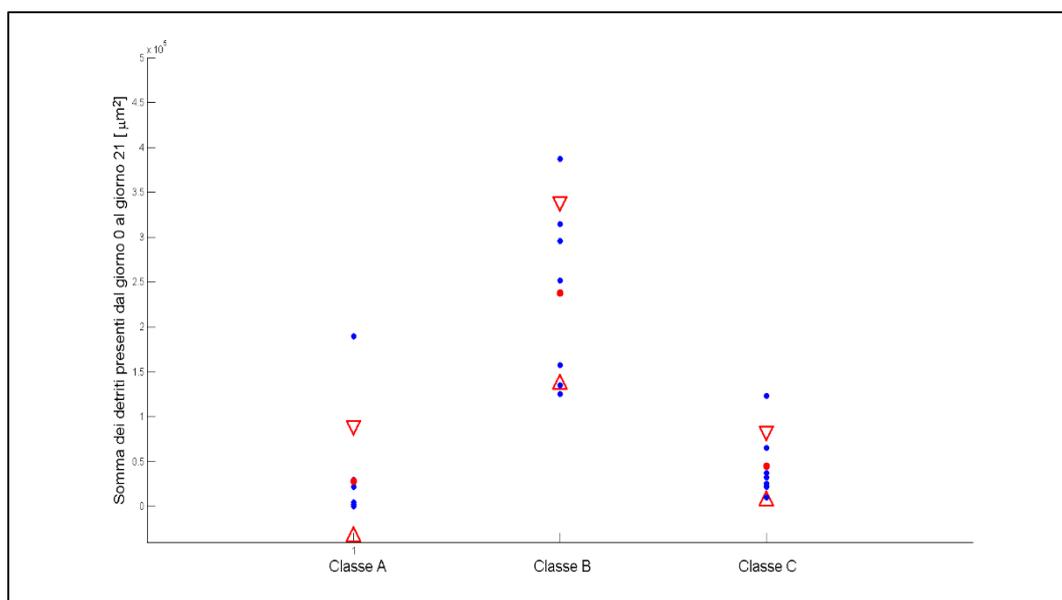


Figura 8.5: somma dei detriti presenti nel pozzetto dal giorno 0 al giorno 21 suddividendo i dati (piastre D655 e C755) nei tre gruppi di sferoidi precedentemente classificati visivamente in Classe A, B o C.

Ancora gli sferoidi classificati visivamente in Classe A sembrano essere caratterizzati da un minor numero di detriti rispetto a quelli classificati in Classe B. La Classe C, in questo caso molto densa e compatta risulta essere caratterizzata da una distribuzione molto simile a quella della Classe A e separata da quella della Classe B. Questo appunto perché visivamente in Classe B sono stati considerati solo quegli sferoidi caratterizzati da un alto numero di detriti. Infatti, a livello visivo, le sequenze in Classe C (Figura 8.6) a livello di detriti risultano essere simili a quelle in Classe A (Figura 8.7), ma in realtà sono caratterizzate da un’evoluzione differente dalla Classe A per quanto riguarda l’area dello sferoide.

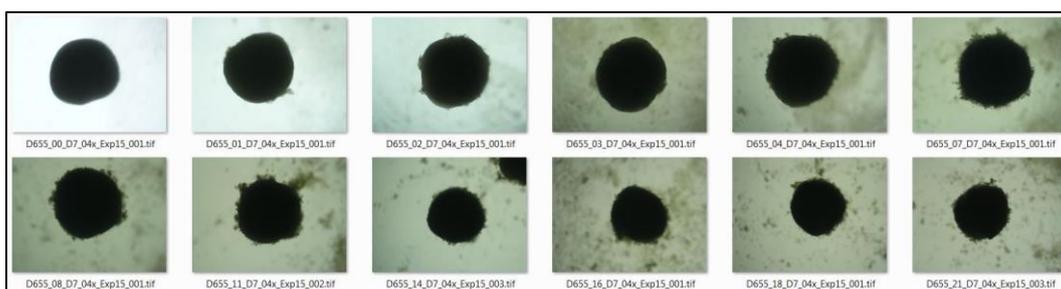


Figura 8.6: sequenza temporale di immagini relative allo sferoide della piastra D655 appartenente alla Classe C.

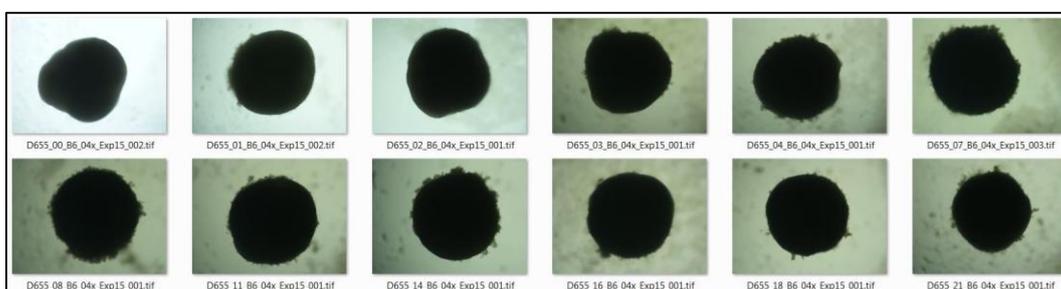


Figura 8.7: sequenza temporale di immagini relative allo sferoide della piastra D655 appartenente alla Classe A.

In Tabella 8.4 sono riportati la media e la deviazione standard calcolata in maniera separata per le tre classi.

	CLASSE A	CLASSE B	CLASSE C
MEDIA [μm^2]	2.80×10^4	2.38×10^5	4.51×10^4
DEV.ST [μm^2]	6.15×10^4	1.01×10^5	3.85×10^4

Tabella 8.4: Media e deviazione standard calcolate a riguardo della *feature* “somma dei detriti presenti nel pozzetto dal giorno 0 al giorno 21”, a riguardo degli sferoidi nelle piastre D655 e C755.

8.5 Valore assoluto di area al giorno 7 (piastre D655, C755)

L'ultima analisi effettuata riguarda una caratteristica molto semplice: l'area degli sferoidi al 7° giorno. Infatti esclusivamente valutando l'area degli sferoidi al 7° giorno si possono distinguere le vari classi individuate visivamente (Figura 8.8).

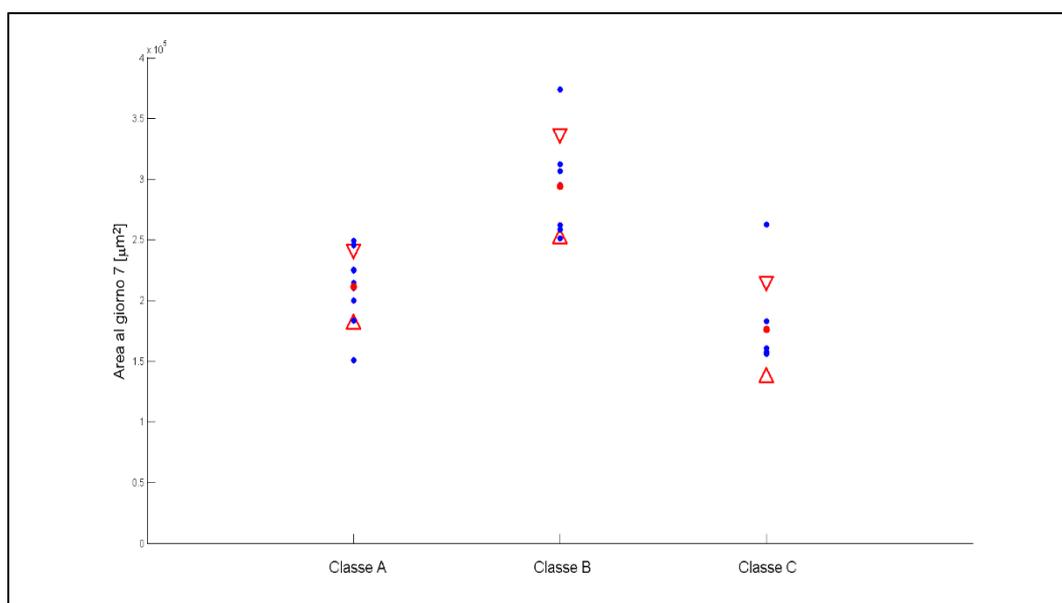


Figura 8.8: area del 7° giorno suddividendo i dati (piastre D655 e C755) nei tre gruppi di sferoidi precedentemente classificati visivamente in Classe A, B o C

La distribuzioni riportate in questo grafico confermano che gli sferoidi caratterizzati da un'area grande al giorno 7 appartengono alla Classe B. Se l'area è più piccola, gli sferoidi risultano classificati in Classe A (nella quale gli sferoidi non modificano tanto le loro caratteristiche morfometriche, Figura 8.9) o nella Classe C dove tendono a sdoppiarsi sul finale (Figura 8.10).

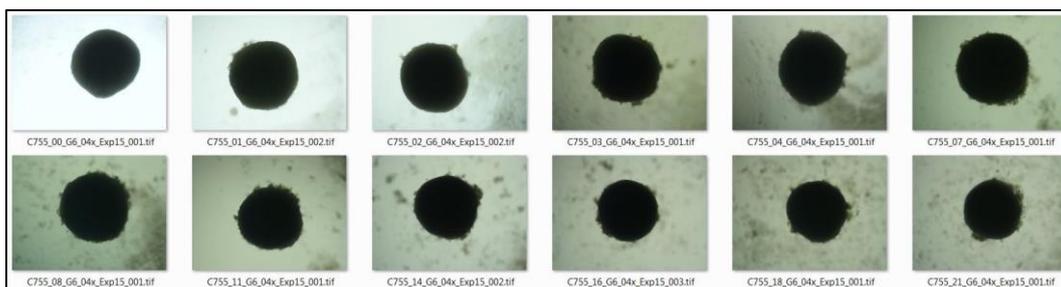


Figura 8.9 sequenza temporale di immagini relative allo sferoide della piastra C755 appartenente alla Classe A.

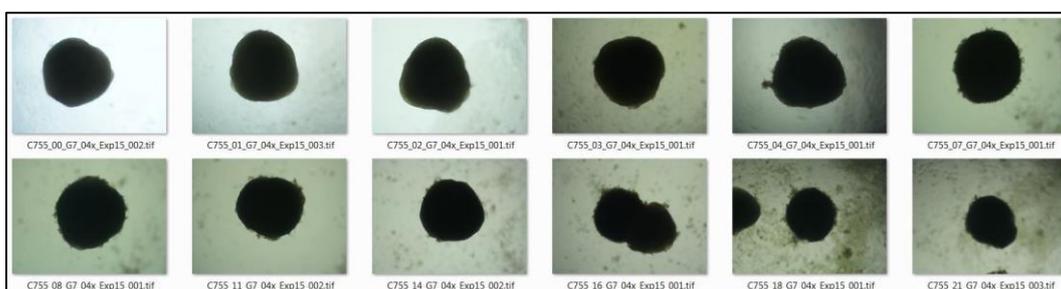


Figura 8.10: sequenza temporale di immagini relative allo sferoide della piastra C755 appartenente alla Classe C.

In Tabella 8.5 sono riportati la media e la deviazione standard calcolata in maniera separata per le tre classi.

	CLASSE A	CLASSE B	CLASSE C
MEDIA [μm^2]	2.11×10^5	2.94×10^5	1.76×10^5
DEV.ST [μm^2]	3.07×10^4	4.27×10^4	3.93×10^4

Tabella 8.5: Media e deviazione standard calcolate a riguardo della *feature* "area del 7° giorno", a riguardo degli sferoidi nelle piastre D655 e C755.

Capitolo 9

Analisi automatica a scopo predittivo

Grazie alle caratteristiche identificate per mezzo dell'analisi visiva, siamo in grado di utilizzare l'analisi automatica di singole *feature* o gruppi di *features* al fine di identificare automaticamente la classe dello sferoide e quindi prevedere il suo comportamento nel tempo. Questo risulta essere un importante risultato in quanto fornirebbe al Radioterapista un valido ausilio per predire in maniera automatica lo stato del tumore ad esempio dopo 10 giorni dal trattamento e eventualmente correggere la terapia, semplicemente elaborando immagini acquisite dopo 3 giorni.

L'analisi delle *features* è condotta nel seguente modo:

- si carica mediante il comando *load* il file “SchedaSferoidi” estratto tramite gli Algoritmi di *Image Processing* e *Image Anaysis*; questo risulta essere una *struct* che contiene tanti elementi quanti sono gli sferoidi analizzati e all'interno di ogni elemento sono archiviati i valori numerici delle *features* considerate;
- si interroga la *struct* mediante un algoritmo appositamente creato:

```
y=ExtractDataSchedaSferoidi (SchedaSferoide, 'piastra', 'pozzetto', 'feature');
```

in questo modo si ottiene l'andamento temporale y di una singola *feature* di interesse analizzando le immagini di un determinato *pozzetto* di una determinata *piastra*;

- si graficano in piani mono-, bi- e multi-dimensionali alcune *features* di interesse in modo da individuare in maniera automatica dei comportamenti tipici in grado di prevedere quello che avverrà al tumore nei giorni seguenti.

Nei prossimi esempi riporteremo alcune analisi condotte considerando due *features* alla volta in uno spazio delle *features* quindi bidimensionale. Statisticamente, per analizzare contemporaneamente più *features* sarebbero necessari più campioni in quanto all'aumentare della dimensionalità dello spazio dovrebbe aumentare di conseguenza il campione analizzato, che risulta già limitato.

Le *features* che hanno dimostrato di poter essere utilizzate per predire l'andamento del tumore identificando in un determinato istante di tempo se lo sferoide può essere considerato di Classe A o Classe B sono risultate:

- i rapporti tra aree;
- il quantitativo di detriti in sospensione contenuti nel pozzetto.

Riportiamo a seguito alcuni risultati ottenuti al fine di classificare in maniera automatica uno sferoide in Classe A e B conoscendo il trattamento e il numero di sedute subite.

9.1 Analisi dell'area iniziale (piastre D655 e C755)

Soffermandoci a condurre l'analisi solo sulle piastre D655 e C755 caratterizzate da un alto numero di frazionamenti, abbiamo preso in considerazione l'area dello sferoide nel 7° giorno (asse y Figura 9.1) e il rapporto tra l'area dello sferoide al 21° giorno e al 7° (asse x Figura 9.1).

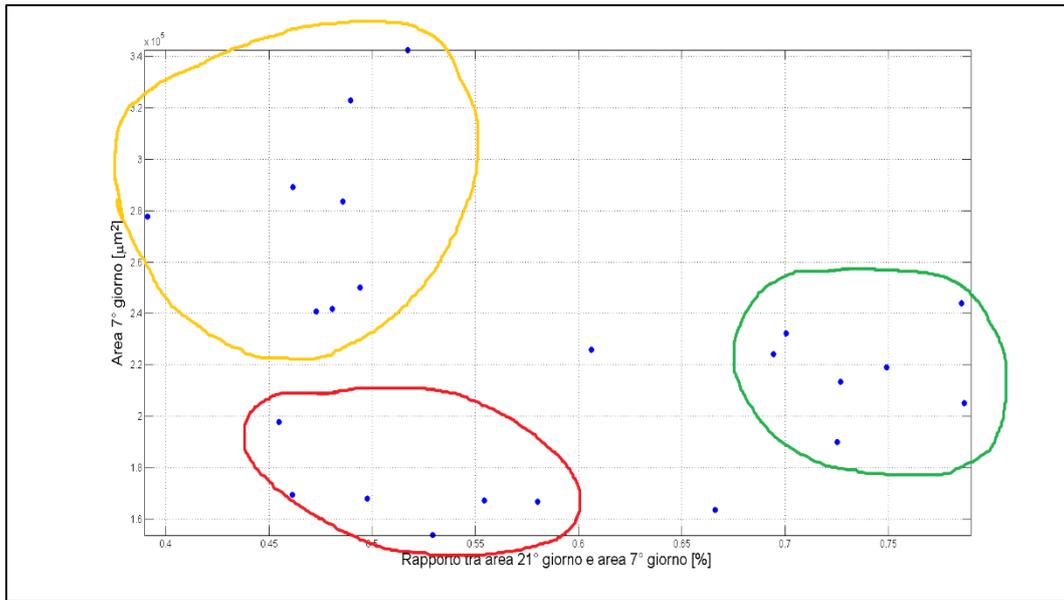


Figura 9.1: grafico relativo al confronto tra area di uno sferoide al 7° giorno (asse y) e rapporto tra area al 21° giorno e area al 7° (asse x).

Come possiamo notare osservando i dati in Figura 9.1, sono facilmente individuabili dal grafico tre *cluster*, cerchiati con colore differente.

1. **Cluster giallo:** indica quel gruppo di sferoidi che posseggono un area al 7° giorno maggiore di $2.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; questi hanno una riduzione di area tra il 21 e il 7 giorno superiore al 50% che è una delle caratteristiche salienti evidenziate precedentemente per la Classe A.
2. **Cluster verde:** indica quel gruppo di sferoidi che posseggono un area al 7° giorno compresa tra circa $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ e $2.4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; questi avranno una riduzione di area tra il giorno 21 e il giorno 7 inferiore al 40%. Questa è una delle caratteristiche salienti evidenziate precedentemente per la classe B.
3. **Cluster rosso:** indica quel gruppo di sferoidi che posseggono un area al 7° giorno inferiore di $2.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$; questi avranno una riduzione di area tra il giorno 21 e il giorno 7 molto diversificata e potrebbero rappresentare la Classe P vista in precedenza.

Se proviamo ad eseguire l'algoritmo di *clustering* descritto nel Capitolo 6 otteniamo il seguente output (Figura 9.2).

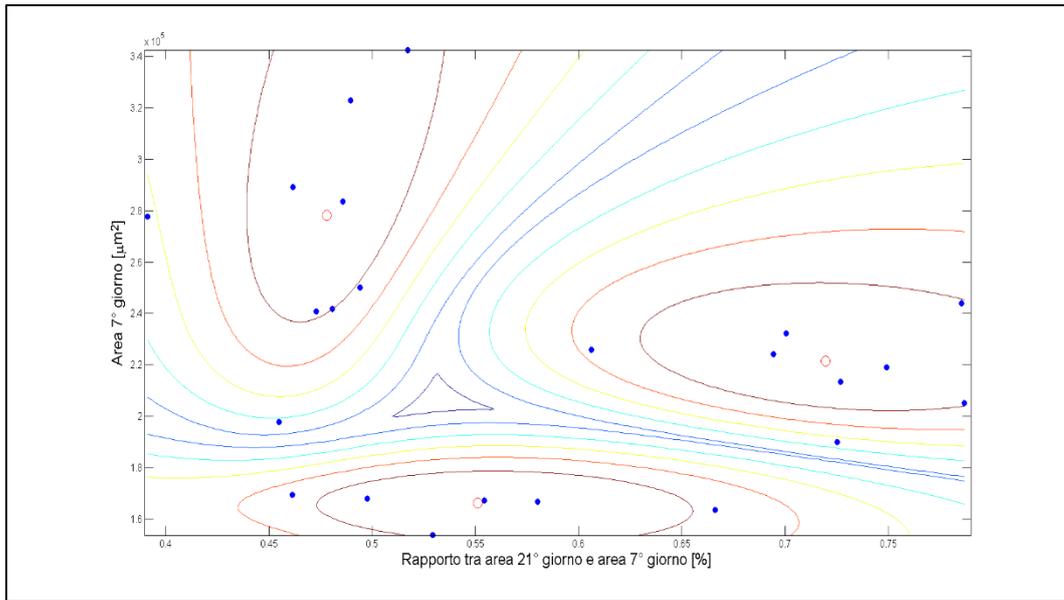


Figura 9.2: risultato del *clustering* automatico degli sferoidi sulla base delle *features*: area di uno sferoide al 7° giorno, rapporto tra area al 21° giorno e area al 7°.

Questo raggruppamento automatico può essere confrontato con quello fatto ad occhio ottenendo una sorta di *performance* dell'algoritmo.

9.1.1 Confronto classificazione manuale e automatica

Effettuando questo confronto si ottiene una *performance* pari all'87% su di un campione di 23 sequenze temporali analizzate: ovvero l'87% degli esempi veniva correttamente etichettato all'interno delle tre classi definite in precedenza (Classe A, Classe B o Classe P).

Il 13% degli sferoidi sono stati erroneamente catalogati. Questi campioni, tre per l'esattezza, sono evidenziati in Figura 9.3 colorati di rosso, verde e viola.

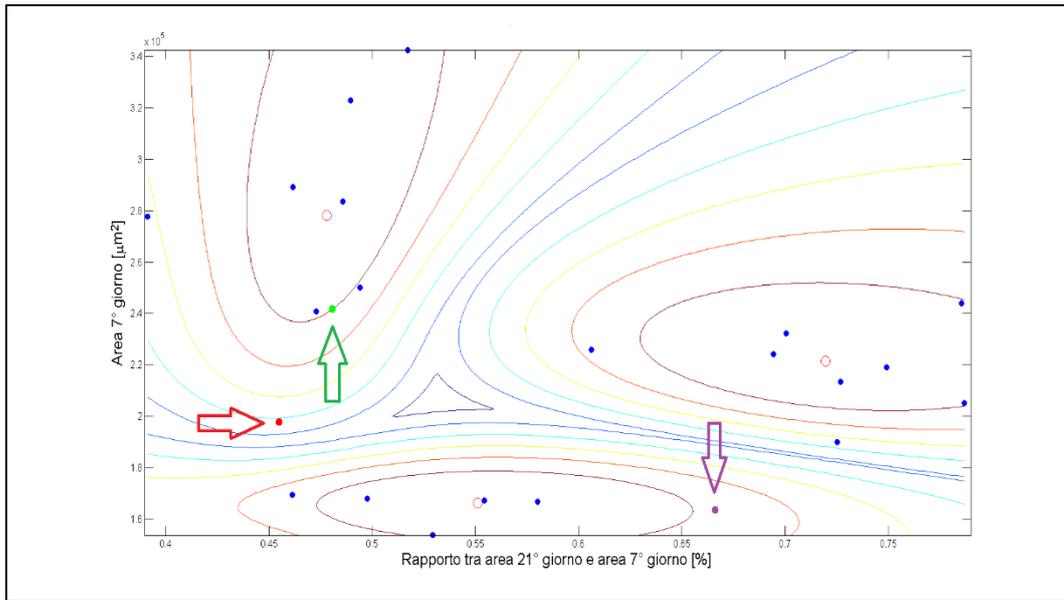


Figura 9.3: risultato del *clustering* automatico con in viola, verde e rosso i punti visivamente classificati in maniera diversa.

Gli esempi classificati in maniera errata dal metodo di *clustering* sono stati presi evidenziati in figura. Andiamo ad analizzarli nel dettaglio.

Campione colorato in rosso: automaticamente è stato assegnato alla Classe B mentre ad occhio era stato assegnato alla Classe C. Possiamo effettivamente notare dal grafico che il punto relativo all'esempio errato si trova in una regione di confine tra le due classi e quindi è facilmente confondibile. Analizzando inoltre la sequenza di immagini relative al pozzetto in esame (Figura 9.4) ed un esempio di sequenza temporale correttamente catalogata appartenente alla Classe B (Figura 9.5) possiamo notare che queste due evoluzioni temporali posseggono analogie in comune ma non tali da spingere l'occhio ad inserirle nella stessa Classe, mentre le aree del 7° e del 21° giorno sono effettivamente simili.

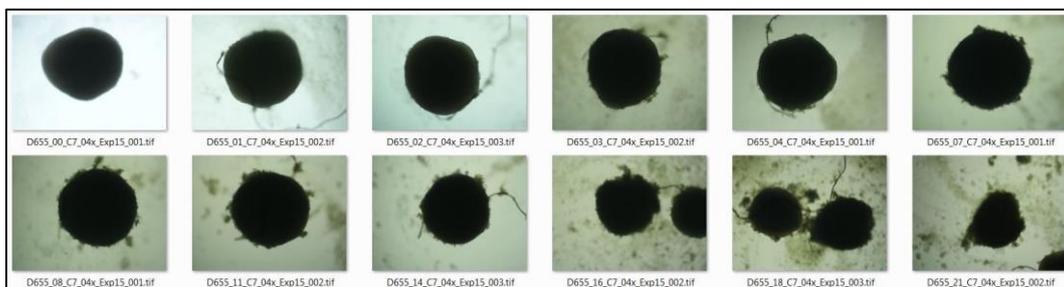


Figura 9.4: esempio automaticamente classificato in Classe B, manualmente in Classe C.

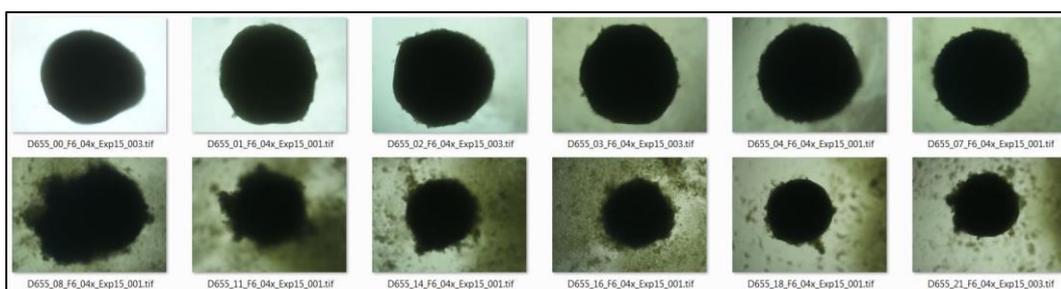


Figura 9.5: esempio automaticamente e manualmente classificato in Classe B.

Campione colorato in verde: automaticamente è stato assegnato alla Classe B mentre ad occhio era stato assegnato alla Classe P. A contrario dell'esempio precedente il campione si trova nelle vicinanze del centroide del *cluster*. Per capire meglio proviamo a osservare l'immagine relativa alla sequenza temporale dello sferoide in esame (Figura 9.6).

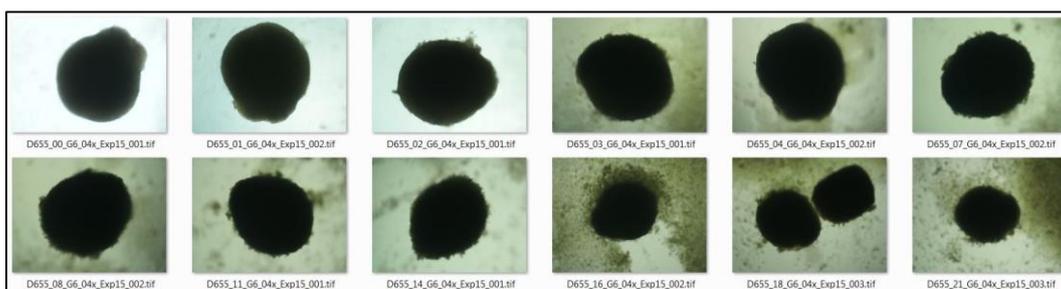


Figura 9.6: esempio automaticamente classificato in Classe B, manualmente in Classe C.

Come per l'esempio precedente possiamo notare che la sequenza in Figura 9.6 assomiglia a quella in Figura 9.5, ma non da dire ad occhio che sono simili. Effettivamente però le aree dei giorni 7° e 21° sono molto simili.

Campione colorato in viola: automaticamente è stato assegnato alla Classe C mentre ad occhio era stato assegnato alla Classe A. Anche in questo caso lo sferoide si trovava in una regione di confine tra le due classi. Confrontiamo ora le immagini dello sferoide in esame (Figura 9.7) e la Figura 9.8.

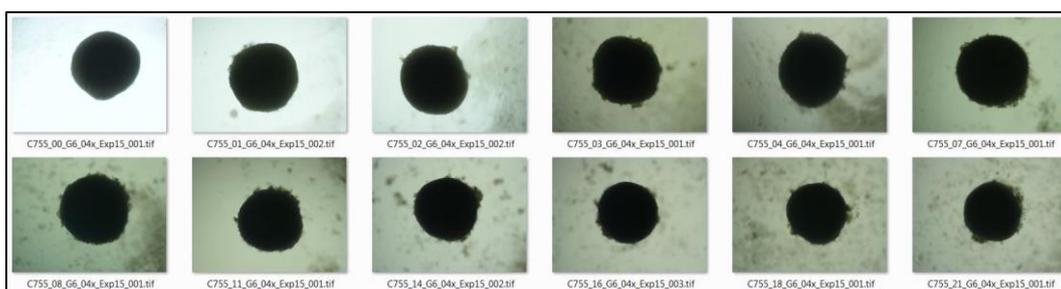


Figura 9.7: esempio automaticamente classificato in Classe C, manualmente in Classe A.

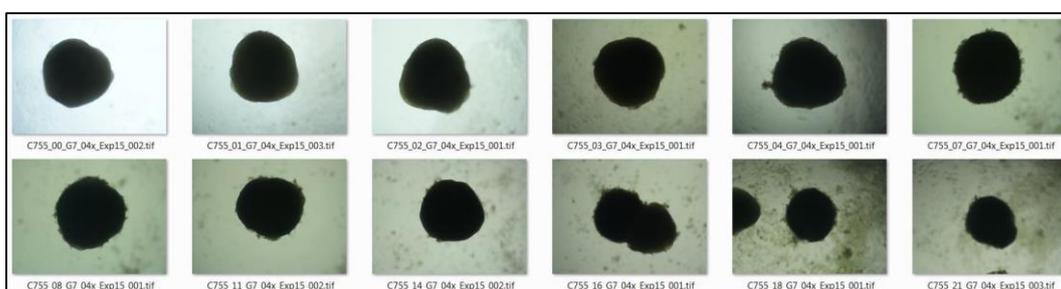


Figura 9.8: esempio automaticamente e manualmente classificato in Classe C.

Come possiamo notare le evoluzioni sono abbastanza simili tra di loro se non fosse per una più accentuata riduzione di area per lo sferoide correttamente catalogato. Se invece si osservano le aree dei giorni 7 e 21 sono relativamente simili.

9.1.2 Conclusioni

Questa prima analisi prova la capacità di alcune *features* dell'essere indicative e predittive del comportamento dello sferoide. Infatti dalla semplice conoscenza dell'area al giorno 7 (ovvero 3 giorni dopo la fine del trattamento radioterapico) si è in grado di identificare la classe dello sferoide e quindi prevedere la sua evoluzione temporale. Questo risultato, se propriamente validato attraverso uno studio più ampio con una statistica più vasta, potrebbe essere uno strumento di importanza fondamentale per il radioterapista che analizzando l'area al 7 giorno potrebbe dire se il trattamento è stato o meno efficace sul paziente potendo anche intervenire per cercare di guidare il tumore verso uno stato desiderato.

9.2 Analisi dell'area iniziale (piastre A000 e D651)

L'analisi dell'area iniziale è stata ripetuta prendendo in considerazione anche le piastre A000 e D651) caratterizzate da un'assenza di trattamento o da un trattamento ma con un basso numero di frazioni. In questo caso non sono state prese in considerazione l'area al giorno 7 e il rapporto tra le aree al giorno 11 e 7 perché già ad occhio avevamo notato che in questo caso non sembra esserci una correlazione tra area iniziale e Classe A o B. Abbiamo considerato come *features* due rapporti di aree: il primo tra il giorno 11 e il giorno 7 (asse y Figura 9.9), il secondo tra il giorno 21 e il giorno 7 (asse x Figura 9.9).

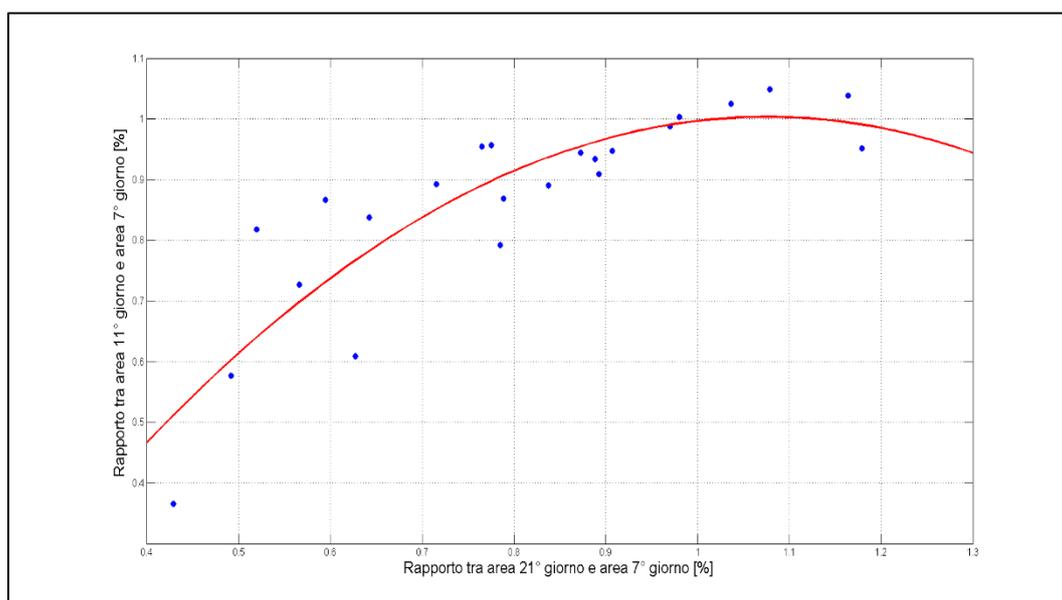


Figura 9.9: grafico relativo al confronto tra rapporto tra area all'11° giorno e area al 7° (asse y) e rapporto tra area al 21° giorno e area al 7° (asse x).

La curva rappresentata in rosso nella figura è una curva di secondo grado (biquadratica) interpolante i punti (coefficiente di determinazione $R^2=0.77$). Fittando una retta si ottiene un *fitting* dei punti visivamente peggiore ($R^2=0.66$). Aumentando il grado del polinomio interpolante il *fitting* migliora leggermente ($R^2=0.79$) ma si hanno problemi di *overfitting*. Per interpretare meglio il dato bisogna ricordare che se R^2 è prossimo ad 1 significa che i regressori predicano bene il valore della variabile dipendente in campione, mentre se è pari a 0 significa

che non lo fanno. Grazie all'ottimo valore R^2 ottenuto dal *fitting* della curva biquadratica, possiamo considerare la equazione della curva biquadratica una ottima approssimazione analitica delle due *features* analizzate. Partendo quindi dalla conoscenza dell'area al giorno 7 e del rapporto dell'area del tumore nel giorno 11 e giorno 7 (valori stimabili dal radiologo già nella settimana seguente alla fine del trattamento del tumore) è possibile prevedere l'area del tumore al giorno 21.

Osservando inoltre i dati ottenuti analizzando gli sferoidi presenti nelle piastre A000 e D651 in maniera separata si nota una caratteristica interessante (Figura 9.10).

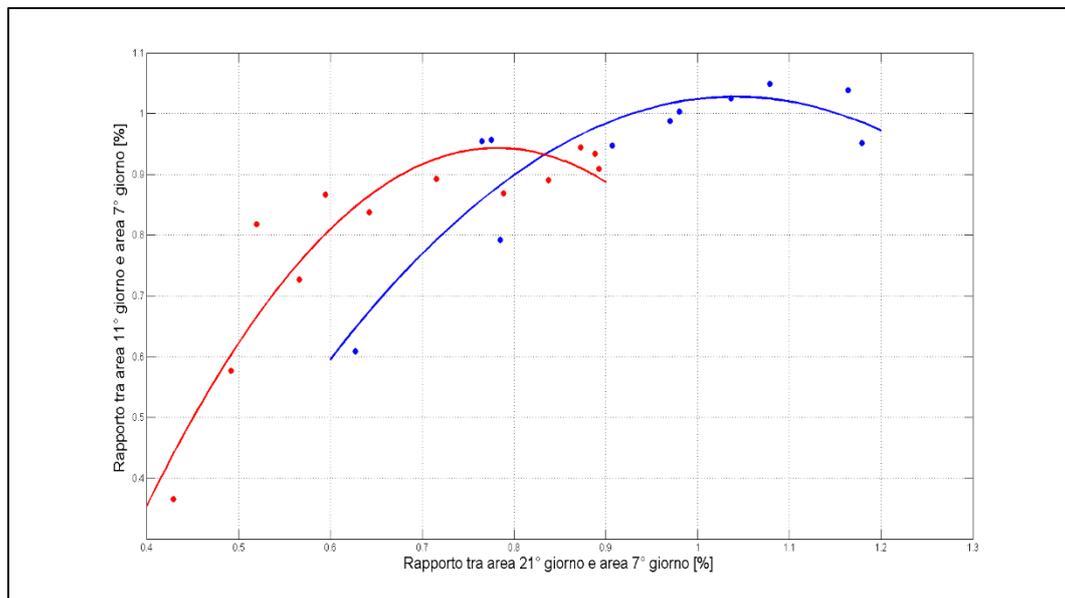


Figura 9.10: confronto tra le curve interpolanti nei due trattamenti a basso numero di frazioni. In blu i valori estratti dall'analisi degli sferoidi contenuti nella piastra A000 e in rosso quelli nella piastra D651.

La piastra A000 contiene sferoidi che non hanno subito trattamenti, mentre la piastra D651 corrisponde alla piastra che ha subito un trattamento a 65 dGy. Detto ciò possiamo notare che le due curve sembrano essere una la versione traslata dell'altra. La traslazione avviene dalla piastra A000 alla piastra D651 passando da percentuali più alte verso percentuali più basse, ovvero da riduzioni più modeste dell'area verso riduzioni più estese. Questo è di semplice comprensione in quanto come detto una subisce un trattamento mentre l'altra no, ma è interessante notare che l'andamento è comunque simile nelle due piastre.

9.2.1 Conclusioni

Anche per le piastre A000 e D651 abbiamo visto che l'analisi dell'area in alcuni giorni particolari può essere fondamentale per la previsione dello stato del tumore a fine trattamento. In questo caso dalla semplice conoscenza dell'area al giorno 7 (ovvero 3 giorni dopo la fine del trattamento radioterapico) e al giorno 11 (7 giorni dopo il trattamento) si è in grado di prevedere le dimensioni del tumore al giorno 21.

Capitolo 10

Conclusioni e sviluppi futuri

Questo lavoro rappresenta uno dei pochi studi condotti in ambito radiobiologico in cui viene discussa la validità dell'utilizzo degli sferoidi multicellulari eterogenei come modello tridimensionale di tumore allo stato solido tipicamente utilizzato in ambito pre-clinico al fine di testare differenti parametri di trattamento o combinazione di terapie antitumorali. In particolare, in questo lavoro quasi cento sferoidi trattati radiobiologicamente sono stati analizzati singolarmente, senza soffermarsi alla semplice valutazione degli effetti medi causati da una particolare terapia su una popolazione di sferoidi teoricamente identici.

Tipicamente gli effetti delle terapie vengono valutati analizzando l'evoluzione temporale post trattamento del volume degli sferoidi. Il valore medio di decremento volumetrico viene considerato quantitativamente per confrontare differenti terapie, assumendo, in maniera molto semplicistica, che l'efficacia della terapia sia proporzionale alla riduzione del volume del tumore. Nel nostro caso abbiamo messo in discussione la validità delle affermazioni sostenute da valori medi ed abbiamo condotto analisi sui singoli sferoidi, al fine di identificare differenze significative e sottoclassi (caratterizzate da probabili differenti caratteristiche biologiche) all'interno di una popolazione supposta dal biologo essere costituita da elementi identici.

Il primo risultato di questo lavoro è stato l'identificazione visiva di una serie di caratteristiche morfometriche degli sferoidi, auspicabilmente correlabili a determinati stati biologici. La semplice analisi del volume degli sferoidi, tuttora utilizzato come indicatore di efficacia delle terapie, è stata affiancata dall'analisi di forma, frastagliatura, presenza di secondi corpi generati e quantità di corpuscoli liberati nel terreno di coltura. In particolare, queste caratteristiche hanno permesso di individuare, basandosi su una semplice analisi visiva, sottopopolazioni di sferoidi facilmente identificabili all'interno di una singola popolazione teoricamente composta da sferoidi identici. In particolare, queste popolazioni hanno mostrato non solo caratteristiche morfometriche differenti, ma anche un'evoluzione temporale di classi che lascia presagire un diverso stato biologico finale.

Partendo quindi dall'acquisizione di immagini relative a popolazioni di sferoidi trattati secondo differenti protocolli radioterapici, abbiamo studiato metodi e realizzato algoritmi al fine di estrarre e analizzare in maniera totalmente automatica le caratteristiche morfometriche precedentemente visivamente definite. Abbiamo quindi classificato i differenti sferoidi in sottopopolazioni sulla base di queste caratteristiche. In particolare, i differenti sferoidi di ogni popolazione sono stati classificati in due distinte sottopopolazioni: la prima composta da sferoidi in cui la riduzione volumetrica e la dissociazione cellulare fanno supporre un generale stato di "morte", o quantomeno di regressione, del tumore, la seconda composta da elementi che sembrano essere resistenti ai trattamenti e non subirne gli effetti.

Gli algoritmi realizzati sono stati inoltre utilizzati al fine di prevedere, analizzando immagini acquisite entro 7 giorni dall'ultimo trattamento, quale sarà lo stato futuro dello sferoide, ad esempio la dimensione del volume, dopo 20 giorni dall'ultimo trattamento. Queste previsioni potrebbero rivelarsi un importante strumento a disposizione del radioterapista al fine di consentirgli di valutare, in un periodo breve, gli effetti a lungo termine della terapia ed eventualmente correggere la stessa al fine di guidare il tumore fino al raggiungimento di uno stato desiderato.

Lo studio è stato condotto utilizzando sferoidi eterogenei di cellule CAEP (carcinoma epidermoidale polmonare), ma il protocollo di acquisizione di immagini utilizzato, i metodi studiati e gli algoritmi realizzati hanno validità del tutto generale. La possibilità di ottenere tramite analisi visiva non invasiva informazioni predittive sullo stato biologico presente e futuro del tumore risulta essere per il radioterapista uno strumento di estremo interesse e del tutto innovativo al fine di valutare gli effetti di terapie antitumorali in atto ed eventualmente avere una possibilità di correzione del protocollo radioterapico.

I principali sviluppi futuri a riguardo dello studio svolto saranno il validare statisticamente i risultati ottenuti ed il rafforzare il concetto della suddivisione in sottoclassi degli sferoidi attraverso una serie di test biologici in grado di evidenziare caratteristiche biologiche significative dei vari gruppi identificati sulla base di caratteristiche morfometriche. A riguardo di questo secondo punto stiamo valutando con i biologi la possibilità di analizzare la percentuale di cellule vive e morte suddividendo, tramite tripsina, i singoli sferoidi in tre strati. Questo potrebbe dare informazioni a supporto delle differenti manifestazioni raccolte analizzando visivamente gli sferoidi. Ad esempio, uno sferoide con bordo esterno completamente frastagliato e sfaldato è probabile che abbia uno strato esterno caratterizzato da un elevato numero di cellule morte, a differenza di uno sferoide perfettamente sferico con bordo liscio. Tutte queste indicazioni rappresentano un'importante fonte di novità nello studio e nell'avanzamento delle terapie antitumorali.

Bibliografia

[AIRC 2012] AIRC. "Tumore al polmone" <http://www.airc.it/tumori/tumore-al-polmone.asp> (2012).

[Arcangeli G. 2010] Arcangeli G., et al. "Oncologia medica pratica: Principi di radioterapia" SEU (2010): 369-408.

[Balasko B. 2005] Balasko, B., et al. "Fuzzy clustering and data analysis toolbox." Department of Process Engineering, University of Veszprem, Veszprem (2005).

[Botchwey E.A. 2004] Botchwey, E. A., et al. "Quantitative analysis of three-dimensional fluid flow in rotating bioreactors for tissue engineering." Journal of Biomedical Materials Research Part A 69.2 (2004): 205-215.

[Conger S.D. 1983] Conger, A. D., et al. "Growth of mammalian multicellular tumor spheroids." Cancer Research 43.2 (1983): 556-560.

[Debessy C. 2000] Dubessy, C., et al. "Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy." Critical reviews in oncology/hematology 36.2 (2000): 179-192.

[Eldridge L. 2012] Eldridge L. "Squamous Cell Carcinoma of the Lungs" 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" Tesi di laurea (2005).

[Freyer J.P. 1980] Freyer, J. P., et al. "Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids." *Cancer research* 40.11 (1980): 3956-3965.

[Friedrich J. 2007] Friedrich, J., et al. "A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay." *Journal of biomolecular screening* 12.7 (2007): 925-937.

[Friedrich J. 2007] Friedrich, J., et al. "Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids-old hat or new challenge?." *International journal of radiation biology* 83.11-12 (2007): 849-871.

[Gasperi-Campani A. 1998] Gasperi-Campani, A., et al. "Molecular and biological features of two new human squamous and adenocarcinoma of the lung cell lines." *Cancer genetics and cytogenetics* 107.1 (1998): 11-20.

[Gordon Steel G. 2002] Gordon Steel G. "Basic clinical Radiobiology" *Arnold* (2002): 94-157.

[Hirschhaeuser F. 2010] Hirschhaeuser, F., et al. "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again." *Journal of biotechnology* 148.1 (2010): 3-15.

[Horiot J.C. 1997] Horiot, J. C., et al. "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: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 44.2 (1997): 111.

[Horner M.J. 2009] Horner, M. J., et al. "SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD." (2009): 545-76.

[Ingram M. 1997] Ingram, M., et al. "Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 33.6 (1997): 459-466.

[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).

- [Jemal A. 2011] Jemal, A., et al. "Global cancer statistics." *CA: a cancer journal for clinicians* 61.2 (2011): 69-90.
- [Kempf H. 2010] Kempf, H., et al. "Spatio-temporal cell dynamics in tumour spheroid irradiation." *The European Physical Journal D-Atomic, Molecular, Optical and Plasma Physics* 60.1 (2010): 177-193.
- [Maghfoor I. 2005] Maghfoor I. "Non-Small-Cell Lung Cancer" National Cancer Institute (2005).
- [Munshi A. 2005] Munshi, A., et al. "Clonogenic cell survival assay." *Methods in molecular medicine* 110 (2005): 21.
- [Otsu N. 1975] Otsu, N. "A threshold selection method from gray-level histograms." *Automatica* 11.285-296 (1975): 23-27.
- [Roh K.W. 2009] Roh, K. W., et al. "Fractionated stereotactic radiotherapy as reirradiation for locally recurrent head and neck cancer." *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 74.5 (2009): 1348-1355.
- [Saunders M. 1999] Saunders, M., et al. "Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small cell lung cancer: mature data from the randomised multicentre trial." *Radiotherapy and oncology* 52.2 (1999): 137-148.
- [Sutherland R.M. 1988] Sutherland, R. M. "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model." *Science (New York, NY)* 240.4849 (1988): 177.
- [Tesei A. 2009] Tesei, A., et al. "Isolation of stem/progenitor cells from normal lung tissue of adult humans." *Cell proliferation* 42.3 (2009): 298-308.
- [Whiters H.R. 1988] Withers, H. R., et al. "The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy." *Acta Oncologica* 27.2 (1988): 131-146.
- [Witschi H. 2001] Witschi, H. "A short history of lung cancer." *Toxicological Sciences* 64.1 (2001): 4-6.