

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Scuola di Scienze
Corso di Laurea Magistrale in Fisica

**Ricostruzione di gradienti di ossigeno e
glucosio da immagini PET per
applicazioni nanobiotecnologiche.**

Relatore:
Prof. Gastone Castellani

Presentata da:
Lucio Diomedì

Sessione II
Anno Accademico 2014/2015

Sommario

La ricerca biomedica è arrivata attualmente a un bivio che vede contrapposte sperimentazione in vitro e in vivo. Per ovviare a questo problema è nata la sperimentazione su biochip che, attraverso l'impiego di apparecchiature dedicate, permette di ottenere misure su campioni che ripropongano le condizioni fisiologiche dei tessuti umani in vivo superando il problema della sperimentazione animale e quello delle misure in vitro, che non rispecchiano le condizioni reali delle cellule in esame.

Il perfezionamento dell'apparecchio in questione richiede la comparazione delle condizioni create nel biochip con quelle riscontrate nei tessuti cellulari di pazienti umani. Il fine della comparazione è quello di riuscire ad eguagliare i due sistemi per poter sfruttare il dispositivo come un fantoccio su cui verificare gli effetti di farmaci in fase sperimentale e misurare grandezze con un grado di precisione molto più alto rispetto ai metodi messi in opera fino a ora.

Questo lavoro di tesi propone uno studio preliminare sulla fattibilità di misure di concentrazioni di ossigeno e glucosio attraverso i radiofarmaci ^{64}Cu -ATSM e ^{18}F -FDG impiegati su pazienti sottoposti a PET-CT.

Nello specifico, dopo aver illustrato i processi cellulari che coinvolgono il glucosio e l'ossigeno all'interno dei tessuti umani, si passa a descrivere le metodologie di misura impiegate, nell'ambito dell'imaging diagnostico, e le caratteristiche che motivano la scelta dei radiofarmaci utilizzati come mezzo di contrasto.

Successivamente viene considerato un modello compartimentale a due tessuti per descrivere la cinetica dei radiofarmaci e per ottenere una stima delle concentrazioni da rapportare alle grandezze rilevate con la PET.

Infine sono tracciati dei profili sulle slice dei volumi PET elaborati che diano dei valori di concentrazione delle molecole studiate.

Indice

Introduzione	vii
1 Importanza biologica dei gradienti di concentrazione	1
1.1 Metabolismo del glucosio	1
1.2 Metabolismo dell'ossigeno	6
1.3 Ipossia	6
1.4 Hipoxia Inducible Factor: HIF	9
1.5 Apparecchio e gradienti	10
2 Tecniche di imaging diagnostico	17
2.1 Positron Emission Tomography	17
2.2 Modalità bi e tri-dimensionale	18
2.3 Sensibilità della PET	19
2.4 Ricostruzione di immagini tomografiche	19
2.5 Standard Uptake Value	20
2.6 Tomografia Assiale Compturerizzata	20
2.7 PET-TC	23
3 Radiofarmaci utilizzati per l'analisi	27
3.1 ^{18}F -FDG	28
3.2 Studio di ipossia PET	29
3.3 Radiofarmaci per lo studio di ipossia	30
3.4 ^{64}Cu -ATSM	30

4	Modello Compartimentale	33
4.1	Modello compartimentale	34
4.2	Modello compartimentale a 2 Tessuti	38
4.3	Misura dei rates di scambio per il ^{18}F -FDG	41
4.4	Misura dei rates di scambio per il ^{64}Cu -ATSM	45
5	Risultati	49
5.1	Inversione della formula per il ^{18}F -FDG	50
5.2	Calcolo per ^{64}Cu -ATSM	55
5.3	Calcolo delle incertezze	61
5.4	Profili per le misure di concentrazione	62
5.5	Conversione dei dati in unità di molarità	62
6	Conclusioni	71
	Bibliografia	75

Elenco delle figure

1.1	Ciclo di Krebs	3
1.2	Glucosio nel mitocondrio, fosforilazione ossidativa	4
1.3	Dispositivo per la coltura cellulare	13
1.4	Andamento della funzionalità cellulare in base all'ossigeno	14
1.5	Parametri fondamentali per la vita cellulare	15
1.6	Gradiente di ossigeno	16
2.1	Slice della sezione assiale della PET-TC acquisita con ^{18}F -FDG	24
2.2	Slice della sezione coronale della PET acquisita con ^{18}F -FDG	25
2.3	Slice della sezione sagittale della PET acquisita con ^{18}F -FDG	25
2.4	Slice della sezione assiale della PET-CT acquisita con ^{64}Cu - ATSM	26
2.5	Slice della sezione sagittale della PET acquisita con ^{64}Cu -ATSM	26
3.1	Molecola di ^{18}F -FDG	28
3.2	Molecola di ^{64}Cu -ATSM	31
3.3	Meccanismo di distribuzione tissutale del ^{64}Cu -ATSM	32
4.1	Modello compartimentale	38
4.2	Andamento temporale di radiofarmaco fosforilato.	45
5.1	Matrice considerata per C_a , 1- ^{18}F -FDG	51
5.2	ROI utilizzata per il calcolo di C_a , 1- ^{18}F -FDG	52
5.3	Risultato dell'analisi per il glucosio, 1- ^{18}F -FDG	53
5.4	Risultato dell'analisi per il glucosio, 2- ^{18}F -FDG	54
5.5	Risultato dell'analisi per 1 - ^{64}Cu -ATSM	56

5.6	ROI utilizzata per ottenere le C_a del 1 - ^{64}Cu -ATSM	56
5.7	Matrice considerata per C_a , 1 - ^{64}Cu -ATSM	57
5.8	Risultato dell'analisi per 2 - ^{64}Cu -ATSM	58
5.9	ROI utilizzata per ottenere le C_a del 2 - ^{64}Cu -ATSM	58
5.10	Matrice considerata per C_a , 2 - ^{64}Cu -ATSM	59
5.11	Concentrazione di O_2 per il primo campione	60
5.12	Concentrazione di O_2 per il secondo campione	61
5.13	Profilo della concentrazione di glucosio per il primo campione [g/ml]	63
5.14	Profilo della concentrazione di glucosio per il secondo campio- ne [g/ml]	64
5.15	Profilo della concentrazione di O_2 per il primo campione [g/cm ³] 65	65
5.16	Profilo della concentrazione di O_2 per il secondo campione [g/cm ³]	65
5.17	Concentrazione molare del glucosio, 1- ^{18}F -FDG, slice 85	66
5.18	Concentrazione molare del glucosio, 2- ^{18}F -FDG, slice 205	66
5.19	Concentrazione molare dell'ossigeno, 1- ^{64}Cu -ATSM, slice 48 . .	67
5.20	Concentrazione molare dell'ossigeno, 2- ^{64}Cu -ATSM, slice 65 . .	67
5.21	Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale 1- ^{18}F -FDG	68
5.22	Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale 2- ^{18}F -FDG	68
5.23	Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale 1- ^{64}Cu - ATSM	69
5.24	Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale 2- ^{64}Cu - ATSM	69

Introduzione

Questo lavoro di tesi propone delle tecniche di studio non invasive, o minimamente invasive, per la misurazione di concentrazioni dell'ossigeno e del glucosio tissutale in vivo tramite l'utilizzo della PET-CT (Positron Emission Tomography - Computed Tomography) con lo scopo di validare un modello di simulazione informatica che studi i gradienti di concentrazione.

L'ossigeno è fondamentale per la vita cellulare ed è stato dimostrato che determinate quantità di ossigeno possono compromettere il normale funzionamento cellulare e indurre i tessuti ad essere radioresistenti, come nel caso dell'ipossia, o permettere fenomeni come la regressione cellulare allo stato di cellula staminale pluripotente. Inoltre determinate concentrazioni di ossigeno possono influire sull'invecchiamento cellulare.

Collegato al consumo di ossigeno, il glucosio provvede a mantenere l'apporto energetico necessario alla vita cellulare; inoltre lo studio del consumo cellulare di glucosio è da sempre associato all'analisi di tumori tramite l'effetto Warburg, secondo cui le cellule tumorali producono energia assumendo glucosio a una velocità molto superiore a quella delle altre cellule.

Per questo motivo si ritiene di particolare importanza l'ideazione di un metodo di studio e di misura della concentrazione di ossigeno e glucosio all'interno dei tessuti che non sia invasivo, per non compromettere la funzionalità dell'organismo ed avere in questo modo una visione più conforme possibile a quella reale della condizione dei tessuti nell'uomo.

La non invasività del metodo di misura permetterebbe una stima in vivo dell'ossigenazione dei tessuti su pazienti radioterapici, ottenendo in questo modo dei dati utili a modificare il trattamento radioterapico in corso senza compromettere ulteriormente lo stato di salute del paziente e permettendo

di studiare la funzionalità cellulare da un punto di vista differente da quelli canonici entrando nell'ottica delle misure in vivo su pazienti.

Attualmente, per ottenere una stima della concentrazione di ossigeno, è utilizzata la polarografia, che consiste in una misurazione di corrente dipendente dalla concentrazione di ossigeno.

Utilizzando la PET, già ampiamente introdotta nell'ambito dell'imaging per lo studio delle funzionalità animali, e che permette, tramite un mezzo di contrasto nel corpo umano, una misura indiretta del metabolismo di glucosio e ossigeno si ha la prerogativa della non invasività di un metodo di misura del sistema in esame.

La tomografia ad emissione di positroni è una metodica basata sull'impiego di radionuclidi, con la quale è possibile ottenere immagini rappresentative di diversi processi biochimici e funzionali nel corpo umano. I radionuclidi sono elementi instabili che decadono in elementi più stabili con l'emissione, da parte del nucleo, di radioattività sotto forma di particelle, di fotoni o di entrambi e le radiazioni emesse vengono rilevate mediante il tomografo.

Associata alla PET, la TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) permette di identificare a livello anatomico le regioni di interesse in esame, arrivando a definire una misura che dà informazioni spaziali e funzionali allo stesso tempo.

Il progetto in cui si inserisce questo lavoro prevede l'ideazione di un dispositivo capace di riprodurre in simili le condizioni ambientali e fisiologiche delle cellule umane, affette da particolari necessità di concentrazione di glucosio e ossigeno oltre che di pH, senza le quali sarebbe preclusa la crescita cellulare e il loro mantenimento.

Nello specifico il metodo di misura della concentrazione di ossigeno e glucosio tramite l'analisi di modelli compartimentali, proposto in questo lavoro di tesi, servirà a validare le simulazioni informatiche che studiano l'andamento delle condizioni fisiologiche da imporre all'apparecchio che verrà utilizzato per accrescere cellule in simili.

Capitolo 1

Importanza biologica dei gradienti di concentrazione

La materia vivente è composta principalmente da atomi di carbonio (C), ossigeno (O), idrogeno (H), azoto (N), e fosforo (P). Queste molecole vanno a comporre le classi di:

- Carboidrati (glucidi);
- Grassi (lipidi);
- Proteine;
- Acidi nucleici.

1.1 Metabolismo del glucosio

Il glucosio è uno degli elementi fondamentali per la vita e la sussistenza della cellula. Infatti il processo attraverso il quale la cellula ottiene energia, sotto forma di ATP, è la respirazione cellulare che coinvolge proprio gli zuccheri monosaccaridi tra cui il glucosio. Questo è un processo di combustione controllata esotermico di ossidoriduzione, che fa parte di una catena di reazioni in cui i prodotti di un passaggio sono utilizzati come reagenti per il passo successivo.

Comunemente per respirazione cellulare si intende un processo aerobico che avviene in presenza di ossigeno, utilizzato come accettore di elettroni. La forma più importante di respirazione cellulare anaerobica, comune a procarioti ed eucarioti, è la *glicolisi*. Si tratta di una via metabolica che costituisce il modo in cui dal glucosio viene ottenuto il piruvato utilizzato nella fase aerobica.

Per produrre energia e quindi gli elementi fondamentali per la sussistenza cellulare, occorre considerare la via catabolica, che consiste nella respirazione cellulare. Il principale meccanismo è quello della rottura di uno zucchero glucosio in presenza di ossigeno per ottenere anidride carbonica e acqua. L'energia accumulata nelle molecole organiche è quindi disponibile per compiere lavoro.

La via anabolica, invece, consuma energia per costruire molecole complesse da elementi semplici.

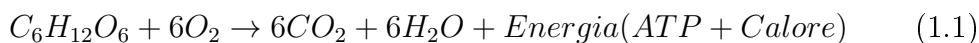
Nella respirazione cellulare alcune reazioni sono costantemente tenute in disequilibrio, in modo che i prodotti della reazione non si accumulino ma diventino reagenti per una reazione successiva.

La reazione si sostiene grazie all'elevata differenza di energia libera tra glucosio e ossigeno e tra anidride carbonica e acqua.

Tecnicamente con respirazione cellulare si intendono quella anaerobica e quella aerobica.

La via metabolica che rilascia energia dalla rottura di molecole complesse viene detta via catabolica.

Nella respirazione aerobica l'ossigeno viene consumato come reagente con il glucosio, secondo la reazione:



esoergonica e spontanea, in quanto presenta un $\Delta G = -686 \text{kcal/mol}$.

Il processo descritto rappresenta una reazione di ossido-riduzione: il reagente ossidato (glucosio) perde un elettrone che viene donato al reagente ridotto (ossigeno). L'elettrone trasferito nel processo perde energia potenziale che

viene rilasciata.

La respirazione aerobica avviene a step. Il trasferimento di elettroni, comparabile al trasferimento di un atomo di idrogeno, sfrutta il trasportatore *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD^+) che può facilmente raggiungere lo stato ossidato ($NADH$).

La glicolisi, ovvero la rottura di una molecola di glucosio, che avviene nel citosol, prosegue fino ad ottenere due molecole di piruvato. Il piruvato, nel mitocondrio, viene ossidato in acetil CoA e può partire il ciclo dell'acido citrico detto anche ciclo di Krebs.

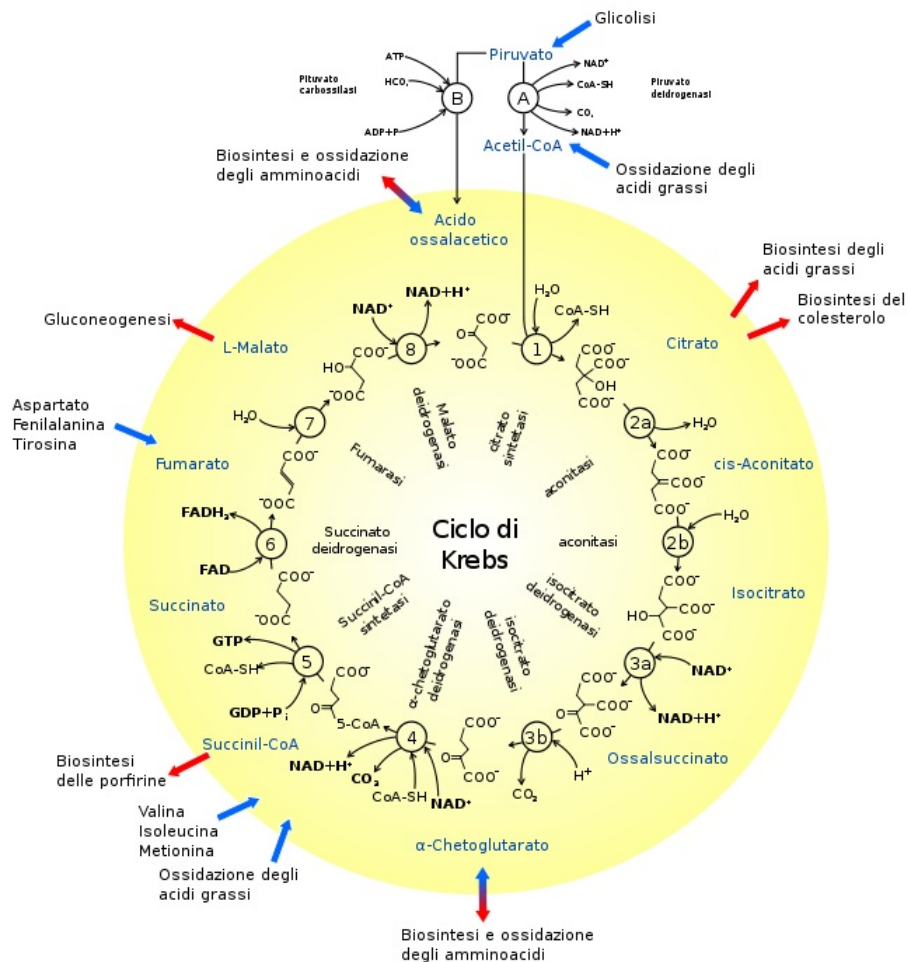


Figura 1.1: Ciclo di Krebs

Nel mitocondrio avviene la sintesi di ATP per fosforilazione ossidativa.

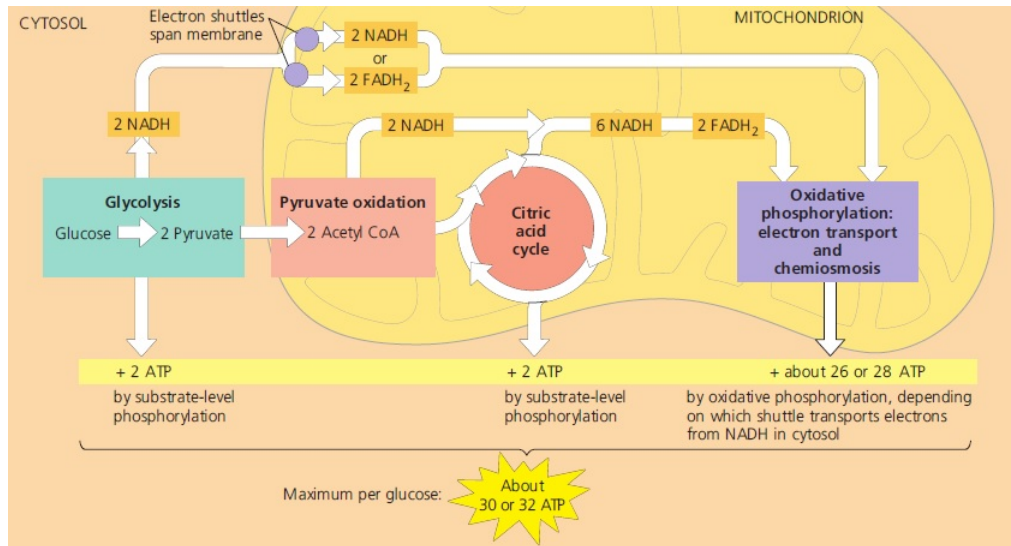


Figura 1.2: Glucosio nel mitocondrio, fosforilazione ossidativa

Dalla reazione illustrata risulta evidente che senza ossigeno, elettronegativo, la fosforilazione ossidativa si ferma.

Il glucosio, in soluzione nel tessuto, è trasportato all'interno della cellula da proteine di membrana.

Il trasporto attivo avviene grazie al simporto Na^+ - glucosio. Questo meccanismo prevede il trasporto contemporaneo di due ioni Sodio secondo gradiente e di una molecola di glucosio contro gradiente.

Il trasporto passivo avviene invece grazie ai GLUT (Glucose Transporters). I trasportatori GLUT sono una famiglia di proteine di membrana che consentono la diffusione facilitata del glucosio. Esistono diverse isoforme dei trasportatori del glucosio, ciascuna con specifiche caratteristiche di cinetica, di distribuzione tissutale e di funzione. Nell'uomo esistono dodici tipi di trasportatori.

Il GLUT1 regola l'assunzione basale di glucosio e segue una cinetica di saturazione che può essere paragonata a quella enzimatica di Michaelis-Menten in cui il substrato è rappresentato dal glucosio extracellulare, il prodotto dal glucosio intracellulare. La velocità del trasporto dipenderà quindi dalla con-

centrazione del substrato: più essa è alta, maggiore sarà la velocità, fino a raggiungere quella massima quando il trasportatore è saturo. Il GLUT1 ha alta affinità per il substrato, e funziona a velocità massima anche quando i livelli del glucosio ematico scendono per assicurare il rifornimento alle cellule impegnate nel metabolismo.

La misura di un gradiente di concentrazione del glucosio tissutale risulta quindi importante per la comprensione del funzionamento cellulare sia in condizioni normali sia in quelle tumorali in cui il consumo di energia viene alterato (effetto Warburg). Infatti attraverso l'effetto Warburg, le cellule cancerose producono energia assumendo glucosio a una velocità molto superiore di quella delle altre cellule; ma utilizzano una frazione minore di quel glucosio per la produzione di energia. Ciò permette alle cellule di promuovere una crescita rapida. Nel corpo umano la produzione di glucosio è imputata agli organi di rene e fegato. Quest'ultimo produce almeno l'80% del glucosio attuando processi di glicogenolisi e gluconeogenesi. Il rene, invece, partecipa alla produzione in periodi abnormali, come nel caso di digiuno prolungato, producendo glucosio esclusivamente tramite il processo di gluconeogenesi.

Tutti i restanti organi possono essere divisi in 2 gruppi fondamentali, in base all'utilizzo del glucosio, il primo gruppo sono gli organi glucosio-dipendenti (cervello, globuli rossi) che utilizzano glucosio con una velocità costante (circa 100 mg/min) e senza il quale non permettono la sopravvivenza del corpo umano. L'altro gruppo sono gli organi insulino-dipendenti (muscolo, cuore, tessuto adiposo) che utilizzano glucosio con velocità non costante, la quale si può definire fasica. L'utilizzo dipende dall'insulina.

Il passo seguente della glicolisi, il processo mediante il quale le molecole di glucosio vengono scisse in modo da generare 2 molecole di ATP e 2 di *NADH*, è il glucosio-6-fosfato (G6P). Il glucosio-6-fosfato, tramite il processo di defosforilazione entra nel sangue, prima nello spazio intracellulare e successivamente, sotto la forma di glucosio-6-fosfato, nella cellula.

1.2 Metabolismo dell'ossigeno

Per questo lavoro si è utilizzata la teoria secondo cui il radiofarmaco ^{18}F -FDG è capace di legarsi a determinati tessuti tumorali ipossici sfruttando l'effetto Warburg e dando in questo modo una stima localizzata dell'attività glicolitica in ogni elemento campionato preso in considerazione.

Secondo l'effetto Warburg, la differenza tra le cellule sane e quelle cancerose sta nella la velocità di flusso della glicolisi.

Considerando l'elevato consumo locale di ossigeno che si verifica nelle cellule tumorali, si evince un alto livello di attività glicolitica, fino ad un livello 200 volte superiore di quello per i tessuti sani.

Inoltre nelle cellule tumorali, non si verifica l'effetto Pasteur che rallenta la glicolisi in presenza di una adeguata quantità di ossigeno.

L'elevata glicolisi delle cellule tumorali può quindi essere utilizzata come fattore diagnostico di un tumore, come fattore per la valutazione di efficacia del trattamento, nonché per una esatta localizzazione della massa tumorale attraverso tecniche di imaging mediate da un radiotracciante PET come il fluorodeossiglucosio, ^{18}F -FDG.

Un altro radiofarmaco comunemente utilizzato per l'identificazione di tessuti ipossici è il ^{64}Cu -ATSM. Questo è stato impiegato in molti studi per ottenere una stima della pO_2 locale.

L'obiettivo è quello di proporre un metodo non invasivo, basato sull'utilizzo della PET, capace di identificare e misurare le quantità di ossigeno e glucosio presenti in un tessuto biologico in vivo. Per questo scopo si utilizza la misura su tessuti ipossici, ovvero con concentrazioni di ossigeno molto basse e facilmente distinguibili da quelle normali.

1.3 Ipossia

L'ipossia è una condizione che si verifica nei tessuti biologici se la concentrazione di ossigeno presente è minore di un certo valore considerato normale.

In condizioni normali, di normossia, il funzionamento cellulare non è alterato

Tabella 1.1: Effetto della variazione di pO_2 sull'organismo

PO_2 (mmHg)	Funzionalità e parametri osservati
30-35	Efficacia di alcune immunoterapie (passive)
15-35	Morte cellulare con terapia fotodinamica
25-30	Morte cellulare con esposizione a radiazione X o γ
10-20	Legame di marcatori ipossici
1-15	Cambi di proteoma
0,2-1	Cambi di genoma

e i tessuti funzionano correttamente, altrimenti le funzioni biologiche potrebbero essere compromesse.

A questa condizione sono associati fenomeni macroscopici come aumento dell'aggressività, incontrollabilità e ricorrenza tumorale; per questo motivo si è scelto di adottare la tecnica PET, diffusamente utilizzata nello studio di tessuti tumorali.

La *pressione parziale dell'ossigeno* in un mezzo gassoso o liquido, pO_2 , definisce indirettamente la concentrazione di ossigeno.

Un tessuto si definisce ipossico se la pressione parziale misurata, pO_2 , è minore di 10 mmHg, mentre in condizioni normali è accettato un valore di $pO_2 = 40-60$ mmHg.

Per completezza sono riportati in tabella 1.1 i valori di pressione parziale di ossigeno e gli effetti che ne derivano sui tessuti nell'uomo.

Rientrano nelle cause dell'ipossia tutti quei fenomeni che causano un anormale apporto di ossigeno in un tessuto. Nello specifico si verifica una diffusione insufficiente dell'ossigeno dovuta ad un aumento della distanza tra il tessuto preso in considerazione e l'apparato circolatorio incaricato di irrorare di sangue ossigenato la zona d'interesse. La distanza minima perché questo fenomeno si verifichi è stimata in 100 micrometri. Nel caso di tessuti tumorali, la massa cresce fino a causare occlusioni di arterie variando il flusso sanguigno da 2,0 a 0,1 ml/g min.

Un ulteriore fenomeno che si verifica è il cambiamento nelle attività di geni specifici che, alterando il proteoma ad essi associato, impedisce alle cellule di migrare dall'ambiente ostile causando in questo modo un aumento fuori

controllo della massa tumorale considerata. I cambi di genoma che portano all'aumento di volume, che causa occlusioni delle arterie e quindi apporto di ossigeno diminuito, è imputabile, nello specifico, al gene corrispondente al Hypoxia Induction Factor (HIF), il cui funzionamento e caratteristiche verranno illustrate in sezione 1.4.

Un'altra causa della condizione di ipossia è un'alterazione del trasporto di ossigeno, come avviene nel trattamento dell'anemia.

Un'ulteriore caso è quello dell'incapacità da parte della cellula ad utilizzare l'ossigeno fornitogli (es: avvelenamento da cianuro).

A livello metabolico, in condizioni normossiche, il rate di consumo e produzione di ATP è simile per tessuti sani e tumorali. In ipossia il consumo mitocondriale di ossigeno e la produzione di ATP sono ridotti, quindi il trasporto attivo in cellule tumorali è ostacolato.

La carenza di energia sotto forma di ATP può causare nelle cellule:

- il collasso dei gradienti sodio-potassio;
- la depolarizzazione delle membrane;
- l'assunzione di Cl^- ;
- il rigonfiamento cellulare;
- l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} (più acido);
- l'abbassamento del pH citosolico che porta ad acidosi cellulare.

Legami tra i marcatori di ipossia (pimonidazolo) nelle cellule epiteliali soprabasali supportano l'ipotesi che l'ipossia agisca come morfogeno per indurre differenziazione terminale dei geni sebbene non sia verificato per cellule tumorali.

Se l'ossigeno presente nel tessuto non riesce a soddisfare la domanda del metabolismo cellulare, si verificano delle conseguenze che portano il sistema ad adattarsi alla nuova condizione di ipossia che si viene a creare.

Avvengono una serie di meccanismi di adattamento cellulare: il principale è un cambio nell'espressione genica responsabile della produzione di $HIF-1\alpha$

e $HIF - 2$. Infatti l'alterazione del HIF dipende dalla concentrazione di ossigeno ed aumenta esponenzialmente in condizioni di ipossia (Concentrazione di $O_2 < 5\%$).

L'ipossia causa altresì angiogenesi, il processo inizia se le cellule nell'ambiente ipossico rispondono allo stimolo producendo VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), quindi tramite il gene che codifica l' $HIF - 1\alpha$ parte l'espressione dei recettori VEGFR-1 e VEGFR-2.

1.4 Hipoxia Inducibile Factor: HIF

L'Hypoxia Inducibile Factor è una proteina eterodimerica costituita da una parte alfa e una beta. Entrambe le unità servono al DNA per legarsi e attivare i geni incaricati di rispondere alla condizione di ipossia. Il gene $HIF - 1\alpha$ è sempre espresso ma, con concentrazioni di ossigeno normali, la proteina codificata viene consumata rapidamente mentre in ipossia, non avendo abbastanza ossigeno da utilizzare come substrato, si accumula.

L' $HIF - 1\beta$ viene prodotta e consumata indipendentemente dalla concentrazione di ossigeno.

A causa dell'età il rate di trascrizione del gene e quello di sintesi di $HIF - 1\alpha$ vengono diminuiti.

L'HIF abilita i geni coinvolti in:

- Glicolisi: l'HIF dirige l'iper-glicolisi, dovuta alla regolazione dei trasportatori, tra cui la proteina di trasporto extra-membrana GLUT-1, e a enzimi glicolitici. C'è un'over-espressione dell'anidrasi carbonica, CA9, quindi aumenta l'angiogenesi (VEFG);
- proliferazione cellulare;
- sopravvivenza cellulare;
- invasione metastatica.

L'abbassamento della pO_2 fa spostare il metabolismo sui processi anaerobici per avere sufficiente ATP, in questo modo subentra l'effetto Pasteur.

L'HIF media le risposte di trascrizione dell'ipossia legandosi all'HRE (*Hormon Response Element*) che è il promotore di un gene bersaglio. Questo meccanismo è spesso usato per marcare geni specifici.

Dati questi presupposti, risulta evidente che il consumo di glucosio in determinate condizioni è strettamente collegato alla concentrazione di ossigeno. Per questo motivo si è deciso di studiare i gradienti dell'ossigeno correlandoli a quelli del glucosio.

1.5 Apparecchio e gradienti

Questo lavoro di tesi si inserisce in un progetto di creare un dispositivo in grado di mantenere una coltura cellulare in particolari condizioni che siano il più possibile simili a quelle delle cellule umane in vivo. Per raggiungere questo scopo occorre uno spazio programmabile in cui si verifichino particolari proprietà, utili perché la coltura si sostenga. Queste sono:

- contenuto di ossigeno;
- pH;
- disponibilità di glucosio;
- microambiente biologico adatto;
- proprietà di adesione.

Con questi presupposti sarebbe possibile creare procedure sperimentali in ambienti che simulino le situazioni in vivo: questo procedimento, detto *in simili* sostituirebbe la già largamente utilizzata sperimentazione animale *in vivo* e quella *in vitro* che spesso presenta caratteristiche poco assimilabili a quelle umane.

Per ottenere le condizioni di un ambiente in simili, ricreando in tre dimensioni le condizioni di tessuto e di microambiente tipiche, occorre che l'apparecchiatura sia capace di controllare le concentrazioni di ossigeno e glucosio locali

e di sviluppare particolari gradienti di concentrazione da imporre alla matrice contenente le cellule in coltura. L'ambiente costruito ad hoc in questo modo, riproducendo le condizioni dei tessuti umani, può essere utilizzato per lo studio di tossicità di farmaci, risposta alle terapie e sperimentazione personalizzata sulle caratteristiche del paziente oltre a studi su sviluppo, invecchiamento cellulare e regressione cellulare allo stato staminale.

L'apparecchio in questione prevede che in uno spazio piccolo, funzionale e programmabile, le condizioni dinamiche di contenuto di ossigeno, pH, disponibilità di glucosio, microambiente biologico, adesione nanometrica, siano rispettate e rispecchino il punto di vista delle cellule in vivo.

Le culture cellulari in vitro presentano un'esposizione al 20% di O_2 , che rappresenta circa il 5% della normale concentrazione trovata nei tessuti. Inoltre i gradienti di glucosio e di pH, differiscono largamente dal normale, soprattutto in distretti cruciali come masse tumorali, tessuti con cellule in invecchiamento e cellule staminali.

Lo scopo primario del progetto è ricreare le condizioni dei tessuti e dell'ambiente che sono irraggiungibili da tutte le comuni apparecchiature in vitro. Per fare ciò occorre che la mappa delle condizioni fisiologiche e dei gradienti sia congruente con quelli osservati tramite PET in pazienti umani.

Un dispositivo che lavori in simili prevede l'utilizzo di superfici caratterizzate dalla presenza di reazioni guidate da fattori enzimatici, catalitici ed elettrochimici capaci di determinare le condizioni di concentrazione di ossigeno e glucosio desiderate, portando in questo modo ad ottenere i gradienti di concentrazione, utili all'impiego del dispositivo per la coltura cellulare, che possano essere controllati sul piano temporale.

Perché la struttura sia aderente alla realtà, occorre creare un ambiente tridimensionale con substrati polimerici nanostrutturati per controllare l'adesione cellulare, la proliferazione e il confinamento di diversi tipi cellulari. Lo sviluppo di membrane 3D e di barriere è usato per controllare il microambiente cellulare regolando il passaggio di biomolecole adatte ad alterarlo. Per fare ciò sono state sviluppate delle procedure di stampa 3D con le quali vengono depositati enzimi, proteine, gel precursori e polimeri su una superficie biocompatibile.

Le membrane selettive, come quelle ispirate all'architettura proteica, saranno impiegate e stampate.

Una volta costruito il dispositivo occorre passare alla fase di verifica delle condizioni. In parole povere si confrontano le concentrazioni ottenute da simulazioni informatiche e da misure con microscopio elettronico con le misure fatte con la PET su pazienti vivi.

Questo lavoro di tesi punta ad ottenere una mappatura dei gradienti di concentrazione di ossigeno e glucosio osservati con la PET su pazienti umani. I valori ottenuti saranno utilizzati nel dispositivo tramite un fit Bayesiano della Chemical Master Equation che descrive i processi e punta a quantificare il numero di enzimi da utilizzare per ricreare i gradienti di concentrazione.

Mentre l'imaging PET permette di ottenere informazioni sui gradienti di ossigeno e glucosio su scala millimetrica o sub-millimetrica, l'apparecchio in simili è capace di riprodurre questi gradienti su scala submicrometrica. Per questo motivo l'acquisizione e conversione in gradienti di ossigeno e glucosio delle immagini PET ottenute con ^{18}F -FDG e ^{64}Cu -ATSM fornirà delle misure di concentrazione mediate.

L'apparecchio verrà utilizzato come un fantoccio PET programmabile in cui i gradienti in media possono essere programmati su scala millimetrica e misurati con una micro-PET. I sub-micro-gradienti nell'apparecchio sono programmati con un approccio stocastico (CME) e misurati da un microscopio elettrochimico (SECM).

La superficie in questione, costituita da chip in grado di controllare le condizioni fisiologiche cellulari desiderate, è illustrata in figura 1.3.

Gli obiettivi biologici specifici del dispositivo saranno: acquisizione di dati sull'invecchiamento nei fibroblasti, dati su come modulare gli stessi parametri sulla differenziazione e la determinazione dell'età delle cellule dei dischi intra-vertebrali, dati su ricostruzione di ossa con cellule mesenchimali.

Lo scopo è ottenere medie e misure per coltivazioni in simili di cellule endoteliali e/o staminali ematopoietiche isolate, HSCs, cellule sanguigne umane o del midollo osseo.

Il microambiente ipossico gioca un ruolo cruciale nella determinazione del destino cellulare e del numero di processi biologici come l'invecchiamento, la

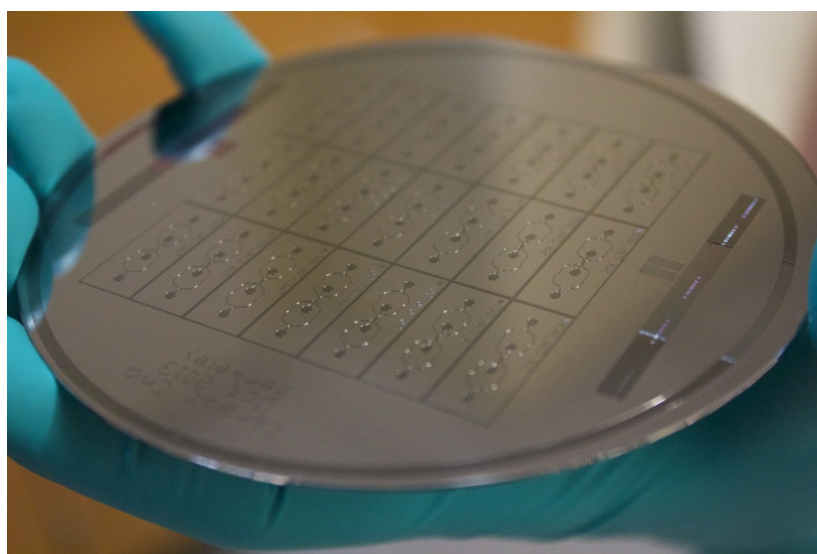


Figura 1.3: Dispositivo per la coltura cellulare

progressione dei tumori e la differenziazione di cellule staminali.

La maggior parte di questi effetti sono mediati dal HIF, una famiglia di fattori di trascrizione attivati a basse concentrazioni di ossigeno. Le HSC, cellule staminali ematopoietiche, sono mantenute meglio a basse concentrazioni di ossigeno, dove sono selezionate e accresciute. È stata proposta l'esistenza in vivo di cellule HSC ipossiche, in cui una tensione di ossigeno bassa (pO_2) può aiutarle a proliferare come staminali e mantenere il loro potenziale autorinnovandosi.

Questo scenario implica che basse concentrazioni di ossigeno sono una caratteristica fisiologica delle cellule staminali.

L'ipossia influenza inoltre il secretoma di molti tipi cellulari e può guidare la propagazione dell'invecchiamento, del cancro e dello sviluppo staminale tramite un meccanismo basato sulla diffusione.

Un altro parametro cruciale, il pH, è strettamente controllato nell'organismo ed è tenuto costante in condizioni standard di coltura. Come risultato dell'attività metabolica nello spazio intravascolare, sono stabiliti gradienti di pH e concentrazione di ossigeno anche nel midollo osseo (BM). Questi gradienti sono importanti per lo sviluppo di cellule staminali ematopoietiche. Un piccolo cambiamento di pH è associato con un consumo ridotto di glucosio e la

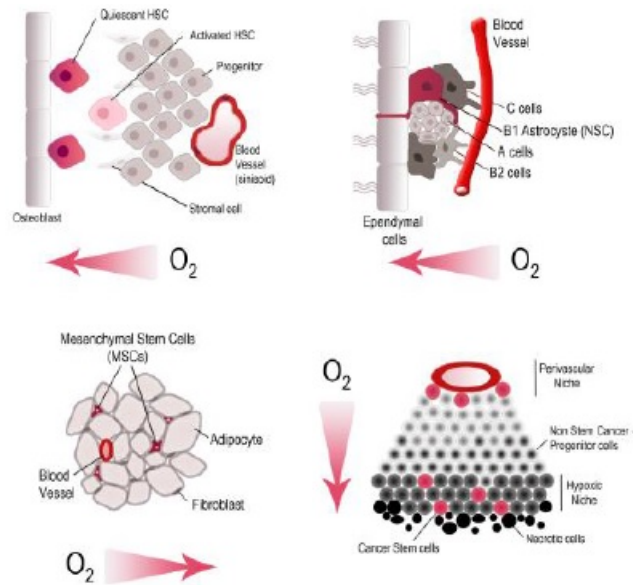


Figura 1.4: Andamento della funzionalità cellulare in base all'ossigeno

produzione di lattato, promuovendo un metabolismo ossidativo.

Il gradiente di glucosio prende posto in microambienti specifici come nelle colture di staminali.

Questo scenario, illustrato in figura 1.5, mostra che questi parametri sono talmente connessi tra loro da modulare metabolicamente le colture in esame.

Variazioni di gradienti di ossigeno e glucosio influenzano vari aspetti cellulari umani.

Uno di questi è l'invecchiamento dei fibroblasti sani della pelle. La senescenza cellulare è inoltre un pilastro fondamentale del processo di invecchiamento e può portare alla crescita tumorale. Non è ancora noto se le cellule provenienti da soggetti di diversa età sono caratterizzate da fenotipi diversi o diversi tipi di senescenza, in particolare in condizioni di concentrazioni di O_2 fisiologiche (5%) o ipossiche (1%). Si suppone che il fenotipo di invecchiamento possa essere indotto attraverso fattori trasmissibili. L'invecchiamento potrebbe quindi essere considerato una malattia che si estende da un tessuto all'altro. Un altro aspetto in cui è influente la concentrazione di ossigeno sono i dischi intervertebrali. Questi sono la più vasta zona non vascolarizzata del corpo

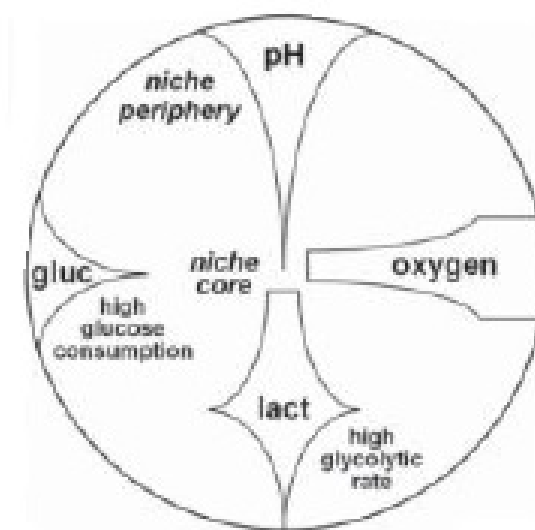


Figura 1.5: Parametri fondamentali per la vita cellulare

umano, un tessuto caratterizzato da un alto livello di ipossia, mancanza di nutrienti e basso pH. Anche nella ricostruzione delle cellule del midollo osseo è importante mantenere determinati livelli di ossigeno.

I valori di concentrazione PET ottenuti verranno confrontati con quelli raccolti da una simulazione e con quelli misurati con il microscopio elettronico. Per fare ciò occorre comprendere come è stato strutturato l'apparecchio.

Su una superficie biocompatibile si posizionano delle strisce di idrogel contenenti enzimi, polimeri e materiale necessario alla creazione del microambiente per l'accrescimento cellulare. Questo processo, attuato tramite una stampante 3D, consente lo sviluppo di gradienti in tre dimensioni.

A titolo esemplificativo, il gradiente di ossigeno nel mezzo di coltura è stato creato utilizzando una proteina legata al glutaldeide contenente un enzima di glucosio-ossidasi capace di consumare simultaneamente glucosio e ossigeno. Il gradiente di ossigeno misurato su una delle strisce di idrogel è illustrato in figura 1.6.

Riassumendo, il dispositivo in simili riproduce i gradienti locali di ossigeno e glucosio e le concentrazioni di materiale coinvolto nelle situazioni umane in vivo.

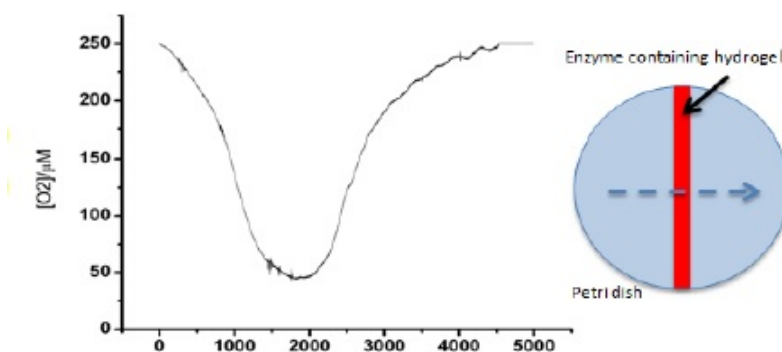


Figura 1.6: Gradiente di ossigeno

Si sviluppano queste condizioni tramite l'analisi dei gradienti microstrutturati in vivo. Queste misure sono comunemente fatte con una tecnica di imaging a fotoni, come la PET. Inoltre sono state fatte simulazioni dei gradienti micrometrici di concentrazione di enzimi e reazioni elettrochimiche.

Capitolo 2

Tecniche di imaging diagnostico

2.1 Positron Emission Tomography

La Positron Emission Tomography (PET) è una tecnica di imaging diagnostico utilizzata in ambito medico. Le immagini vengono formate con l'ausilio di un radionuclide emettitore di radiazione inglobato in un radiofarmaco, che funge da mezzo di contrasto, ed è quindi inserito nel metabolismo del soggetto che si sottopone all'analisi.

Il principio alla base di questa tecnica sfrutta l'annichilazione dei positroni emessi dal radionuclide utilizzato, tramite l'interazione con gli elettroni presenti nel tessuto in analisi in cui viene introdotto. Questa interazione particella-antiparticella produce due fotoni lungo una linea di volo comune e con verso opposto secondo le leggi della fisica quantistica; dato che $E = mc^2$, l'energia di ognuno dei fotoni emessi è comunemente di 511KeV .

Il fenomeno di annichilazione elettrone-positrone ha luogo in un tempo estremamente rapido (massimo 2 nanosecondi) dall'emissione del positrone e ad una distanza generalmente non superiore a 1-2 mm dal nucleo da cui è originato il positrone. Questa distanza dà un limite di risoluzione spaziale del radiofarmaco nel tessuto.

L'elettronica dell'apparato permette di rivelare coppie di fotoni che arrivino al rivelatore entro una data finestra di tempo: queste coppie vengono dette eventi.

L'immagine verrà formata retroproiettando con tecniche tomografiche, le proiezioni attraverso il paziente, da identificare con gli eventi rivelati entro un intervallo di tempo breve.

Considerando che l'accumulo del radiofarmaco non è isotropico all'interno dei tessuti, ma è maggiormente presente in zone specifiche dei tessuti in base al funzionamento di questi ultimi, è chiaro che le immagini ottenute con la tomografia a emissione di positroni non rappresentano la conformazione anatomica dei tessuti in esame, per questo motivo l'analisi viene detta funzionale ed è spesso accoppiata alla TAC, che produce un'immagine anatomica.

Il tomografo PET è concepito per rivelare simultaneamente i fotoni emessi a 180 gradi dal processo di annichilazione positrone-elettrone.

La maggior parte dei tomografi PET è costituita da anelli di rivelatori, costruiti impiegando cristalli di germanato di bismuto (BGO). Nella costruzione di un tomografo PET possono essere utilizzati fino a ventimila cristalli allo scopo di rivelare l'emissione di fotoni in un campo di vista di circa 15 cm lungo il corpo del paziente. I cristalli di rivelazione sono raggruppati in blocchi di rivelatori connessi a tubi fotomoltiplicatori, a loro volta connessi a circuiti elettronici che permettono di convertire la rivelazione dei fotoni in segnali elettrici e di ottenere mediante l'elaborazione di tali segnali mappe tridimensionali (3D) della distribuzione del radiofarmaco.

2.2 Modalità bi e tri-dimensionale

La maggior parte delle camere utilizza rivelatori a blocchi che possono operare sia in modalità 2D che 3D. Nella modalità in due dimensioni, dei setti di piombo o tungsteno vengono posti tra gli anelli rivelatori e le coincidenze vengono così registrate solo all'interno del piano di vista o nelle sue vicinanze. Le coincidenze vengono poi sommate per produrre un dataset di $2P+1$ linee di risposta (LOR) coplanari, dove P è il numero di piani di rivelazione corrispondente al numero di anelli.

Nella modalità 3D vengono rimossi i setti e le coincidenze vengono così regi-

strate su ogni combinazione di anelli. La tecnica di ricostruzione utilizzata è specifica per volumi in tre dimensioni.

2.3 Sensibilità della PET

La sensibilità dipende dal numero di anelli rivelatori utilizzati e dal grado di rebinning applicato. Inoltre i setti coprono un angolo significativo alla rivelazione creando un'ombra sui rivelatori; per questo motivo la modalità 3D è preferibile per ottenere una sensibilità maggiore data l'assenza dei setti. Tuttavia in questa modalità si ottiene anche una maggiore sensibilità agli eventi scatterati proprio a causa dell'assenza dei setti. Un'altra causa di incertezza è dovuta agli eventi singoli che possono essere registrati come coincidenze, soprattutto nelle vicinanze di zone particolarmente attive come il cervello, il cuore o altri organi di interesse.

Il sistema rivelatore comunemente utilizzato consiste in due camere, note come camere di coincidenza a doppia testa (DHCI).

2.4 Ricostruzione di immagini tomografiche

Il numero di conteggi assegnati ad ogni LOR (Line Of Response) è proporzionale a un integrale di linea dell'attività lungo la linea considerata. Un set di linee è detto proiezione.

L'algoritmo più utilizzato per la ricostruzione in 2D è il *Filtered Back-Projection* (FBP), mentre per avere volumi in 3D il metodo più impiegato è costituito da una *Retroprojection* e una FBP (3D-RP).

A causa dell'elevata mole di dati coinvolti nella ricostruzione 3D, spesso si utilizza un rebinning di Fourier che sposta il problema 3D a una serie di piani 2D tramite una trasformazione nello spazio delle frequenze.

2.5 Standard Uptake Value

Il radiofarmaco è fondamentale per un esame PET, infatti senza di esso non avrebbe luogo l'attivazione delle zone in analisi. In funzione del tipo di esame e della funzionalità degli organi che si vogliono investigare è possibile utilizzare diversi tipi di radiofarmaci basati su differenti radionuclidi. Ogni isotopo utilizzato avrà le sue proprietà di vita media, particelle emesse nel tempo e attività a cui corrispondono segnali PET differenti.

Un parametro che rende i diversi segnali PET indipendenti dall'anatomia del paziente, dall'attività somministrata e permette di normalizzare l'immagine indipendentemente dal radiofarmaco utilizzato è lo *Standard Uptake Value* (SUV). Questa quantità adimensionale si calcola come il rapporto della concentrazione di radioattività di un tessuto a un certo tempo $c(t)$, misurata in $[MBq/Kg]$, e la dose iniettata per chilogrammo del paziente:

$$SUV = \frac{c(t)}{[dose\ iniettata(MBq)/peso\ paziente(Kg)]} \quad (2.1)$$

Questa grandezza dà il rapporto in ogni pixel tra l'attività del tessuto rispetto a quella in tutto il corpo.

Con il termine SUV, viene quindi indicata una misura semi-quantitativa dell'accumulo del radiofarmaco nel tessuto. Il SUV è calcolato come la concentrazione di attività del radiofarmaco PET in una regione di interesse corporea, normalizzata alla dose somministrata al paziente e ad un parametro come ad es. il peso (Body-Weighted SUV) o la superficie corporea (Body-Surface Area SUV) del paziente.

2.6 Tomografia Assiale Computerizzata

La *Tomografia Assiale Computerizzata* (TAC) è la tecnica di imaging diagnostico maggiormente utilizzata nell'ambito medico per ottenere immagini morfologiche del paziente. Questo tipo di analisi prevede l'impiego di raggi

X come fonte di radiazione che dopo aver interagito con la materia va a depositarsi su una lastra rivelatrice per formare l'immagine.

A questo scopo si combina un set di immagini a raggi X, registrate ad angoli diversi, per produrre un'immagine virtuale (slice) di un'area specifica dell'oggetto in esame, permettendone l'investigazione dell'interno.

La TAC produce quindi un numero di dati che sono manipolati per visualizzare la struttura interna dell'oggetto che interagisce con i raggi X, utilizzati come fonte di radiazione. Sebbene storicamente le immagini generate erano nel piano trasversale, perpendicolarmente all'asse del paziente, le nuove generazioni di scanner, grazie all'avvento del digitale, permettono di riformattare queste immagini e ottenere anche visualizzazioni tridimensionali.

L'applicazione di questa tecnica prevede l'utilizzo di una testa emettitrice di radiazione X, un sistema di movimentazione, usualmente un lettino su cui viene sdraiato il paziente in posizione supina, e un sistema di rivelazione composto da materiale scintillatore capace di interagire con i raggi X.

La produzione di raggi X avviene per mezzo di un tubo catodico, una camera di vetro sotto vuoto spinto, rivestita di piombo per schermare le fuoriuscite di radiazione, ad eccezione di una piccola area, tipicamente in Berillio, detta finestra, bombardando con elettroni veloci un bersaglio di materiale pesante. All'interno è posizionato un sistema composto da anodo (polo positivo) e catodo (polo negativo). Applicando un flusso di corrente si scalda il catodo, tipicamente composto da un filamento in tungsteno, fino ad ottenere l'emissione di elettroni dagli orbitali esterni di questo per effetto termoionico. Questi vengono accelerati da un campo elettrico tra la coppa focalizzante, che serve a far convergere gli elettroni focalizzandoli sull'anodo. Nell'urto con quest'ultimo gli elettroni perdono energia e producono raggi X.

Il fascio di raggi X creato viene quindi indirizzato sul paziente che è interposto tra la sorgente e il rivelatore. Le immagini che si ottengono sul rivelatore rappresentano delle mappe del coefficiente di attenuazione nei vari punti dell'oggetto in esame e si sfrutta il fatto che il fascio entrante di raggi X, attraversando l'oggetto, interagisce con esso subendo un'attenuazione che dipende dallo spessore e dal coefficiente di attenuazione μ . Se il campione investigato non è omogeneo, l'intensità del fascio subirà una distribuzione

spaziale che dipende dall'oggetto stesso. Quindi:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.2)$$

dove x rappresenta i valori spaziali dell'oggetto.

Ruotando la sorgente di radiazione e il rivelatore intorno al paziente si acquisiscono le immagini, dette proiezioni, su tutto l'angolo giro. Dopo ogni giro completo il sistema o il lettino scorrono lungo l'asse verticale del paziente per ricominciare l'acquisizione su un altro piano. In questo modo si copre tutto il volume in esame.

Le nuove generazioni di scan permettono una rotazione continua, queste macchine lavorano in CT a spirale o a elica; con questo metodo il sistema, muovendosi, disegna una spirale il cui asse è il corpo del paziente. Un ulteriore sviluppo consiste nella registrazione di più slice contemporaneamente (multi-slice detecting), questo avviene grazie all'utilizzo di più rivelatori che lavorano in parallelo e all'utilizzo di un fascio a cono che investe un'area maggiore del paziente in un tempo minore.

Queste tecniche di ultima generazione sono nate dalla necessità di rendere minima la dose di radiazione rilasciata al paziente.

RICOSTRUZIONE:

Una volta acquisite tutte le proiezioni, si passa al preprocessing delle immagini. Ogni scan viene normalizzato con le variabili di calibrazione dello scanner per correggere eventuali inomogeneità del campo. Può inoltre essere applicato un algoritmo per correggere eventuali dead pixels interpolando i dati dell'intorno in questione. Successivamente è applicata la correzione per gli scattering e un filtro di riduzione del rumore.

Le proiezioni ottenute subiscono quindi una trasformazione logaritmica per correggere l'attenuazione esponenziale caratteristica dell'interazione dei raggi X.

I dati proiettati lungo ogni linea che passa nel corpo del paziente è la somma

lineare dei valori nel voxel che interagisce con la radiazione.

A questo punto si applica una *backprojection*, retroproiezione, attraverso un algoritmo di ricostruzione tomografica che produce una serie di immagini corrispondenti ognuna a una sezione del volume in esame. Si predilige questo metodo per la sua semplicità, adattabilità e velocità computativa. Con questo metodo i valori misurati nelle proiezioni vengono spalmati indietro nella matrice dell'immagine. Il problema del blurring, ovvero uno sfocamento dell'immagine, che si crea è ovviato applicando un algoritmo di backprojection filtrato.

Per ottenere una tomografia il metodo più semplice è quello di applicare il processo di retroproiezione su ogni slice e unire tutte le slice, una di seguito all'altra, per creare un volume che rappresenti la struttura interna del paziente in modo tridimensionale.

Nel caso di un volume tridimensionale, per questioni di tempo, occorre applicare tecniche dedicate in quanto la mole di dati coinvolta è maggiore rispetto al caso bidimensionale. In particolare è possibile applicare una ricostruzione multiplanare (MPR).

2.7 PET-TC

La PET non è tale da permettere la localizzazione anatomica accurata delle aree di captazione del radiofarmaco.

La metodica TC, d'altra parte può solo permettere di ottenere informazioni anatomiche non permettendo di studiare l'attività metabolica. I progressi tecnologici attuati hanno consentito l'impiego di queste due modalità di analisi in modo quasi simultaneo.

L'immagine PET-TC che ne deriva, è la combinazione di dati anatomici derivati dall'esame TC con quelli metabolici derivati dall'indagine PET.

Successivamente all'iniezione endovenosa del tracciante radioattivo, la quantità di radiofarmaco accumulata nel tessuto metabolicamente attivo continua a crescere mediamente per 45-60 minuti. L'acquisizione PET dovrà quindi avvenire solo dopo che la distribuzione del radiofarmaco diventi stabile.

In questo tempo è chiesto al paziente di rimanere immobile per evitare eventuali attivazioni metaboliche non desiderate.

Sfruttando il fatto che il paziente in esame resta immobile, supino e in posizione rilassata, si può procedere all'esame TC. Al giorno d'oggi i tomografi TC accoppiati ai tomografi PET permettono l'acquisizione di immagini dell'intero corpo in pochi secondi. Il campo di scansione va comunemente dalla base del cranio fino alla radice degli arti inferiori.

Successivamente all'esame TC, vengono acquisite le immagini PET.

L'ultimo passo consiste nel fondere insieme i dati ottenuti dalla TAC con quelli PET, ottenendo una mappa delle concentrazioni di radiofarmaco localizzate spazialmente.

Un esempio dei risultati ottenuti è presentato in figura 2.1.

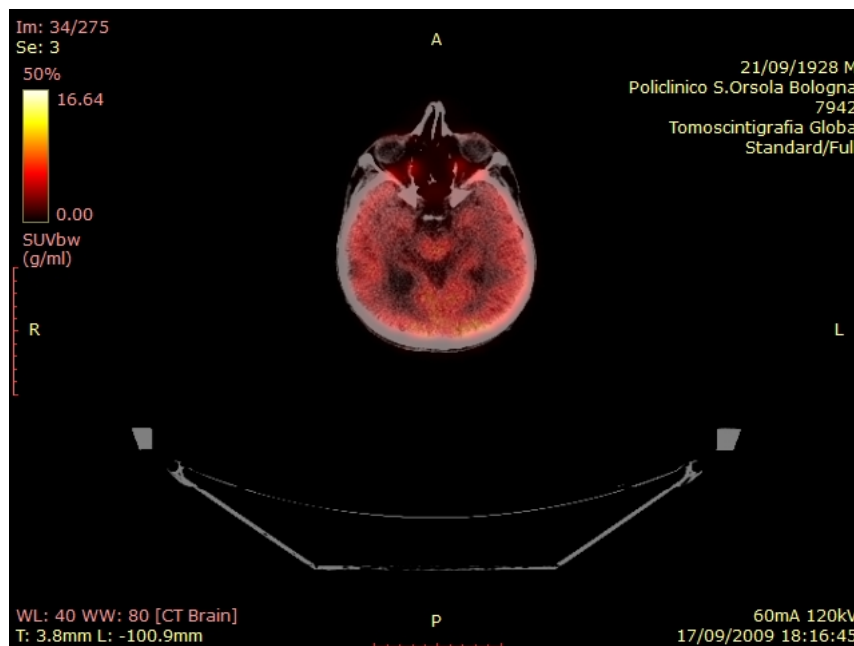


Figura 2.1: Slice della sezione assiale della PET-TC acquisita con ^{18}F -FDG



Figura 2.2: Slice della sezione coronale della PET acquisita con ^{18}F -FDG



Figura 2.3: Slice della sezione sagittale della PET acquisita con ^{18}F -FDG

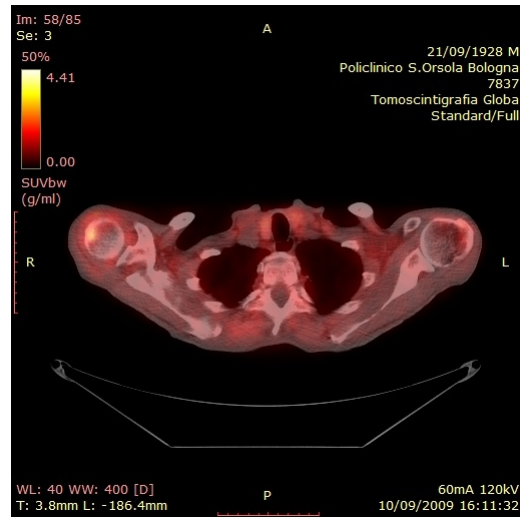


Figura 2.4: Slice della sezione assiale della PET-CT acquisita con ^{64}Cu -ATSM

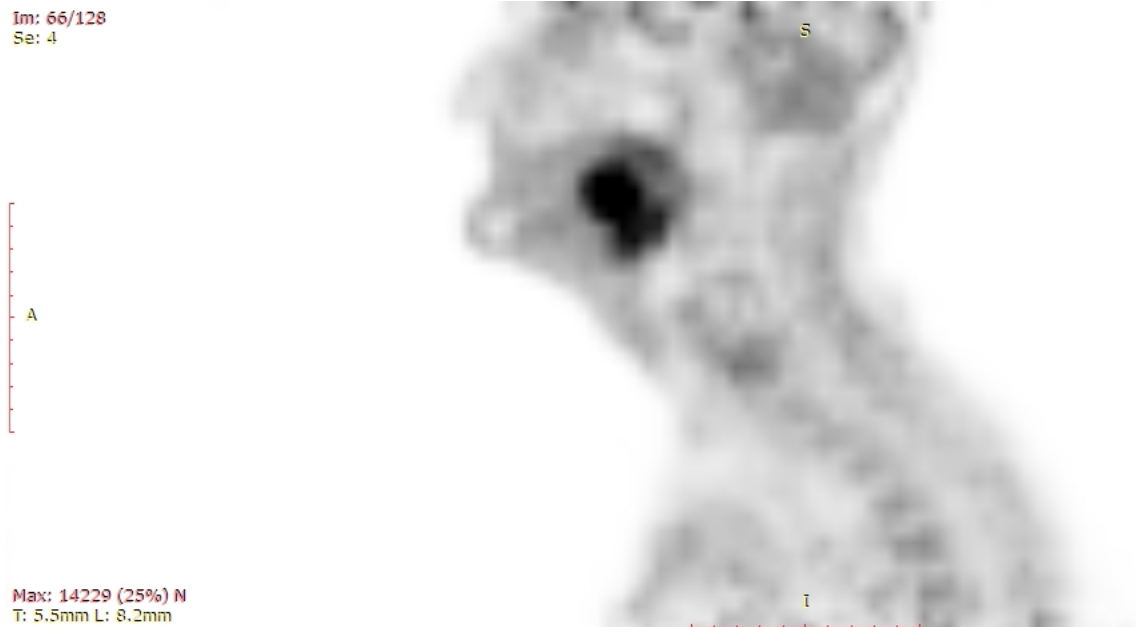


Figura 2.5: Slice della sezione sagittale della PET acquisita con ^{64}Cu -ATSM

Capitolo 3

Radiofarmaci utilizzati per l'analisi

I radionuclidi più utilizzati nelle indagini PET sono prodotti mediante un ciclotrone, ma alcuni possono essere anche ottenuti mediante generatori.

Il ciclotrone è uno strumento in cui un fascio di particelle cariche acquisisce un'energia molto elevata e viene diretto verso un materiale bersaglio.

Perché un radionuclide possa emettere positroni deve essere instabile ed avere un eccesso di protoni. Per produrre radionuclidi emettitori una via percorsa è quindi quella di aggiungere protoni a nuclei stabili grazie all'utilizzo di apparecchiature che permettono di accelerare particelle cariche.

Queste apparecchiature si basano sull'utilizzo di una fonte di particelle cariche che vengono accelerate in un campo magnetico fino ad acquisire un'energia così elevata da penetrare il materiale bersaglio determinando delle reazioni nucleari.

Gli elementi radioattivi vengono quindi prodotti come conseguenza di cambiamenti che avvengono a seguito dell'interazione del fascio con il bersaglio. Dopo la produzione mediante ciclotrone, i radionuclidi vengono incorporati nei radiofarmaci attraverso un processo di radiomarcatura.

Molecole biologiche, come il glucosio, l'ammoniaca o l'acqua possono quindi essere marcate con i radionuclidi prodotti dando origine al radiofarmaco di interesse che, iniettato per via endovenosa, si distribuisce nel corpo del pa-

ziente in relazione alle proprie caratteristiche biologiche.

Il radiofarmaco più comunemente usato è l'analogo del glucosio: *2-deossi-2-fluoro-D-glucosio* (FDG) legato al radionuclide emettitore di positroni ^{18}F .

La produzione di fluoro-18 avviene tramite il bombardamento, con un fascio di protoni ad alta energia, di un bersaglio costituito da acqua arricchita in ossigeno-18.

Questa molecola radiomarcata ha caratteristiche molto simili a quelle del glucosio ed è quindi captata dai tessuti che ne fanno utilizzo sostituendosi ad esso.

3.1 ^{18}F -FDG

Il radiofarmaco in questione è comunemente utilizzato come tracciante del glucosio, infatti il fluoro-18 si sostituisce a quest'ultimo fungendo da analogo. Le zone di maggiore accumulo sono le stesse che fanno un utilizzo maggiore del glucosio per la produzione di energia, con conseguente consumo di ossigeno.

All'ingresso nella cellula il FDG viene fosforilato, evitando in questo modo

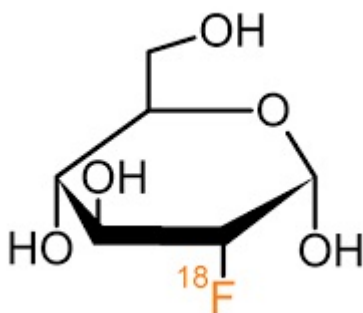


Figura 3.1: Molecola di ^{18}F -FDG

la sua fuoriuscita dalla cellula.

Il processo di fosforilazione consiste nell'aggiunta di un terzo gruppo PO_4^{3-} fosfato alla molecola di ADP, nel mitocondrio, per ottenere ATP.

A differenza del glucosio, tuttavia, l'FDG non può essere catabolizzato nella via glicolitica e rimane nella forma di FDG-6-fosfato fintantoché la molecola rimane radioattiva. Il decadimento della molecola produce ^{18}O da ^{18}F : in questo modo la molecola risultante è una vera e propria molecola di glucosio-6-fosfato, normalmente metabolizzabile dall'organismo.

La valutazione di ^{18}F -FDG è quindi un ottimo metodo per stimare la biodistribuzione del glucosio e la sua fosforilazione nei diversi distretti dell'organismo.

Il ^{18}F può inoltre essere utilizzato per ottenere una misura di ossigeno, sebbene sia comunemente impiegato nella misura di funzionalità biologica. Ciò è giustificato dal fatto che i tessuti tumorali, essendo soggetti a iperglicolisi, subiscono una sovraregolazione di GLUT1, ovvero le proteine responsabili del trasporto di glucosio, e degli enzimi glicolitici. Questo fenomeno è regolato dal *HIF* - 1α , descritto in sezione 1.4, quindi è possibile collegare una misura di concentrazione di glucosio a una di ossigeno.

Tuttavia ulteriori teorie sostengono che sono altri fattori ad influenzare il metabolismo del glucosio, in quanto l'espressione del *HIF* - 1α è osservata anche in zone di normossia.

L'assimilazione cellulare del glucosio avviene sia in condizioni di normossia, con l'effetto Warburg, sia in condizioni di ipossia, con l'effetto Pasteur. Per le due condizioni si riscontra una sovrapposizione degli effetti.

3.2 Studio di ipossia PET

La PET sfrutta la cattura da parte del tessuto di radiofarmaci specifici che si legano alle cellule ipossiche in quantità proporzionale alla concentrazione di ossigeno, evitando le alte concentrazioni e seguendo la cinetica di Michaelis-Menten e legandosi alle macromolecole ipossiche.

È possibile usare radiofarmaci come droghe bioriduttive o citotossine selettive per l'ipossia, che si attivano solo in ambiente ipossico e rilasciano sostanze tossiche per vari meccanismi cellulari.

I farmaci PET hanno un meccanismo di accumulo intracellulare basato su

diffusione transmembrana, in ipossia si legano a macromolecole evitando la retrodiffusione.

In aggiunta alla PET per lo studio dell'ipossia si può completare l'analisi con uno studio sull'emodinamica o un'analisi metabolica, sfruttando l'acqua con ¹⁵O o il FDG.

3.3 Radiofarmaci per lo studio di ipossia

Come detto, l'obiettivo dell'analisi è quello di ottenere una misura della concentrazione di ossigeno nel tessuto tramite un radiofarmaco che funga da mezzo di contrasto e sia quindi direttamente collegabile alla presenza di ossigeno. Il problema si riduce quindi alla determinazione della concentrazione del radiofarmaco.

La concentrazione dipende da due fattori: il primo è la fisiologia locale del tessuto, ad esempio il flusso sanguigno o il metabolismo, il secondo è rappresentato dalla funzione di input, cioè il tempo di radioattività della concentrazione del tracciante.

Le categorie di radiofarmaci finora utilizzati nella misura di concentrazione di ossigeno possono essere raggruppati nelle categorie di *fluoridi*, *copper-based* e *ioduri*, in base alla natura chimica della componente emettitrice, rispettivamente ¹⁸F, ⁶⁰⁻⁶²⁻⁶⁴Cu e ¹²⁴I.

Mentre i radiofarmaci fluoridi utilizzano un elemento emettitore già presente all'interno dell'organismo umano, i radiofarmaci Copper-based vengono costruiti sfruttando la radioattività di ⁶⁰Cu, ⁶²Cu e ⁶⁴Cu. Tra questi il più studiato, anche in virtù dei risultati ottenuti nella sperimentazione umana e animale, è il:

3.4 ⁶⁴Cu-ATSM

Il radiofarmaco *Cu-diacetyl-bis-N₄-methylthiosemicarbazone* (Cu-ATSM) ha una conformazione neutro-lipofila, grazie alla quale è in grado di penetrare

nella membrana subendo diffusione passiva intracellulare.

Nella cellula, il Cu-ATSM subisce bioriduzione citosolica/mitocondriale, co-

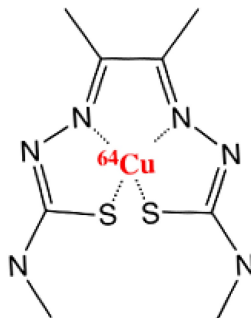
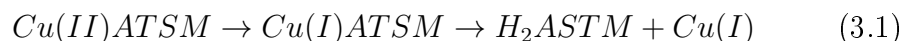


Figura 3.2: Molecola di ^{64}Cu -ATSM

me illustrato in figura 3.3, secondo cui: Cu(II)-ASTM viene ridotto in Cu(I)-ASTM che, essendo poco stabile rispetto al Cu(II) , in condizioni di ipossia si dissocia in $\text{H}_2\text{-ASTM} + \text{Cu(I)}$; quest'ultimo viene velocemente intrappolato nelle proteine intracellulari in proporzione alla quantità di ossigeno presente. Per questo motivo il radiofarmaco in questione rende possibile un'indagine sulla presenza dell'ossigeno e sull'ipossia.



Il principale vantaggio dei radiofarmaci copper-based è il tempo di assimilazione biologico estremamente breve; infatti sono stati misurati tempi di 10-15 minuti a fronte di ordini di grandezza di ore per quanto riguarda i concorrenti. La conseguente analisi può quindi essere effettuata più velocemente ottenendo più facilmente risultati vicini a quelli dell'effettivo fenomeno studiato.

Una caratteristica interessante è che questo radiofarmaco è stato utilizzato nell'identificare l'espressione genica di $HIF-1\alpha$ (^{62}Cu -ATSM). Correlandolo al contrast-enhanced MRI, si è ottenuta SENSITIVITY = 92.3% e SPECIFICITY = 88.9%. L'ostacolo maggiore è che l'analisi non vale per ogni tipo di tessuto tumorale investigato, quindi si rischia di perdere di oggettività e

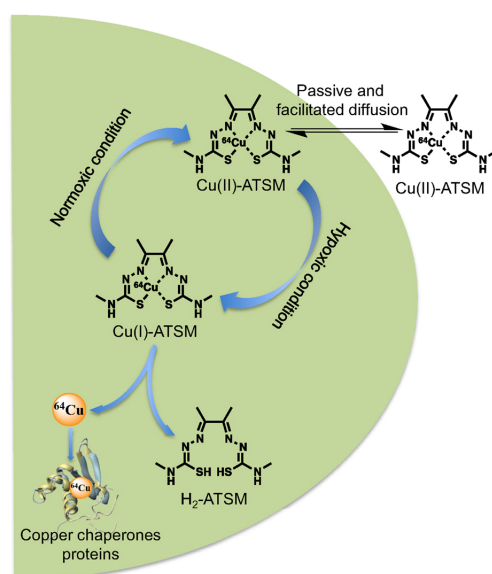
Figura 3.3: Meccanismo di distribuzione tissutale del ^{64}Cu -ATSM

Tabella 3.1: Caratteristiche fisiche dei radionuclidi

Nuclide	$T_{1/2}$	Emissione di β^+ (E_{media})	Range nel tessuto
Copper-60 (^{60}Cu)	23.7 min	93% (0.970 MeV)	4.4 mm
Copper-61 (^{61}Cu)	3.33 h	61% (0.500 MeV)	2.6 mm
Copper-62 (^{62}Cu)	9.67 min	97.83% (1.319 MeV)	6.6 mm
Copper-64 (^{64}Cu)	12.7 h	17.6% (0.278 MeV)	1.4 mm
Fluoride-18 (^{18}F)	109.7 min	96.7% (0.249 MeV)	0.6 mm
Iodine-124 (^{124}I)	4.17 days	22.7% (0.820 MeV)	3 mm
Gallium-68 (^{68}Ga)	67.71 min	88.91% (0.829 MeV)	2.9 mm

occorre una calibrazione più accurata e soggettiva.

Tuttavia i radiofarmaci copper-based, nello specifico il ^{64}Cu -ATSM, risultano il compromesso migliore in termini di $T_{1/2}$, risoluzione intrinseca dell'immagine e resa di produzione.

Capitolo 4

Modello Compartimentale

Come già citato, è stata utilizzata la PET per ottenere degli scan del corpo umano in condizioni tali da evidenziare i centri di maggior accumulo di radiofarmaco. In questo modo è possibile studiare come variano le concentrazioni di ossigeno e glucosio all'interno dei vari tessuti.

Considerando che il ^{18}F -FDG si concentra maggiormente nelle cellule che hanno più attività glicolitica, quindi necessitano di un maggior apporto di glucosio, la PET permette di visualizzare i punti in cui il glucosio è maggiormente concentrato direttamente osservando l'intensità dei pixel.

Per l'ossigeno la maggior concentrazione sarà inversamente proporzionale all'intensità dei pixel in quanto il ^{64}Cu -ATSM va a interagire con le cellule ipossiche e quindi l'analisi permette di individuare i centri in cui l'ossigeno è meno presente o assente.

L'analisi PET fornisce come risultato un volume costituito da fette corrispondenti a immagini di una sezione anatomica. Ogni tomografia è quindi rappresentabile con una matrice in tre dimensioni i cui elementi hanno un valore proporzionale al numero di fotoni emessi nel corrispondente punto di annichilazione nel corpo del paziente. Comunemente ogni matrice di due dimensioni è rappresentata come un'immagine la cui intensità dei pixel è data in scala di grigi a seconda del valore dell'elemento di matrice associatogli.

Nello studio compiuto sono state utilizzate due PET effettuate entrambe utilizzando come radiofarmaci i succitati ^{18}F -FDG e ^{64}Cu -ATSM.

Su ogni PET è stata effettuata una normalizzazione per rappresentare l'immagine in modo tale da avere i pixel più scuri con valore 0 e i pixel più chiari con valore massimo. Tutti i valori intermedi sono espressi in scala lineare da 0 al valore massimo su un range di 16 bit corrispondente a 32767 valori.

È possibile associare ad ogni valore di pixel una data concentrazione di radiofarmaco emettitore di radiazione β^+ che è proporzionale al numero di fotoni che formano l'immagine e alla quantità di radiofarmaco corrispondente all'ossigeno o al glucosio concentrata in quel punto.

I dati utilizzati sono in formato DICOM, uno standard che definisce i criteri per la comunicazione, la visualizzazione, l'archiviazione e la stampa di informazioni di tipo biomedico. Questo particolare formato, comunemente utilizzato per trattare le informazioni PET, presenta il volume di dati normalizzato slice per slice su valori da 0 a 16 bit. La normalizzazione non permette un'associazione diretta dell'intensità del pixel alla concentrazione. Utilizzando i dati forniti dall'header del file .dcm (DICOM) si riesce ad ottenere una mappa dell'attività del radiofarmaco accumulato nel pixel in esame. Il procedimento di scaling è:

$$PETActivities = RescaleSlope * PETintensity + RescaleIntercept$$

con la variabile *RescaleIntercept* che comunemente assume il valore 0.

Per ottenere la concentrazione di ossigeno nel voxel o pixel in esame, rispettivamente considerando la tomografia o la singola slice, occorre creare un modello iniziale che permetta di associare l'uptake del radiofarmaco alla concentrazione.

4.1 Modello compartimentale

Per la determinazione delle concentrazioni misurate dalla PET si è scelto di applicare l'analisi di modelli compartimentali.

Dato che ogni radiofarmaco è caratterizzato dalla sua particolare cinetica nel corpo umano, la quantificazione di questo comportamento diventa importante per i protocolli di imaging. Infatti ogni radiotracciante è sviluppato per misurare un parametro fisiologico di interesse in un tessuto specifico, come

attività glicolitica o consumo di ossigeno; per questo motivo occorre conoscere il processo biochimico in cui ogni elemento è coinvolto per stimare la concentrazione di reagenti e prodotti nel tempo, quindi per ottenere i rates di reazione.

L'analisi compartimentale permette di ottenere una rappresentazione matematica del passaggio di un farmaco attraverso il corpo, costruendo quindi un modello farmacocinetico.

Le diverse strategie per definire la cinetica del tracciante sono generalmente divise in due categorie: costruite sul modello e costruite sui dati. La differenza sta nel fatto che nel secondo non servono conoscenze a priori sul modello più appropriato che viene stimato direttamente dai dati della cinetica.

Per la descrizione del modello occorre considerare delle variabili (dose, tempo di somministrazione, ecc) e dei parametri costanti (volume di distribuzione e capacità di smaltimento) da inserire nelle equazioni che quantificano la distribuzione del farmaco.

In questo approccio il corpo viene diviso in una serie di compartimenti omogenei collegati tra loro che rappresentano la disposizione del farmaco. Se i compartimenti sono basati sulla struttura anatomica, questo approccio si dice fisiologico (PBPK: *physiological Based Pharmacokinetics*).

Un tale approccio permette di considerare vari tessuti insieme se questi presentano caratteristiche simili rispetto al posizionamento del farmaco nel tessuto.

Un altro approccio compartimentale è quello di assumere che il corpo può essere rappresentato da un singolo compartimento omogeneo (modello mono-compartimentale) e aggiungere compartimenti per descrivere altri processi che possono essere visti dai dati di concentrazione rispetto al tempo.

Occorre notare che i modelli bi-compartimentali, non necessariamente riflettono ogni tessuto distinto fisiologicamente, ma piuttosto sono rappresentativi di una specifica caratteristica (ad es: tempo di perfusione).

Il vantaggio che si trae dall'approccio compartimentale è quello di sviluppare il modello farmacocinetico in modo da descrivere accuratamente l'andamento delle concentrazioni di farmaco rispetto al tempo. Inoltre questa tecnica è

indipendente dalla quantità di dose e quindi può essere estrapolato a altri individui generalizzando in questo modo i risultati ottenuti e permettendo di fare delle predizioni sui dati futuri.

In generale un farmaco è trasportato dal sangue fino al sito di interesse. Il tracciante, presente nello spazio extra cellulare, attraversa la membrana cellulare per entrare nella cellula dove viene metabolizzato.

I compartimenti interagiscono scambiando la sostanza in esame o i prodotti della sua interazione con le molecole interne all'organismo. Ci possono anche essere scambi tra un compartimento e lo spazio intorno.

Il modello è quindi capace di stimare la concentrazione di sostanza in ogni compartimento e il rate di scambio tra loro. Nella PET, questi rates forniscono i parametri fisiologici che caratterizzano il comportamento di un farmaco in un tessuto di interesse.

Le variabili necessarie per definire un modello compartimentale sono i rates di scambio tra compartimenti (k_1, k_2, k_3, \dots), la funzione di input, che definisce la quantità di sostanza in esame immessa nel sistema circolatorio, e le lumped constant, comunemente definite come il rapporto tra la costante di estrazione arterio-venosa di radiofarmaco e quello del suo equivalente fisiologico sotto condizioni stazionarie e con k_4 piccolo, nel caso del glucosio misurato con la PET. L'analisi cinetica può essere fatta applicando il modello pixel per pixel (immagini parametriche) oppure su ROI raggruppando strutture omogenee. Quest'ultimo metodo sembra una soluzione apprezzabile in quanto media la radioattività dei pixel nella ROI permettendo una migliore statistica e riducendo i tempi di calcolo.

Per ottenere le concentrazioni di radiofarmaco reciproco del glucosio, il ^{18}F -FDG, è stato preso in esame lo studio di modelli compartimentali che rappresentino la farmacocinetica del glucosio. In questo modo è possibile ottenere i coefficienti che regolano lo scambio nel tempo di sostanza tra i compartimenti presi in esame e determinare dalle equazioni canoniche l'andamento della concentrazione di glucosio fosforilato e libero all'interno dell'organo in esame.

Il deossi-glucosio (DG) e il ^{18}F -deossiglucosio (FDG) hanno il potenziale di

essere intrappolati e accumularsi nel tessuto come prodotti primari o secondari di fosforilazione.

L'FDG nel plasma viene trasportato attraverso le barriere sanguigne. Il glucosio è metabolizzato mentre il FDG-6-PO₄ è intrappolato nel tessuto e rilasciato lentamente.

Comunemente si assume che i compartimenti tissutali siano omogenei rispetto al flusso sanguigno, ai rate di trasporto del glucosio tra plasma e tessuto e a quelli di fosforilazione; il metabolismo del glucosio sia stazionario; il rate di utilizzo del glucosio, la concentrazione nel plasma e quella di tutti i substrati sia costante durante la misura.

Il modello preso in considerazione sfrutta l'imaging dinamico, *dynamic PET* (dPET), una particolare tecnica che permette la registrazione della cinetica del tracciante, non solo in un singolo punto temporale dopo l'iniezione come nella modalità statica, ma per tutto il tempo di misura.

Le immagini parametriche che ne derivano permettono la visualizzazione di parametri dedicati della cinetica, come perfusione, trasporto o fosforilazione nel caso FDG.

Con questa metodologia è possibile acquisire immagini sommate su un variabile numero di frame e studiare il movimento delle sostanze nei tessuti e negli organi.

Il modello compartimentale a due tessuti è adatto per traccianti che vengono trasportati e, dopo il primo step metabolico, intrappolati, come nel caso del FDG e dell'ATSM.

Per definire questo modello si identificano quattro rates di trasporto che descrivono lo scambio di tracciante tra sangue e tessuto. Per l'FDG:

- k_1 : flusso in entrata;
- k_2 : flusso in uscita;
- k_3 : rate di fosforilazione;
- k_4 : rate di defosforilazione.

Una semplificazione del modello consiste nella somma degli spazi interstiziali e cellulari.

Una modifica consiste nel calcolo del volume frazionale sanguigno V_b , un parametro che correla con il volume sanguigno (densità vascolare). Senza questo e il k_4 , si avrebbero dei rates 1,3 differenti perché dipendenti da V_b e k_4 . Sebbene basso, il k_4 non è trascurabile.

I parametri sono accettati se V_b e k_1/k_4 sono minori di 1 e $V_b > 0$.

Le immagini parametriche sono calcolate in base ai dati dPET/CT fittando una funzione di regressione lineare ai dati delle *curve tempo-attività* (TAC) per ogni pixel. Le immagini della forma e dell'intercetta della curva TAC possono essere calcolate con un software. Le immagini parametriche riflettono l'intrappolamento del FDG e possono essere usate per delineare le lesioni maligne e il posizionamento di una VOI a partire dall'alto contrasto nel tessuto circostante.

4.2 Modello compartimentale a 2 Tessuti

La struttura compartimentale che segue questo modello è quella illustrata in figura 4.1.

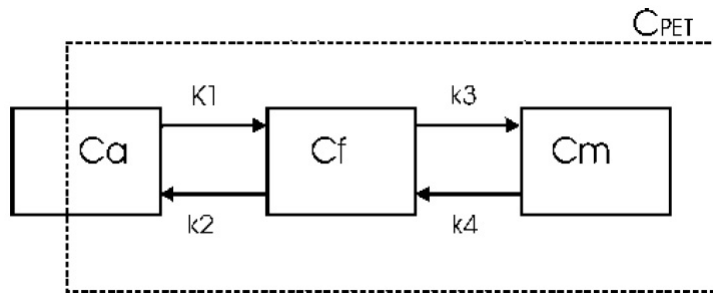


Figura 4.1: Modello compartimentale

Oltre ai rate k_i precedentemente introdotti, si assumono le concentrazioni di radiofarmaco ^{18}F -FDG nel modo seguente:

- C_a : concentrazione nel compartimento di input (sistema circolatorio);

- C_f : concentrazione di FDG non fosforilato;
- C_m : concentrazione di FDG fosforilato (metabolizzato).

in questo modo è possibile calcolare la variazione delle concentrazioni nel tempo tenendo conto dei rates costanti e di quello di perfusione come in eq. (4.1).

$$\begin{aligned}\frac{d}{dt}C_f(t) &= k_1C_a - (k_2 + k_3)C_f + k_4C_m \\ \frac{d}{dt}C_m(t) &= k_3C_f - k_4C_m\end{aligned}\quad (4.1)$$

Da cui:

$$\begin{aligned}C_f(t) &= \frac{k_1}{\alpha_2 - \alpha_1} [(k_4 - \alpha_1)e^{-\alpha_1 t} + (\alpha_2 - k_4)e^{-\alpha_2 t}] \int_0^T C_a(t) dt \\ C_m(t) &= \frac{k_1 k_3}{\alpha_2 - \alpha_1} (e^{-\alpha_1 t} - e^{-\alpha_2 t}) \int_0^T C_a(t) dt\end{aligned}\quad (4.2)$$

Con α_1 e α_2 definiti come:

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= \frac{1}{2}[k_2 + k_3 + k_4 - \sqrt{(k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4k_2k_4}] \\ \alpha_2 &= \frac{1}{2}[k_2 + k_3 + k_4 + \sqrt{(k_2 + k_3 + k_4)^2 - 4k_2k_4}]\end{aligned}\quad (4.3)$$

Con la PET si misura la somma dei due compartimenti $C_f(t)$ e $C_m(t)$, che deve combaciare con i dati PET come in eq. 4.4:

$$C_{PET}(t) = \frac{k_1}{\alpha_2 - \alpha_1} [(k_3 + k_4 - \alpha_1)e^{-\alpha_1 t} + (\alpha_2 - k_3 - k_4)e^{-\alpha_2 t}] \int_0^T C_a(t) dt \quad (4.4)$$

Una volta che i parametri sono definiti, il parametro di interesse fisiologico diventa il *rate metabolico per il glucosio* (MRGI). Questo è calcolato dai

rate costanti ma anche come funzione delle *Lumped Constant* (LC) e della glicemia (gl).

La LC è definita come il rapporto tra la frazione di estrazione arterio-venosa di FDG e quello del glucosio sotto condizioni stazionarie e con k_4 piccolo. Infatti il ^{18}F -FDG e il glucosio subiscono un trasporto differente attraverso la barriera cellulare sanguigna, inoltre anche la quantità di materiale fosforilato che arriva allo step iniziale della glicolisi è differente. Per questo motivo l'assunzione netta di tracciante dev'essere convertita in quella di glucosio attraverso la LC. La Lumped Constant è quindi necessaria a convertire la quantità di radiofarmaco misurata in uptake effettivo di glucosio, in quanto questi hanno meccanismi simili ma non uguali di diffusione attraverso il tessuto.

In altre parole la LC è il fattore di conversione tra FDG e glucosio nell'assunzione totale nel tessuto.

La glicemia è definita come la concentrazione del glucosio nel plasma in stato stazionario. Si ottiene mediando i valori di glicemia misurati in due o tre campioni di sangue attraverso la PET.

Nel caso di una sola acquisizione, viene utilizzato il metodo di singolo scan, definito da Sokoloff et al. In questo metodo si definisce il MRGl come:

$$MRGl = \frac{gl}{LC} \frac{K'_1 k'_3}{k'_2 + k'_3} \left[\frac{C_{PET}(T)}{C'_f(T) + C'_m(T)} \right] \quad (4.5)$$

e si può considerare $k_4 = 0$.

Le grandezze con l'apice sono ottenute da una popolazione campione.

k_1 dipende dall'assunzione iniziale di radiofarmaco nei tessuti.

Le costanti con l'apice k' vengono poi utilizzate nelle equazioni(4.2) per calcolare C_f e C_m integrate su tutto il tempo di acquisizione.

Invertendo l'ultima formula si ottiene una misura da associare alla concentrazione misurata in ogni pixel:

$$C_{\text{PET}}(T) = \frac{MRGl * LC}{gl} \frac{k'_2 + k'_3}{k'_1 k'_3} (C'_m(t) + C'_f(t)) \quad (4.6)$$

4.3 Misura dei rates di scambio per il ^{18}F -FDG

I rates di trasporto del ^{18}F -FDG sono stati misurati da M. Reivich et Al. [7]. Lo scopo del loro lavoro è quello di ottenere una stima del rate metabolico locale del glucosio cerebrale (LCMRGl). Per fare ciò occorre considerare il valore della Lumped Constant (LC) da associare al modello compartimentale utilizzato.

Per creare il modello compartimentale a due tessuti da utilizzare sono state fatte le seguenti assunzioni:

- Il glucosio e il ^{18}F -FDG competono per un trasportatore comune tra plasma e tessuto cerebrale;
- Il glucosio e il ^{18}F -FDG competono entrambi per il trasportatore comune per tornare indietro dal cervello al plasma. Per la fosforilazione verso il rispettivo *hexose-6-phosphate*, è utilizzata l'hexokinase;
- una volta formato, il FDG-6-PO4 non è più metabolizzato e viene intrappolato nel tessuto;
- dato che l'attività di fosfatasi è trascurabile nel cervello, la defosforilazione del FDG-6-PO4 può essere ignorata;
- la regione locale è omogenea rispetto a flusso sanguigno, rates di trasporto di glucosio e ^{18}F -FDG tra plasma e tessuto, fosforilazione di glucosio e ^{18}F -FDG;

- i rates di trasporto e la concentrazione di glucosio nel plasma sono costanti durante la misura;
- $^{18}\text{F-FDG}$ e glucosio sono presenti in un singolo compartimento in ogni regione locale omogenea;
- il contributo del tracciante libero nel volume sanguigno del tessuto rappresenta una frazione trascurabile dell'attività del tessuto.

Sulla base di queste assunzioni è stata sviluppata la seguente equazione:

$$R = \frac{C_T^*(T) - k_1^* e^{-(k_2^*+k_3^*)T} \int_0^T C_p^* e^{-(k_2^*+k_3^*)t} dt}{[(\lambda V_{MAX}^* K_{MAX}) / (\phi V_{MAX} K_{MAX}^*)] \int_0^T \frac{C_p^*}{C_p} dt - e^{-(k_2^*+k_3^*)T} \int_0^T \frac{C_p^*}{C_p} e^{(k_2^*+k_3^*)t} dt} \quad (4.7)$$

in cui:

- R : rate calcolato del consumo di glucosio per grammo di tessuto;
- C_T^* : concentrazione di FDG e FDG-6-PO4 nel tessuto;
- C_p^* : concentrazione di FDG nel plasma arterioso;
- C_p : concentrazione di glucosio nel plasma arterioso;
- k_1^* : rate di trasporto plasma-tessuto;
- k_2^* : rate di trasporto tessuto-plasma;
- k_3^* : rate di trasporto per la fosforilazione;
- λ : rapporto del volume di distribuzione nel tessuto di $^{18}\text{F-FDG}$ rispetto a glucosio;
- ϕ : frazione di glucosio fosforilato che continua la glicolisi;
- K_M^* : costante apparente di M-M per FDG;

- V_M^* : velocità massima per FDG;
- K_M : costante apparente di M-M per glucosio;
- V_M : velocità massima per glucosio.

Le ultime sei costanti, combinate come nell'equazione (4.7), determinano le LC.

In questo modo, quantificando l'attività totale del FDG per ogni regione attraverso la PET, misurando l'andamento nel tempo dell'attività del radiofarmaco nel plasma arterioso e conoscendo le k e le LC nell'uomo, è possibile calcolare i rate metabolici del glucosio nelle varie strutture del cervello.

Determinazione delle costanti di rate:

Le costanti k sono correlate all'andamento nel tempo della concentrazione totale di attività del ^{18}F nel tessuto e di quella nel plasma tramite la seguente equazione:

$$C_i^*(\tau) = k_1^* e^{-(k_2^*+k_3^*)\tau} \int_0^T C_p^* e^{-(k_2^*+k_3^*)t} dt + k_1^* k_3^* \int_0^T e^{-(k_2^*+k_3^*)T} \int_0^T C_p^* e^{-(k_2^*+k_3^*)t} dT \quad (4.8)$$

Con:

$C_i^*(\tau)$ che rappresenta l'attività del ^{18}F nel tessuto al tempo τ .

Determinando la concentrazione dell'attività del radionuclide nel plasma arterioso e nel tessuto attraverso un'iniezione di bolo di FDG, è possibile determinare i $k_1^*, k_2^*, k_3^*, k_4^*$ con un fit non lineare ai minimi quadrati.

Determinazione della Lumped Constant:

Secondo la teoria di Sokoloff, assumendo $k_4^* = 0$, è dimostrabile che seguendo il cambiamento della concentrazione nel radiofarmaco nel sangue, il valore del rapporto tra i rates di estrazione di FDG e glucosio dal cervello moltiplicato per il rapporto tra attività specifiche di sangue e plasma, tende asintoticamente al valore della LC.

Tabella 4.1: Costanti di rates utilizzate per il ^{18}F -FDG

Costante	Materia Grigia	Materia Bianca
k_1^* (ml / g min)	$0,950 \pm 0,005$	$0,065 \pm 0,005$
k_2^* (min^{-1})	$0,125 \pm 0,002$	$0,126 \pm 0,003$
k_3^* (min^{-1})	$0,069 \pm 0,002$	$0,660 \pm 0,002$
k^*_{*4} (min^{-1})	$0,0055 \pm 0,0003$	$0,0054 \pm 0,0006$
$MRGl$ (ml / g min)	$5,58 \pm 0,03$	
LC	$0,520 \pm 0,028$	

$$\left[\frac{(C_a^* - C_v^*)/C_a^*}{(C_a - C_v)/C_a} \right] \left[\frac{C_a^*/C_a}{C_p^*/C_p} \right] (\alpha) = \frac{\lambda V_{MAX}^* K_m}{\phi V_{MAX} K_m^*} \quad (4.9)$$

Con:

C_a^* e C_a : concentrazioni nel sangue arterioso rispettivamente di FDG e glucosio;

C_v^* e C_v : concentrazioni nel sangue venoso rispettivamente di FDG e glucosio;

Nelle successive misure si utilizzerà la Lumped Constant misurata da Phelps et Al. [10].

Determinazione delle K:

Le K vengono determinate seguendo l'andamento nel tempo dell'attività di ^{18}F , misurata attraverso un'iniezione in vena di bolo.

Gli andamenti dell'attività tissutale nel tempo nella materia grigia e bianca sono determinati con degli scan PET a intervalli di tempo.

Da questi andamenti temporali è possibile fare un best fit per determinare le costanti k.

Le metodologie di misura descritte sono state applicate al tessuto cerebrale di materia grigia e di materia bianca su un campione di nove volontari.

I valori ottenuti per i rates k, la Lumped Constant e il MRGl sono riportati in tabella 4.1:

Per completezza vengono riportati anche gli andamenti temporali di radiofarmaco fosforilato in figura 4.2.

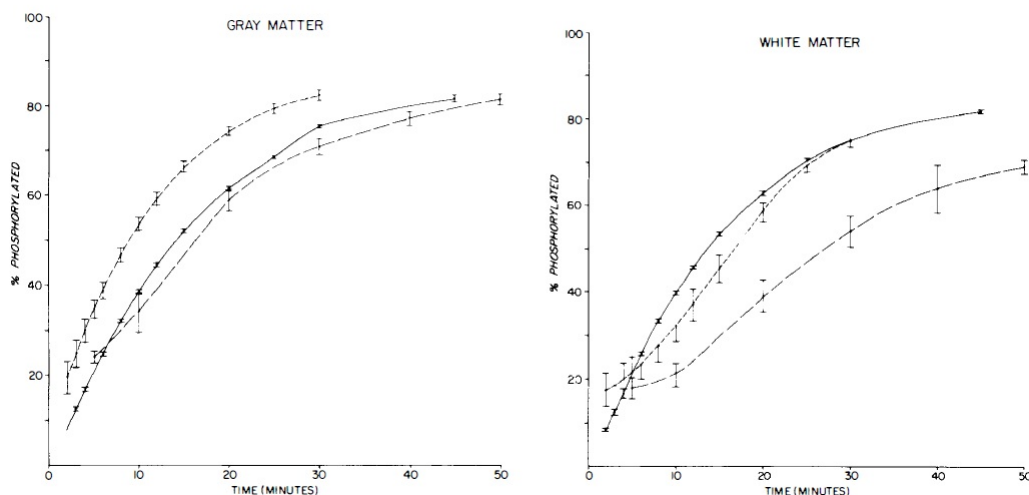


Figura 4.2: Andamento temporale di radiofarmaco fosforilato.

4.4 Misura dei rates di scambio per il $^{64}\text{Cu-ATSM}$

Le costanti di trasporto da inserire nell'analisi compartimentale del $^{64}\text{Cu-ATSM}$ sono state misurate in uno studio che ha come scopo quello di valutare la fattibilità di creare un modello cinetico basato sui voxel attraverso un dataset ottenuto da cellule tumorali umane impiantate su cavie di laboratorio e studiate con una dPET che utilizza il $^{64}\text{Cu-ATSM}$ come tracciante.

Le cavie sono state studiate con una dPET di 90 minuti e uno scan CT con mezzo di contrasto.

Successivamente sono stati utilizzati due modelli compartimentali, uno reversibile e uno irreversibile, a due tessuti, fittati alle curve tempo-attività (TAC) ottenute dall'intero volume tumorale in esame e paragonati usando il *criterio di informazione di Akaike* (AIC), un metodo che misura la qualità della stima fatta da modelli statistici basandosi sulla complessità del modello e sulla bontà dell'adattamento di questo ai dati.

Basandosi sull'analisi farmacocinetica dei voxel, sono state generate delle mappe parametriche delle costanti di rate $k_1, k_3 e K_i$ da paragonare all'assimilazione del radiofarmaco.

Basandosi sulla AIC, è stato selezionato il modello irreversibile a due compartimenti per l'analisi farmacocinetica sui voxel, in quanto la stima fatta con questo modello risulta migliore rispetto a quella fatta seguendo un andamento reversibile del radiofarmaco. Dei parametri estratti, la perfusione k_1 ha mostrato una forte correlazione con l'uptake ($R=0,88$ Spearman) di radiofarmaco già da 5 minuti dopo l'iniezione. Inoltre una relazione positiva è stata trovata tra k_3 e il rate di influsso costante K_i con l'uptake finale (dopo 90 min): $R = 0.56$ e $R = 0.86$ rispettivamente.

Per il trapianto sono state utilizzate cellule tumorali umane coloretali (HT29) e cellule tumorali umane neuroendocrine polmonari (H727) inoculate nei topi in quantità di circa 10^6 cellule di HT29 o H727.

Le immagini PET e CT sono state coregistrate in uno scan di 90 minuti. I dati sono acquisiti in list mode in due sets di sequenze temporali per definire la funzione di input (15 x 2 s; 10 x 10 s; 5 x 80 s; 3 x 240 s; 3 x 960 s; 1 x 920 s) e l'uptake di tracciante nelle regioni tumorali (1 x 10 s; 1 x 20 s; 1 x 30 s; 4 x 60 s; 4 x 150 s; 15 x 300 s).

Lo studio è stato eseguito su un VOI nel centro della cavità cardiaca da usare per generare le funzioni di input basate sull'immagine.

Le TACs ottenute dalle VOI, disegnate manualmente, sono poi state utilizzare per creare il modello compartimentale.

Ai dati è stato applicato un modello a due tessuti irreversibile con un fit di regressione per generare le mappe parametriche di k_1, k_3 e K_i .

Il flusso in entrata netto, K_i è definito come $\frac{k_1 k_3}{(k_2 + k_3)}$ ed ha lo stesso significato del rate metabolico utilizzato nel modello per il glucosio.

L'assimilazione media per voxel nelle regioni tumorali è stata acquisita a 0 / 5 min, 25 / 30 min e 85 / 90 min dopo l'iniezione di radiofarmaco e confrontata ai valori ottenuti dalle mappe parametriche.

Dallo studio si è notato che mentre l'uptake nel tessuto muscolare resta relativamente stabile, nel tumore continua a crescere nel tempo, raggiungendo un rapporto tumore su muscolo (T/M) medio di 2.16 ± 0.74 (*media* \pm *SD*)

Tabella 4.2: Costanti di rates utilizzate per il ^{64}Cu -ATSM

Costante	HT29	H727
k_1^* (ml / cm ³ min)	0,0524 ± 0,0126	0,0586 ± 0,0236
k_2^* (min ⁻¹)	0,0753 ± 0,0176	0,098 ± 0,046
k_3^* (min ⁻¹)	0,0042 ± 0,0017	0,0067 ± 0,0003
K_i (ml / cm ³ min)	0,0027 ± 0,0007	0,0038 ± 0,0003

a 90 minuti.

Le costanti misurate da applicare al modello compartimentale irreversibile, ovvero ponendo la costante k_4 a 0, sono riportate in tabella 4.2.

Capitolo 5

Risultati

Il metodo illustrato verrà applicato a diverse acquisizioni PET effettuate dal dipartimento di fisica nucleare dell'Ospedale S.Orsola-Malpighi di Bologna. I volumi di dati derivano da due pazienti su cui sono stati effettuati esami con entrambi i traccianti: ^{18}F -FDG e ^{64}Cu -ATSM.

I dati utilizzati per lo studio effettuato sono stati acquisiti con una macchina PET-CT in grado di fornire simultaneamente uno scan anatomico (TC) e funzionale (PET) del paziente in esame.

La macchina in questione è prodotta dalla GE MEDICAL SYSTEMS ed è in dotazione al Policlinico S.Orsola di Bologna.

Per entrambi i pazienti analizzati i dati forniti sono costituiti da due acquisizioni PET-CT ognuna delle quali impiega uno dei due radiofarmaci già citati. Dopo l'acquisizione si ottiene una serie di file DICOM (Digital Imaging and COmmunication in Medicine) che formano il volume di acquisizione.

Il volume di dati è costituito per l'acquisizione con ^{18}F -FDG da 275 e 237 slices, rispettivamente per il primo e secondo paziente, e da 85 slices per le acquisizioni con ^{64}Cu -ATSM. Il numero di slice è lo stesso per la registrazione PET e per la corrispondente CT. La zona del corpo visualizzata nell'analisi va dalla testa all'addome.

Ogni slice è costituita da una matrice di pixel con intensità da 0 a 16 bit sulla scala di grigi, corrispondente a un valore massimo di 32766. Per le immagini TAC la matrice è data da 512 x 512 pixel con una larghezza del pixel

equivalente a 0.976562^2mm^2 di tessuto e un passo tra le slices di 3.75 mm. Per le PET la matrice è di 128 x 128 pixel, ognuno dei quali copre un'area di 5.46875^2mm^2 , il passo tra le slice è di 3.27 mm.

Con questi presupposti ogni voxel, nella visualizzazione tridimensionale, rappresenta un volume di 97.797mm^3 per la PET e di 3.576mm^3 per la TAC. Per i dati impiegati si presentano in tabella 5.1 i tempi utilizzati per l'analisi. I tempi misurati vanno dal momento dell'iniezione del radiofarmaco a quello in cui inizia l'acquisizione PET e sono ottenuti dall'header del file DICOM. Si è supposto che questo tempo sia sufficiente a rendere stabile la cinetica del radiofarmaco riuscendo in questo modo a visualizzare la situazione limite in cui il radiofarmaco sia uscito completamente dalla zona vascolare e si trovi perfuso nel tessuto di interesse al momento dell'analisi.

Si è scelto di utilizzare il programma Matlab per visualizzare ed elaborare le immagini ottenute con la PET e la TAC.

5.1 Inversione della formula per il ^{18}F -FDG

Applicando le formule invertite si ottiene un valore della concentrazione nella zona cerebrale del volume PET. Il valore considerato è corrispondente alla materia bianca cerebrale, più attiva per l'FDG in quanto assume maggiori quantità di tracciante per via della maggior attività metabolica.

Invertendo la formula (4.5) si ottiene:

$$C_{PET}(T) = \frac{LC}{gl} \frac{k'_2 + k'_3}{K'_1 k'_3} MRGl(C'_f(T) + C'_m(T)) \int_0^T C_a(t) dt \quad (5.1)$$

Nell'eq. (5.1) i valori di C_a integrati sul tempo sono ottenuti da una ROI prelevata come in figura 5.2. Questa ROI corrisponde all'area sottesa da una curva che rappresenti l'andamento della concentrazione nel tempo nella

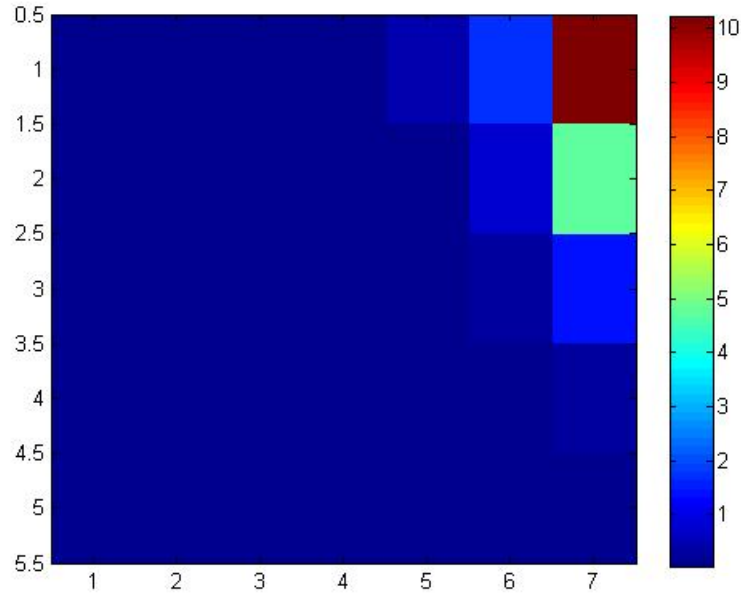


Figura 5.1: Matrice considerata per C_a , ^{18}F -FDG

regione stessa. Si suppone che la ROI considerata rappresenti una zona di afflusso sanguigno costante, quindi la perfusione di radiofarmaco dopo un dato intervallo di tempo è da considerarsi esaurita, ovvero tutto il radiofarmaco è passato dal compartimento di C_a a quello di C_f . Per questo motivo la regione utilizzata può essere considerata con una concentrazione costante e bassa rispetto al tessuto in esame. Successivamente è stata applicata la media della matrice nell'eq. 5.1 per ottenere un valore che rispecchi la concentrazione nell'intervallo di tempo considerato in tabella 5.1.

I valori calcolati attraverso il metodo illustrato, sia per la misura della concentrazione di glucosio che per quella di ossigeno, sono calcolati in funzione della ROI considerata su cui è stata valutata la concentrazione C_a .

Una volta ottenuto il valore di C_{PET} , è stata applicata una trasformazione basata sul SUV della zona del tessuto considerata come ROI per attuare una normalizzazione.

Dividendo in gruppi i pixel in base ai valori di SUV della slice considerata, è

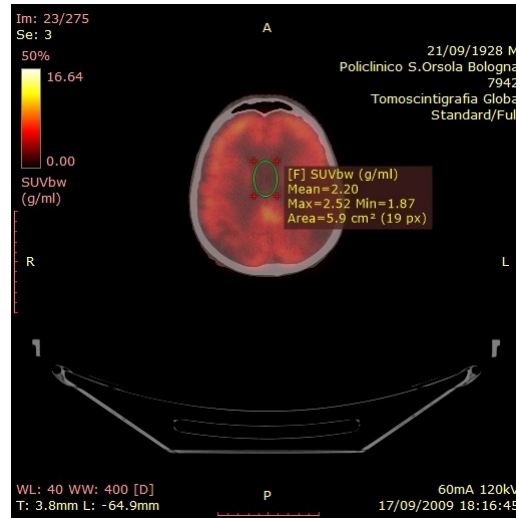


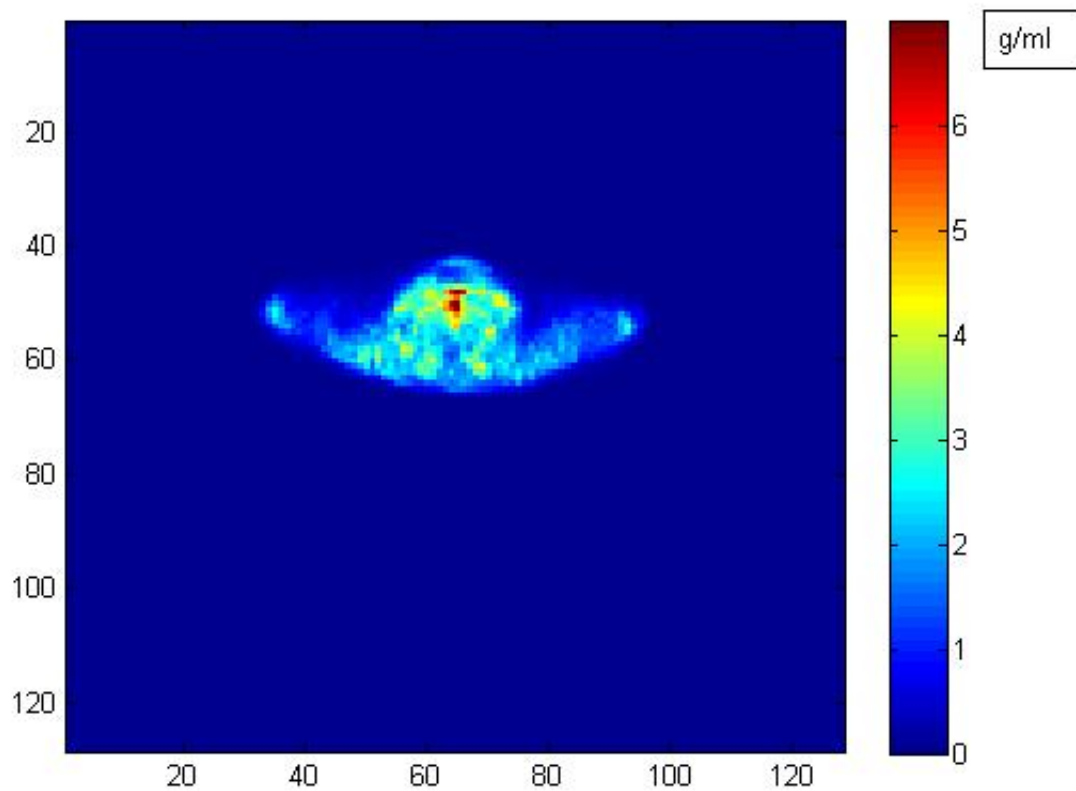
Figura 5.2: ROI utilizzata per il calcolo di C_a , ^{18}F -FDG

stato assegnato il valore di C_{PET} alle intensità dei pixel del gruppo con valori corrispondenti a C_a e tutti gli altri valori dell'immagine sono stati riscaliati secondo questo coefficiente assegnando loro un valore proporzionale all'intensità del pixel iniziale.

La trasformazione applicata associa quindi all'intensità considerata del pixel il valore di concentrazione calcolato con l'eq. (5.1) e tutti gli altri valori sono ottenuti in proporzione a questo.

Le immagini ottenute sono una mappa della concentrazione relativa al valore C_a .

Per il secondo set di dati è stata analizzata la matrice in figura 5.1 per ottenere i valori di C_a da utilizzare. Questa ROI è la stessa prelevata dal primo campione come in figura 5.2. L'elaborazione ha portato al risultato in figura 5.4. È stata utilizzata la stessa ROI per i due campioni in quanto la selezione di una regione nel secondo campione non è stata possibile a causa dell'elevata attività cerebrale del paziente al momento dell'esame. Infatti le misure attuate utilizzando la ROI selezionata dal secondo campione avrebbero portato a concentrazioni molari di 158 mol/L, quindi risulta di fondamentale importanza la selezione della ROI che porta alla misura di C_a . È stata operata questa scelta basandosi sul fatto che i due campioni hanno la stessa concen-

Figura 5.3: Risultato dell'analisi per il glucosio, $1\text{-}^{18}\text{F}$ -FDG

trazione sanguigna al momento dell'analisi.

Il ^{18}F -FDG è un analogo del glucosio, cioè si sostituisce a quest'ultimo nel metabolismo illustrato in sezione 1.1. A parità di tessuto e di attività metabolica, date le ipotesi precedentemente esposte, si avrebbe la stessa concentrazione nel tempo in una stessa regione sia per il glucosio sia per il suo analogo. Per questo motivo misurare la concentrazione di radiofarmaco equivale a misurare quella di glucosio a cui esso si sostituisce.

La concentrazione di glucosio rappresentata nelle immagini è da intendersi

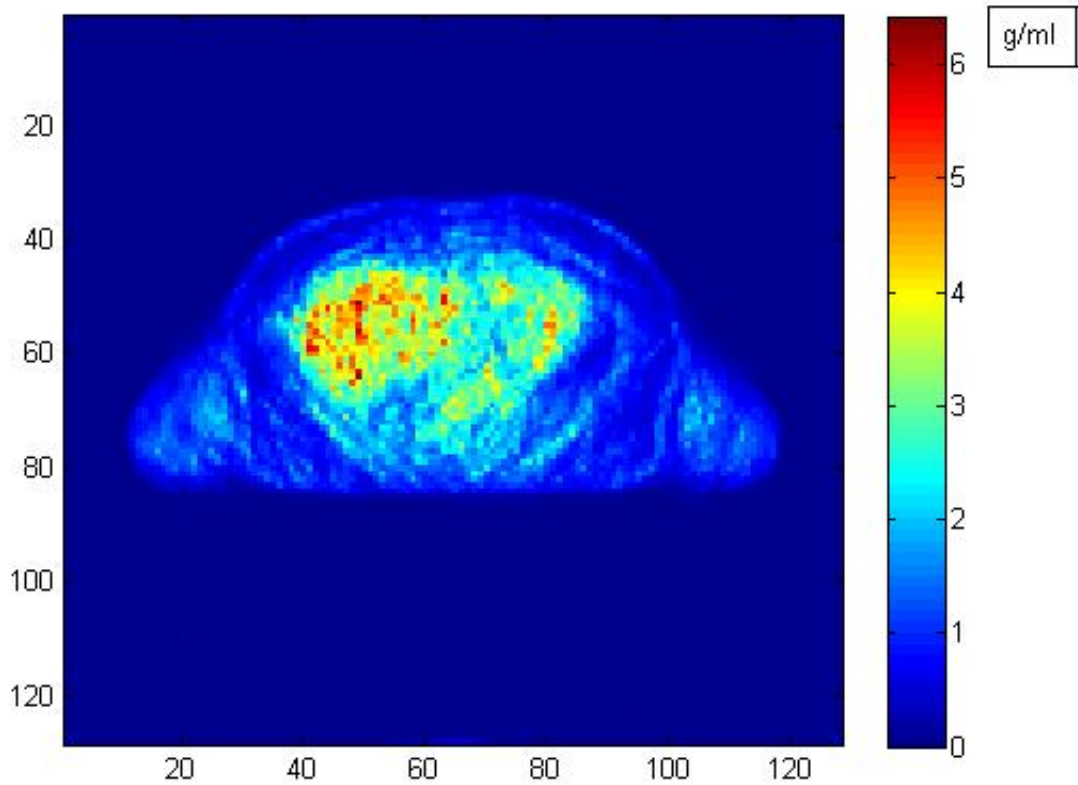


Figura 5.4: Risultato dell'analisi per il glucosio, $2\text{-}^{18}\text{F}$ -FDG

in g/ml. Il colore del pixel dà la quantità di concentrazione. Per un futuro confronto con i valori ottenuti dalle simulazioni dell'apparecchio in simili si preferisce riportare i valori in *concentrazione molare* (M).

5.2 Calcolo per $^{64}\text{Cu-ATSM}$

Applicando il modello compartimentale invertito come nella sezione 5.4 il calcolo per la concentrazione di radiofarmaco $^{64}\text{Cu-ATSM}$ ha dato i risultati riportati in figura 5.5

Il modello compartimentale considerato è quello a due tessuti irreversibile, quindi non viene considerata nell'analisi la frazione di radiofarmaco che viene espulsa dal tessuto in quanto non interagisce con esso.

Si è scelto il modello irreversibile in quanto è dimostrabile con il AIC che questo modello descrive meglio di quello reversibile i fenomeni osservati e perciò è possibile considerare la frazione di radiofarmaco che non interagisce con il tessuto in esame come una quantità trascurabile.

Per ottenere la ROI corrispondente a C_a si è considerata una regione con

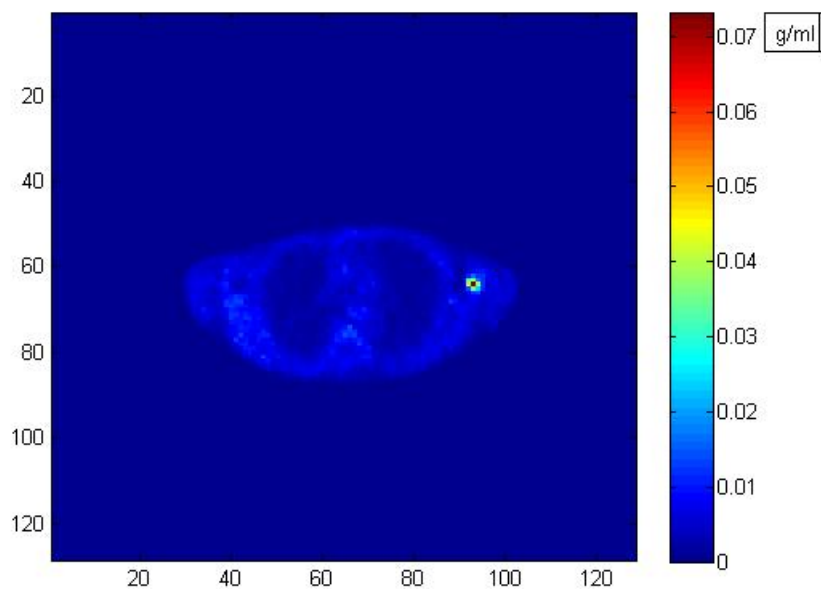


Figura 5.5: Risultato dell'analisi per 1 - $^{64}\text{Cu-ATSM}$

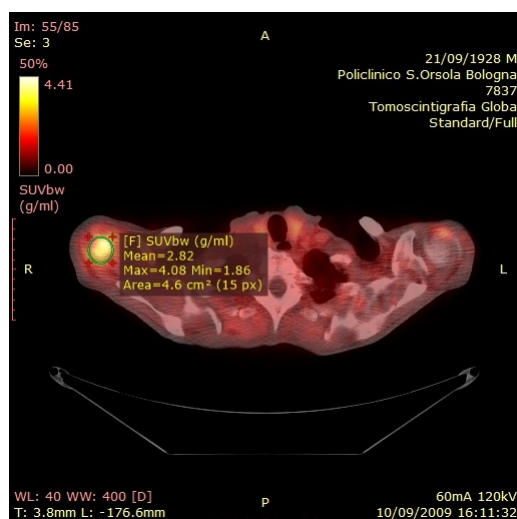
caratteristiche simili a quelle del ceppo cellulare H727 di cui si sono ricavate

Tabella 5.1: Tempi utilizzati per applicare il modello compartimentale

Analisi	Tempo (s)
1- ^{18}F -FDG	8232 s
2- ^{18}F -FDG	5070 s
1- ^{64}Cu -ATSM	2084 s
2- ^{64}Cu -ATSM	2524 s

le costanti in sezione 4.4. La ROI è presentata in figura 5.6 e corrisponde alla matrice di pixel di figura 5.7.

I tempi utilizzati per il calcolo sono presentati in tabella 5.1.

Figura 5.6: ROI utilizzata per ottenere le C_a del 1 - ^{64}Cu -ATSM

Per il secondo set di dati è stata ottenuta la normalizzazione corrispondente a figura 5.8, con la ROI di figura 5.9 e la matrice di pixel mediata di figura 5.10. Si è supposto che il radiofarmaco sia complementare con l'ossigeno. Infatti il ^{64}Cu -ATSM, è dedicato allo studio di tessuti tumorali e quindi subisce la maggior accumulazione in regioni in cui la concentrazione di ossigeno è minore. Per questo motivo occorre invertire la normalizzazione delle immagini ponendo il valore massimo di intensità dei pixel a 0 e assegnando a tutti gli altri un valore crescente in base all'intensità. Questo procedimento si basa sul fatto che in condizioni di perfusione nor-

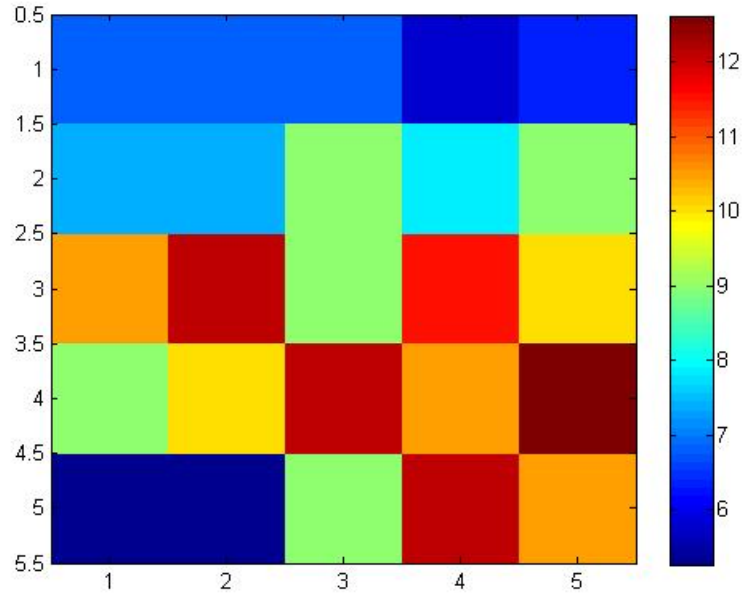
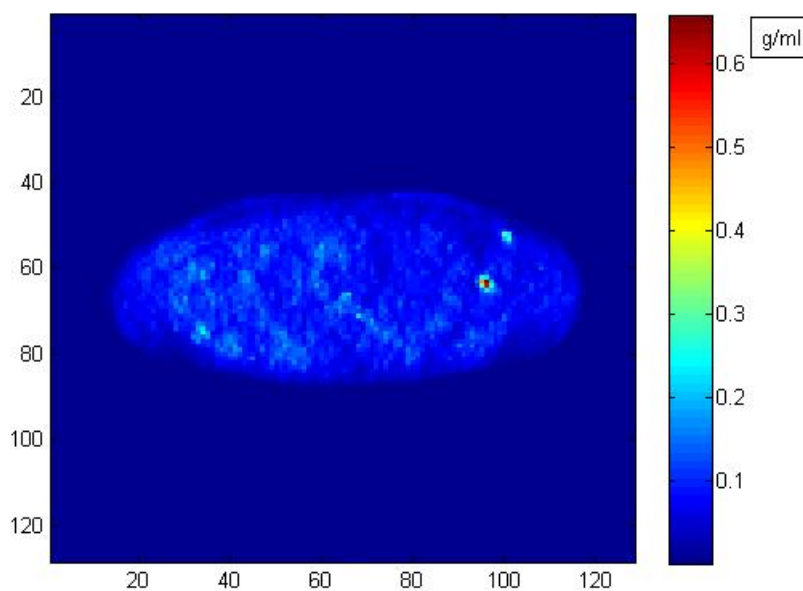
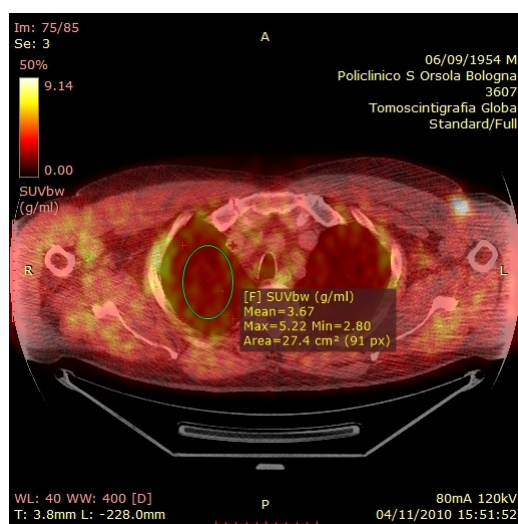


Figura 5.7: Matrice considerata per $C_a, 1 - ^{64}\text{Cu}$ -ATSM

male e con tessuti sani, la quantità di ossigeno, nel caso di normossia, e di radiofarmaco in quello di ipossia, subiscono un accumulo in quantità simili. In altre parole, al variare del caso in esame, o si misura una data quantità di radiofarmaco o la stessa quantità di ossigeno. Ad esempio, dato che ogni voxel dà la misura di concentrazione di radiofarmaco accumulato tralasciando quella di ossigeno che non è visualizzata, nel caso di un valore al 50% di intensità di pixel si ottiene la visualizzazione della metà di molecole contenute in quel voxel, ovvero il radiofarmaco, mentre l'altra metà, l'ossigeno, non è visualizzabile. Se il valore è all'80% del massimo, la quantità di sostanza in quel voxel sarà composta per 1/5 da ossigeno.

Secondo questa ipotesi, per avere la concentrazione di ossigeno in un voxel, è sufficiente invertire l'immagine passando in questo modo dalle quantità di radiofarmaco a quelle di ossigeno.

Le immagini da sottoporre a questo procedimento non sono state sogliate per non perdere informazione nei pixel con intensità minore che presentano in realtà il maggior accumulo di ossigeno.

Figura 5.8: Risultato dell'analisi per 2 - ^{64}Cu -ATSMFigura 5.9: ROI utilizzata per ottenere le C_a del 2 - ^{64}Cu -ATSM

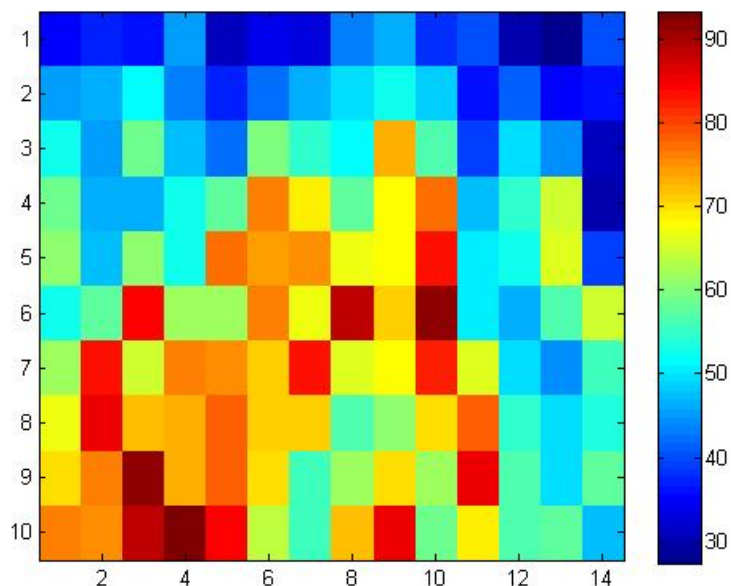


Figura 5.10: Matrice considerata per C_a , 2 - ^{64}Cu -ATSM

La trasformazione puntuale, applicata pixel a pixel, da attuare per trasformare le slice della concentrazione di ^{64}Cu -ATSM in concentrazione di O_2 segue la seguente equazione (5.2):

$$y = -x + k \quad (5.2)$$

in cui y rappresenta l'intensità del pixel in uscita, x quella del pixel in entrata e k è il valore massimo dei pixel in ogni slice.

Oltre alla trasformazione di inversione dell'intensità sono stati azzerati i valori di background in cui lo spazio si presenta vuoto e che, senza questa accortezza, sarebbero invece presentati con il valore massimo di intensità.

Il risultato di questa operazione permette di rappresentare la concentrazione di ossigeno all'interno del corpo del paziente come in figure 5.18 e 5.19.

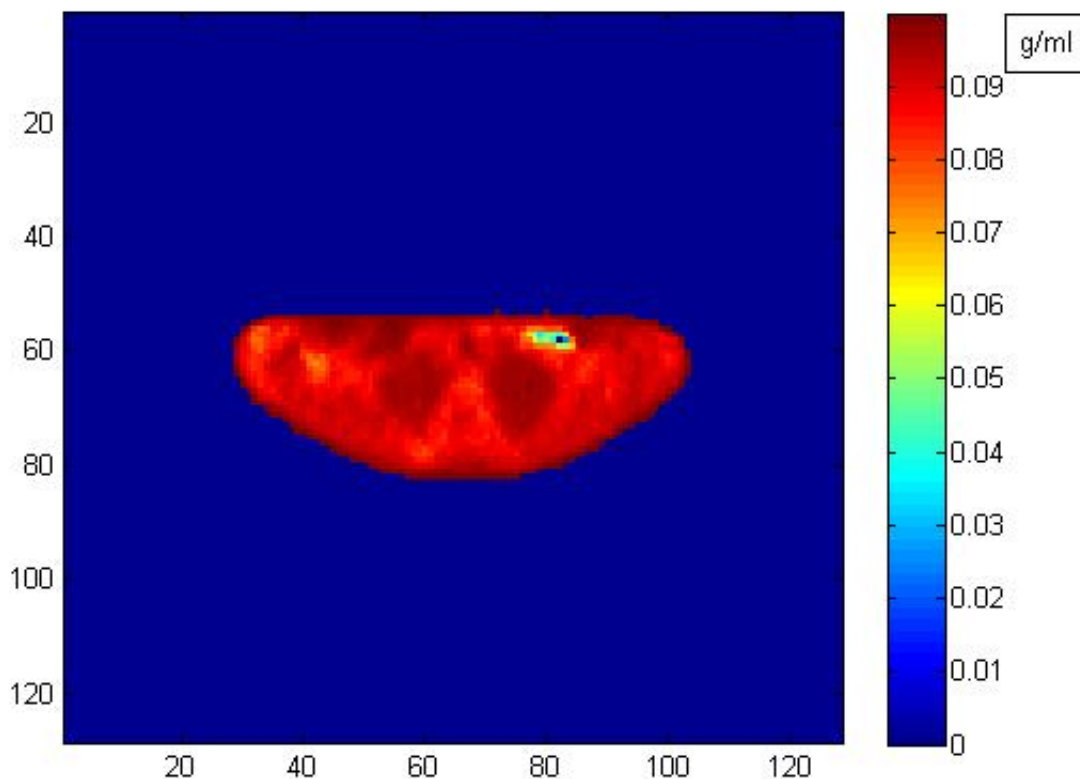


Figura 5.11: Concentrazione di O₂ per il primo campione

I valori di intensità dei pixel riportati in figura corrispondono alla concentrazione nel rispettivo voxel espressi in g/cm^3 . Anche in questo caso, come in quello per la misura della concentrazione di glucosio, si procederà a convertire le concentrazioni in valori di Molarità.

5.3 Calcolo delle incertezze

Dato che i rates di scambio e il MRGI misurati in tabella 4.1 presentano incertezze, si è proceduto al calcolo dell'incertezza sulla misura di concentrazione tramite la propagazione degli errori.

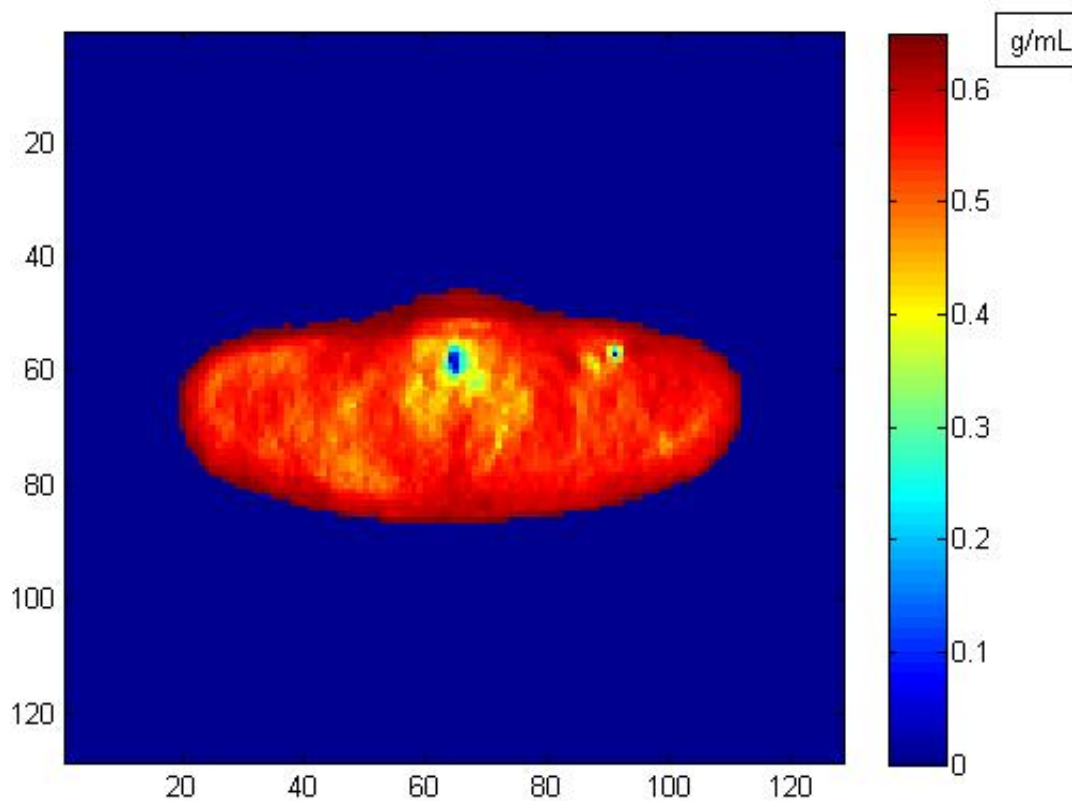


Figura 5.12: Concentrazione di O_2 per il secondo campione

La misura di C_a è data dalla media dell'intensità dei pixel in una ROI, quindi ad ogni valore è associata una deviazione standard. Questa incertezza è imputabile al rumore statistico. L'errore percentuale ottenuto è minore del 20% per le misure effettuate sui quattro campioni.

Il valore di incertezza da associare alla concentrazione utilizzata per la rinormalizzazione delle immagini è stato ottenuto con la formula (5.3):

$$\Delta f(x_1, x_2, \dots, x_n) = \left(\sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial}{\partial x_i} f(x_i) \Delta x_i \right)^2 \right)^{1/2} \quad (5.3)$$

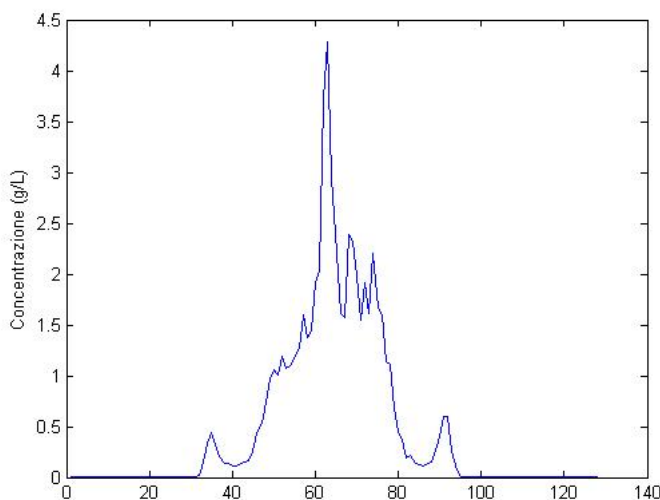


Figura 5.13: Profilo della concentrazione di glucosio per il primo campione [g/ml]

L'errore stimato è di 0.2 per $1\text{-}^{18}\text{F-FDG}$, di 0.25 per $2\text{-}^{18}\text{F-FDG}$ di 0.07 per $1\text{-}^{64}\text{Cu-ATSM}$ e di 0.3 per $2\text{-}^{64}\text{Cu-ATSM}$.

5.4 Profili per le misure di concentrazione

Si è provveduto a tracciare dei profili su alcune slice dei campioni per avere una miglior visione dell'andamento delle concentrazioni di radiofarmaco e di molecole coinvolte nel metabolismo dei tessuti in esame.

I profili sono presentati in figure 5.13 e 5.14 rispettivamente per i due campioni studiati con $^{18}\text{F-FDG}$ e in figure 5.15 e 5.16 per quelli studiati con $^{64}\text{Cu-ATSM}$.

I profili esprimono i valori di concentrazione in ogni pixel lungo la linea considerata in g/ml e g/cm^3 rispettivamente per glucosio e ossigeno.

Il range di concentrazione per il glucosio nel tessuto è consistente per i due campioni studiati con il ^{18}F e va da 0 a valori di circa 6 g/ml.

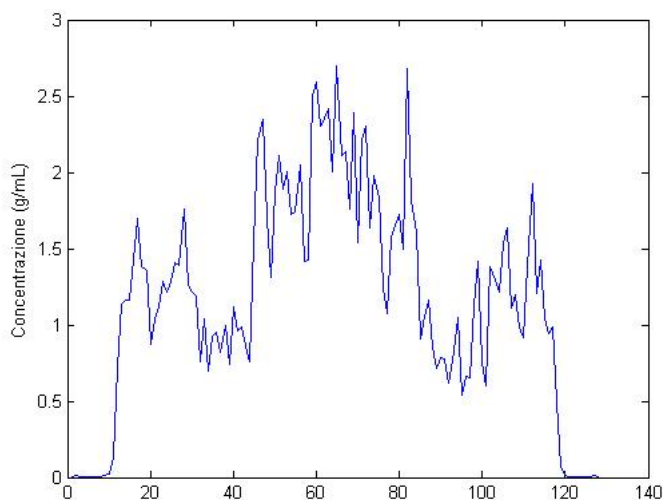


Figura 5.14: Profilo della concentrazione di glucosio per il secondo campione [g/ml]

Per i campioni studiati con ^{64}Cu i valori di concentrazione per i due campioni differiscono di un ordine di grandezza su una zona con tessuti simili all'interno del corpo dei pazienti. Il range va da 0 a 0.07 cm^3 per il primo campione e da 0 a 0.6 cm^3 circa per il secondo.

5.5 Conversione dei dati in unità di molarità

La *molarità* esprime la concentrazione di un soluto quantificato in moli all'interno di un volume secondo la definizione data in (5.4).

$$M = \frac{n_{\text{soluto}}}{V} \left[\frac{\text{mol}}{L} \right] \quad (5.4)$$

Per ottenere il numero di moli di soluto occorre considerare la massa molare, che esprime la massa di una mole di sostanza, e dividere la massa del soluto come in (5.5).

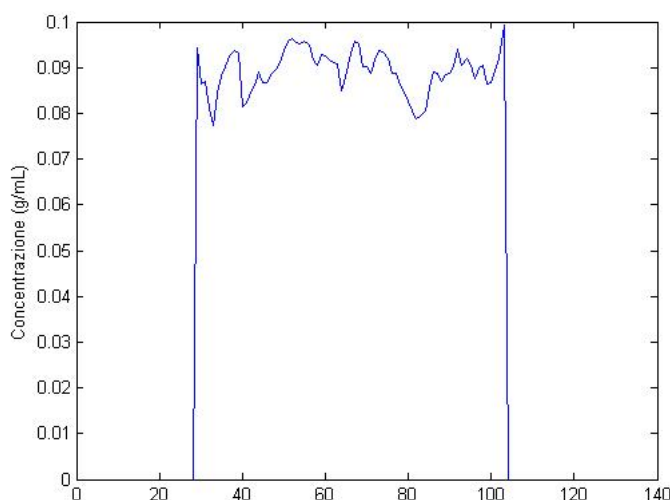


Figura 5.15: Profilo della concentrazione di O₂ per il primo campione [g/cm³]

$$n = \frac{\text{massa}}{\text{massamolare}} \quad (5.5)$$

La massa molare per il ¹⁸F-FDG è di 181.1495 g/mol mentre quella per il glucosio è di 180.1559 g/mol. Il fatto che siano valori simili è una riprova che queste due sostanze siano analoghe all'interno dei tessuti. Si è scelto di utilizzare per la conversione delle grandezze in concentrazione molare la massa molare del ¹⁸F-FDG.

In figure 5.17 e 5.18 sono riportati i profili e le slice dei volumi, da cui sono stati prelevati i valori di intensità dei pixel, convertiti in valori di molarità.

Per la conversione delle immagini per lo studio dell'ossigeno si è seguito lo stesso procedimento attuato per quelle del glucosio. La massa molare del ⁶⁴Cu-ATSM è stimata in 211.718 g/mol. I valori, precedentemente espressi in g/cm³ sono stati in primo luogo convertiti in g/ml. Successivamente la concentrazione molare del radiofarmaco è stata invertita per ottenere quella dell'ossigeno

I risultati sono presentati in figure 5.19 e 5.20

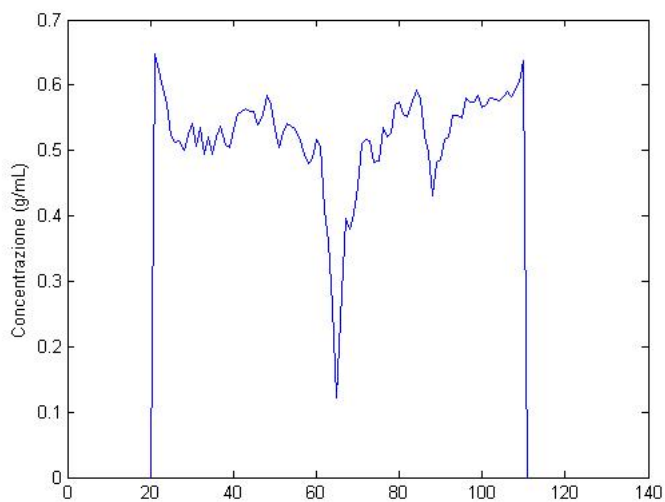
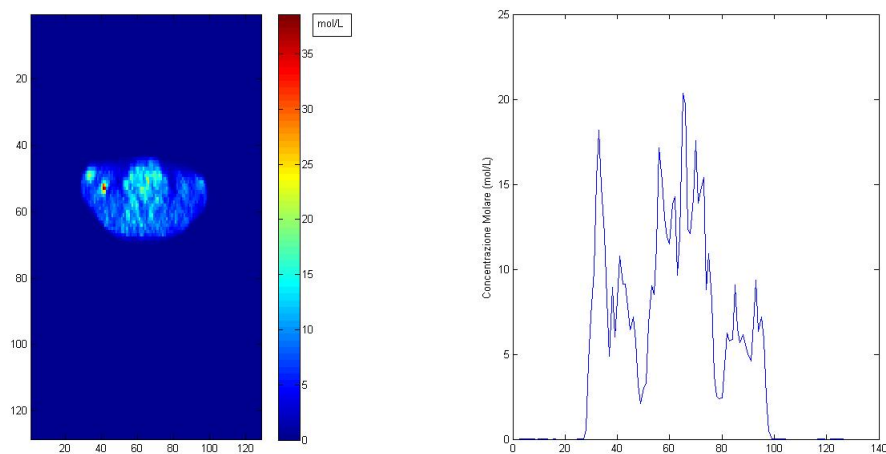
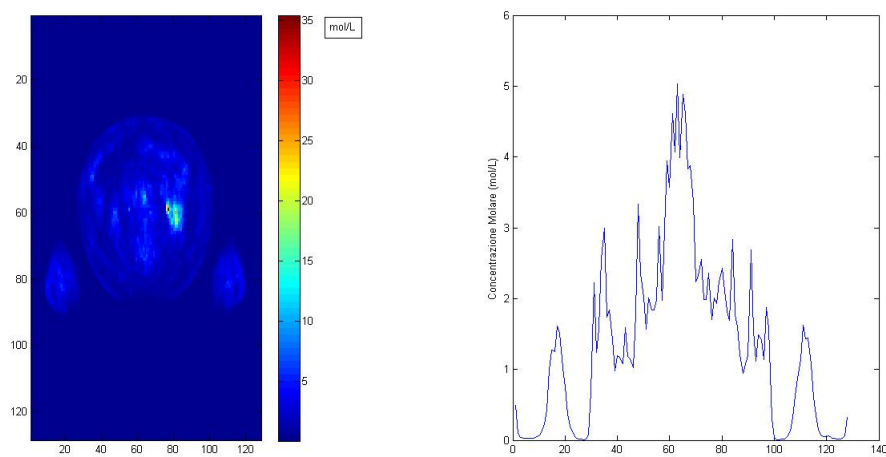


Figura 5.16: Profilo della concentrazione di O₂ per il secondo campione [g/cm³]

Si presentano inoltre i profili prelevati sulle sezioni coronali dei campioni analizzati con le corrispondenti slice. Anche in questo caso i valori sono espressi in concentrazione molare.

Figura 5.17: Concentrazione molare del glucosio, $1\text{-}^{18}\text{F-FDG}$, slice 85Figura 5.18: Concentrazione molare del glucosio, $2\text{-}^{18}\text{F-FDG}$, slice 205

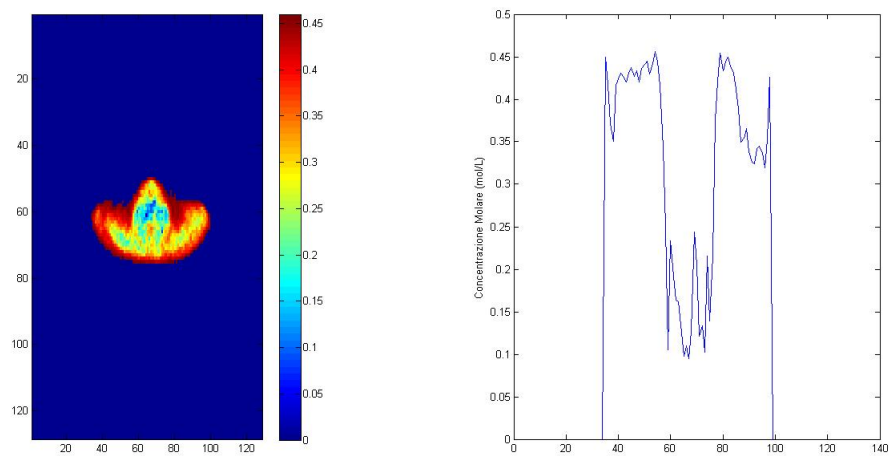


Figura 5.19: Concentrazione molare dell'ossigeno, 1-⁶⁴Cu-ATSM, slice 48

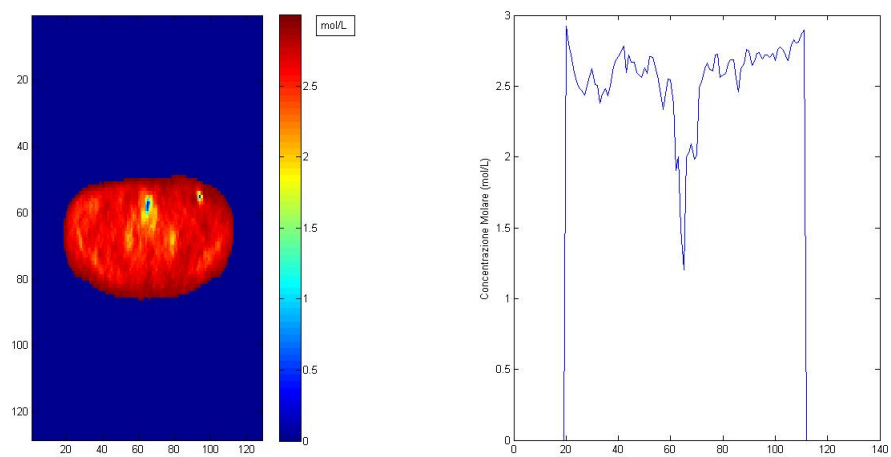


Figura 5.20: Concentrazione molare dell'ossigeno, 2-⁶⁴Cu-ATSM, slice 65

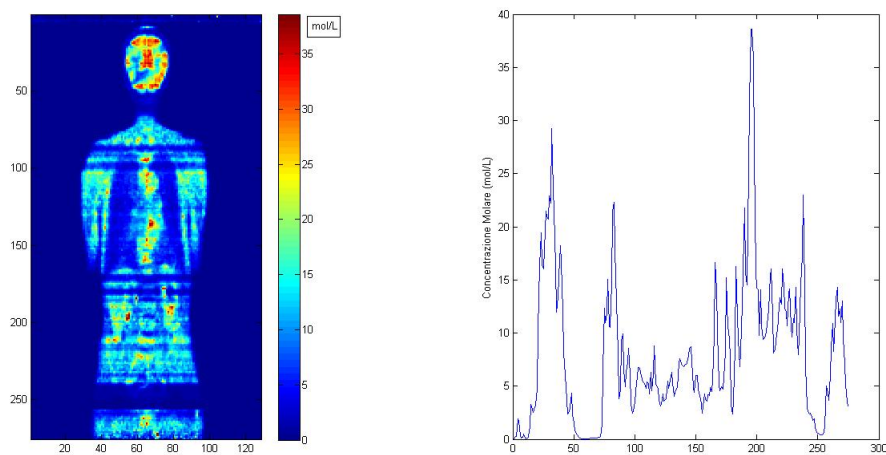


Figura 5.21: Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale 1- ¹⁸F-FDG

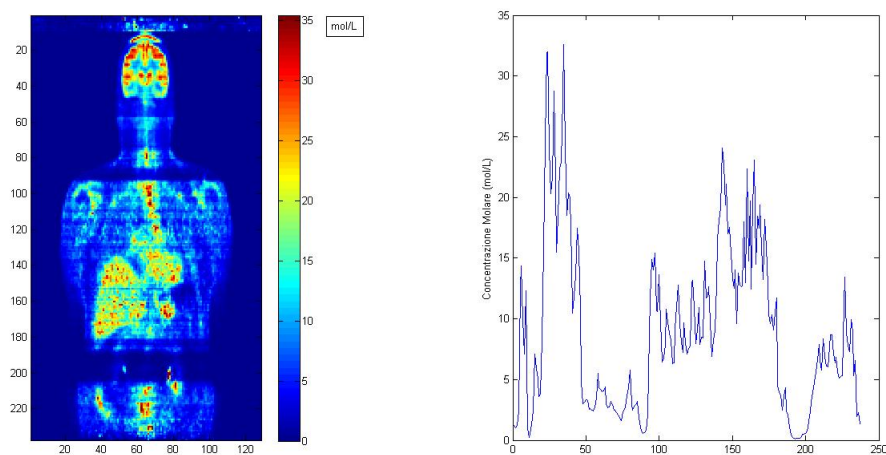


Figura 5.22: Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale 2- ¹⁸F-FDG

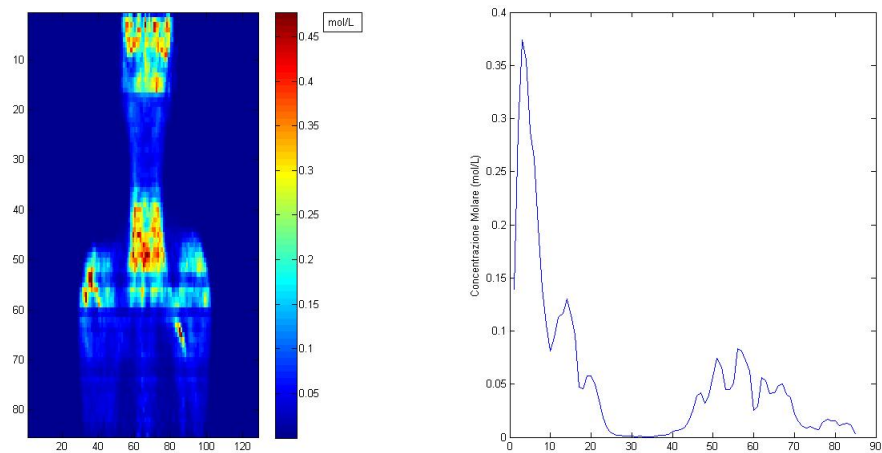


Figura 5.23: Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale $1\text{-}^{64}\text{Cu-ATSM}$

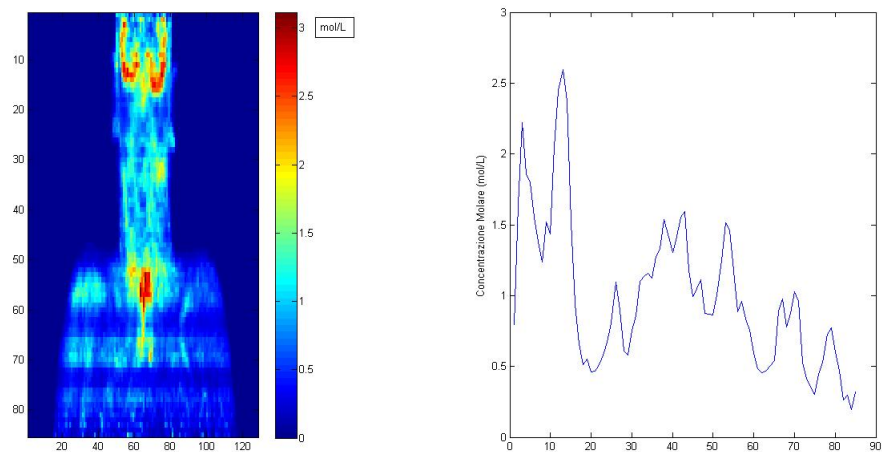


Figura 5.24: Concentrazione molare del glucosio, sezione coronale $2\text{-}^{64}\text{Cu-ATSM}$

Capitolo 6

Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a punto un metodo preliminare per lo studio di gradienti di concentrazione di molecole, come glucosio e ossigeno, fondamentali per il funzionamento e lo sviluppo dei tessuti umani. Questo lavoro si inserisce nell'ambito di un progetto finalizzato alla progettazione di un biochip da utilizzare per lo studio di funzionalità biologiche a livello nanometrico su prototipi di farmaci in fase sperimentale e che consenta di riprodurre ambienti tissutali che rispecchino la fisiologia riscontrata in pazienti umani. Le grandezze ottenute e il metodo proposto verranno utilizzati per il confronto con simulazioni molecolari che stimano le quantità di biomolecole coinvolte, come ad esempio la quantità di enzima reagente con l'ossigeno, necessario a creare le condizioni fisiologiche per l'accrescimento cellulare.

Lo studio effettuato permette di ottenere la misura della concentrazione di glucosio e ossigeno basata su valori estrapolati da ROI, prelevate da immagini di esami PET effettuate su due pazienti, fornite dal Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna.

In primo luogo è stato analizzato il comportamento delle molecole di interesse, glucosio e ossigeno, all'interno dei tessuti umani, tenendo conto della loro farmacocinetica e biodistribuzione nei vari compartimenti come sangue, tessuti e cellule. Dopo aver considerato le caratteristiche dei sistemi di imaging diagnostico impiegati per l'analisi, sono stati presi in esame i due radiofar-

maci: il ^{18}F -FDG e il ^{64}Cu -ATSM. Le caratteristiche di questi radiotraccianti sono state analizzate e illustrate per motivare la scelta fatta a discapito di altre molecole costruite con lo stesso scopo, ma che avrebbero fornito risultati meno attendibili.

Attraverso il modello compartimentale si è arrivati alla misura dei valori desiderati, basata sulla media di una ROI iniziale selezionata, che rispecchia la concentrazione del radiofarmaco allo stato iniziale, ovvero prima di distribuirsi nel tessuto di interesse. Modellizzare attraverso compartimenti un sistema significa dividere i tessuti in base all'accumulazione di radiofarmaco considerato per fare l'analisi. Dalla delineazione del modello nascono le costanti di rate (rate constants) che, associate alla quantità di molecola consumata, permettono di stimare la concentrazione di sostanza in un dato istante di tempo.

Attraverso l'inversione del modello compartimentale reversibile a due tessuti sono state calcolate le concentrazioni molari di glucosio, misurate attraverso la PET con ^{18}F -FDG. Partendo da questo modello sono stati assegnati ad ogni pixel del volume componente l'immagine PET tridimensionale dei valori derivati dalle formule che descrivono l'andamento di concentrazione di radiofarmaco nel tempo. Attraverso il modello irreversibile e le immagini PET con ^{64}Cu -ATSM sono state calcolate le concentrazioni molari di ossigeno tissutale che hanno valori medi di 0.23 mol/L per il primo campione analizzato e di 0.73 mol/L per l'altro.

Il modello compartimentale si è rivelato adatto a descrivere l'andamento nei tessuti delle molecole tracciate, con valori di concentrazione molare di glucosio medi di 1.1545 mol/L e 1.5105 mol/L rispettivamente per il primo e il secondo campione. Mentre per l'ossigeno si ha una misura simile per i due campioni, i valori di concentrazione del glucosio sarebbero differenti di due ordini di grandezza se non fosse stata considerata una ROI comune; questo potrebbe essere imputabile alla differente attività cerebrale dei soggetti esaminati che ha portato a valori discrepanti di attività glicolitica in tutto il volume analizzato. La selezione della ROI da cui misurare C_a è quindi di fondamentale importanza.

Dato che la misura di concentrazione molare di ossigeno si basa su delle costanti di rate k_i misurate su cellule umane trapiantate su topi di laboratorio, c'è la possibilità futura di un miglioramento del metodo, a partire dalla stima delle costanti attraverso l'analisi farmacocinetica del ^{64}Cu -ATSM su pazienti umani invece che su cellule umane trapiantate.

Inoltre le caratteristiche di questo radiofarmaco, essendo il suo impiego recente, non sono ancora completamente note, tuttavia si rivela un promettente candidato per lo studio di tessuti ipossici e conseguentemente per la misura della concentrazione di ossigeno.

Un ulteriore miglioramento può essere apportato nell'ambito della precisione delle misure sostituendo l'apparechiatura di analisi comunemente utilizzata con una micro-PET. Inoltre uno studio con PET dinamica permetterebbe di studiare gli andamenti della concentrazione di glucosio e ossigeno nel tempo su uno stesso tessuto di interesse.

In conclusione, durante questo lavoro di tesi, è stata affrontata in maniera preliminare una problematica complessa che necessariamente richiederà ulteriori approfondimenti.

Bibliografia

- [1] E. Lopci, I. Grassi, A. Chiti, C. Nanni, G. Cicoria, L. Toschi, C. Fonti, F. Lodi, S. Mattioli, S. Fanti, PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence, *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 2014.
- [2] P. McQuade, K. E. Martin, T. C. Castle, M. J. Wentz, P. J. Blower, M. J. Welch, J. S. Lewis, Investigation into ^{64}Cu -labeled Bis(selenosemicarbazone) and Bis(thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents, *Nuclear Medicine and Biology*, 2005.
- [3] J. T. Bushberg, J. A. Seibert, E. M. Leidholdt JR, J. M. Boone, The Essential physics of Medical Imaging, *Lippincott Williams & Wilkins*, 2002, 2 ed.
- [4] T. B. Lynch, PET-TC nella pratica clinica, *Springer*, 2007.
- [5] S. Garbarino, V. Vivaldi, F. Delbary, G. Caviglia, M. Piana, C. Marini, S. Capitanio, I. Calamia, A. Buschiazzo, G. Sambuceti, A new compartmental method for the analysis of liver FDG kinetics in small animal models, *EJNMMI*, 2015.
- [6] A. Dimitrakopoulou-Strauss, L. Pan, L. G. Strauss, Quantitative approaches of dynamic FDG-PET and PET/CT studies (dPET/CT) for the evaluation of oncological patients, *Cancer Imaging*, 2012.
- [7] Reivich, A. Alavi, A. Wolf, J. Fowler, J. Russell, C. Arnett, R. R. MacGregor, Y. Shiue, H. Atkins, A. Anand, R. Dann, and J. H. Greenberg, Glucose Metabolic Rate Kinetic Model Parameter Determination in Humans: The Lumped Constants and Rate Constants for $[^{18}\text{F}]\text{Fluorodeoxyglucose}$ and $[^{14}\text{C}]\text{Deoxyglucose}$, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 5:179-192 1985.

-
- [8] M. Bentourkia and H. Zaidiy, Tracer Kinetic Modeling in Nuclear Medicine: Theory and Applications.
- [9] Fan Li, J. Tranekjær Jørgensen, J. Madsen and A. Kjaer, Pharmacokinetic Analysis of ^{64}Cu -ATSM Dynamic PET in Human Xenograft Tumors in Mice .
- [10] Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ , Selin C, Sokoloff L , Kuhl DE, Tomographic measurements of local cerebral glucose metabolic rate in humans with ^{18}F -2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method, *Ann Neurol*, 1979.