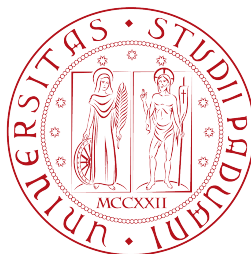


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI INGEGNERIA



LAUREA TRIENNALE IN
INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

Metodi per la quantificazione del sistema serotonergico
da immagini PET di [^{11}C]WAY 100-635

Relatore: Dott. Bertoldo Alessandra

Laureanda: Brigo Sara Luisa

Matricola: 591273

Anno Accademico 2012/2013

Indice

I	FISIOLOGIA	6
1	IL SISTEMA NERVOSO.	8
1.1	Aspetti generali di fisiologia	8
1.2	La struttura cerebrale.	8
1.2.1	Il sistema limbico	11
1.2.1.1	Amigdala (AMY)	11
1.2.1.2	Ippocampo (HIP)	11
1.2.1.3	Ipotalamo	12
1.2.1.4	Insula (INS)	12
1.2.1.5	Corteccia prefrontale mediale (MPFC)	12
2	SISTEMI DI NEUROTRASMISSIONE.	13
2.1	Principali neurotrasmettitori	13
2.2	Principi basilari della neurotrasmissione	14
2.3	Trasporto dei neurotrasmettitori	15
3	SISTEMA SEROTONINERGICO.	16
3.1	Sintesi - immagazzinamento - rilascio	17
3.2	Principali vie serotoninergiche	18
3.3	Funzioni fisiologiche	19
3.4	Recettori	20
3.4.1	Cenni generali	20
3.4.2	Recettori della serotonina	21
4	PET: TOMOGRAFIA AD EMISSIONE DI POSITRONI	24
4.1	Concetti generali	24
4.2	Funzionamento	25
4.3	Obiettivi degli studi in vivo	27
4.4	Traccianti PET	27

4.4.1	Tracciante [carbonio- ^{11}C] WAY-100635	29
II	ESPERIMENTO E MODELLIZZAZIONE	30
5	MODELLI DI SISTEMA A DUE E TRE COMPARTIMENTI	32
5.1	Modello compartimentale per il metodo 1	33
5.2	Modello compartimentale per il metodo grafico di Logan (o metodo 2)	36
5.3	Modelli per i metodi con tessuto di riferimento (o metodi di tipo 3)	37
5.4	Modello non lineare	41
6	[CARBONIO-^{11}C]WAY100-635: SOGGETTI E DATI SPERIMENTALI	43
6.1	Protocollo, soggetti e misura della funzione input	43
6.2	Acquisizione MRI (imaging a risonanza magnetica) e procedure di segmentazione	44
6.3	Analisi delle immagini	44
6.3.1	Riallineamento dei frame	45
6.3.2	Registrazione combinata PET-MRI	45
6.3.3	Tracciamento delle regioni di interesse (ROI) e campionamento delle attività.	45
7	RISULTATI DELL'ESPERIMENTO	47
7.1	Analisi sul tracciante	47
7.1.1	Analisi plasmatica: metabolizzazione del tracciante.	47
7.1.2	Analisi PET: assorbimento cerebrale del tracciante.	48
7.2	Basi generali del confronto tra i metodi	49
7.3	METODO 1 : ANALISI CINETICA CON INPUT ARTERIALE	51
7.3.1	Metodi 1A, 1B e 1C	52
7.3.2	Stime parametriche ottenute sfruttando i metodi 1A e 1B	53
7.3.3	Stime parametriche ottenute utilizzando il metodo 1C	54
7.3.4	Discussione su identificabilità, stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti dai metodi 1A, 1B, 1C	55
7.3.5	Analisi della regione di riferimento: cervelletto.	60
7.4	METODO GRAFICO: LOGAN (METODO 2).	60
7.4.1	Stime nelle regioni di interesse (ROI).	60
7.4.2	Discussione su stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti con il metodo grafico	61
7.4.3	Analisi della regione di riferimento: cervelletto.	64
7.5	METODO 3 : ANALISI CINETICA CON INPUT DERIVATO DALLA REGIONE DI RIFERIMENTO.	64
7.5.1	FRTM (Full reference tissue model - metodo 3A).	65

7.5.1.1	Discussione su stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti con il metodo FRTM	65
7.5.2	SRTM (Simplified reference tissue model - metodo 3B).	65
7.5.2.1	Discussione su stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti con il metodo SRTM (Simplified tissue model - 3B)	65
8	CONCLUSIONE E DISCUSSIONE DEI RISULTATI	68
8.1	Esiti delle misurazioni, modelli e metodi.	68
8.2	Misurazione della funzione plasmatica di input.	70
8.3	Volume di distribuzione del cervelletto.	70
8.4	Impatto dei metodi analitici sui parametri recettoriali.	71
8.4.1	Metodo 1. Analisi cinetica con input arteriale.	71
8.4.2	Metodo 2. Analisi grafica con funzione di input.	71
8.4.3	Metodo 3. Analisi cinetica con input derivante dalla regione di riferimento.	71
8.4.4	Stabilità nel tempo.	72
8.4.5	Riproducibilità.	73
8.5	Confronti tra metodi e risultati	73
8.6	In vivo e in vitro.	74

SOMMARIO

Lo studio della fisiologia umana è prerogativa essenziale per formulare qualsiasi modello matematico che tenta di descriverla.

Proprio per questo motivo la prima parte dell'elaborato concentra la sua attenzione sul punto di vista fisiologico e biologico di quanto avviene a livello cerebrale.

- Capitolo 1: presenta il sistema nervoso, focalizzandosi in particolare sull'encefalo e sulle strutture del sistema limbico, che saranno poi quelle più coinvolte nell'analisi funzionale.
- Capitolo 2: analizza il sistema di neurotrasmissione e di propagazione del potenziale di azione attraverso i mediatori chimici.
- Capitolo 3: descrive brevemente il sistema serotonergico, il rilascio e l'immagazzinamento della serotonina ed il funzionamento della coppia neurotrasmettitore-recettore.
- Capitolo 4: esamina in termini generali il funzionamento della PET (tomografia ad emissione di positroni) ed il ruolo dei traccianti radioattivi in questo tipo di diagnostica per immagini, soffermandosi in particolare sul tracciante [^{11}C]WAY 100635.

La seconda parte ha invece come obiettivo quello di presentare i dati utilizzati, il protocollo e la modellizzazione matematica sfruttata in un esperimento condotto al fine di ottenere una stima quantitativa di alcuni importanti parametri dell'interazione tracciante-recettore serotonergico.

- Capitolo 5: presenta i modelli compartimentali noti in letteratura ed i metodi utilizzati per la stima parametrica.
- Capitolo 6: discute il dataset e il protocollo con cui si realizza la raccolta dei campioni arteriali. Viene inoltre presentata la procedura dell'acquisizione delle immagini PET che ci servirà poi per individuare le regioni cerebrali di interesse e una correlazione tra queste ultime e la presenza più o meno massiccia dei recettori serotonergici.
- Capitolo 7: raccoglie i risultati dell'esperimento in forma sintetica. Ad ogni metodo è dedicata una sezione corredata da tabelle di analisi.
- Capitolo 8: presenta una trattazione verbale comparata e una discussione conclusiva su quanto dedotto nel capitolo precedente.

Parte I

FISIOLOGIA

Capitolo 1

IL SISTEMA NERVOSO.

1.1 Aspetti generali di fisiologia

Il sistema nervoso umano è costituito da due tipi di cellule: le cellule nervose (comunemente chiamate neuroni), deputate alla generazione e alla propagazione dei segnali nervosi, e le cellule di Glia, che sostengono i neuroni e partecipano alla formazione di strutture come la barriera ematoencefalica assicurando l'isolamento delle cellule nervose e la loro protezione dagli agenti esterni.

Encefalo e midollo spinale formano il cosiddetto sistema nervoso centrale, che è in grado di raccogliere e trasmettere le informazioni all'interno della scatola cranica e del canale vertebrale, mentre i nervi cranici e i nervi spinali costituiscono il sistema nervoso periferico.

Nella nostra trattazione focalizzeremo l'attenzione sul sistema nervoso centrale ed in particolar modo sull'encefalo.

1.2 La struttura cerebrale.

Il sistema nervoso centrale (SNC) è una struttura bilaterale simmetrica, divisa in sei parti: midollo spinale, bulbo, ponte, mesencefalo, diencefalo ed emisferi cerebrali. Le funzioni cerebrali trovano una localizzazione nella corteccia, che ricopre gli emisferi cerebrali ed è il luogo deputato all'elaborazione delle informazioni. La corteccia è una struttura complessa, dalla morfologia sostanzialmente irregolare, caratterizzata da solchi e giri che vengono fisiologicamente sfruttati per dividere la corteccia di ogni emisfero in quattro lobi: frontale, parietale, temporale e occipitale.

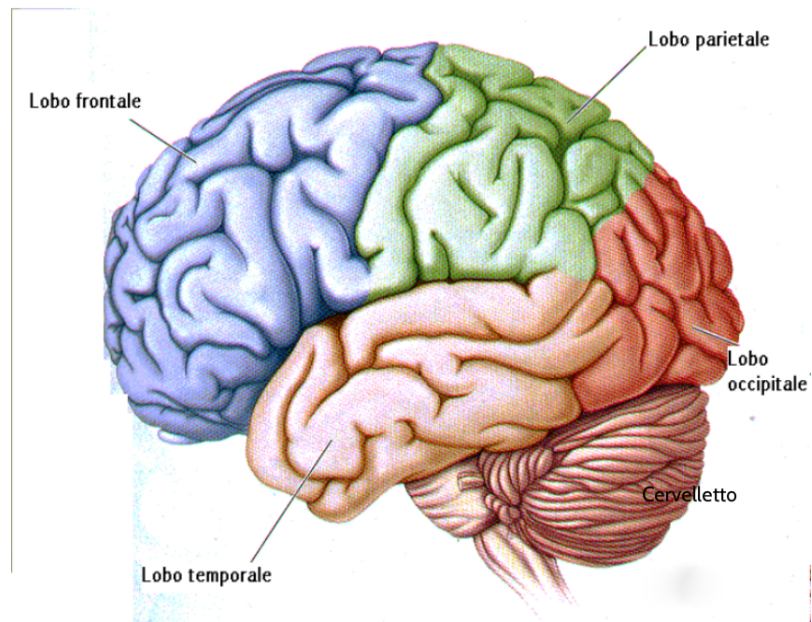


Figura 1.2.1: Rappresentazione schematica della struttura cerebrale

Sin dagli inizi del '900 è noto che alcune zone del cervello svolgono specifici compiti cognitivi e motori.

Il neurologo tedesco Brodmann, all'inizio del secolo scorso, si occupò di suddividere e classificare la superficie corticale in aree omogenee dal punto di vista della morfologia e della organizzazione cellulare.

Operando esami istologici accurati, valutando i diversi tipi di cellule nervose e la loro disposizione, Brodmann giunse ad individuare una cinquantina di aree con caratteristiche distinte, alcune delle quali presenti solo nei primati. Tale classificazione è largamente accettata ed utilizzata ancora oggi.

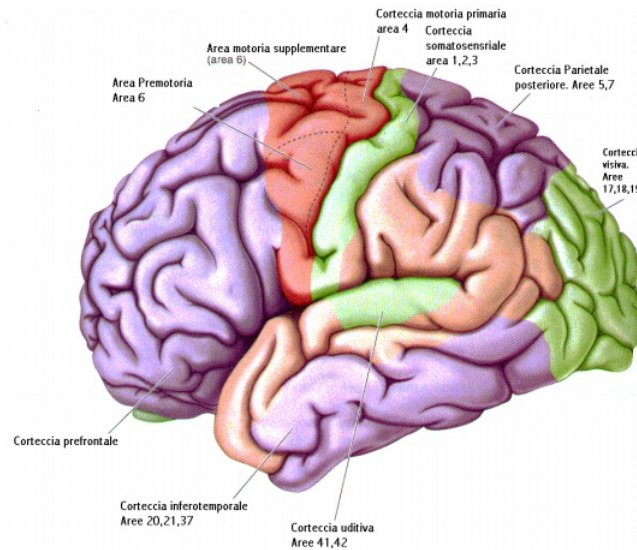


Figura 1.2.2: Macro-regioni corticali di Brodmann

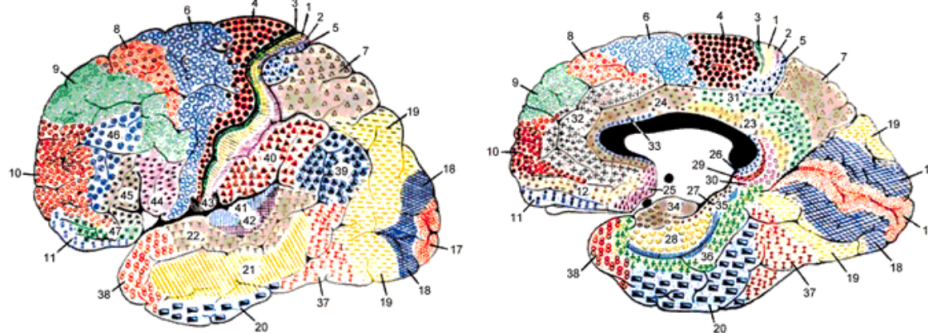


Figura 1.2.3: Aree di Brodmann.

Area 3, 1 e 2 - corteccia somestesica primaria, Area 4 - corteccia motoria primaria, Area 5 - corteccia associativa somatosensoriale, Area 6 - corteccia premotoria e corteccia motoria supplementare, Area 7 - corteccia associativa somatosensoriale, Area 8 - corteccia frontale intermedia, Area 9 - corteccia prefrontale dorsolaterale, Area 10 - corteccia anteriore prefrontale, Aree 11,12 - area orbitofrontale (OFC), Area 17 - corteccia visiva primaria (V1), Area 18 - corteccia visiva secondaria (V2), Area 19 - corteccia visiva associativa (V3), Area 20 - giro temporale inferiore, Area 21 - giro temporale medio, Area 22 - giro temporale superiore, Area 23 - corteccia posteriore del giro cingolato, Area 24 - corteccia del giro cingolato anteriore, Area 25 - corteccia subgenuale (SGPFC), Area 26 - area ectosplenica, Area 28 - corteccia entorinale, parte posteriore, Area 29 - giro cingolato, parte retro-splenica, Area 30 - parte del giro cingolato, Area 31 - giro cingolato posteriore, parte dorsale, Area 32 - giro cingolato anteriore, parte dorsale, Area 33 - parte del giro cingolato anteriore, Area 34 - corteccia entorinale anteriore (ENT), Area 35 - perirhinal cortex (nel giro paraippocampale), Area 36 - corteccia paraippocampale (nel giro paraippocampale), Area 37 - giro fusiforme, Area 38 - area temporo-polare, Area 39 - giro angolare, Area 40 - giro sopramarginale, Area 41, 42 - corteccia primaria e di associazione uditiva, Area 43 - area subcentrale (tra l'insula e il giro post/precentrale), Area 44 - opercoli, Area 45 - parte triangolare, Area 46 - dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC), Area 47 - giro prefrontale inferiore,

Area 48 - area retrosubiculare (una piccola parte della superficie mediale del lobo temporale), Area 52 - area parainsulare (nella giunzione del lobo temporale con il lobo dell'insula)

L'imaging funzionale, di cui ci occuperemo più avanti nella trattazione, può comunque individuare soltanto la localizzazione approssimativa dell'attivazione del cervello in termini di aree di Brodmann, dal momento che i confini di qualsiasi cervello del singolo sono da individuare mediante esame istologico.

1.2.1 Il sistema limbico

Gli interessi di fisiologi e psicologi si incontrano nello studio del sistema limbico, una porzione di cervello definito come “luogo di origine delle emozioni” (Fulton, 1951) che interviene nella elaborazione e nella manifestazione più intima degli stati emozionali.

Il sistema limbico, che si ripete simmetricamente nei due emisferi e si colloca subito sopra il tronco cerebrale, con cui è strettamente connesso, è costituito da una cornice di tessuto corticale che accoglie un gruppo di strutture profonde tra cui l'amigdala, l'ippocampo, il giro paraippocampale, il giro del cingolo, l'ipotalamo, il talamo, la corteccia prefrontale mediale, l'insula e l'uncus.

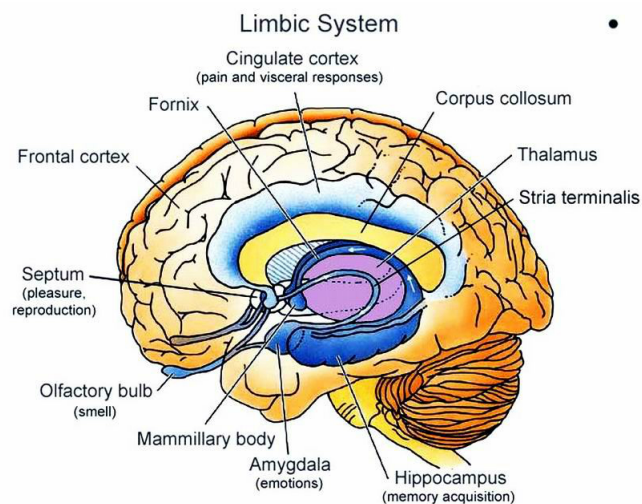


Figura 1.2.4: Sistema limbico

Diamo ora alcuni brevi cenni su alcune delle principali strutture sopracitate.

1.2.1.1 Amigdala (AMY)

È un'area cerebrale che consiste approssimativamente di 12 regioni, ciascuna delle quali può essere ulteriormente suddivisa in diverse sottoregioni. L'amigdala riceve connessioni dal sistema visivo (corteccia del lobo temporale inferiore), dal sistema uditivo (lobo temporale superiore), dal sistema gustativo (lobo frontale), dal sistema somatosensoriale e da quello olfattivo. Le connessioni sono reciproche, e a loro volta tutte queste aree corticali ricevono l'output dell'amigdala. L'output dell'amigdala raggiunge poi strutture subcorticali come l'ipotalamo, tramite le quali vengono influenzate le reazioni “involontarie”, come ad esempio il battito cardiaco o la sudorazione.

1.2.1.2 Ippocampo (HIP)

È una struttura a forma di C che costituisce parte della parete mediale dell'emisfero cerebrale e svolge un ruolo importante nella memoria a lungo termine e nell'apprendimento di natura spaziale.

1.2.1.3 Ipotalamo

L'ipotalamo è situato nella zona centrale interna ai due emisferi cerebrali. Esso è costituito da cellule della sostanza grigia collegate con la corteccia cerebrale, con il talamo e l'epitalamo, da cui arrivano o ai quali vanno impulsi sensoriali vari. L'ipotalamo svolge pertanto una funzione di attivazione e controllo del sistema nervoso autonomo (attraverso il quale modifica la motilità viscerale, i riflessi, il ritmo sonno-veglia, il bilancio idrosalino, il mantenimento della temperatura corporea, l'appetito e l'espressione degli stati emotivi) e di quello endocrino.

1.2.1.4 Insula (INS)

Ubicata sulla superficie laterale del cervello, l'insula riceve diverse informazioni corticali e talamiche. Le porzioni anteriori e posteriori dell'insula sono connesse con i nuclei del talamo e con il nucleo centrale dell'amigdala. L'insula assume un ruolo importantissimo nell'elaborazione dell'esperienza emozionale soggettiva.

1.2.1.5 Corteccia prefrontale mediale (MPFC)

La corteccia prefrontale mediale è connessa con le strutture limbiche ed è implicata in processi emotivi ed affettivi. Il circuito orbitofrontale mediale connette la corteccia prefrontale mediale con la corteccia cingolata anteriore, l'amigdala e le altre strutture limbiche e tale struttura svolge un ruolo generale nel processo di elaborazione emozionale.

Capitolo 2

SISTEMI DI NEUROTRASMISSIONE.

Una delle funzioni principali di una cellula è quella di propagare un potenziale di azione (impulso nervoso, segnale) lungo il proprio assone e trasmettere questo segnale da un neurone all'altro.

La conduzione di impulsi lungo un assone è di tipo elettrico ed è provocata dagli scambi di ioni Na^+ e K^+ attraverso la membrana neuronale. Per contro, la trasmissione di impulsi da un neurone a un altro dipende dall'azione di specifici neurotrasmettitori su specifici recettori.

Un particolare neurone genera un identico potenziale d'azione dopo ogni stimolo, lo conduce a una velocità fissa lungo l'assone, riceve simultaneamente molti stimoli positivi e negativi da altri neuroni e li integra in vari tipi di scariche. Gli impulsi nervosi viaggiano lungo gli assoni fino alla sinapsi successiva. Farmaci, tossine o altri fattori chimici possono però influenzare l'effetto della trasmissione sinaptica mediante modificazioni di un recettore, rendendo dunque l'entità della neurotrasmissione variabile a seconda delle condizioni fisiologiche.

Molte malattie neurologiche e psichiatriche sono causate da iperattività o ipoattività patologiche della neurotrasmissione.

2.1 Principali neurotrasmettitori

Un neurotrasmettitore è un fattore chimico che viene selettivamente rilasciato da un terminale nervoso in seguito a un potenziale d'azione. Esso interagisce con uno specifico recettore posto su di una struttura adiacente e, se rilasciato in quantità adeguate, provoca una risposta fisiologica specifica. Per essere un neurotrasmettitore, un agente chimico deve essere presente a livello del terminale nervoso; deve essere rilasciato dal terminale in seguito a un potenziale d'azione e, se fatto interagire sperimentalmente con il recettore, deve produrre sempre lo stesso effetto.

Alcuni tra i neurotrasmettitori principali, il cui ruolo è formalmente provato, sono:

1. l'acetilcolina;
2. la dopamina e la noradrenalina (derivate dall'amminoacido tirosina);
3. il GABA (derivato dall'acido glutammico);
4. la serotonina (dall'amminoacido triptofano)

Nello specifico caso cerebrale i neuroni tendono a specializzarsi, cioè alcuni utilizzano prevalentemente un certo tipo di neurotrasmettitore mentre altri ne usano un altro, cosicché si formano dei "sistemi": neuroni che utilizzano la serotonina costituiscono il sistema serotoninergico, quelli che usano la noradrenalina il sistema noradrenergico, ecc.

2.2 Principi basilari della neurotrasmissione

Il rilascio del neurotrasmettitore può essere modulato dalle connessioni asso-assoniche e dai recettori presinaptici.

Dando uno schema generale della neurotrasmissione, per punti, si ha:

1. Il corpo cellulare (soma) risponde a uno stimolo appropriato generando un potenziale di azione (PA).
2. Il PA è condotto lungo l'assone mediante l'apertura dei canali del Na^+ . Quando il PA raggiunge la terminazione nervosa presinaptica causa un influsso di Ca^{2+} attraverso i canali.
3. Processi Ca^{2+} -dipendenti causano la fusione delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore con la membrana presinaptica e il rilascio nello spazio sinaptico dei trasmettitori chimici immagazzinati.
4. Il neurotrasmettitore rilasciato si lega agli appropriati recettori nelle membrane postsinaptiche, li stimola e genera (trasduce) modificazioni biochimiche nelle cellule riceventi; questo può comportare modificazioni funzionali dell'attività cellulare (per esempio, contrazione della muscolatura liscia) o l'eccitazione o inibizione di un altro neurone (per esempio, trasmissione del PA alle fibre nervose postsinaptiche).
5. Il neurotrasmettitore rilasciato può anche stimolare autorecettori sulle membrane presinaptiche, modulando così il suo ulteriore rilascio.
6. Il trasmettitore è distrutto da enzimi o ricaptato dal neurone presinaptico per essere usato nuovamente.

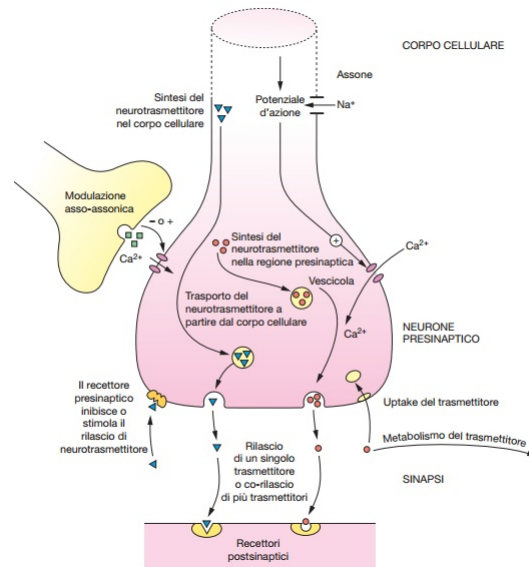


Figura 2.2.1: Illustrazione dei principi della neurotrasmissione nella sinapsi

2.3 Trasporto dei neurotrasmettitori

Due tipi di trasportatori di neurotrasmettitori risultano essenziali nella neurotrasmissione. Il carrier di raccolta, localizzato nei neuroni presinaptici e nelle cellule plasmatiche, spinge i neurotrasmettitori dallo spazio extracellulare all'interno della cellula; garantisce il rifornimento di neurotrasmettitori e aiuta a interrompere l'azione del neurotrasmettitore. L'altro tipo di trasportatore, localizzato sulla membrana delle vescicole, concentra il neurotrasmettitore all'interno delle vescicole stesse, rendendolo disponibile per la successiva esocitosi. Questi trasportatori sono potenziati dal pH citoplasmatico e dal gradiente elettrico della membrana vescicolare.

Tra tutti i sistemi di neurotrasmissione sopra menzionati, in questo lavoro concentreremo la nostra attenzione prettamente sul sistema serotoninergico.

Capitolo 3

SISTEMA SEROTONINERGICO.

La serotonina (5-HT) è un mediatore presente in numerose zone nell'organismo, ma svolge funzioni diverse a seconda della regione corporea considerata. La sua scoperta deriva dall'osservazione che nel siero lasciato a coagulare è presente una sostanza vasocostrittrice che interviene in ambiti eterogenei quali la regolazione dell'umore, il controllo dell'appetito, le relazioni sociali, la sensibilità al dolore e le funzionalità gastrointestinali.

Lo studio della produzione e del rilascio di tale neurotrasmettitore risulta dunque fondamentale per comprendere pienamente le funzionalità del corpo umano.

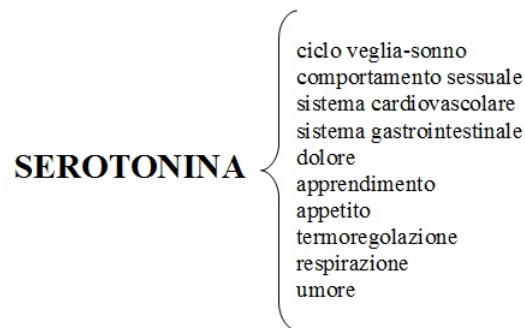


Figura 3.0.1: Schema delle attività regolate dalla serotonina

Nel capitolo ci occuperemo di sottolineare i concetti principali della biosintesi della 5-HT e della sua principale interazione con i recettori.

3.1 Sintesi - immagazzinamento - rilascio

La serotonina è una triptamina sintetizzata principalmente nell'apparato gastrointestinale e nei neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale a partire dal triptofano, amminoacido essenziale che viene necessariamente assunto con la dieta.

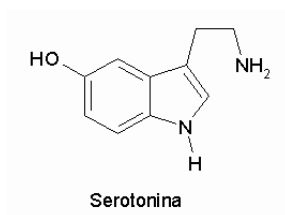


Figura 3.1.1: Struttura chimica della serotonina

Una volta sintetizzata, la 5-HT viene immagazzinata nelle cellule EC del tratto gastrointestinale e nelle piastrine.

Nel cervello sono distribuiti numerosi neuroni che utilizzano la serotonina. Essa è inizialmente immagazzinata in vescicole e poi è soggetta ad un processo di uptake attivo che la trasferisce nelle vescicole di deposito.

E' l'applicazione di adeguati stimoli, siano essi chimico-fisici o nervosi, che può però indurre la liberazione del mediatore nei valli sinaptici (nel caso dei neuroni serotoninergici) o nei siti interstiziali (nel caso delle EC del tratto gastrointestinale).

Dopo la secrezione, l'azione della serotonina si spegne per:

1. allontanamento dal luogo di produzione mediante un trasportatore apposito, chiamato SERT, che modula i livelli di serotonina nell'ambiente extracellulare e regola così anche l'attivazione dei recettori;
2. diluizione negli spazi extracellulari;
3. metabolizzazione;
4. ripompaggio nel bottone del neurone serotoninergico (reuptake) e accumulo nelle vescicole in attesa di un nuovo rilascio

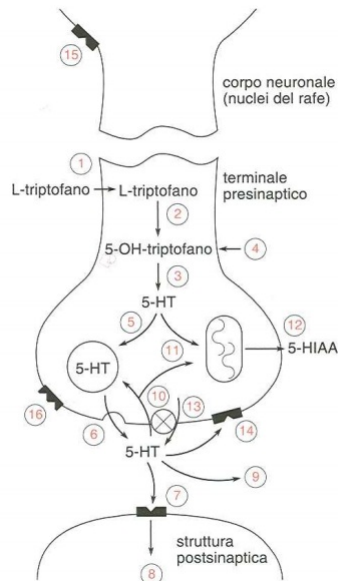


Figura 3.1.2: Schema sintesi-immagazzinamento-rilascio della serotonina

3.2 Principali vie serotoninergiche

I neuroni serotoninergici sono allocati in strutture profonde sottocorticali, soprattutto a livello ipotalamico. Le vie serotoninergiche si irradiano verso il tronco encefalico e il midollo spinale, verso il sistema limbico e verso la corteccia. Il sistema serotoninergico stabilisce, dunque, una connessione tra i centri sottocorticali (dove si regolano le funzioni vitali e la vita emozionale), il sistema nervoso periferico e la corteccia. Data la sua distribuzione, è ovvio che si tratta di un sistema aspecifico, che concorre con altri ad assicurare un certo equilibrio funzionale.

Nella figura le frecce rappresentano le varie vie nervose e i vari collegamenti.

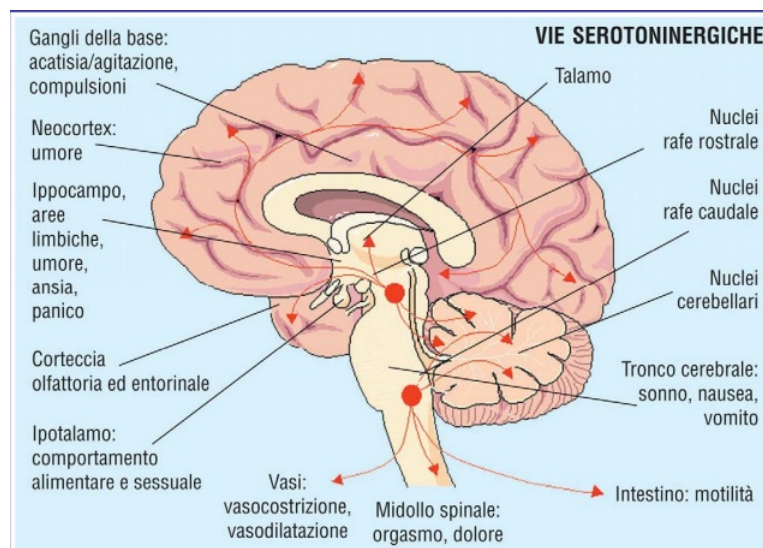


Figura 3.2.1: Principali vie serotoninergiche

3.3 Funzioni fisiologiche

La 5-HT, presente in molti siti del corpo umano, regola numerosi processi, sia durante lo sviluppo embrionale che nell'organismo adulto.

La sua azione riguarda principalmente:

1. la motilità intestinale, in parte per un effetto eccitatorio su neuroni enterici (che innervano la muscolatura liscia intestinale) ed in parte per gli effetti diretti sulle cellule muscolari lisce;
2. il sistema respiratorio, provocando, ad esempio, per azione diretta sulla muscolatura liscia, broncocostrizione;
3. l'aggregazione piastrinica;
4. il sistema cardiovascolare, in quanto determina vasodilatazione o vasocostrizione della muscolatura liscia dei vasi sanguigni;
5. il sistema nervoso centrale, con conseguente regolazione dell'umore, del sonno, della temperatura corporea, della sessualità, dell'appetito e dunque dello stato psicofisico normale dell'individuo.

L'effetto svolto nell'organismo da tale neurotrasmettitore è quindi strettamente correlato alla presenza di diversi recettori transmembrana presenti sia nel sistema nervoso centrale, che in quello periferico, che in diversi tessuti non neuronali.

Dei recettori in generale e di quelli specifici per la serotonina ci occuperemo nel prossimo paragrafo.

3.4 Recettori

3.4.1 Cenni generali

Un recettore è una proteina che si trova a livello della membrana plasmatica (recettore di membrana) o all'interno della cellula stessa (recettore di transmembrana) e che ha il compito di riconoscere una sostanza esogena o endogena e provocare, dopo tale riconoscimento, una reazione all'interno della cellula.

La reazione avviene perché tale proteina è in grado di modulare l'attività del canale ionico, aprendolo o chiudendolo a certe sostanze.

I recettori, presenti naturalmente nelle cellule del nostro organismo, sono target di molte sostanze ed è la cellula che possiede nel suo corredo genetico tutte le informazioni necessarie per la sintesi di determinati recettori di membrana.

Il recettore inoltre è :

- idoneo al legame con un AGONISTA. L'agonista si lega con il recettore modificando l'attività recettoriale. Un legame di questo tipo, AGONISTA + RECETTORE, è un legame reversibile, dunque debole, che garantisce che il recettore non si desensibilizzi a causa di un'eccessiva stimolazione.
- idoneo al legame con un ANTAGONISTA. Un legame di questo genere, invece, non modifica l'attività recettoriale e per questo motivo non ci sarà alcuna risposta a livello cellulare. Esso può essere sia reversibile che irreversibile e causare dunque l'inibizione del recettore per un tempo più o meno lungo.
- in grado di interagire sia con l'antagonista che con l'agonista, assumendo dunque tre conformazioni: a riposo (se può accogliere sia l'agonista che l'antagonista), attivato o desensibilizzato.

Il modello utilizzato per descrivere in maniera intuitiva il legame che si instaura tra una specifica molecola e il recettore è quello chiave-serratura.

La molecola che si lega può essere intesa come la "chiave" che apre una determinata "serratura", rappresentata appunto dal recettore e la risultante da questa interazione è una eventuale reazione fisiologica.

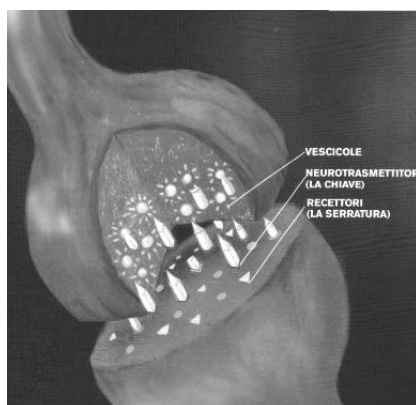


Figura 3.4.1: Modello chiave-serratura

3.4.2 Recettori della serotonina

La serotonina produce i suoi effetti grazie all'interazione con 14 tipi differenti di recettori transmembrana, suddivisibili in 7 classi sulla base di caratteristiche di tipo funzionale e strutturale: $5-HT_1$, $5-HT_2$, $5-HT_3$, $5-HT_4$, $5-HT_5$, $5-HT_6$, $5-HT_7$.

Alcune famiglie sono costituite da ulteriori sottotipi, indicati con una lettera maiuscola in seguito al numero della famiglia, ad esempio $5-HT_{1A}$.

Tali sottotipi presentano differenze marcate in termini di localizzazione, struttura proteica, sequenze aminoacidiche e funzioni fisiologiche, ma solo dei primi 4 gruppi si hanno buone conoscenze.

Mentre i recettori $5-HT_1$, $5-HT_2$, $5-HT_4$, $5-HT_5$ fanno parte della famiglia di recettori accoppiati alle proteine G, il recettore $5-HT_3$ ha invece una funzione di recettore-canale, attivando e regolando gli scambi Na^+ e K^+ .

I recettori $5-HT_1$ presentano 5 sottotipi (A, B, D, E, F) e tutti regolano le seguenti funzionalità:

1. inibizione nel sistema nervoso della liberazione di noradrenalina, serotonina e acetilcolina;
2. influenza su alcune componenti comportamentali, sull'attività cardiovascolare e gastrointestinale;
3. vasodilatazione a livello cardiovascolare con ipotensione, aumento del flusso sanguigno e tachicardia

Considerando nello specifico i sottotipi recettoriali individuamo:

- $5-HT_{1A}$: si trovano nell'ippocampo, nei nuclei del rafe del midollo allungato, nei vasi sanguigni e nel sistema nervoso centrale. Nei nuclei del rafe del midollo allungato e nell'ippocampo in particolare agiscono come autorecettori somatodendritici sui corpi cellulari dei neuroni serotoninergici e si pensa possano essere coinvolti nella termoregolazione e nei meccanismi emozionali.

- 5 – HT_{1B} : sono presenti nel sistema nervoso centrale e nei tessuti vascolari. Hanno una localizzazione presinaptica e fungono da autorecettori inibitori o da modulatori per il rilascio di alcuni neurotrasmettitori.
- 5 – HT_{1D} : localizzati nei vasi sanguigni cranici, e perciò importanti per la diagnosi della patologia emicranica, funzionano mediando la vasocostrizione e regolando il rilascio di dopamina.

I recettori 5 – HT_2 presentano invece 3 sottotipi che possono essere sia pre-sinaptici che post-sinaptici:

- 5 – HT_{2A} : ampiamente distribuiti nel sistema nervoso centrale, nella corteccia prefrontale, nella muscolatura liscia e nelle piastrine. La stimolazione di tale sottotipo regola dunque i fenomeni di vasocostrizione, aggregazione piastrinica, contrazione della muscolatura gastrointestinale, bronchiale e urogenitale;
- 5 – HT_{2B} : sono stati individuati nel fondo dello stomaco, ma le conoscenze su tale sottotipo recettoriale sono ancora alquanto limitate;
- 5 – HT_{2C} : si trovano soprattutto nel sistema nervoso centrale e sono deputati, si ritiene, prettamente alla regolazione della composizione del liquido cerebrospinale. Tale recettore è stato inoltre implicato nel controllo dei comportamenti alimentari e nella propensione allo sviluppo delle convulsioni. La scarsità di informazioni circa agonisti ed antagonisti specifici ne limita molto le conoscenze funzionali.

A differenza degli altri tipi di recettori serotoninergici, che sono accoppiati a proteine di tipo G, il recettore 5 – HT_3 funziona come canale ionico attivato da un ligando, permettendo il flusso di Na^+ e K^+ . Tali recettori sono localizzati principalmente sulle terminazioni parasimpatiche e nel tratto gastrointestinale, mentre a livello di SNC sono coinvolti nella risposta emetica.

Accoppiati alle proteine G, sono recettori ampiamente distribuiti in tutto il corpo. Essendo presenti soprattutto nell'ippocampo, ma anche nel tratto gastroenterico, essi sono ritenuti i principali responsabili del riflesso peristaltico.

I dati e le informazioni attualmente a nostra disposizione sui recettori di tipo 5 – HT_5 , 5 – HT_6 , 5 – HT_7 non sono sufficienti a determinarne e definirne meccanismi e funzionalità.

Tra i vari recettori serotoninergici, quelli a cui fino ad ora è stata prestata maggiore attenzione sono i sottotipi 1A, 2B e 2C, in quanto le loro funzioni sono più chiare ed è più chiaro anche il loro coinvolgimento in alcuni casi patologici a carico del sistema nervoso centrale.

<i>Principali caratteristiche e distribuzione dei recettori serotoninergici</i>		
<i>Recettore</i>	<i>Antagonista</i>	<i>Distribuzione</i>
5-HT1A	WAY 100635	nuclei del rafe, ippocampo, setto, amigdala
5-HT1B	SB22489 (Metergolina)	striato, SN, ippocampo, muscolatura liscia vascolare
5-HT1D	BRL15572 (Metergolina)	striato, nucleo accumbens, ippocampo, muscolatura liscia vascolare
5-HT1E	-	amigdala, n.caudato, tubercolo olfattivo
5-HT1F	-	corteccia, talamo, muscolatura liscia vascolare
5-HT2A	Ketanserina	corteccia, striato, muscolatura liscia vascolare, piastrine
5-HT2B	RS127445	cervelletto, setto, muscolatura liscia vascolare, endotelio
5-HT2C	Mesulergina	plesso corioideo, ipotalamo, ippocampo
5-HT3	Ondansetron	striato, ippocampo, area postrema
5-HT4	GR113808	striato, SN, muscolo cardiaco, muscolatura liscia esofagea
5-ht5a	Metiotepina	ippocampo, corteccia, cervelletto
5-ht5b	Metiotepina	ippocampo, abenula, corteccia
5-HT6	Metiotepina (clozapina)	tubercolo olfattivo, caudato, nucleo accumbens
5-HT7	Metiotepina (clozapina)	ipotalamo, ippocampo, SNC

Tabella 3.1: Tabella recettore-antagonista-localizzazione-funzione

Capitolo 4

PET: TOMOGRAFIA AD EMISSIONE DI POSITRONI

La scoperta del positrone, antiparticella dell'elettrone, avvenuta nei laboratori americani all'inizio degli anni '30, ha permesso lo sviluppo di metodologie nuove di diagnostica per immagini tra cui la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), che fa la prima apparizione nel panorama clinico negli anni '70.

La grandissima precisione, la notevole sensibilità e la piccola invasività sul paziente la rendono sicuramente uno strumento molto affidabile e versatile in campo neurologico, oncologico e cardiologico. In questo capitolo ci occuperemo di delineare le principali caratteristiche di questa tecnica di imaging.

4.1 Concetti generali

La PET è una delle più recenti tecniche di diagnostica medica che sfrutta la somministrazione di isotopi caratterizzati dall'emissione di positroni.

Diversamente da quanto avviene con una tomografia computerizzata (TC) o una risonanza magnetica (RM), che mostrano immagini di tipo morfologico, la PET invece permette di evidenziare l'attività di un organo o di un apparato e quindi anche lo stato patologico di esso. Inoltre, poiché le alterazioni funzionali si manifestano prima rispetto alle alterazioni morfologiche, l'utilizzo della PET consente di velocizzare i tempi di diagnosi, soprattutto nei casi di patologie di tipo tumorale. La combinazione e la sovrapposizione delle informazioni di tipo strutturale ottenute mediante la RM e di quelle funzionali provenienti dalla PET, però, viene sfruttato in maniera ottimale ad esempio nello studio del cervello, che realizza una rete molto complessa in cui ogni singola porzione ha una sua funzionalità strettamente connessa alle altre.

4.2 Funzionamento

La tecnica PET prevede l'iniezione per via endovenosa di un tracciante radioattivo caratterizzato da un'emivita piuttosto breve, che va da alcuni minuti ad un massimo di due ore.

Gli isotopi utilizzati sono in genere di tipo ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e consentono, proprio grazie alla loro rapidità di eliminazione, di non esporre per un tempo prolungato l'organismo alle radiazioni. I radionuclidi vengono preparati nei ciclotroni ed associati poi a composti normalmente assimilati dal corpo (come il glucosio, l'acqua o l'ammoniaca) che si distribuiscono nelle varie zone del corpo, in base alla loro composizione chimica. I composti così contrassegnati prendono il nome di radio-traccianti. Nel momento in cui i traccianti decadono emettono positroni che, annichilandosi con gli elettroni, generano due raggi gamma da 511keV che si allontanano con un angolo di 180 gradi e vengono rilevati da alcuni anelli dello scanner PET e trasformati in segnali elettrici. Servendosi di un software di ricostruzione, dalla misurazione della posizione in cui i fotoni colpiscono il rilevatore si può determinare l'ipotetica posizione del corpo da cui sono stati emessi, permettendo la determinazione dell'attività della regione.

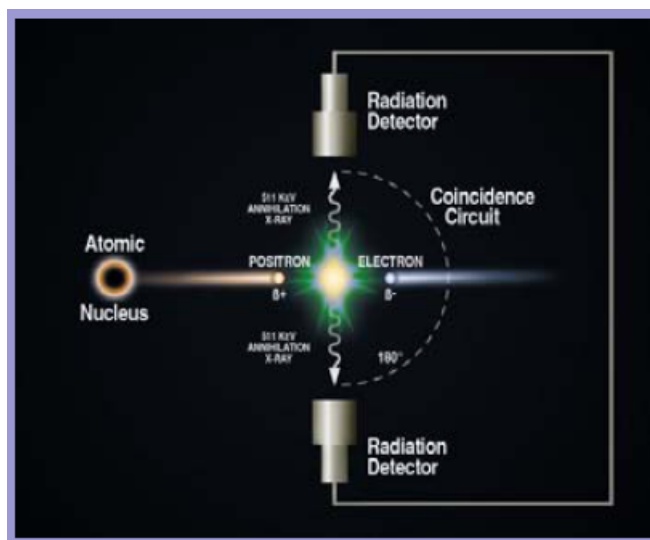


Figura 4.2.1: Emissione di positroni ed annichilazione

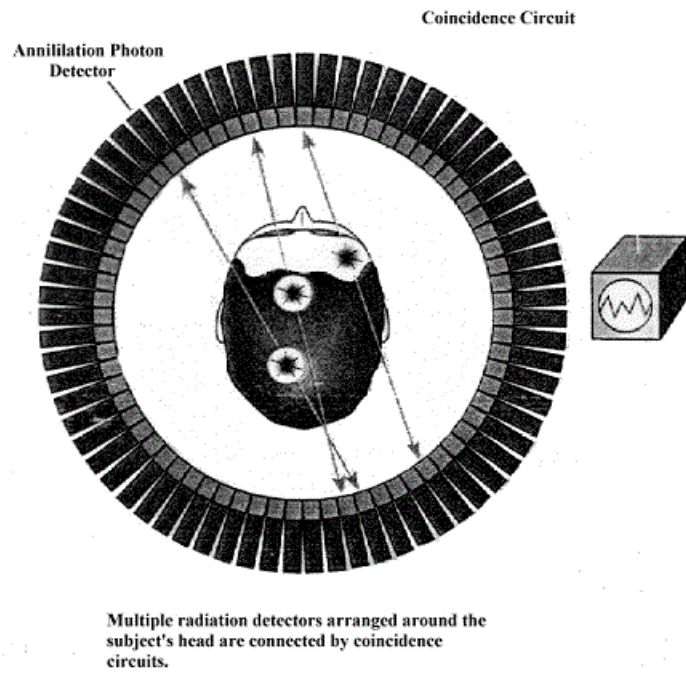


Figura 4.2.2: PET detectors

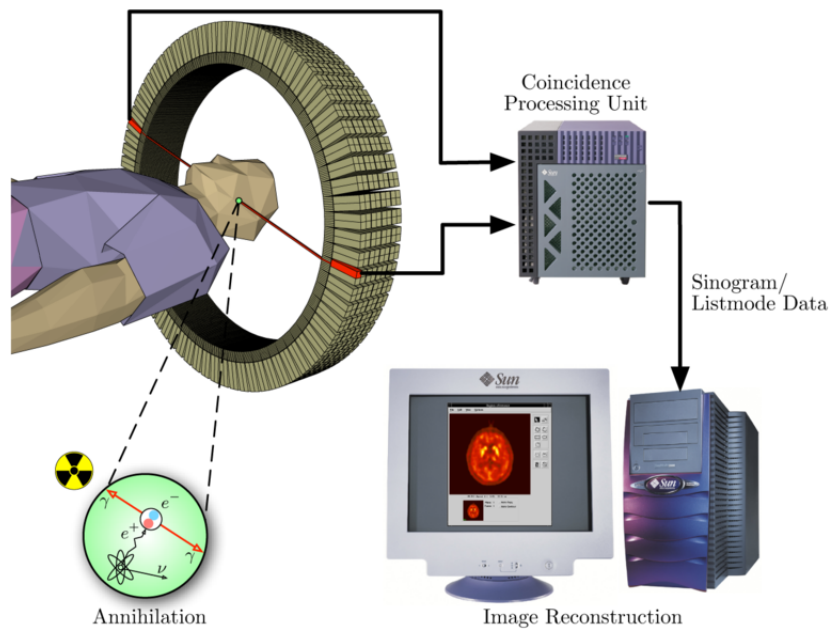


Figura 4.2.3: Schema di un processo di acquisizione PET

4.3 Obiettivi degli studi in vivo

Studi recettoriali in vivo con la PET consentono di:

- valutare la penetrazione della BEE del ligando;
- calcolare il volume di distribuzione;
- calcolare il potenziale di legame (BP);
- calcolare l'occupazione recettoriale del ligando;
- calcolare l'affinità e la densità recettoriale in una determinata regione.

4.4 Traccianti PET

L'indagine chimica e la conoscenza della composizione di un organismo dicono ben poco sui processi biologici che lo coinvolgono.

In un organismo vivente si nota che la presenza di certi contenuti chimici è strettamente correlata a stati di equilibrio dovuti a sintesi e scissioni di sostanze che non sono direttamente distinguibili a partire dalla pura osservazione.

La distinzione tra sostanze introdotte, sostanze sintetizzate e sostanze accumulate può avvenire solo mediante l'uso di sostanze riconoscibili dalle altre e aventi composizione chimica che non altera i comportamenti chimici e biologici.

Gli isotopi radioattivi sono quelli che più di ogni altra sostanza rispondono ai requisiti di essere facilmente individuabili e di non alterare il comportamento biologico. A partire da questi, perciò, si è potuto investigare sulla dinamica della materia vivente.

E' nel 1924, dopo che i coniugi Curie aprirono la strada ad una scoperta di tale portata, che Von Havesey espone l'idea di usare gli isotopi radioattivi come indicatori degli elementi dei sistemi chimici e biologici. Nella lezione che tenne nel 1944, in occasione del conferimento del premio Nobel, Von Havesey affermò: *“l'impiego degli isotopi radioattivi apre nuove linee di approccio, non solo alla soluzione di problemi già noti, ma potrà dirigere la nostra attenzione a nuove idee non prese in considerazione fino ad ora. L'uso di indicatori radioattivi apre l'unica via possibile per determinare la velocità, il luogo e la sequenza della formazione della maggior parte dei costituenti molecolari degli organismi viventi. L'esistenza di questi metodi è strumentale nell'aprire nuove vie di pensiero per dimostrare la dinamicità dei processi metabolici.”*

Si definisce quindi “tracciante” un elemento o una sostanza che introdotta in un sistema chimico o biologico, si mescola rapidamente ed uniformemente con i costituenti di questo e ne riproduce fedelmente il comportamento, senza influenzarlo.

Il tracciante permette dunque di ottenere informazioni sulla cinetica temporale di una sostanza (tracciata) con la quale si mescola e deve quindi possedere i seguenti requisiti:

- essere equivalente dal punto di vista chimico e biologico agli elementi dei sistemi che con esso si studiano e quindi averne una cinetica sovrapponibile;
- non alterare il comportamenti dei sistemi che si studiano;
- essere facilmente individuabile;
- possedere una minima degradazione in sottoprodotti metabolici che possono compromettere le immagini rivelate e dare falsi positivi nel corso dello studio PET;
- avere un'elevata affinità e selettività per il sito molecolare d'interesse, soprattutto se abbiamo a che fare con un enzima o un sottotipo recettoriale, in quanto la specificità di legame gioca un ruolo di primo piano nella fase di captazione (o uptake) del radiofarmaco e dunque nell'interpretazione delle immagini PET risultanti;
- possedere una buona permeabilità attraverso la barriera ematoencefalica (BEE).

Il passaggio attraverso le barriere biologiche e, in particolare, attraverso la BEE, rappresenta senza dubbio uno degli step più critici soprattutto per quei radiofarmaci che devono raggiungere il cervello per effettuare studi a livello del sistema nervoso.

Generalmente, il passaggio attraverso questa barriera può avere luogo con due modalità differenti:

- per diffusione passiva, nel momento in cui il tracciante risulta sufficientemente lipofilo;
- per trasporto attivo mediato da uno specifico trasportatore o carrier.

Si distinguono fondamentalmente due tipi di traccianti : radiotraccianti e traccianti stabili.

Nel caso dei radiotraccianti, la traccia misurabile consiste nell'emissione di radiazioni elettromagnetiche dovute al decadimento radioattivo. Traccianti di questo tipo trovano largo impiego nell'ambito della medicina nucleare e in tecniche di diagnostica come la PET e sono caratterizzati da tempi di dimezzamento piuttosto brevi. Se l'emivita del positrono-emittente è troppo breve ciò non consente di iniettarne la dose corretta al paziente prima che tale radiofarmaco decada; viceversa se l'emivita è troppo lunga si assiste ad un processo di decadimento radioattivo anche una volta che il paziente è stato allontanato dallo scanner.

Poiché la materia organica è formata in modo principale da ossigeno, idrogeno, carbonio, azoto, i traccianti utilizzati nella PET sono comunemente marcati con radioisotopi naturali emittenti positroni, quali Carbonio-11, Azoto-13, Ossigeno-15 e Fluoro-18.

Nella tabella sottostante riportiamo i tempi di dimezzamento di tali isotopi:

<i>Isotopo positrono-emittente</i>	<i>Emivita (min)</i>
Carbonio-11	20.4
Azoto-13	9.96
Ossigeno-15	2.07
Fluoro-18	109.8

Tabella 4.1: Tabella di alcuni isotopi e della loro emivita

4.4.1 Tracciante [carbonio- ^{11}C] WAY-100635

Il [carbonio- ^{11}C] WAY-100635 è uno dei più recenti e promettenti traccianti introdotti nell'utilizzo della PET come antagonista per i recettori $5-HT_{1A}$ nel cervello.

Poiché i recettori di sottotipo $5-HT_{1A}$ sono implicati nello sviluppo di fenomeni di ansia, depressione e disordini alimentari, essi sono ottimi obiettivi per rilevare tali patologie mediante l'utilizzo di questo tracciante.

I primi studi sulla PET, sviluppati sulle scimmie e sugli animali, prevedevano l'utilizzo di [O-methyl- ^{11}C] WAY100-635, caratterizzato però da un metabolite lipofilo ([O-methyl- ^{11}C] WAY100-634) in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e caratterizzato da una affinità anche con il recettori adrenergici.

I dati acquisiti mediante la PET, a causa di tale contaminazione, non risultavano quindi corretti e di conseguenza il [O-methyl- ^{11}C]WAY100-635 non può essere considerato un tracciante ottimale per la quantificazione dei recettori di sottotipo $5-HT_{1A}$.

Pike ed altri, una decina di anni fa, proposero di legare il WAY 100-635 con il carbonio-11 per costituire un nuovo tracciante, denominato poi [carbonio- ^{11}C] WAY100-635 che evitava la formazione di metaboliti radioattivi. In tal modo, il composto creato diventa così l'unica fonte della radioattività misurata nel cervello dallo scanner PET, permettendo così, dopo l'iniezione, di quantificare con precisione i parametri dei recettori $5-HT_{1A}$. Il rapporto segnale/rumore del [carbonio- ^{11}C] WAY100-635 è migliorato rispetto a quello ottenibile con [O-methyl- ^{11}C] WAY100-635, così il [carbonio- ^{11}C] WAY100-635 è ora il tracciante più largamente impiegato negli studi in vivo e contiene quindi un emettitore di positroni con emivita di 20.4 min.

Parte II

**ESPERIMENTO E
MODELLIZZAZIONE**

Capitolo 5

MODELLI DI SISTEMA A DUE E TRE COMPARTIMENTI

La complessità dei sistemi biologici richiede strumenti di modellizzazione che siano utili allo scopo di progettare e interpretare, in modo appropriato, esperimenti biologici, dal momento che tutta la realtà fisica e biologica è definibile da equazioni e quantità matematiche.

Nel nostro caso, per stimare numericamente i parametri recettoriali serotoninergici nelle varie regioni cerebrali, vengono dapprima definiti dei modelli e poi utilizzati metodi che appartengono a tre macro-categorie e si differenziano in base al tipo di input che ricevono in ingresso.

- metodo 1 : si basa sull'analisi cinetica avente come input la funzione arteriale. Sulla base della semplificazione o meno del modello compartimentale e sui gradi di libertà dei parametri verranno poi individuati tre sotto-metodi;
- metodo 2 : prevede una descrizione grafica avente anch'essa come input la funzione arteriale e non sfrutta alcun modello compartimentale per la modellizzazione,
- metodo 3 : nel terzo caso l'analisi cinetica prende forma a partire da una funzione di input derivata da una regione di riferimento, il cervelletto. Anche in questo caso è possibile individuare due varianti a seconda della semplificazione compartimentale.

Mentre i primi due metodi permettono di stimare sia il potenziale di legame BP che il rapporto $\frac{k_3}{k_4}$, inteso come coefficiente di partizione tra compartimento specifico e non specifico, il terzo metodo fornisce solamente informazioni sul rapporto $\frac{k_3}{k_4}$.

E' possibile anche individuare un ulteriore modello, non lineare, che verrà brevemente analizzato nel capitolo, ma su cui non ci soffermeremo perchè non è utilizzato nell'ambito dell'esperimento che andremo a trattare.

5.1 Modello compartimentale per il metodo 1

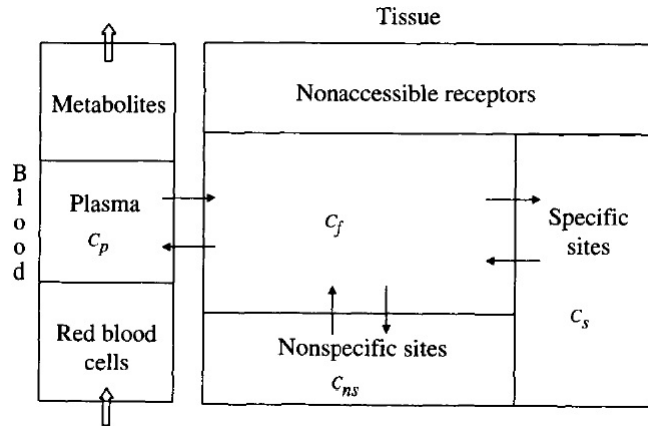


Figura 5.1.1: Interazione legato-recettore

Fondamentalmente l'interazione tra il tracciante presente nel sangue e il recettore può essere schematizzata mediante un modello a tre compartimenti, come quello presentato sopra, in cui C_p rappresenta la concentrazione di plasma arteriale privato dei metaboliti; C_f è la concentrazione del tracciante libero nel cervello, C_{ns} è la concentrazione del tracciante legato in modo non specifico e C_s è la concentrazione di traccianti legato specificatamente.

Una volta individuati i 6 parametri $k_1, k_2, k_3, k_4, k_5, k_6$ che regolano gli scambi inter-compartimentali il modello diviene:

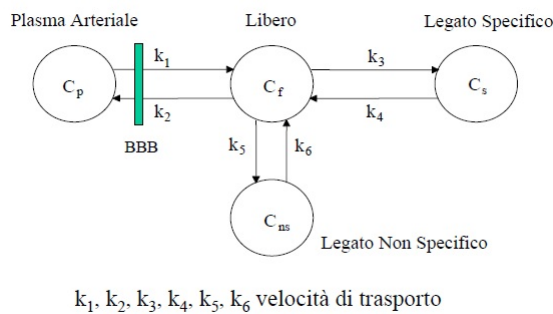


Figura 5.1.2: Modello compartimentale a tre compartimenti per il sistema legante-recettore

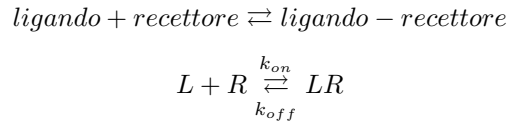
ed è facile determinare le equazioni differenziali che lo regolano.

$$\dot{C}_f(t) = k_1 C_p(t) - (k_2 + k_3 + k_5) C_f(t) + k_4 C_s(t) + k_6 C_{ns}(t) \qquad C_f(0) = 0$$

$$\begin{aligned} \dot{C}_s(t) &= k_3 C_f(t) - k_4 C_s(t) & C_s(0) &= 0 \\ \dot{C}_{ns}(t) &= k_5 C_f(t) - k_6 C_{ns}(t) & C_{ns}(0) &= 0 \end{aligned}$$

dove k_1 ($mL/min \cdot mL$) e k_2 (min^{-1}) sono i parametri che regolano lo scambio del tracciante tra sangue e barriera ematoencefalica; mentre i rimanenti parametri regolano gli scambi tra tessuti e plasma o tra i tessuti stessi.

Focalizziamo ora la nostra attenzione su k_3 e k_4 e cerchiamo di ricavarne il significato fisiologico. Supponiamo innanzitutto che la relazione tra ligando e recettore sia descrivibile da una reazione molecolare del tipo



dove L rappresenta il legante, R il recettore, LR il prodotto di legame legante-recettore (dunque il tasso di recettori occupati), k_{on} il parametro di velocità di associazione del ligando con il recettore e k_{off} il parametro di velocità di dissociazione del prodotto della reazione LR .

Il binding avviene dunque quando ligando e recettore collidono mediante diffusione e quando tale collisione presenta un'energia sufficiente a generare il legame.

Sfruttando i parametri determinati in precedenza e con riferimento al modello compartimentale si ha che:

$$\frac{dC_s(t)}{dt} = k_{on} C_f(t) C_r(t) - k_{off} C_s(t)$$

dove con C_r si indica la concentrazione di recettori.

Indicando con B_{max} la concentrazione totale dei recettori, si ha che

$$B_{max} = C_s + C_r$$

ossia che i recettori totali sono la somma di quelli liberi e di quelli legati al ligando.

Poichè $C_s \ll C_r$ si otterrà che

$$B_{max} \approx C_r$$

Riscrivendo l'equazione dunque

$$\frac{dC_s(t)}{dt} = k_{on} C_f(t) B_{max} - k_{off} C_s(t) = k_3 C_f(t) - k_4 C_s(t)$$

con $k_3 = k_{on} B_{max}$ e $k_4 = k_{off}$.

Un importante parametro che si ricava da queste considerazioni è la costante di legame all'equilibrio, definita come il rapporto

$$K_d = \frac{C_s}{C_r C_f} = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

Tale quantità indica dunque la concentrazione di radioligando che all'equilibrio occupa la metà dei recettori.

Il risultato di una PET prevede che venga individuata la quantità di tracciante presente nel tessuto e la quantità di tracciante presente nel sangue delle regioni di interesse; da questa considerazione deduciamo l'equazione di misura della concentrazione del tracciante nel tessuto espressa come

$$C_i(t) = (1 - V_b)(C_f(t) + C_{ns}(t) + C_s(t)) + V_b C_b(t)$$

dove C_b rappresenta la concentrazione totale di tracciante nel sangue e V_b rappresenta il volume vascolare.

Un modello di questo tipo però non è identificabile a priori; in particolare esso ammette due soluzioni per ogni parametro.

Per garantire l'identificabilità a priori è possibile accoppiare il compartimento del tracciante libero nel tessuto (C_f) con quello del tracciante non specificatamente legato (C_{ns})

$$C_f(t) + C_{ns}(t) = C_{f+ns}(t)$$

sono le concentrazioni di tracciante nel tessuto libero e nel sito non specifico.

Le equazioni di modello diventano dunque

$$\begin{aligned} C_{f+ns}(t) &= k_1 C_p(t) - (k_2 + k_3)C_{f+ns}(t) + k_4 C_s(t) & C_{f+ns}(t) &= 0 \\ C_s(t) &= k_3 C_{f+ns}(t) - k_4 C_s(t) & C_s(0) &= 0 \end{aligned}$$

con

$$k_3 = k_{on} B_{max} f$$

dove

$$f = \frac{C_f}{C_{f+ns}} = \frac{C_f}{C_f + C_{ns}} = \frac{C_f}{C_f \left(1 + \frac{C_{ns}}{C_f}\right)} = \frac{1}{1 + \frac{k_5}{k_6}}$$

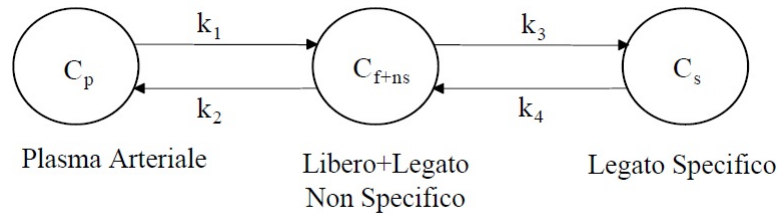


Figura 5.1.3: Semplificazione. Modello a due compartimenti del sistema ligando-recettore

L'equazione della misura PET diventa quindi

$$C_i(t) = (1 - V_b)(C_{f+ns}(t) + C_s(t)) + V_b C_b(t)$$

Il modello ora è identificabile a priori ed è possibile stimare il valore del potenziale di legame normalizzato al volume di distribuzione di una regione di riferimento senza recettori:

$$BP = \frac{B_{max}}{K_d} = \frac{k_{on} B_{max}}{k_{off}} = \frac{k_3}{k_4}$$

5.2 Modello compartimentale per il metodo grafico di Logan (o metodo 2)

I metodi grafici offrono una valida alternativa ai metodi precedentemente esposti che prevedono l'identificazione numerica mediante il metodo dei minimi quadrati.

Non avvalendosi di un modello compartimentale ben definito, tali metodi non consentano di stimare i singoli parametri, ma si occupano piuttosto dell'individuazione di un unico macroparametro, permettendo perciò di ottenere delle stime anche per i traccianti di cui non è nota la struttura ed il comportamento compartimentale.

I metodi grafici che ricordiamo sono essenzialmente due : il metodo grafico di Patlak e quello di Logan.

In questo paragrafo daremo dei cenni sul metodo proposto da Logan per la stima del potenziale di legame BP .

Innanzitutto tale metodo può essere applicato solo se valgono alcune ipotesi:

- i traccianti sono descritti da modelli reversibili;
- il tracciante lascia i compartimenti reversibili attraverso il plasma o attraverso il compartimento irreversibile;
- la cinetica del tracciante è descritta da equazioni differenziali lineari, del primo ordine a coefficienti costanti;
- se l'organismo metabolizza il tracciante, i suoi prodotti metabolici devono essere misurabili;
- la concentrazione iniziale di tracciante nel tessuto deve essere nulla

Dalle stime di Logan è possibile determinare V_d , ossia il volume di distribuzione del tracciante come rapporto tra la concentrazione del tracciante nel tessuto e la concentrazione nel plasma in stato stazionario.

Usando la concentrazione di tracciante nel plasma e nel tessuto vengono individuati nel piano cartesiano le due coordinate:

$$x = \frac{\int_0^t C_p(v) dv}{C_i(t)} \quad , \quad y = \frac{\int_0^t C_i(v) dv}{C_i(t)}$$

In particolare, se esiste un istante t^* per cui tutti i compartimenti sono in equilibrio con la concentrazione plasmatica, ovvero

$$\frac{C_i(t)}{C_p(t)} = \text{costante}$$

è possibile dimostrare che esiste una relazione lineare tra le coordinate cartesiane x e y rappresentabile graficamente mediante una retta di pendenza

$$m = \frac{k_1}{k_2} + \frac{k_1 k_3}{k_2 k_4} + V_b = V_d \left(1 + \frac{B_{max}}{K_d} \right) + V_b = V_d(1 + BP) + V_b$$

Assumendo V_d noto e V_b noto (oppure trascurabile) è possibile dunque dedurre, a partire da m , il parametro BP .

Per la stima di V_d appena presentata è in genere richiesta l'invasività di una misura plasmatica; ma nel 1996 Logan propose un'alternativa che consentisse di stimare il BP senza che venisse richiesta tale misura.

L'unica differenza è che ora si considera, per $t > t^*$

$$x = \frac{\int_0^t C_{reference}(v)dv}{C_i(t)}$$

$$y = \frac{\int_0^t C_{reference}(v)dv}{C_i(t)}$$

Presentiamo ora un brevissimo sommario dei vantaggi e svantaggi dell'utilizzo del metodo grafico di Logan

PRO:

- 1) permette una stima computazionale notevolmente più rapida
- 2) non richiede un modello compartimentale definito
- 3) non invasivo nel caso della variante con regione di riferimento

CONTRO:

- 1) le misure sono affette da errori
- 2) non consente di stimare individualmente i parametri, ma individua un solo macroparametro
- 3) la scelta dell'istante t^* può influenzare notevolmente il risultato

5.3 Modelli per i metodi con tessuto di riferimento (o metodi di tipo 3)

La misurazione arteriale non è però indispensabile per la modellizzazione del sistema recettoriale. Un metodo alternativo a quanto descritto sopra, che non prevede la cannulazione arteriosa, è stato teorizzato e descritto da Lammertsma sul finire degli anni '90 e consente, analogamente a sopra, di quantificare la cinetica recettoriale eliminando l'invasività e l'elaborazione dei dati sui metaboliti plasmatici.

Per realizzare un approccio di questo tipo, dunque, risulta necessaria l'esistenza di una ROI tessutale di riferimento, priva di legami specifici con i siti recettoriali.

Graficamente il modello compartimentale si presenta come in figura

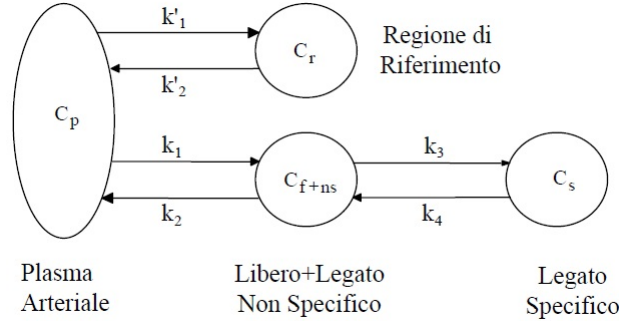


Figura 5.3.1: Modello compartimentale recettore-ligando con regione di riferimento.

ed è descritto dalle equazioni:

$$\begin{aligned}
 \dot{C}_r(t) &= k'_1 C_p(t) - k'_2 C_r(t) & C_r(0) &= 0 \\
 \dot{C}_{f+ns}(t) &= k_1 C_p(t) - (k_2 + k_3) C_{f+ns}(t) + k_4 C_s(t) & C_{f+ns}(0) &= 0 \\
 \dot{C}_s(t) &= k_3 C_{f+ns}(t) - k_4 C_s(t) & C_s(0) &= 0
 \end{aligned}$$

dove ancora una volta i parametri

$$k_3 = k_{on} B_{max} f$$

$$k_4 = k_{off}$$

Assumendo ora che la distribuzione del tracciante non specificatamente legato sia la medesima in entrambe le regioni si ottiene

$$V_d = \frac{C_{f+ns}}{C_p} = \frac{C_r}{C_p}$$

L'equazione di misura PET diventa

$$C_i(t) = C_{f+ns}(t) + C_s(t)$$

Il modello non è univocamente identificabile a priori e per renderlo tale sfruttiamo una parametrizzazione particolare con

$$R_1 = \frac{k_1}{k'_1}$$

che ci permette di ottenere l'equivalenza dei rapporti k_1, k_2 e k'_1, k'_2

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{k'_1}{k'_2}$$

I parametri R_1, k_2, k_3, k_4 possono essere stimati con scarsa precisione utilizzando il metodo ai minimi quadrati.

Il parametro importante la cui stima è sufficientemente precisa risulta essere invece

$$BP = \frac{k_3}{k_4}$$

Per ottenere l'univoca identificabilità a priori è però possibile semplificare il modello compartimentale e ottenere

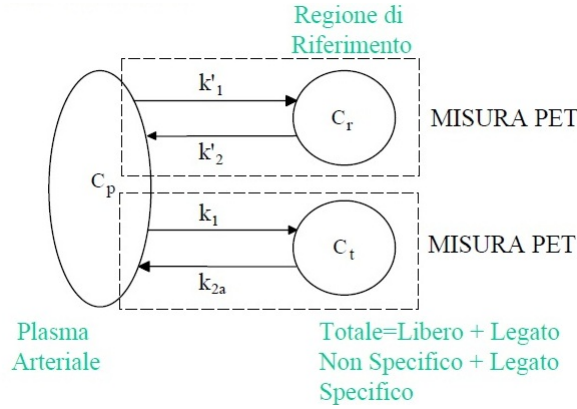


Figura 5.3.2: Semplificazione mediante accorpamento dei compartimenti

regolato dalla coppia di equazioni:

$$\begin{aligned} \dot{C}_r(t) &= k'_1 C_p(t) - k'_2 C_r(t) & C_r(0) &= 0 \\ \dot{C}_t(t) &= k_1 C_p(t) - k_{2a} C_t(t) & C_t(0) &= 0 \end{aligned}$$

in cui si mantiene la prima equazione mentre le altre due del modello non semplificato sono accorpate in una unica con $C_t(t) = C_{f+ns}(t) + C_r(t)$ che esprime la concentrazione totale del tracciante nel tessuto e k_{2a} (min^{-1}) è la costante di rapporto tra il compartimento specifico ed il plasma.

Se l'equazione ottenuta descrive in maniera soddisfacente la cinetica del tracciante si deve ottenere, analogamente alle equazioni del modello non semplificato, che :

$$k_{2a} = \frac{k_2}{1 + BP} = \frac{k_2}{1 + \frac{k_3}{k_4}}$$

e quindi

$$\frac{k_1}{k_{2a}} = \left(\frac{k_1}{k_2} \right) (1 + BP)$$

Dimostriamo ora questo fatto analizzando nel dettaglio il modello semplificato di figura 5.3.2, mediante una scomposizione compartimentale.

E' noto da analisi precedenti che

$$C_t(t) = C_{f+ns}(t) + C_s(t)$$

Analizzando il primo modello parziale

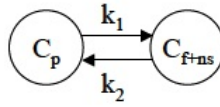


Figura 5.3.3: Primo modello compartimentale parziale

all'equilibrio si ha che

$$k_1 C_p(t) = k_2 C_{f+ns}(t)$$

e quindi

$$C_{f+ns}(t) = \frac{k_1}{k_2} C_p(t)$$

Nel secondo modello

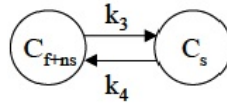


Figura 5.3.4: Secondo modello compartimentale parziale

$$k_3 C_{f+ns}(t) = k_4 C_s(t)$$

da cui possiamo ricavare

$$C_s(t) = \frac{k_3}{k_4} C_{f+ns}(t)$$

La somma che otteniamo, esprimendo le nuove quantità ottenute da questa analisi sarà

$$C_t(t) = \frac{k_1}{k_2} C_p(t) + \frac{k_3}{k_4} C_{f+ns}(t) = \frac{k_1}{k_2} C_p(t) + \frac{k_3 k_1}{k_4 k_2} C_p(t) = \frac{k_1}{k_2} \left(1 + \frac{k_3}{k_4} \right) C_p(t)$$

e quindi

$$V_d = \frac{C_t(t)}{C_p(t)} = \frac{k_1}{k_2} \left(1 + \frac{k_3}{k_4} \right)$$

Poichè si ha anche un'equazione che regola gli scambi tra i compartimenti C_p e C_t , all'equilibrio

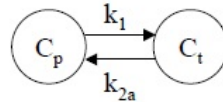


Figura 5.3.5: Terzo modello compartimentale parziale

$$k_1 C_p(t) = k_{2a} C_t(t)$$

da cui ricaviamo ancora una volta il rapporto V_d

$$V_d = \frac{k_1}{k_{2a}}$$

Uguagliando i rapporti ottenuti dall'analisi separata dei vari compartimenti coinvolti nel modello si ottiene

$$\frac{k_1}{k_2} \left(1 + \frac{k_3}{k_4} \right) = \frac{k_1}{k_{2a}}$$

e quindi

$$k_{2a} = \frac{k_2}{1 + \frac{k_3}{k_4}} = \frac{k_2}{1 + BP}$$

L'utilizzo della trasformata di Laplace per le equazioni differenziali trattate separatamente mi permette di individuare la concentrazione plasmatica e quella totale in funzione di quella del tessuto di riferimento:

$$\begin{aligned} sC_r(s) &= k'_1 C_p(s) - k'_2 C_r(s) \implies C_p(s) = \frac{s + k'_2}{k'_1} C_r(s) \\ sC_t(s) &= k_1 C_p(s) - k_{2a} C_t(s) \end{aligned}$$

da cui

$$sC_t(s) = k_1 \left(\frac{s + k'_2}{k'_1} \right) C_r(s) - k_{2a} C_t(s) \implies C_t(s) = R_1 \left(\frac{s + k'_2}{s + k_{2a}} \right) C_r(s)$$

Da $\frac{k_1}{k_2} = \frac{k'_1}{k'_2} \implies R_1 k'_2 = k_2$

e quindi

$$C_t(s) = \frac{R_1 s + k_2}{s + k_{2a}} C_r(s)$$

che nel tempo diventa

$$C_t(t) = R_1 C_r(t) + \left[k_2 - \frac{R_1 k_2}{1 + BP} \right] \int_0^t C_r(v) e^{-(k_2/1+BP)(t-v)} dv$$

L'equazione di misura è

$$C_i(t) = C_t(t)$$

5.4 Modello non lineare

Tutti i modelli compartimentali precedentemente discussi sono modelli lineari e non permettono una stima precisa dei valori di B_{max} , k_{on} e K_d . La realizzazione di un esperimento che prevede l'iniezione di un ligando non marcato consente di dedurre importanti informazioni sull'occupazione recettoriale.

Poichè la concentrazione $C_s(t)$ di ligando nel tracciante non è più trascurabile e il parametro k_3 non risulta più costante, l'equazione che si ottiene è

$$\frac{dC_s(t)}{dt} = k_{on}(B_{max} - C_s(t))C_f(t) - k_{off}C_s(t) = k_3C_f(t) - k_{off}C_s(t)$$

dove $k_3 = k_{on}(B_{max} - C_s(t))$ e $k_4 = k_{off}$.

Introducendo il ligando non marcato risulta fondamentale ora descriverne la cinetica ed affiancarne le equazioni dedotte a quelle del ligando marcato.

Il sistema compartimentale

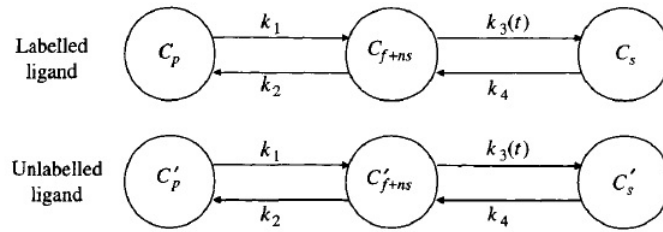


Figura 5.4.1: Modello non lineare

risulta dunque regolato dalle seguenti equazioni:

$$\begin{aligned} C_{f+ns}(t) &= k_1 C_p(t) - (k_2 + k_3(t)) C_{f+ns}(t) + k_4 C_s(t) & C_{f+ns}(0) &= 0 \\ C_s(t) &= k_3(t) C_{f+ns}(t) - k_{off} C_s(t) & C_s(0) &= 0 \\ C'_{f+ns}(t) &= k_1 C'_p(t) - (k_2 + k_3(t)) C'_{f+ns}(t) + k_4 C'_s(t) & C'_{f+ns}(0) &= 0 \\ C'_s(t) &= k_3(t) C'_{f+ns}(t) - k_{off} C'_s(t) & C'_s(0) &= 0 \end{aligned}$$

dove C'_p , C'_{f+ns} e C'_s sono rispettivamente la concentrazione del ligando non marcato nel plasma, la concentrazione del ligando non marcato non specificatamente legato e la concentrazione del ligando non marcato specificatamente legato.

L'equazione di misura è ancora:

$$C_i(t) = (1 - V_b)(C_{f+ns}(t) + C_s(t)) + V_b C_b(t)$$

Il modello ottenuto è quindi univocamente identificabile a priori ed in particolare è possibile stimare i parametri $k_1, k_2, k_{on}, B_{max}, k_{off}$ e V_b , oltre che l'affinità del ligando V_d .

Capitolo 6

[CARBONIO-¹¹C]WAY100-635: SOGGETTI E DATI SPERIMENTALI

L'esperimento su cui verte la discussione, che ora andremo a presentare nel dettaglio, ha come obiettivo quello di indagare i parametri dell'interazione recettore-ligando sfruttando l'iniezione di un tracciante radioattivo antagonista dei recettori serotoninergici per permettere di individuare, mediante imaging PET, le aree sollecitate e a più alta densità recettoriale.

I dati derivati dalla tomografia e quelli di campione arteriale verranno poi analizzati secondo i tre metodi descritti brevemente prima e confrontati tra loro per ottenere le migliori stime parametriche, come vedremo nei prossimi capitoli.

6.1 Protocollo, soggetti e misura della funzione input

Per questo studio sono stati analizzati 5 soggetti maschi, in buona salute, di età compresa tra i 25 e i 33 anni.

Essi sono stati sottoposti alla PET per due volte nello stesso giorno, per verificare la riproducibilità degli esiti delle misure.

Lo studio è stato approvato dal Columbia Presbyterian Medical Center IRB.

La buona forma di salute, inclusa l'assenza di qualunque tipo di patologia neurologica, medica, psichiatrica (abuso di alcool e droghe compreso) è stata valutata attraverso l'elettrocardiogramma e i vari test di routine. I soggetti inoltre, per almeno due settimane prima degli esami, non devono aver assunto alcun medicinale.

Per l'acquisizione dei dati PET, ai soggetti vengono inseriti dei cateteri arteriali e venosi e dei markers fiduciali riempiti di C-11 a livello del cranio.

I movimenti del capo sono minimizzati con un sistema di immobilizzazione in poliuretano.

La PET è stata eseguita con un tomografo ECAT-EXACT 47 (Siemens) in grado di produrre 47 fette per ogni paziente. Una prima scansione, della durata di circa 10 minuti, viene effettuata prima dell'iniezione del radiotracciante. Successivamente il [¹¹C]WAY 100-635 viene iniettato per circa 45 secondi.

I dati acquisiti vengono collezionati in 3D per 120 minuti, organizzati come 21 frammenti di durata crescente (3x20 secondi, 3x1 minuto, 3x2 minuti, 2x5 minuti, 10x10 minuti). Le immagini così ottenute sono ricostruite in una matrice di 128x128 pixel, dove ciascun pixel presenta un'area di 2.5 mm².

Tra un'iniezione e l'altra per il medesimo soggetto intercorrono tra i 15 e i 20 minuti.

Dopo l'iniezione del radiotracciante, campioni arteriali vengono raccolti ogni 5 secondi con un sistema automatico di campionamento per i primi 2 minuti. Il prelievo del campione, successivamente, avviene manualmente ad intervalli più lunghi. Per ogni esperimento vengono prodotti 31 campioni. Il plasma prelevato viene centrifugato per 10 minuti e posto in provette da 200 µL. La radioattività viene analizzata mediante un contatore Gamma. I campioni prelevati a 2, 6, 12, 20, 40 e 60 minuti sono processati secondo precipitazione proteica eseguita con acetonitrile per misurare la percentuale di [¹¹C]WAY 100-635 non metabolizzato.

Per ogni campione la frazione non metabolizzata del tracciante viene fittata come somma di un esponenziale e di una costante con il valore per t=0 vincolato a 1.

Si ottiene in tal senso una funzione di input $C_a(t)$ (µCi/mL) data dal prodotto tra i conteggi di plasma e la frazione di tracciante non metabolizzata, graficabile come somma di tre esponenziali che viene poi utilizzata nell'analisi cinetica e grafica.

6.2 Acquisizione MRI (imaging a risonanza magnetica) e procedure di segmentazione

L'imaging MRI viene acquisito con un sistema GE 1.5 T Signa Advantage.

L'obiettivo della acquisizione di immagini MRI è quello di ottenere informazioni di carattere morfologico sulla struttura tissutale.

6.3 Analisi delle immagini

L'analisi delle immagini ottenute viene realizzata con il sistema MEDx secondo tre criteri:

- riallineamento dei frame;
- registrazione combinata PET-MRI;
- tracciamento delle regioni di interesse e campionamento

6.3.1 Riallineamento dei frame

Il movimento del soggetto durante la PET riduce la precisione e la qualità delle immagini e può condurre a stime scorrette, specialmente nei casi di dati acquisiti con tomografia ad alta risoluzione. Il riallineamento dei frame consente dunque di migliorare e riassetare la qualità delle immagini acquisite in caso di movimenti del cranio.

6.3.2 Registrazione combinata PET-MRI

Dopo la fase di registrazione frame-to-frame i 21 frame ottenuti vengono sommati, coregistrati e ricampionati sfruttando la registrazione delle immagini tipiche della MRI e quindi combinando le informazioni ottenute. Le immagini multimodali vengono poi ricondotte ad un unico sistema di coordinate e consentono l'allineamento delle strutture anatomiche corrispondenti.

L'uso combinato di queste due tecniche di imaging consente dunque di visualizzare quale regione cerebrale accumula il tracciante impiegato.

6.3.3 Tracciamento delle regioni di interesse (ROI) e campionamento delle attività.

Sfruttando i dati acquisiti con la MRI vengono riportate dunque 15 regioni di interesse (ROI) e una regione di riferimento (cervelletto), con i rispettivi contorni.

Le regioni di interesse considerate sono riportate in tabella con l'indicazione dell'area media occupata. Viene riportata la superficie totale nel caso di regioni bilaterali.

<i>regione</i>	<i>area media (mm³)</i>
corteccia prefrontale dorsolaterale	32.575 ± 2.579
corteccia prefrontale mediale	9.104 ± 1.596
corteccia orbito-prefrontale	16.228 ± 3.191
corteccia cingolata anteriore	8.005 ± 594
corteccia subgenuale prefrontale	2.055 ± 302
corteccia temporale	23.019 ± 3.271
corteccia parietale	62.183 ± 5.979
corteccia occipitale	42.963 ± 6.776
amigdala	3.442 ± 922
uncus	905 ± 393
formazione ippocampale	5.824 ± 441
corteccia entorinale	2.359 ± 536
giro paraippocampale	7.835 ± 474
insula	8.245 ± 463
nucleo del rafe dorsale	880 ± 742
cervelletto	113.701 ± 3.549

Tabella 6.1: Tabella delle regioni con relativa area media e deviazione standard

La regione del nucleo del rafe, al contrario di tutte le altre, viene tracciata grazie alle immagini acquisite direttamente dalla PET, data l'impossibilità di delimitarne i contorni tramite MRI. Osservato il basso livello di potenziale di legame individuato in regioni quali il caudato, il talamo e il putamen, tali valori non sono presi in considerazione ai fini dell'analisi.

Capitolo 7

RISULTATI DELL'ESPERIMENTO

I risultati che riportiamo qui partono da alcune considerazioni sul metabolismo del tracciante e sul suo assorbimento a livello cerebrale e poi si concentrano sulle stime parametriche che, dopo essere state dedotte con i diversi metodi, vengono analizzate secondo alcuni criteri che spaziano dal tasso di successo alla stabilità temporale.

7.1 Analisi sul tracciante

7.1.1 Analisi plasmatica: metabolizzazione del tracciante.

Il [^{11}C]WAY 100635 ha un metabolismo molto rapido nel sangue, come è possibile dedurre dall'analisi del grafico sotto riportato.

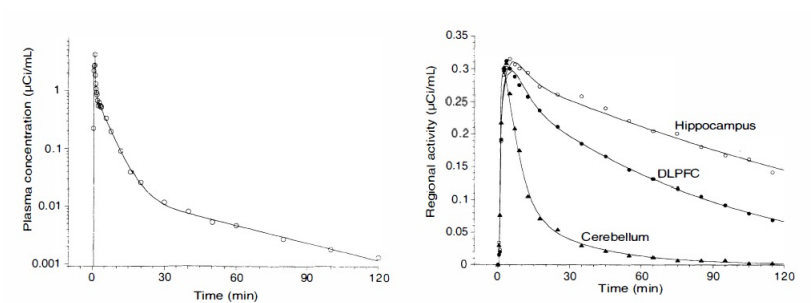


Figura 7.1.1: Curve di attività plasmatica (sinistra) e cerebrale (destra) associate al metabolismo del tracciante radioattivo. Plasma: i punti sono i valori misurati del tracciante non metabolizzato e la linea rappresenta l'andamento dell'esponenziale. Analogamente per il cervello, dove sono riportati però tre diversi andamenti esponenziali del metabolismo del tracciante a seconda della regione considerata.

La TRV del tracciante non metabolizzato cresce con il tempo, dal $6 \pm 5\%$ al secondo minuto fino al $91 \pm 75\%$ dopo 60 minuti, mentre il coefficiente ICC di affidabilità passa da -0.26 dopo 2 minuti al valore 0.61 dopo un'ora.

In questi termini, dunque, i risultati ottenuti indicano che i valori iniziali sono determinabili con accuratezza, ma solo quelli finali forniscono informazione significativa circa le differenze di metabolizzazione del tracciante tra i vari pazienti.

La frazione di [^{11}C] WAY100635 non metabolizzato viene poi rappresentata graficamente dal punto di vista plasmatico e del tessuto cerebrale in termini di curve tempo/attività.

Nel cervelletto la frazione non metabolizzata del tracciante è approssimata con un esponenziale dal minuto 20 al 120 con esponente $\lambda_{cer} = -0.024 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$ come si può vedere nel grafico sottostante.

Similmente, la curva tempo-attività del plasma, contenente sia il tracciante non metabolizzato che eventuali altri metaboliti, è ancora una volta un esponenziale sullo stesso intervallo (20 - 120 minuti) avente come esponente $\lambda_{tot} = -0.024 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$.

Questi risultati suggeriscono che la curva della frazione non metabolizzata di [^{11}C] WAY100635 può essere interpolata come somma di un esponenziale e di una costante. Una funzione di questo tipo è dunque utilizzata per fittare la frazione di tracciante non metabolizzata in ciascun soggetto. Il valore medio della costante è 0.035 ± 0.021 ed è significativamente variabile a seconda del soggetto (ICC=0.61).

7.1.2 Analisi PET: assorbimento cerebrale del tracciante.

L'attività rilevata mediante la PET si concentra prevalentemente nelle aree neocorticali e in quella limbica, con un picco di attività nella corteccia temporale e nelle strutture temporali mediali.

Una bassa attività metabolica è invece rilevata nello striato, nel talamo e nel cervelletto.

Il picco di assorbimento cerebrale si osserva tra i 10 e i 15 minuti per poi calare successivamente.

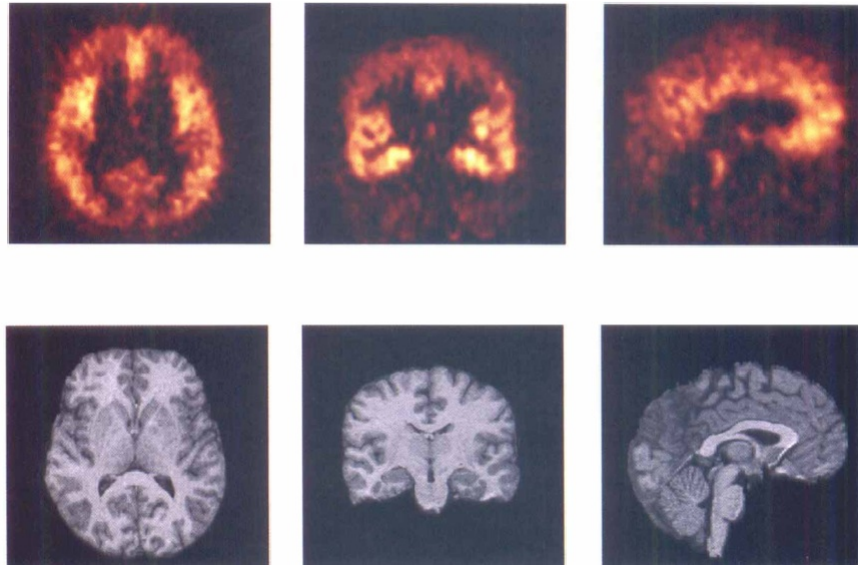


Figura 7.1.2: Distribuzione cerebrale del tracciante e struttura anatomica di riferimento. L'attività è concentrata nella zona neocorticale e limbica e si abbassa nello striato, nel talamo e nel cervelletto. La distribuzione corrisponde alla localizzazione dei recettori della serotonina 5 – HT_{1A} .

7.2 Basi generali del confronto tra i metodi

Prima di procedere ad una trattazione dettagliata e comparativa dei metodi utilizzati per dedurre le stime parametriche nel nostro esperimento, facciamo chiarezza sui rapporti metodi/modelli/misurazioni deducibili e sui criteri con i quali, nei prossimi paragrafi, verranno poi discusse le varie strategie di analisi.

# e descrizione del metodo	Modello #	Descrizione del modello	Misurazioni parametriche ottenibili
1) Analisi cinetica con input arteriale	1A	Modello 3CM con derivazione diretta delle misurazioni (rapporto tra parametri)	$BP, \frac{k_3}{k_4}$
	1B	Modello 3CM con derivazione indiretta delle misurazioni (volumi di distribuzione)	$BP, \frac{k_3}{k_4}$
	1C	Modello a 3CM con parametro fissato e derivazione diretta delle misurazioni (rapporto tra parametri)	$BP, \frac{k_3}{k_4}$
2) Analisi grafica con input arteriale	2	Nessun modello compartimentale adottato	$BP, \frac{k_3}{k_4}$
3) Analisi cinetica con input derivato dal tessuto di riferimento	3A	Modello compartimentale a 2 tessuti (full reference tissue model FRTM)	$\frac{k_3}{k_4}$
	3B	Modello compartimentale a 1 tessuto (simplified reference model SRTM)	$\frac{k_3}{k_4}$

Tabella 7.1: Tabella dei metodi e dei modelli utilizzati con le relative misurazioni deducibili

I valori del potenziale di legame (BP) e del rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ che si ottengono sfruttando i diversi metodi sopra elencati verranno confrontati secondo 5 criteri fondamentali : tasso di successo, identificabilità, stabilità, variabilità e affidabilità.

- *tasso di successo* : viene dichiarato il fallimento dell'analisi su base cinetica se la regressione non lineare non raggiunge una convergenza dopo n iterazioni; se l'errore degli esiti misurati è superiore al 30% o se un qualunque parametro assume un valore negativo.
- *identificabilità*: l'identificabilità viene valutata a partire dall'incertezza della stima parametrica.
- *stabilità*: i dati sperimentali vengono raccolti per 120 minuti. La relazione tra il BP o il rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ e la durata della scansione viene valutata secondo la corrispondenza tra i dati raccolti in campioni di tempo crescenti e i dati raccolti sui 120 minuti. Il parametro viene considerato stabile rispetto alla durata della scansione dopo il tempo t se tutti i risultati ottenuti dal tempo t al 120esimo minuto hanno un media entro il 10% del valore di riferimento e una SD (deviazione standard) che non eccede del 15% rispetto alla media.
- *variabilità*: la TRV (test-retest variability) viene calcolata come il valore assoluto della differenza dei valori di test e quelli di retest, divisa per la media di entrambe le misure.

- *affidabilità*: le variabilità che ci proponiamo di indagare sono due : quella intrinseca del soggetto (WS) e quella che si verifica tra i soggetti (BS). Entrambe vengono calcolate ed espresse come percentuale della media. L'affidabilità delle misure è attestata dal coefficiente

$$ICC = \frac{BSMSS - WSMSS}{BSMSS + (n - 1)WSMSS}$$

dove $MSS = \sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ ossia la somma dei quadrati delle differenze tra il valore misurato e quello atteso. In particolare dunque $BSMSS$ è l' MSS riferito alle misurazioni tra i soggetti, mentre $WSMSS$ è l' MSS riferito alle misurazioni intrinseche del soggetto. Il coefficiente n indica il numero di osservazioni ripetute fatte. L' ICC stima quindi l'affidabilità delle misure e il range di valori che può assumere varia tra -1 (nessuna affidabilità, $BSMSS = 0$) e 1 (massima affidabilità - ottenuta nel caso di uguaglianza tra il test e il retest -, $WSMSS=0$).

L'analisi precisa e il confronto dei risultati ottenuti con i diversi metodi verrà proposta e trattata adeguatamente nei prossimi paragrafi.

7.3 METODO 1 : ANALISI CINETICA CON INPUT ARTERIALE

Riepiloghiamo in breve le equazioni differenziali che descrivono il modello compartimentale che viene utilizzato (CM semplificato):

$$\frac{dC_2(t)}{dt} = K_1 C_a(t) - k_2 C_2(t) - k_3 C_2(t) + k_4 C_3(t)$$

$$\frac{dC_3(t)}{dt} = k_3 C_2(t) - k_4 C_3(t)$$

con i parametri :

$$K_1 = FE = F(1 - e^{-PS/F}) \quad (mLg^{-1}min^{-1})$$

$$k_2 = K_1/V_2 f_1 \quad (min^{-1})$$

$$k_3 = k_{on} B'_{max}/V_2 \quad (min^{-1})$$

$$k_4 = k_{off} \quad (min^{-1})$$

dove F è il flusso sanguigno nella regione, E è la frazione estratta, k_{on} è la costante di associazione, B_{max} la concentrazione dei recettori disponibili per il legame e k_{off} è la costante di dissociazione. Nelle regioni di interesse possiamo derivare i volumi di distribuzione

$$V_2 = \frac{K_1}{k_2 f_1}$$

$$V_3 = \frac{K_1 k_3}{k_2 k_4 f_1} = \frac{B_{max}}{K_D}$$

$$V_T = V_2 + V_3 = \frac{K_1}{k_2 f_1} \left(1 + \frac{k_3}{k_4} \right)$$

ed esprimere poi, a differenza di quanto fatto nel capitolo 6, due versioni del binding potential, la prima in termini di volume di distribuzione del tracciante relativamente alla concentrazione plasmatica e la seconda in termini normalizzati al volume di distribuzione in una regione priva di recettori.

$$BP = \frac{K_1 k_3}{k_2 k_4} = \frac{f_1 B_{max}}{K_D}$$

$$\frac{k_3}{k_4} = \frac{V_3}{V_2} = \frac{f_2 B_{max}}{K_D}$$

7.3.1 Metodi 1A, 1B e 1C

Gli approcci utilizzati per l'analisi cinetica su input arteriale sono 3 e permettono di derivare BP e il rapporto $\frac{k_3}{k_4}$.

- Seguendo il metodo 1A, chiamato anche approccio diretto, i dati dedotti dalle regioni di interesse (ROIs) sono fittati secondo il modello compartimentale 3CM, e il BP e $\frac{k_3}{k_4}$ sono calcolati semplicemente applicando le equazioni sopra riportate con i parametri determinati dall'osservazione.
- Nel metodo 1B (definito anche metodo indiretto), ancora una volta le ROIs vengono fittate secondo il modello compartimentale 3CM, il volume di distribuzione V_T viene stimato come somma di V_2 e V_3 , mentre il potenziale di legame e il rapporto k_3/k_4 diventano

$$BP = V_{TROI} - V_{TCER}$$

$$\frac{k_3}{k_4} = \frac{BP}{V_{TCER}}$$

dove V_{TROI} e V_{TCER} sono il volume di distribuzione totale nella regione di interesse e nel cervelletto, rispettivamente.

- L'ultimo approccio, il metodo 1C, consente di fittare le ROIs secondo il modello compartimentale 3CM con il rapporto k_1/k_2 fissato. BP e k_3/k_4 vengono derivati direttamente dalle equazioni analogamente al metodo 1A.

7.3.2 Stime parametriche ottenute sfruttando i metodi 1A e 1B

I valori di V_T (distribuzione totale nelle regione di interesse) variano da $2.57 \pm 0.78 \text{ mL g}^{-1}$ nel nucleo del rafe dorsale, sino a $7.83 \pm 2.13 \text{ mL g}^{-1}$ nella corteccia entorinale; i valori di V_2 sono strettamente correlati con i valori di V_T e molto diversi in base alla regione considerata, da circa $0.29 \pm 0.05 \text{ mL g}^{-1}$ (DRN) a $0.81 \pm 0.08 \text{ mL g}^{-1}$ (ENT). Il problema principale è che una così marcata differenza non è fisiologicamente accettabile e dunque l'analisi di questi risultati indica che l'approccio diretto (metodo 1A) provoca una sottostima del volume di distribuzione dei compartimenti.

Un errore di questo genere ha un impatto minimo sulla stima del potenziale di legame BP , che risulta, secondo il metodo 1A, $10 \pm 7\%$ più alto rispetto a quello ottenuto sfruttando il metodo 1B. D'altra parte, però, le sottostime dei volumi di distribuzione, influiscono fortemente sul calcolo del rapporto k_3/k_4 .

Il rapporto di tali parametri risulta infatti maggiore del $205 \pm 48\%$ nel caso del metodo 1A rispetto a quanto si ottiene mediante il metodo 1B.

Una differenza di questo tipo è dovuta al fatto che il volume di distribuzione V_2 appare al denominatore nel calcolo del rapporto k_3/k_4 , mentre come termine di sottrazione nel calcolo del potenziale di legame BP .

A partire da queste considerazioni si conclude che il metodo 1A non è appropriato e ottimale per le stime dei parametri recettoriali generando dei risultati fisiologicamente improbabili.

Per derivare BP e k_3/k_4 si utilizza dunque l'approccio indiretto (metodo 1B).

Analisi diretta (Metodo 1A)				
Regione	$V_T \text{ (MLg}^{-1}\text{)}$	$V_2 \text{ (mLg}^{-1}\text{)}$	$BP \text{ (mLg}^{-1}\text{)}$	k_3/k_4
DLPFC	4.05 ± 1.16	0.45 ± 0.06	3.60 ± 1.10	7.98 ± 1.39
MPFC	4.57 ± 1.30	0.47 ± 0.09	4.10 ± 1.22	8.71 ± 1.31
AMY	5.14 ± 1.75	0.50 ± 0.02	4.41 ± 1.41	9.05 ± 2.68
HIP	5.47 ± 2.52	0.46 ± 0.02	4.82 ± 2.44	10.48 ± 5.05
ENT	7.83 ± 2.13	0.81 ± 0.08	7.02 ± 2.06	8.69 ± 1.84
INS	6.78 ± 1.93	0.55 ± 0.14	6.23 ± 1.81	11.59 ± 1.85
DRN	2.57 ± 0.78	0.29 ± 0.05	2.29 ± 0.73	8.19 ± 1.37
CER	0.89 ± 0.27			

Tabella 7.2: Tabella parametri stimati con metodo 1A. Si vede come il parametro V_2 sia soggetto ad una grande differenza a seconda della regione considerata. Risultati di questo tipo sono fisiologicamente inaccettabili. Si deduce dunque che il metodo 1A non è quello ottimale per la stima parametrica.

Analisi indiretta (Metodo 1B)			
Regione	$V_2 (mLg^{-1})$	$BP (mLg^{-1})$	k_3/k_4
DLPFC	0.89 ± 0.27	3.15 ± 0.95	3.64 ± 0.79
MPFC	0.89 ± 0.27	3.68 ± 1.08	4.24 ± 0.87
AMY	0.89 ± 0.27	4.38 ± 2.32	4.77 ± 1.67
HIP	0.89 ± 0.27	4.82 ± 2.44	4.16 ± 2.64
ENT	0.89 ± 0.27	6.85 ± 1.94	7.09 ± 1.20
INS	0.89 ± 0.27	5.88 ± 1.71	6.76 ± 1.36
DRN	0.89 ± 0.27	1.87 ± 0.53	2.40 ± 0.44
CER			

Tabella 7.3: Tabella parametri stimati con metodo 1B. Si ottengono risultati comparabili in termini di volume di distribuzione compartimentale. L'approccio indiretto è quindi migliore, rispetto a quello diretto, per la stima di BP e di $\frac{k_3}{k_4}$, generando risultati plausibili.

7.3.3 Stime parametriche ottenute utilizzando il metodo 1C

I risultati dell'utilizzo del metodo 1C, sono riportati integralmente e dettagliatamente in tabella. Come si può notare k_1 varia da $0.044 \pm 0.004 mL g^{-1} min^{-1}$ nel nucleo dorsale del rafe (DRN) fino a $0.104 \pm 0.016 mL g^{-1} min^{-1}$ nell'insula. Le differenze tra le varie regioni dunque sono evidenti e dipendono anche dalla differenza di flusso sanguigno che si registra.

I valori di k_3 variano da $0.056 \pm 0.020 min^{-1}$ (DRN) a $0.120 \pm 0.040 min^{-1}$ nell'insula e sono anch'essi notevolmente differenti in base alla regione considerata, poichè il parametro dipende fortemente dalla concentrazione di recettori B_{max} , che è significativamente differente a seconda della regione considerata.

D'altra parte k_4 e k_{off} non subiscono variazioni notevoli a seconda della regione considerata ed i valori di BP e k_3/k_4 non differiscono granchè da quelli rilevati con il metodo 1B.

Analisi (Metodo 1C)				
Regione	$k_1(mLg^{-1}min^{-1})$	$k_2(min^{-1})$	$k_3(min^{-1})$	$k_4(min^{-1})$
DLPFC	0.082 ± 0.018	0.098 ± 0.018	0.079 ± 0.007	0.022 ± 0.003
MPFC	0.088 ± 0.019	0.104 ± 0.019	0.086 ± 0.008	0.020 ± 0.003
AMY	0.070 ± 0.011	0.090 ± 0.011	0.088 ± 0.024	0.020 ± 0.05
HIP	0.080 ± 0.019	0.104 ± 0.019	0.088 ± 0.041	0.018 ± 0.006
ENT	0.082 ± 0.006	0.088 ± 0.006	0.134 ± 0.030	0.020 ± 0.007
INS	0.104 ± 0.016	0.125 ± 0.016	0.107 ± 0.025	0.016 ± 0.005
DRN	0.044 ± 0.004	0.062 ± 0.004	0.056 ± 0.020	0.021 ± 0.006

Analisi cinetica (Metodo 1C)			
Regione	$V_T(mLg^{-1})$	$BP(mLg^{-1})$	k_3/k_4
DLPFC	4.14 ± 1.19	3.25 ± 0.97	3.75 ± 0.84
MPFC	4.68 ± 1.33	3.79 ± 1.12	4.37 ± 0.91
AMY	5.05 ± 1.56	4.53 ± 1.94	5.71 ± 2.42
HIP	5.46 ± 2.53	4.87 ± 2.60	6.14 ± 3.29
ENT	7.89 ± 2.19	6.91 ± 1.99	7.14 ± 1.24
INS	6.99 ± 2.07	6.10 ± 1.85	6.99 ± 1.47
DRN	2.75 ± 0.65	1.99 ± 0.49	2.65 ± 0.24

Tabella 7.4: Tabella parametri stimati con il metodo 1C. BP e $\frac{k_3}{k_4}$ sono simili a quelli rilevati dall'approccio indiretto, mentre i rimanenti parametri (escluso k_4) sono significativamente differenti a seconda della regione considerata. Ciò è dovuto alla differente concentrazione recettoriale che si registra nelle varie zone cerebrali.

7.3.4 Discussione su identificabilità, stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti dai metodi 1A, 1B, 1C

Procediamo ora a discutere identificabilità, stabilità e riproducibilità per i dati stimati con questi approcci.

- Identificabilità.
 1. L'identificabilità del volume di distribuzione V_T con il metodo 1B è ottimale, con un errore medio di $4.1 \pm 3.2\%$ che aumenta a $5.9 \pm 3.7\%$ se consideriamo il metodo 1C, che ha quindi un'identificabilità leggermente inferiore.
 2. Il potenziale di legame BP è soggetto ad un errore medio di $7.37 \pm 5.16\%$ con il metodo 1C e si mantiene inferiore al 10% in tutte le regioni, eccetto nel DRN.
 3. L'identificabilità del rapporto k_3/k_4 è simile a quella del BP , con un errore medio di $7.91 \pm 5.42\%$ che non supera mai il 10%, eccezion fatta per il DRN.
- Stabilità nel tempo.

BP time stability (min)			
Regione	Analisi cinetica	Analisi cinetica	Analisi grafica
	Metodo 1B	Metodo 1C	Metodo 2
DLPFC	50	80	60
MPFC	70	80	70
OFC	80	90	80
ACC	60	80	60
SGPFC	100	100	70
TC	50	80	70
PC	50	100	50
OC	50	100	60
AMY	100	90	80
UNC	120*	120*	80
HIP	90	110	120*
ENT	80	80	90
PHG	80	100	100
INS	50	80	70
DRN	110	120*	120*
<i>media ± sd</i>	76 ± 24	94 ± 15	79 ± 21

Tabella 7.5: BP time-stability table

k_3/k_4 time stability (min)				
Regione	Analisi cinetica	Analisi cinetica	Analisi grafica	Analisi SRTM
	Metodo 1B	Metodo 1C	Metodo 2	Metodo 3B
DLPFC	70	80	70	80
MPFC	70	80	70	80
OFC	80	90	80	60
ACC	70	80	70	80
SGPFC	100	100	80	70
TC	60	80	80	90
PC	60	100	70	70
OC	60	100	50	70
AMY	100	90	80	90
UNC	120*	100	80	90
HIP	100	110	90	90
ENT	79	80	90	90
PHG	70	90	100	90
INS	50	100	70	90
DRN	110	120*	120*	110
<i>media ± sd</i>	79 ± 21	93 ± 12	80 ± 16	83 ± 12

Tabella 7.6: k_3/k_4 time-stability table

Il tempo minimo di scansione richiesto per ottenere delle misure stabili di BP per i metodi 1B e 1C è presentato nella tabella soprastante. Il tempo medio per ottenere un BP stabile è 76 ± 24 minuti per il metodo B e 94 ± 15 minuti nel caso del metodo C. Risultati simili ai precedenti si ottengono per il rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ con un tempo medio di scansione richiesto pari a 79 ± 21 minuti e 93 ± 12 minuti rispettivamente per i metodi 1B e 1C.

Una differenza di questa entità, per ciò che riguarda il tempo medio richiesto per ottenere risultati stabili nel tempo, indica chiaramente l'alta vulnerabilità del metodo 1C se utilizzato su tempi di scansione più brevi di 90 minuti e ci conduce a ritenere ottimale la scelta del metodo 1B per ottenere i risultati su tempi di scansione inferiori ai 120 minuti.

- Riproducibilità.

La riproducibilità dei parametri BP e $\frac{k_3}{k_4}$ secondo il metodo 1B è presentata in tabella. Gli effetti principali sulla riproducibilità dei parametri derivano da due fattori decisivi: ciò che viene misurato (BP o $\frac{k_3}{k_4}$) e la regione considerata. La TRV di BP e di $\frac{k_3}{k_4}$ è significativamente differente e si attesta sul $14 \pm 6\%$ nel caso del BP e sul $20 \pm 6\%$ per quanto riguarda $\frac{k_3}{k_4}$. Il coefficiente

ICC (affidabilità) del BP (pari a 0.84 ± 0.14) è notevolmente migliore rispetto a quello di $\frac{k_3}{k_4}$ (0.53 ± 0.33). In generale i risultati ottenuti nelle estese regioni corticali (ad esempio la corteccia temporale) sono di gran lunga più riproducibili rispetto a quelli ottenuti considerando le regioni più piccole (come le piccole aree limbiche). Il DRN è invece la regione con la più bassa riproducibilità con un coefficiente di ICC relativo al rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ negativo ($ICC = -0.24$), che indica che si individuano maggiormente differenze di misurazione nello stesso soggetto che tra i soggetti. In definitiva, inoltre, non si riscontrano particolari differenze in termini di TRV tra le misure ottenute secondo il metodo 1B e di quelle rilevate dall'utilizzo del metodo 1C. Tali metodi producono esiti simili affetti da un margine di variabilità simile.

BP (Analisi cinetica metodo 1B)					
Regione	Media	BS STD (%CV)	WS STD (%CV)	VAR±SD %	ICC
DLPFC	3.15	0.95 (30)	0.14 (4)	9 ± 5	0.96
MPFC	3.68	1.08 (29)	0.15 (4)	8 ± 8	0.96
OFC	2.94	0.76 (26)	0.24 (8)	15 ± 13	0.81
ACC	4.27	1.27 (30)	0.23 (5)	11 ± 6	0.94
SGPFC	4.39	1.45 (33)	0.54 (12)	18 ± 10	0.76
TC	5.18	1.50 (29)	0.25 (5)	6 ± 10	0.95
PC	3.09	0.82 (27)	0.20 (6)	11 ± 10	0.89
OC	2.55	0.56 (22)	0.14 (5)	10 ± 6	0.89
AMY	4.02	1.27 (32)	0.58 (14)	25 ± 17	0.66
UNC	5.71	1.23 (22)	0.43 (7)	14 ± 8	0.79
HIP	4.38	2.32 (53)	0.73 (17)	21 ± 19	0.82
ENT	6.85	1.94 (28)	0.57 (8)	12 ± 12	0.84
PHG	5.52	1.80 (33)	0.43 (8)	13 ± 11	0.89
INS	5.88	1.71 (29)	0.25 (4)	9 ± 5	0.96
DRN	1.87	0.53 (28)	0.33(18)	21 ± 22	0.44
<i>media ± sd</i>				14 ± 6	0.84 ± 0.14

Tabella 7.7: Valori della riproducibilità del parametro BP ottenuti con il metodo 1B nella singola regione stimati con media e deviazione standard misurati due volte sui 5 soggetti, eccetto per AMY, HIP e ENT (4 soggetti) e DRN (3 soggetti)

k_3/k_4 (Analisi cinetica metodo 1B)					
Regione	Media	BS STD (%CV)	WS STD (%CV)	VAR±SD %	ICC
DLPFC	3.64	0.79 (22)	0.41 (11)	19 ± 14	0.58
MPFC	4.24	0.87 (20)	0.46 (11)	17 ± 14	0.56
OFC	3.43	0.72 (21)	0.42 (12)	23 ± 20	0.49
ACC	4.89	0.96 (20)	0.49 (10)	16 ± 10	0.58
SGPFC	5.05	1.46 (29)	0.57 (11)	23 ± 11	0.74
TC	5.94	0.83 (14)	0.52 (9)	15 ± 12	0.43
PC	3.59	0.81 (22)	0.36 (10)	16 ± 14	0.67
OC	2.96	0.43 (14)	0.24 (8)	15 ± 8	0.53
AMY	4.77	1.67 (35)	0.59 (12)	25 ± 18	0.78
UNC	6.59	0.99 (15)	0.29 (4)	8 ± 4	0.84
HIP	5.16	2.64 (51)	0.78 (15)	30 ± 24	0.84
ENT	7.09	1.20 (17)	0.85 (12)	21 ± 14	0.33
PHG	6.35	1.18 (19)	1.03 (16)	25 ± 13	0.14
INS	6.76	1.36 (20)	0.63 (9)	16 ± 8	0.65
DRN	2.40	0.44 (18)	0.56 (23)	29 ± 30	-0.24
<i>media ± sd</i>				20 ± 6	0.53 ± 0.28

Tabella 7.8: Valori della riproducibilità del parametro k_3/k_4 ottenuti con il metodo 1B nella singola regione stimati con media e deviazione standard misurati due volte sui 5 soggetti, eccetto per AMY, HIP e ENT (4 soggetti) e DRN (3 soggetti)

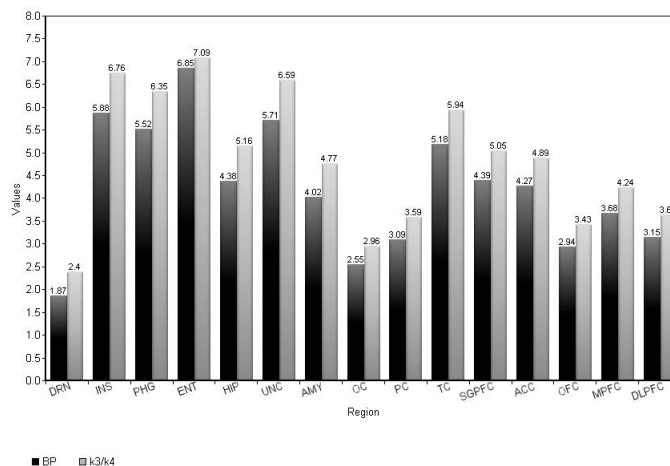


Figura 7.3.1: Istogramma di riferimento che riporta i valori di media di BP e del rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ per le varie regioni cerebrali considerate secondo il metodo 1B

7.3.5 Analisi della regione di riferimento: cervelletto.

Le curve di tempo-attività vengono graficate sia secondo il modello a due compartimenti (2CM) che secondo quello a tre compartimenti (3CM) e i risultati ottenuti nei due casi vengono poi confrontati secondo criteri quali la bontà del fit, l'identificabilità, la stabilità nel tempo, la TRV e l'ICC.

Il volume V_T del cervelletto risulta $0.64 \pm 0.14 \text{ mL g}^{-1}$ misurato secondo il 2CM, mentre sfruttando il modello 3CM si ottiene $V_T = 0.89 \pm 0.27 \text{ mL g}^{-1}$, ossia V_T è del $39 \pm 23\%$ più grande se misurato secondo il modello 3CM.

Confrontando infine, secondo i criteri sopra riportati, i risultati ottenuti nei due casi si ottiene quanto segue:

- **bontà del fit.** In tutti i soggetti il fit è migliore se viene utilizzato il modello a 3 compartimenti.
- **identificabilità di V_T .** L'identificabilità del volume di cervelletto V_T derivata secondo il modello 2CM è nettamente inferiore rispetto a quella ottenuto mediante l'analisi del modello 3CM.
- **stabilità nel tempo.** La stabilità non risulta compromessa nè nel caso si utilizzi il modello 2CM nè in quello 3CM; entrambe le analisi su data sets maggiori di 25 minuti (nel caso del 2CM) o di 45 minuti (nel caso del 3CM) generano valori di V_T caratterizzati da una media entro il 10% del valore di riferimento ottenuto nei 120 minuti di esperimento.
- **affidabilità (TRV e ICC).** L'affidabilità dell'esperimento condotto secondo il modello 3CM ($TRV = 21 \pm 9\%$, $ICC = 0.77$) è superiore rispetto a quella ottenibile dal modello 2CM ($TRV = 19 \pm 19\%$, $ICC = -0.47$).

Quanto osservato fino ad ora, dunque, suggerisce che il modello 3CM è da preferire per derivare il valore del volume V_T del cervelletto.

7.4 METODO GRAFICO: LOGAN (METODO 2).

Come precedentemente descritto nel capitolo apposito ricordiamo che il metodo grafico si basa sull'analisi dell'attività regionale in accordo con la seguente equazione

$$\frac{\int_0^t C_{ROI}(t)dt}{C_{ROI}(t)} = a \frac{\int_0^t C_a(t)dt}{C_{ROI}(t)} + b$$

dove a (pendenza) e b (intercetta) sono individuati dalla regressione lineare.

7.4.1 Stime nelle regioni di interesse (ROI).

I risultati ottenuti sono presentati nelle tabelle 7.8 e 7.9 e sono simili a quanto già precedentemente osservato sfruttando il metodo 1B, ma sottostimati, in questo caso, del circa $5 \pm 9\%$.

Una stima erronea si manifesta soprattutto nelle regioni più piccole e con i dati acquisiti più compromessi dal rumore.

Il rapporto $\frac{k_3}{k_4}$, invece, non differisce in maniera significativa da quanto ottenuto con l'approccio indiretto (metodo 1B).

7.4.2 Discussione su stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti con il metodo grafico

- Stabilità nel tempo

Dai dati raccolti si osserva che il tempo medio minimo di scan per ottenere una misura stabile di BP è di 79 ± 21 minuti, un tempo non molto diverso da quello ottenuto con il metodo 1B, ma significativamente inferiore a quanto stimato nel caso 1C.

Risultati simili si ottengono per la stima stabile di $\frac{k_3}{k_4}$ che richiede un tempo medio minimo di scan di 80 ± 16 minuti.

I dati sono presentati nelle tabelle 7.4 e 7.5.

- Riproducibilità

La riproducibilità di BP e $\frac{k_3}{k_4}$ in base alle regioni considerate è riportata in tabella. La TRV di BP

e di $\frac{k_3}{k_4}$ è rispettivamente di $15 \pm 8\%$ e $20 \pm 5\%$, significativamente differenti. La stessa differenza si osserva quando si determina il coefficiente ICC ($ICC_{BP} = 0.84 \pm 0.19$, $ICC_{k3/k4} = 0.47 \pm 0.38$): l' ICC_{BP} risulta essere migliore rispetto all' $ICC_{k3/k4}$.

Per quanto riguarda la variabilità test-retest, confrontando l'analisi grafica e il metodo 1B, TRV_{BP} , $TRV_{k3/k4}$ e analogamente i coefficienti ICC_{BP} e $ICC_{k3/k4}$ hanno valori simili.

BP (Analisi cinetica metodo 2)					
Regione	Media	BS STD (%CV)	WS STD (%CV)	VAR \pm SD %	ICC
DLPFC	3.17	1.03 (32)	0.14 (4)	9 \pm 4	0.97
MPFC	3.67	1.16 (32)	0.18 (5)	10 \pm 9	0.96
OFC	2.81	0.95 (34)	0.31 (11)	23 \pm 17	0.81
ACC	4.19	1.28 (31)	0.27 (6)	11 \pm 7	0.92
SGPFC	4.07	1.31 (32)	0.47 (12)	16 \pm 11	0.77
TC	5.14	1.61 (31)	0.25 (5)	6 \pm 10	0.95
PC	3.10	0.86 (28)	0.21 (7)	12 \pm 10	0.89
OC	2.56	0.64 (25)	0.13 (5)	9 \pm 7	0.92
AMY	3.61	1.44 (40)	0.37 (10)	13 \pm 11	0.87
UNC	5.32	1.34 (25)	0.50 (9)	18 \pm 12	0.76
HIP	4.01	2.12 (53)	0.61 (15)	26 \pm 11	0.85
ENT	5.85	1.92 (33)	0.60 (10)	17 \pm 11	0.82
PHG	5.13	1.90 (37)	0.43 (8)	11 \pm 9	0.90
INS	5.61	1.62 (29)	0.24 (4)	8 \pm 5	0.96
DRN	1.24	0.30 (24)	0.25 (20)	36 \pm 14	0.19
<i>media \pm sd</i>				15 \pm 8	0.84 \pm 0.19

Tabella 7.9: Valori della riproducibilità del parametro BP ottenuti con il metodo grafico nella singola regione stimati con media e deviazione standard misurati due volte sui 5 soggetti, eccetto per AMY, HIP e ENT (4 soggetti) e DRN (3 soggetti)

k_3/k_4 (Analisi cinetica metodo 2)					
Regione	Media	BS STD (%CV)	WS STD (%CV)	VAR±SD %	ICC
DLPFC	3.78	0.82 (22)	0.41 (11)	18 ± 13	0.60
MPFC	4.38	0.86 (20)	0.49 (11)	18 ± 16	0.51
OFC	3.33	0.65 (19)	0.41 (12)	24 ± 23	0.42
ACC	4.98	0.90 (18)	0.57 (11)	18 ± 11	0.43
SGPFC	4.86	1.20 (25)	0.65 (13)	25 ± 16	0.54
TC	6.11	0.91 (15)	0.55 (9)	16 ± 11	0.46
PC	3.74	0.81 (22)	0.36 (9)	16 ± 11	0.68
OC	3.07	0.35 (12)	0.24 (8)	14 ± 7	0.38
AMY	4.36	1.37 (31)	0.39 (9)	18 ± 13	0.85
UNC	6.38	1.15 (18)	0.43 (7)	9 ± 10	0.75
HIP	4.95	2.43 (49)	0.61 (12)	28 ± 23	0.88
ENT	6.87	0.93 (14)	0.75 (11)	17 ± 12	0.22
PHG	6.04	0.94 (16)	0.80 (13)	25 ± 8	0.16
INS	6.68	0.98 (15)	0.69 (10)	17 ± 10	0.34
DRN	1.65	0.32 (19)	0.39 (23)	37 ± 38	-0.19
<i>media ± sd</i>				20 ± 7	0.47 ± 0.28

Tabella 7.10: Valori della riproducibilità del parametro k_3/k_4 ottenuti con il metodo grafico nella singola regione stimati con media e deviazione standard misurati due volte sui 5 soggetti, eccetto per AMY, HIP e ENT (4 soggetti) e DRN (3 soggetti)

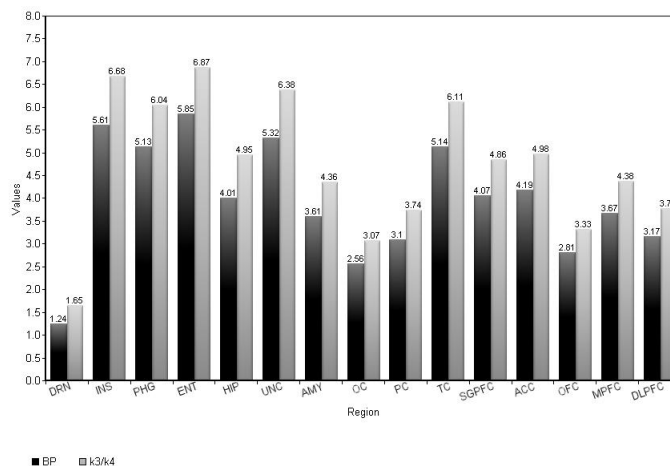


Figura 7.4.1: Istogramma di riferimento che riporta i valori medi di BP e del rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ per le varie regioni cerebrali considerate secondo il metodo grafico

7.4.3 Analisi della regione di riferimento: cervelletto.

Con il metodo grafico di Logan la linearità del tracciato si ottiene dopo un tempo stimato tra i 5 e i 10 minuti e si osserva poi una regressione lineare sino al 120esimo minuto.

Il risultato della distribuzione di volume V_T che si ottiene con il metodo di Logan è molto simile a quanto stimato con il modello compartimentale 3CM e si attesta su $0.85 \pm 0.21 \text{ mL g}^{-1}$ che rimane comunque molto superiore a quanto derivato dal modello 2CM ($0.64 \pm 0.14 \text{ mL g}^{-1}$).

L'osservazione che per l'analisi grafica non ci si basa su alcuna configurazione compartimentale e la somiglianza dei valori di V_T ottenuti secondo il metodo grafico e secondo il modello 3CM ci spinge a ritenere che il modello 3CM sia ottimale per la descrizione cinetica nel cervelletto.

A sostegno di ciò si nota anche che i parametri TRV e ICC stimati con il metodo grafico e in precedenza con il modello 3CM sono identici

($TRV = 21 \pm 9\%$, $ICC = 0.77$).

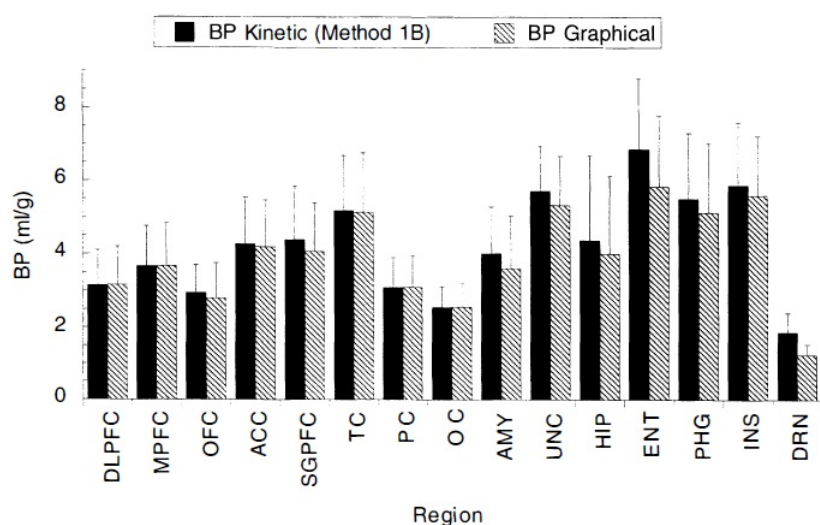


Figura 7.4.2: Istogramma di confronto tra i valori di BP ottenuti nelle 15 regioni di interesse con il metodo 1B ed il metodo 2 (grafico).

I valori sono stati ottenuti utilizzando la funzione di input arteriale.

7.5 METODO 3: ANALISI CINETICA CON INPUT DERIVATO DALLA REGIONE DI RIFERIMENTO.

Per semplificare la comprensione dei risultati che andremo qui a esporre rielaboriamo quanto precedentemente spiegato nell'apposito paragrafo sui modelli di descrizione compartimentale.

Si andranno dunque a riprendere i concetti di modello con tessuto di riferimento, che d'ora in poi indicheremo con la sigla FRTM (metodo 3A) e di modello semplificato con tessuto di riferimento SRTM (metodo 3B) che sono importanti per eliminare l'invasività della misura arteriale. Modelli di questo tipo utilizzano come termine di paragone una regione di riferimento con un potenziale di legame bassissimo o inesistente.

7.5.1 FRTM (Full reference tissue model - metodo 3A).

Il FRTM è il modello compartimentale base per i metodi che sfruttano le regioni di riferimento per la stima del potenziale di legame.

I parametri R_1 (rapporto fra i k_1 della regione di interesse e di quella di riferimento), k_2 , k_3 , BP e k_3/k_4 possono essere stimati utilizzando un fit non lineare. Questo metodo ha un importante vantaggio rispetto al metodo grafico di Logan: non è infatti necessario attendere alcuna situazione di equilibrio per la stima parametrica.

7.5.1.1 Discussione su stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti con il metodo FRTM

Il metodo completo ha una percentuale di fallimento nella stima di k_3/k_4 del 38% con il 15% dei casi che in cui si verifica la non convergenza, l'11% converge con valori negativi di R_1 e il 12% converge con valori positivi di R_1 ma un errore in k_3/k_4 che supera il 30%.

Considerato l'elevata percentuale di errore, il metodo suddetto viene accantonato.

Ci rimane quindi da valutare il SRTM.

7.5.2 SRTM (Simplified reference tissue model - metodo 3B).

Il modello semplificato con regione di riferimento viene utilizzato quando la cinetica del tracciante nel tessuto può essere descritta in maniera ragionevole con un modello a due compartimenti. La stima parametrica può essere risolta non solamente non-linearmente, ma anche utilizzando metodi lineari o approcci di base.

7.5.2.1 Discussione su stabilità e riproducibilità sui risultati ottenuti con il metodo SRTM (Simplified tissue model - 3B)

- Identificabilità

Contrariamente a quanto osservato nel caso FRTM il modello semplificato permette di stimare con sufficiente precisione il rapporto k_3/k_4 . R_1 è pari a 1.04 ± 0.21 ed è mediamente superiore del $44 \pm 20\%$ rispetto ai valori ottenuti secondo il modello 1C con input arteriale.

I valori regionali medi di k_3/k_4 sono riportati nella tabella 7.11.

Dall'analisi dei risultati è possibile notare che i rapporti k_3/k_4 sono ben identificati e strettamente correlati con i valori ottenuti dal metodo 1B anche se inferiori di circa $17 \pm 8\%$.

Il SRTM sottostima il rapporto k_3/k_4 maggiormente nelle regioni con un'alta densità di recettori $5 - HT_{1A}$ piuttosto che in quelle con una bassa densità recettoriale.

- Stabilità nel tempo.

La durata media della scansione necessaria ad ottenere un valore k_3/k_4 stabile è di 83 ± 12 minuti, non molto differente da quanto richiesto dal metodo 1B (79 ± 12 minuti) o da quello grafico (80 ± 16 minuti), ma decisamente inferiore a quanto osservato con il metodo 1C (93 ± 12 minuti). Con una scansione di un'ora il parametro k_3/k_4 viene sottostimato di circa il $14 \pm 16\%$.

- Riproducibilità

La riproducibilità di k_3/k_4 secondo il metodo 3B è simile a quanto ottenuto dal metodo 1B e dal metodo 2.

k_3/k_4 (Analisi cinetica metodo 3B)					
		BS STD	WS STD	VAR±SD	
Regione	Media	(%CV)	(%CV)	%	ICC
DLPFC	3.17	0.68 (21)	0.34 (11)	19 ± 13	0.59
MPFC	3.64	0.70 (19)	0.36 (10)	17 ± 17	0.58
OFC	2.88	0.50 (17)	0.33 (11)	21 ± 22	0.40
ACC	4.20	0.73 (17)	0.38 (9)	15 ± 9	0.58
SGPFC	4.14	0.97 (23)	0.41 (10)	20 ± 10	0.69
TC	4.75	0.72 (15)	0.37 (8)	14 ± 11	0.58
PC	3.22	0.72 (22)	0.29 (9)	15 ± 12	0.72
OC	2.71	0.41 (15)	0.19 (7)	13 ± 5	0.66
AMY	3.83	1.14 (30)	0.34 (9)	19 ± 15	0.83
UNC	4.93	0.79 (16)	0.23 (5)	9 ± 5	0.85
HIP	4.24	1.98 (47)	0.54 (13)	26 ± 21	0.86
ENT	5.18	0.74 (14)	0.60 (12)	20 ± 13	0.21
PHG	4.85	0.86 (18)	0.58 (12)	21 ± 8	0.37
INS	5.45	0.98 (18)	0.51 (9)	16 ± 8	0.57
DRN	2.33	0.54 (23)	0.69 (30)	44 ± 34	-0.25
<i>media ± sd</i>				21.9 ± 8	0.55 ± 0.29

Tabella 7.11: Valori medi del rapporto $\frac{k_3}{k_4}$ e valori della riproducibilità ottenuti con il metodo 3B nella singola regione stimati con media e deviazione standard misurati due volte sui 5 soggetti, eccetto per AMY, HIP e ENT (4 soggetti) e DRN (3 soggetti)

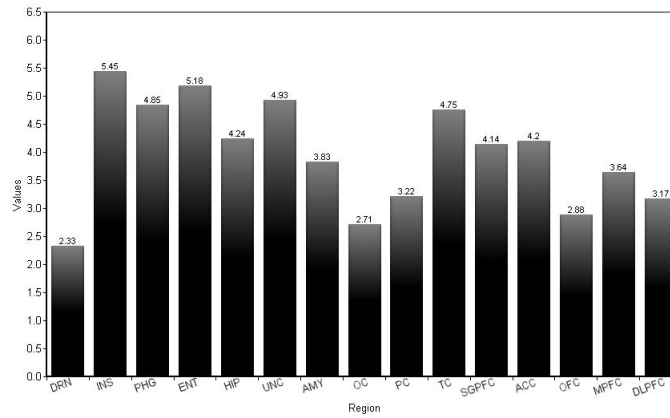


Figura 7.5.1: Istogramma relativo ai valori medi di $\frac{k_3}{k_4}$ ottenuti con il metodo 3B

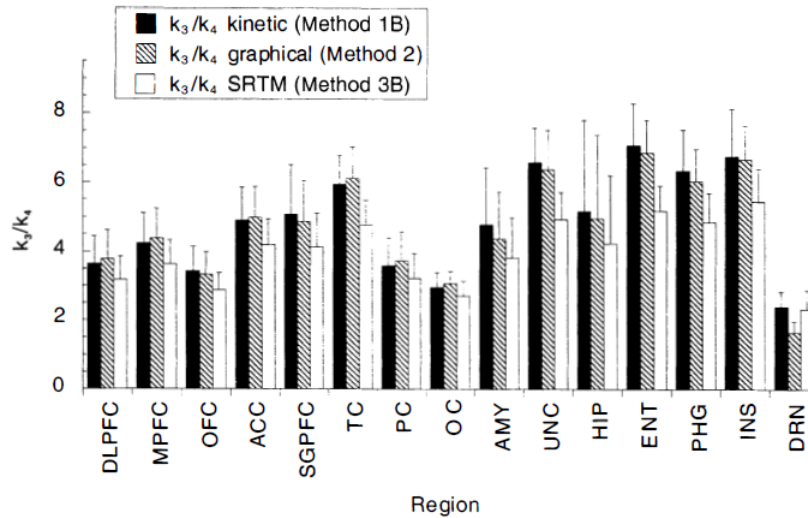


Figura 7.5.2: Confronto tra i valori del rapporto k_3/k_4 ottenuti secondo i metodi 1B, 2 e 3B. I valori ottenuti attraverso il metodo grafico sono simili a quelli ottenuti con il metodo 1C, fatta eccezione per le regioni piccole molte soggette al rumore (es. DRN). Il rapporto determinato attraverso il metodo 3B è significativamente inferiore rispetto a quanto ritrovato con il metodo 1C e tale discrepanza è maggiore nelle regioni ad alta densità di recettori, indipendentemente dal rumore

Capitolo 8

CONCLUSIONE E DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Lo scopo della trattazione è quello di valutare e confrontare le strategie di analisi dei dati per dedurre i parametri recettoriali dopo l'iniezione di una dose singola di [^{14}C]WAY 100635.

Per garantire una panoramica completa e più corretta possibile i dati sono rilevati su input arteriale e scansione di lunga durata e gli esperimenti vengono ripetuti più volte per stabilirne la riproducibilità.

8.1 Esiti delle misurazioni, modelli e metodi.

Misurazioni indipendenti della densità recettoriale ($Bmax$) e dell'affinità ($\frac{1}{KD}$) non è possibile determinarle a partire da esperimenti condotti sul tracciante. Esperimenti di questo genere permettono di ottenere il parametro BP , pari al rapporto tra $Bmax$ e KD , che rappresenta il rapporto all'equilibrio tra il legato specifico e il radiotracciante libero.

È importante sottolineare, però, che il radiotracciante libero è solamente una frazione della concentrazione totale presente nel plasma (f_1) o in una regione cerebrale priva di recettori (f_2).

In virtù di ciò, quando esprimiamo il potenziale di legame relativo alla concentrazione plasmatica di tracciante ci riferiremo a $BP = \frac{f_1 Bmax}{KD}$. Viceversa, quando esprimeremo il potenziale di legame relativo al tessuto cerebrale in una regione priva di recettori, $BP = \frac{f_2 Bmax}{KD} = \frac{k_3}{k_4}$.

Nel nostro caso dunque

$$BP = \frac{f_1 Bmax}{KD}$$

e

$$\frac{k_3}{k_4} = \frac{f_2 Bmax}{KD}$$

Entrambe i risultati sono comunque potenzialmente faziosi, il primo a causa della possibile differenza di legame con le proteine del plasma (f_1), mentre il secondo per le possibili differenze di legame con il tessuto di riferimento (f_2).

A partire da questi presupposti sono comunque stati utilizzati tre metodi differenti per valutare i suddetti parametri.

- Il metodo 1 è il più completo e si basa sull'analisi dell'assorbimento cerebrale a partire dalla misurazione della funzione di input arteriale. Questo metodo considera un modello compartimentale e permette di calcolare le costanti che regolano il trasferimento del tracciante tra i compartimenti e i volumi di distribuzione nei compartimenti stessi.
- Il metodo 2 ed il metodo 3 discendono matematicamente dal precedente. L'analisi grafica (metodo 2) viene introdotta da Logan partendo dal presupposto che non è necessaria, per la stima dei parametri, una configurazione compartimentale ben precisa. Il metodo 3, basato sul tessuto di riferimento, è invece stato sviluppato per la prima volta per sopperire ai casi di mancata rilevazione della funzione di input arteriale. Come nel caso del metodo grafico, il modello con il tessuto di riferimento deriva matematicamente dal modello 1.

In un mondo ideale, privo di errori di misura, in cui i traccianti si comportano secondo un modello compartimentale preciso, i tre metodi genererebbero risultati e stime parametriche simili, ma nella realtà la scelta del metodo per l'analisi dei dati è decisamente importante.

Vediamo subito alcuni criteri e alcune considerazioni che portano a decretare il metodo da utilizzare. Prima di tutto è importante notare che, mentre i metodi 1 e 2 consentono di derivare e confrontare entrambi i parametri BP e k_3/k_4 , il metodo 3 stima solamente quest'ultimo rapporto.

Altre osservazioni che conducono alla scelta del metodo principe relativamente al caso che si sta considerando sono:

- percentuale di successo : anche se ci si aspetta che in certe situazioni un metodo possa fallire, un tasso di insuccesso troppo alto non è tollerabile;
- identificabilità : le stime devono essere soggette ad un errore ragionevolmente basso; l'identificabilità deve dunque essere accettabile;
- indipendenza dal tempo di scansione : l'esito deve essere indipendente dalla durata della scansione, perlomeno dopo un dato tempo.
- affidabilità : le stime devono essere affidabili e dunque caratterizzate da un basso TRV e da un'alto ICC.

In ultimo è importante sottolineare che i tre metodi, essendo matematicamente derivati l'uno dall'altro, dovrebbero condurre a risultati simili. Se ciò non accade è necessario individuare la ragione di queste differenze, che possono rivelare particolari suscettibilità al rumore o derivare da assunzioni erranee.

Prima di soffermare la nostra analisi nel dettaglio dei tre metodi discuteremo le difficoltà incontrate nella misurazione dell'input arteriale e della regione di riferimento con il tracciante $[^{11}\text{C}]\text{WAY 100635}$.

8.2 Misurazione della funzione plasmatica di input.

$[^{11}\text{C}]\text{WAY 100635}$ ha un metabolismo plasmatico molto rapido; circa il 90% della dose iniettata, infatti, viene metabolizzata nei primi 10 minuti.

Questo fattore, combinato con la rapidità del decadimento del ^{11}C , rende impossibile la determinazione precisa della frazione di tracciante non metabolizzata dopo 60 minuti.

La percentuale di tracciante non metabolizzato dopo 60 minuti è estrapolata quindi graficamente come somma di un esponenziale e di una costante, in quanto se tale frazione viene assimilata alla somma di due esponenziale uno di essi reca comunque come esponente 0 e si ottiene quindi che la frazione di tracciante non metabolizzato per tempi $t \rightarrow 120$ minuti risulta costante.

Nonostante queste difficoltà la misura del $[^{11}\text{C}]\text{WAY 100635}$ nel plasma presenta una buona riproducibilità ($TRV = 7 \pm 4\%$) e un'alta affidabilità ($ICC = 0.83$).

8.3 Volume di distribuzione del cervelletto.

Poichè l'assorbimento del tracciante a livello del cervelletto è decisamente basso, l'attività di questa regione cerebrale sarà soggetta alla contaminazione dell'attività presente nel compartimento vascolare. Senza una misura di input arteriale, e una correzione per il contributo vascolare, il rapporto k_3/k_4 sarebbe sottostimato e affetto dalla differenza attività plasmatica rilevata tra i soggetti.

Poichè il contributo vascolare all'attività regionale del cervelletto è alto, ci occuperemo ora di individuare gli effetti degli errori di assunzione sul volume sanguigno in relazione alle misurazioni rilevate.

I dati acquisiti dal cervello vengono inizialmente simulati sfruttando una tipica funzione di input, con parametri standard e un volume sanguigno del 7.5%. Successivamente i dati vengono analizzati assumendo un volume del sangue pari al 5%. I valori di BP e k_3/k_4 sono rilevati 101% e 104% rispetto ai valori utilizzati per generare le curve, dunque gli errori nell'assunzione del volume sanguigno ricadono maggiormente su k_3/k_4 piuttosto che su BP .

Notiamo anche che la correzione vascolare avviene considerando l'attività plasmatica totale e non quella sanguigna.

Come osservato originariamente nei primati, e poi nell'uomo, dunque, il modello 3CM è quello più indicato per rivelare l'assorbimento del tracciante a livello del cervelletto. Confrontando i valori di V_T rilevati secondo il modello 2CM, il volume di distribuzione nel caso del modello a tre

compartimenti risulta maggiormente identificabile, equamente stabile, maggiormente riproducibile e più vicino alla approssimazione grafica.

8.4 Impatto dei metodi analitici sui parametri recettoriali.

8.4.1 Metodo 1. Analisi cinetica con input arteriale.

Nell'analisi delle regioni di interesse per calcolare BP e k_3/k_4 sono sfruttate tre strategie differenti. I metodi 1B (indiretto) e 1C producono risultati equivalenti, ma l'approccio diretto 1A causa una sottostima del volume di distribuzione V_2 che si ripercuote sulla stima di k_3/k_4 .

I valori di k_3/k_4 e di BP derivati dai metodi 1B e 1C sono molto simili a quelli dell'analisi grafica.

8.4.2 Metodo 2. Analisi grafica con funzione di input.

I valori ricavati dal metodo grafico sono leggermente più bassi del $5 \pm 9\%$ rispetto a quelli ottenuti con i metodi 1C e 1B. Nel nostro studio notiamo anche che è presente una relazione molto stretta tra il rumore della regione e la sottostima di BP che si ottiene sfruttando il metodo grafico. Questa osservazione spiega il motivo per cui il nucleo del rafe dorsale (DRN), la regione più rumorosa, è anche la regione in cui il BP è maggiormente sottostimato dall'analisi grafica rispetto a quanto determinato con il metodo C.

8.4.3 Metodo 3. Analisi cinetica con input derivante dalla regione di riferimento.

Mentre il metodo 3A porta ad un'identificazione parametrica molto povera, lo sviluppo del metodo semplificato (SRTM), in cui il secondo ed il terzo compartimento sono collassati in uno unico, è fondamentale per stimare il rapporto k_3/k_4 anche se tale parametro risulta sottostimato del $19 \pm 7\%$ rispetto ai valori dedotti con il metodo 1C e del $32 \pm 15\%$ rispetto a quanto dedotto mediante il metodo 1B.

Le cause di una sottostima così notevole sono principalmente due:

- i dati in tabella per l'SRTM non sono corretti secondo il contributo vascolare;
- i dati sono rilevati su un intervallo temporale di 90 minuti anzichè i 120 richiesti dallo studio.

Confrontando ora la retta di regressione per il parametro k_3/k_4 derivante dal metodo 3B con la retta di regressione dei metodi 1C e 1B per il medesimo parametro si nota che in entrambi i casi la pendenza è lontana dall'unità e l'intercetta è positiva. Un'osservazione di questo tipo indica che l'SRTM sottostima maggiormente il rapporto k_3/k_4 nelle regioni con alta densità recettoriale,

piuttosto che in quelle con bassa densità recettoriale e permette di individuare come la sottostima non sia un fattore di scala, ma piuttosto una costante significativa che affligge le misurazioni.

Contrariamente a quanto trattato nel caso della sottostima del potenziale di legame del metodo grafico, in questo caso la sottostima di k_3/k_4 non è un fenomeno dipendente dal rumore e poichè sperimentalmente si deduce che anche dati totalmente privi di rumore ne sono affetti, si deduce che questo tipo di errore è intrinsecamente dovuto alla scelta del modello applicato.

Vediamo ora come rintracciare la natura di questo errore, analizzando due importanti assunzioni per il modello SRTM che vengono violate.

Prima di tutto, il modello RTM, sia nel caso completo che in quello semplificato, assume che la regione di riferimento sia modellata in maniera appropriata da un modello 2CM. Secondariamente, nel caso del SRTM, è previsto che le regioni di interesse siano tutte modellate secondo il modello a due compartimenti, e ciò non accade.

In ogni caso, quando FRTM converge, sottostima il rapporto k_3/k_4 del $19 \pm 18\%$. Questa analisi ci fa dedurre che, poichè la seconda assunzione è fatta solamente per il modello semplificato e non per quello completo, la violazione principale sia quella relativa alla prima assunzione.

8.4.4 Stabilità nel tempo.

Un requisito fondamentale per qualsiasi approccio analitico usato per derivare BP e k_3/k_4 è che, dopo un dato tempo, le misure rilevate non siano affette da errori dovuti alla considerazione di dati aggiuntivi.

La durata della scansione per ottenere dunque valori stabili, è significativamente differente a seconda della regione cerebrale considerata e ci si aspetta che sia maggiore nel caso di regioni con una maggior densità di recettori.

In ogni caso, anche la dimensione della regione è un fattore molto importante per la stabilità delle misurazioni nel tempo.

Le regioni neocorticali raggiungono la stabilità più velocemente, seguite dalle piccole regioni limbiche e in ultimo dal DRN. Quest'osservazione suggerisce che il rumore presente nelle regioni è un altro fattore fondamentale per la stabilità dei risultati; si evidenzia in questo senso una relazione tra il rumore presente nelle varie regioni e la durata minima della scansione per ottenere un valore BP stabile con il metodo 1C.

Il metodo 1B, quello grafico e quello SRTM richiedono circa 10 minuti in meno, rispetto al metodo 1C, per raggiungere la stabilità, anche se la deviazione e l'errore di misura su scansioni più brevi affligge maggiormente il metodo 1C piuttosto che gli altri tre metodi considerati.

Dal punto di vista della durata minima della scansione, dunque, l'analisi grafica offre il miglior metodo di analisi (deviazione trascurabile, errore piccolo), seguita dal metodo 1B (deviazione trascurabile, errore grande) e in ultimo dal metodo 1C, caratterizzato da una grande deviazione e da un grande errore.

8.4.5 Riproducibilità.

La riproducibilità delle misure è strettamente dipendente dalla dimensione della regione e naturalmente, anche dal tipo di misura che si va ad analizzare (BP vs. k_3/k_4), ma non dal metodo di analisi.

Non è sorprendente, infatti, che i parametri dei recettori $5-HT_{1A}$ siano misurabili con una maggiore riproducibilità nelle regioni più estese, rispetto a quelle più piccole. Le regioni meno estese, infatti, sono più vulnerabili ai movimenti del capo o ad errori di co-registrazione.

In ogni caso i valori di ICC per il BP sono accettabili (>50) o eccellenti (>75) in ogni regione considerata, eccezion fatta per il DRN.

Solitamente il TRV di BP è superiore rispetto a quello di k_3/k_4 . Poichè k_3/k_4 è normalizzato sulla distribuzione di volume del cervelletto (in generale è normalizzato sul volume di distribuzione della regione di riferimento), tale misura sarà meno affetta da errori che riguardano le misurazioni plasmatiche e la calibrazione incrociata tra il contatore gamma e la camera PET. Tipicamente, una normalizzazione di questo tipo porta alla perdita di informazioni riguardo le variazioni inter-soggetto, e l'ICC del BP è frequentemente superiore rispetto all'ICC di k_3/k_4 .

Nel nostro studio si evidenzia come BP sia superiore sia a k_3/k_4 sia in termini di TRV che in termini di ICC. Questo deriva dal fatto che la concentrazione di [^{11}C]WAY 100635 nel cervelletto è molto bassa, che la misura del volume di distribuzione del cervelletto è soggetta ad una bassa riproducibilità e che l'errore fatto nella stima del VT del cervelletto ricade maggiormente sul calcolo di k_3/k_4 , essendone il denominatore, piuttosto che sul calcolo di BP , dove figura come termine sottrattivo.

La riproducibilità delle misure di tracciante, è dunque indipendente dall'approccio di analisi utilizzato.

I valori di TRV e di ICC di k_3/k_4 sono simili sia derivati con che senza input arteriale.

8.5 Confronti tra metodi e risultati

Il metodo 1B, appare, in definitiva, come il metodo migliore per l'analisi.

Il metodo 1A produce valori poco precisi per BP e k_3/k_4 , mentre il metodo 3A funziona solamente nel 62% dei casi.

Il metodo 1C deve essere invece utilizzato con particolare attenzione in quanto porta una significativa instabilità dei risultati sui tempi di scansione brevi.

I metodi 2 e 3B sono invece associati ad una sottostima parametrica dovuta a diverse ragioni.

Nel caso 2, la sottostima di BP è sicuramente moderata, dipendente dal rumore e affligge solamente le regioni piccole e particolarmente rumorose (DRN è infatti la ragione maggiormente affetta dalla sottostima). Nel metodo 3B, invece, è il rapporto k_3/k_4 ad essere maggiormente sottostimato. In questo secondo caso, però, la sottostima non dipende dal rumore, ma dalla densità recettoriale nelle

varie regione e colpisce dunque principalmente le regioni con un alto k_3/k_4 , rispetto a quelle con un basso k_3/k_4 (DRN risulta infatti la regione meno soggetta a tale sottostima).

Nel nostro studio, risulta evidente come sia da preferire la valutazione di BP rispetto a quella di k_3/k_4 . Nel caso in cui l'input arteriale non dovesse essere disponibile, infatti, il metodo 3B si rivela molto utile se utilizzato tenendo presente le seguenti limitazioni:

- la sottostima di k_3/k_4 è significativa e varia a seconda delle regioni e a seconda del soggetto in funzione della densità di recettori;
- la sottostima è accentuata nel caso di scansioni brevi;
- l'attività del cervelletto è contaminata dall'attività nel sangue;
- il volume di distribuzione del cervelletto può variare in relazione al soggetto e a particolari condizioni.

8.6 In vivo e in vitro.

I dati osservati su esperimenti condotti in vivo o in vitro riportano entrambi la regione della corteccia entorinale come quella con una maggiore densità di recettori di tipo 5 – HT_{1A} .

Bibliografia

- [1] Ramin V. Parsey, Mark Slifstein, Dah-Ren Hwang, Anissa Abi-Dargham, Norman Simpson, Osama Mawlawi, Ning.Ning Guo, Ronald Van Heertum, J. John Mann and Marc Laruelle. Validation and reproducibility of measurements of 5 – HT_{1A} receptors parameters with [carbonyl- ^{11}C]WAY 100635 in humans: comparison of arterial and reference tissue input function. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Vol.20, No.7, 2000
- [2] Serotonin-1A receptors in major depression quantified using PET: Controversies, confounds, and recommendations. Saurav Shrestha, Jussi Hirvonen, Christina S. Hines, Ioline D. Henter, Per Svenningssoon, Victor W. Pike, Robert B. Innis. *NeuroImage* 59 (2012) 3243-3251.
- [3] PET Pharmacokinetic Course. S. Dittrich, J. van den Hoff, R.P. Maguire. Loch Lomond, Scotland, 2010
- [4] Modelling methodology for physiology and medicine. Ewart Carson, Claudio Cobelli. Academic PR (2000), Academic Press Series in Biomedical Engineering.
- [5] Positron Emission Tomography Compartmental Models. Roger N. Gunn, Steve R. Gunn, and Vincent J. Cunningham. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Vol.21, No.6, 2001
- [6] Fondamenti di Medicina Nucleare. Duccio Volterrani, Giuliano Mariani, Paola Anna Erba. Springer-Verlag Italia, 2010.
- [7] Tracer kinetic modeling of the 5-HT_{1A} receptor ligand [carbonyl- ^{11}C]WAY-100635 for PET. Gunn RN, Sargent PA, Bench CJ, Rabiner EA, Osman S, Pike VW, Hume SP, Grasby PM, Lammertsma AA. *Neuroimage*. 1998 Nov;8(4):426-40.
- [8] Appunti del corso “Neuroingegneria”, tenuto dalla prof. Alessandra Bertoldo presso l’Università degli Studi di Padova
- [9] Appunti del corso “Modelli e controllo dei sistemi biologici”, tenuto dal prof. Claudio Cobelli, presso l’Università degli Studi di Padova