

Principi di Cinetica dei traccianti



Introduzione

Lo studio dell'organismo umano fu iniziato dai grandi anatomici del rinascimento, in seguito ai progressi della fisica con l'indagine microscopica fu possibile elaborare la teoria cellulare.

Successivamente si cercò di conoscere la struttura intima della materia vivente attraverso tecniche e metodologie proprie della fisica e chimica.

Il primo successo fu la scoperta dello zucchero nel sangue e fegato e quindi del glicogene e della funzione glicogenica dell'epatocita.

Crebbe così la chimica biologica che ebbe grande influenza sulla fisiologia, infatti la patologia inizialmente strettamente di tipo morfologico si orientò a contenuti sempre più funzionali per addivenire a ciò che ora si definisce fisiopatologia.



I traccianti radioattivi

L'indagine chimica e la conoscenza della composizione di un organismo vivente dicevano ben poco sulla dinamica dei processi biologici. Nell'osservazione di un organismo vivente si nota la presenza di certi contenuti chimici a strutture costanti che è il risultato di uno stato di equilibrio dovuto a processi di sintesi e scissione per cui non è possibile distinguere fra le sostanze introdotte da quelle simili sintetizzate o accumulate e studiarne il destino.

Questo compito poteva essere realizzato solo con l'uso di sostanze riconoscibili dalle altre ed aventi la stessa struttura chimica e purché queste sostanze portatrici di questo segnale di riconoscimento non alterasse i comportamenti chimici e biologici.

Gli isotopi radioattivi e le molecole a strutture biologiche marcate con questi rispondono al requisito di essere riconoscibili e di non alterare il comportamento biologico e quindi si è potuto studiare la dinamica della materia vivente.



Cenni storici sui traccianti radioattivi

Alla fine dell'ottocento i coniugi Curie nell'analizzare la pechblenda, uno dei principali minerali dell'uranio, notarono che possedeva una attività maggiore di quella che avrebbe dovuto avere sulla base dell'uranio contenuto. Ciò indicava la presenza di composti di elementi (o elemento) più radioattivi dell'uranio. Attraverso metodi chimici individuarono due di tali elementi: il Radio e il Polonio.

Nel 1912 George Von Hevesy dopo inutili tentativi di isolare il Piombo, estratto dalla pechblenda, da un elemento identificato come Radio D ebbe la idea brillante di utilizzare il radio D come indicatore del piombo.

Nasce così il concetto di tracciante. Ora noi sappiamo che il radio D è un isotopo radioattivo del piombo e precisamente il Pb^{210} . Studiando queste sostanze Soddy arrivò alla conclusione che non erano separabili perché si trattava dello stesso elemento chimico, proponendo il termine isotopo per questi elementi che possedevano lo stesso numero atomico, occupavano lo stesso posto nella tavola periodica ma differivano per la massa atomica.



Prime applicazioni dei traccianti

Nel 1924 Von Hevesy espose l'idea di usare gli isotopi radioattivi come indicatori degli elementi di sistemi chimici e biologici. Inizialmente furono fatti studi sulla circolazione del piombo e del bismuto in organismi viventi.

La più importante conseguenza nell'uso dei traccianti fu la scoperta dello stato dinamico dei costituenti gli organismi viventi.

L'impiego dei traccianti consentì di evidenziare come il complesso dei costituenti degli organismi viventi sia da considerare come un delicato sistema in continuo rinnovamento nel quale, tuttavia, i rapporti tra i diversi componenti sono costanti nell'individuo sano.

Nella lezione che tenne nel 1944, in occasione del conferimento del premio Nobel, Von Hevesy 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”



Cosa è un tracciante?

Si definisce “Tracciante” un elemento o sostanza che introdotta in un sistema chimico o biologico, si mescola rapidamente ed uniformemente con i costituenti di questo e, pur essendo sempre identificabile e differenziabile da essi, ne riproduca fedelmente il comportamento, senza influenzarlo.

Quindi il tracciante deve possedere i seguenti requisiti:

1. *Equivalenza dal punto di vista chimico e biologico agli elementi dei sistemi che con essi si studiano;*
2. *Assenza di effetti sul comportamento dei sistemi in studio;*
3. *Possibilità di identificazione e misura tra gli altri elementi del sistema.*

Esempi di traccianti radioattivi sono l'acqua triziata e lo I131



Cosa è un tracciante?

- È un **INDICATORE** che segue, o traccia, una sostanza all'interno dell'organismo in esame
- Le proprietà dei traccianti dovrebbero essere **analoghe** a quelle della molecola endogena. Il tracciante dovrebbe essere introdotto nel sistema in quantità piccole tali da non perturbare il sistema.
- Il tracciante e la molecola endogena possono essere coinvolte in processi quali **trasporto, flusso, metabolismo, legame recettoriale ed altri**,
- In alcuni casi, il tracciante ideale è l'analogo radiomarcato della sostanza endogena. È essenziale che il sistema non sia danneggiato dalle radiazioni



Gli Indicatori possono a loro volta essere suddivisi in Indicatori Positivi e in Indicatori Negativi questa differenziazione è associata alla caratteristica di raggiungere concentrazioni maggiori o minori in un determinato organo o tessuto in studio rispetto alle zone circostanti.

Es. di indicatore positivo: Ga⁶⁷ citrato per i tumori polmonari; DTPA per il cervello; Polifosfati e Difosfonati marcati con Tc^{99m}.

Es. di indicatore negativo: DMSA per il rene; Solfocolloidale per il fegato e i generale colloidi marcati con Tc^{99m} per lo studio del fegato.

In cosa consiste uno studio di cinetica dei traccianti?

Uno studio di cinetica utilizza principi di cinetica per **stimare** parametri fisiologici di interesse

In uno studio di cinetica, **l'informazione relativa al processo in esame viene derivata dal comportamento cinetico del tracciante** permettendo uno studio quantitativo in vivo del processo in esame sia in animali che in pazienti.

Uno **studio cinetico dinamico** segue il comportamento del tracciante dalla sua iniezione (cinetiche di trasporto) alla fine dello studio (processo di interesse) e fornisce più informazioni (misure multiple) di quante siano ottenibili in condizioni stabili (misura singola all'equilibrio).

L'insieme di teorie e metodologie che permettono di esaminare e descrivere la distribuzione dei radiofarmaci negli spazi anatomici, in relazione a funzioni fisiologiche e reazioni chimiche si chiama **TEORIA DEI TRACCIANTI**



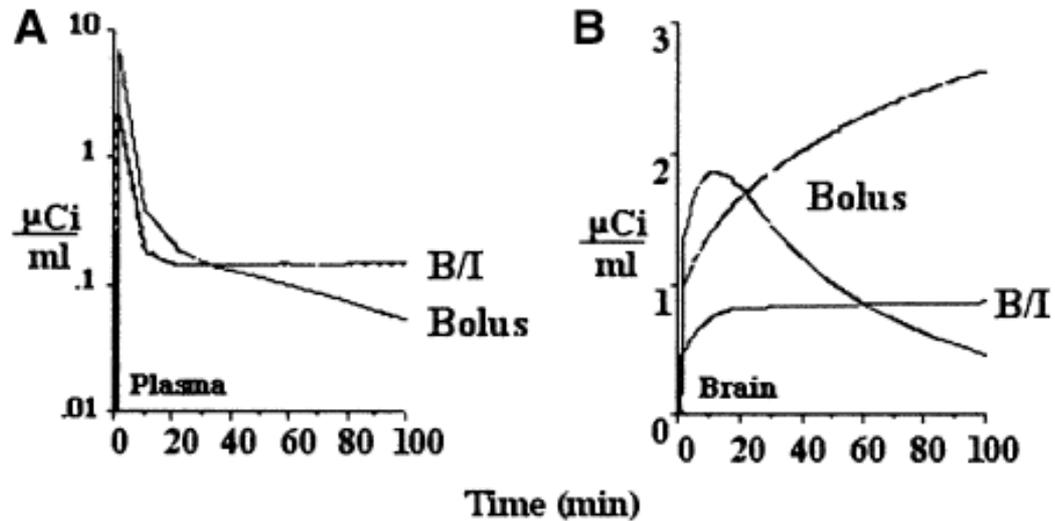
Come si effettua uno studio cinetico?

1. **Somministrazione** del radiotracciante
2. **Misurazione della concentrazione** del radiotracciante nel sangue e nell'organo di interesse
3. I dati vengono analizzati per fornire **misure relative alla fisiologia del sistema in studio**
4. Il disegno dello studio richiede di prendere in considerazione le **dinamiche del processo in esame e del radiotracciante**



Modi di somministrazione

- bolo
- bolo + infusione continua (B/I).



BOLO

Produce un **rapido trasporto del tracciante** nell'organismo. Questo approccio fornisce **cinetiche transienti** e **l'equilibrio generalmente non viene raggiunto** durante il tempo della misurazione



BOLO + INFUSIONE CONTINUA

La somministrazione **B/I** è una combinazione di un **iniezione iniziale come bolo seguita da una infusione del radiotracciante**. Il metodo B/I produce concentrazioni di tracciante che **possono raggiungere un valore costante**. Quando i livelli di tracciante tra sangue e tessuto divengono equivalenti, si assume che l'equilibrio sia raggiunto e la **misura della concentrazione del tracciante** è la misurazione principale di questo tipo di studio.



Confronto

- Il metodo del **bolo** può fornire **diversi parametri associati al processo di interesse**
- Il metodo del **B/I** generalmente fornisce **solo la misura all'equilibrio**
- Un vantaggio del metodo B/I è che **l'equilibrio non è influenzato da variazioni del flusso ematico, mentre i dati derivanti da un tracciante in bolo possono riflettere tali fluttuazioni.**



Dati ematici (I)

- Dati ematici sono collezionati da arteria radiale (campionamento arterioso) o dalla vena antecubitale (campionamento venoso)
- Il protocollo di campionamento dipende dal modello cinetico applicato per lo studio (del tutto quantitativo o semplificato)
- I dati ematici possono essere raccolti in **continuo** o mediante **campionamenti discreti**
- La concentrazione della radioattività viene espressa come **attività per unità di volume** (Bq/mL or mCi/mL).



Dati ematici (II)

- Dopo l'iniezione, alcuni radiofarmaci vengono clivati producendo **metaboliti radiomarcati**
- In questi casi, i dati ematici andranno valutati dopo cromatografie che determinino a quale frazione di sangue o plasma la radioattività appartenga: **frazione parentale** (radiofarmaco) o **metaboliti**.



Dati ematici (III)

- La concentrazione del radiotracciante parentale nel sangue o nel plasma è determinata correggendo la radioattività totale per la frazione del metabolita. È quindi importante sapere se un radiofarmaco produce metaboliti marcati per descriverne adeguatamente la cinetica e quindi interpretare i dati ottenuti in modo corretto.
- È anche importante quanto **radiotracciante raggiunge effettivamente l'organo di interesse** (cervello e BBB), quanto sia il legame alle proteine plasmatiche e il legame alla frazione rossa



Come si ottengono i dati?

- Metodi matematici e statistici sono usati per determinare parametri di interesse dai dati cinetici
- Questi modelli cinetici generalmente possono essere suddivisi come **compartimentali** e **non-compartimentali**
- Modelli compartimentali coinvolgono la formulazione di un modello compartimentale che si basa su una **conoscenza a priori di caratteristiche chimiche e fisiologiche associate al processo di interesse**



Modelli non-compartimentali

- I modelli non-compartimentali non si basano su specifici assunti riguardanti il comportamento della sostanza nell'organismo
- Tecniche non-compartimentali generalmente sono limitate non forniscono informazioni su parametri interni ma **descrivono processi in termini di velocità di eliminazione del tracciante.**
- I parametri ottenibili sono: **tempo medio di transito (reciproco del flusso), volume di distribuzione, flusso di uscita del tracciante**



Modelli compartimentali

- L'approccio compartimentale si basa su caratteristiche che coinvolgono la **somministrazione**, le **proprietà metaboliche e farmacologiche** del radiotracciante e la sua **estrazione** dal pool vascolare al tessuto.
- Il modello compartimentale permette di studiare e predire il comportamento di un determinato processo attraverso una simulazione al computer basandosi su equazioni che contengono costanti di flusso relative a diversi stati del sistema



Compartimenti e costanti di trasferimento

- Un **compartimento** rappresenta uno spazio o volume in cui il tracciante si distribuisce. Può essere un compartimento **FISICO** o **CHIMICO**.
- Le **costanti di trasferimento** (parametri interni) legano i compartimenti e **descrivono i flussi di scambio di tracciante** tra i diversi compartimenti. Si assume in genere che la quantità di tracciante che lascia un compartimento è proporzionale alla quantità totale nel compartimento, tutto il tracciante iniettato si distribuisce in uno o più compartimenti in modo omogeneo per ogni singolo compartimento



COMPARTIMENTI

- **CHIUSI:** non si ha trasferimento del contenuto ad altri compartimenti
- **APERTI:** è possibile un ricambio del contenuto attraverso le connessioni con gli altri compartimenti
 - Il tracciante tende a raggiungere una condizione di equilibrio all'interno di ciascun compartimento e tra i compartimenti. La conc nei diversi comp dipenderà dalle caratteristiche dei comp e del tracciante.
 - Rapporto tra le conc nei due comp è il coeff di ripartizione

La distinzione formale dipende dalle caratteristiche del compartimento e del tracciante.



Diffusibilità m

- Il passaggio di una sostanza da un compartimento ad un altro può essere limitata e una condizione di equilibrio tra due compartimenti (Es sangue e tessuto) può non essere raggiunta nel transito di un tracciante attraverso i capillari.
- La limitazione al raggiungimento dell'equilibrio è espressa da una costante di valore compreso tra 0 e 1 che indica la frazione di equilibrio raggiunto ad ogni passaggio nei capillari.

$$m=1-e^{-PS/F}$$

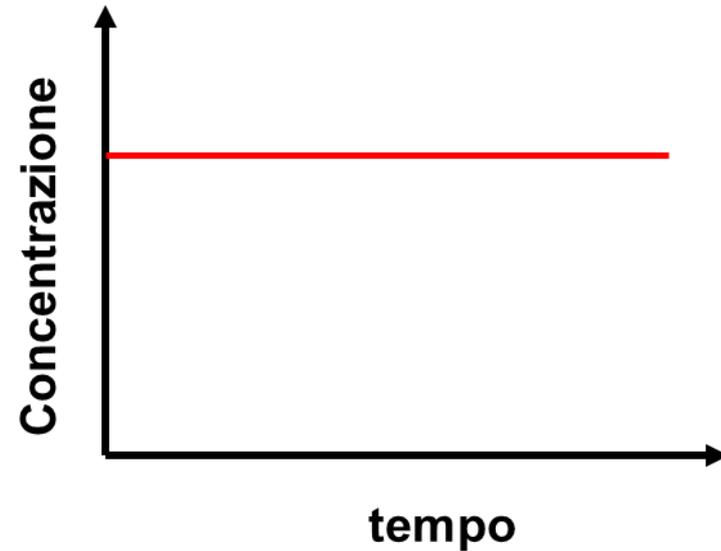
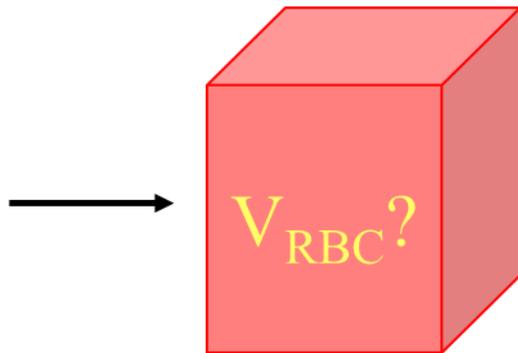


Modello compartimentale

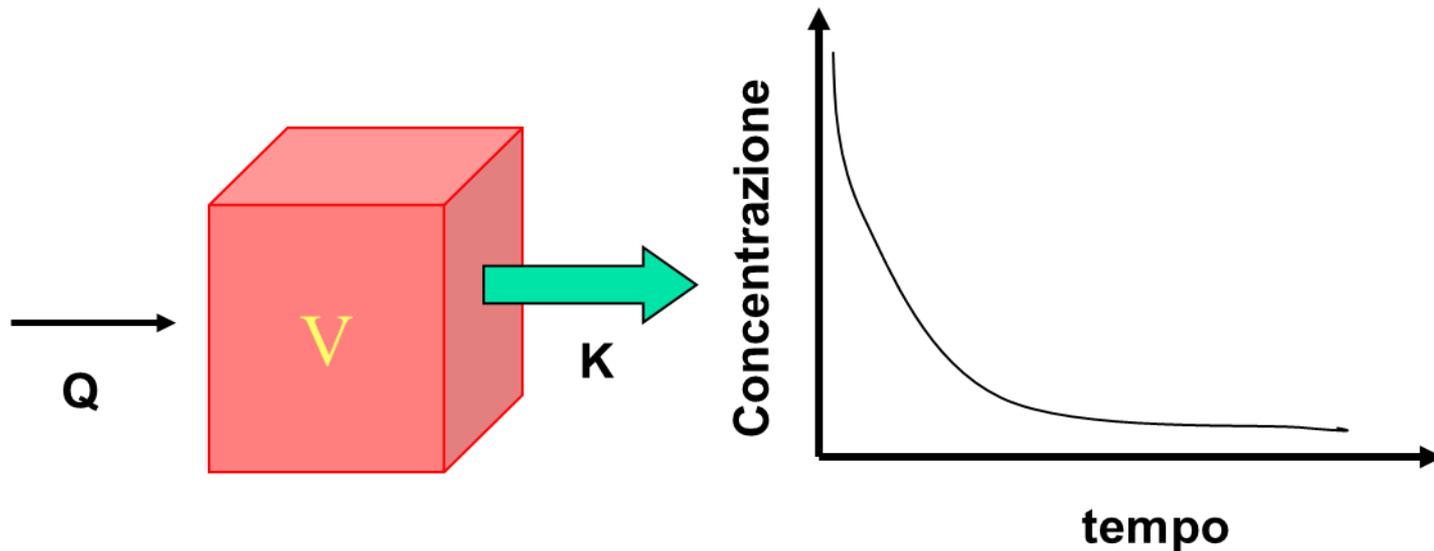
- Sistema di compartimenti, di complessità variabile, con cui viene descritta l'organizzazione e l'interazione dei processi biochimici e fisiologici rivelanti per la distribuzione del tracciante utilizzato.
- Def. di compartimento: volume entro cui il tracciante si distribuisce in modo uniforme
 - Fisico: extra-intracellulare
 - Biochimico: substrato-prodotto
 - Cellulare: extra-intracellulare
 - Tessutale: sottotipi cellulari (normali, patologici)



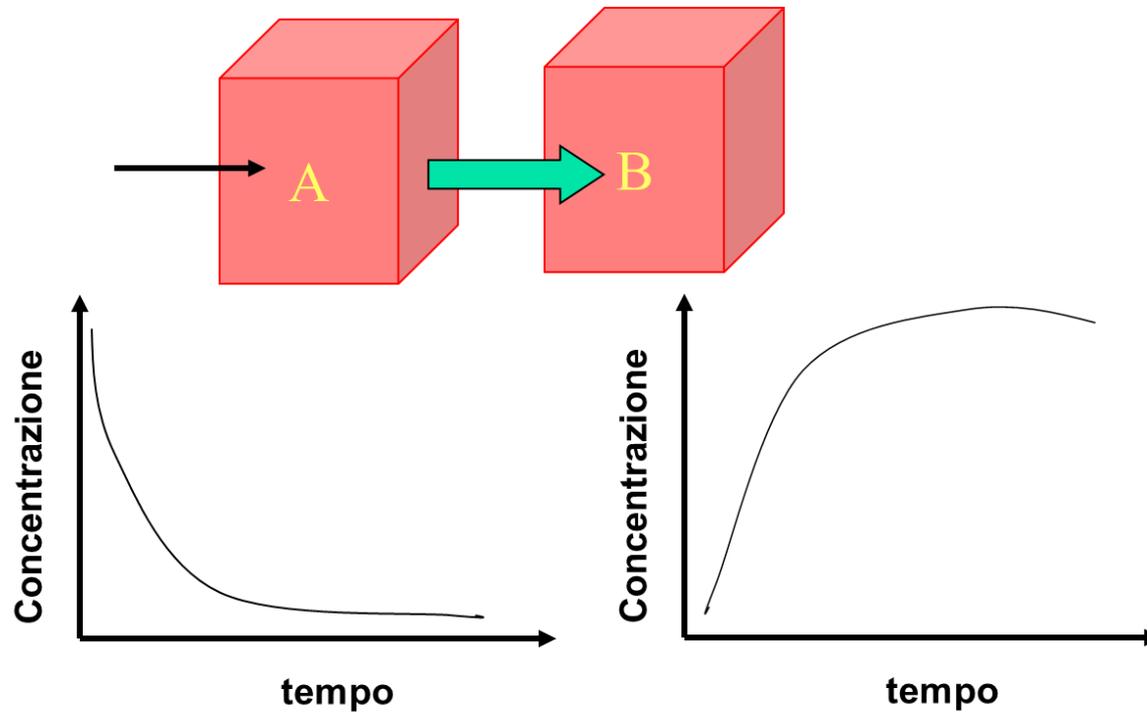
Mono compartimentale chiuso (calcolo volume di distribuzione)



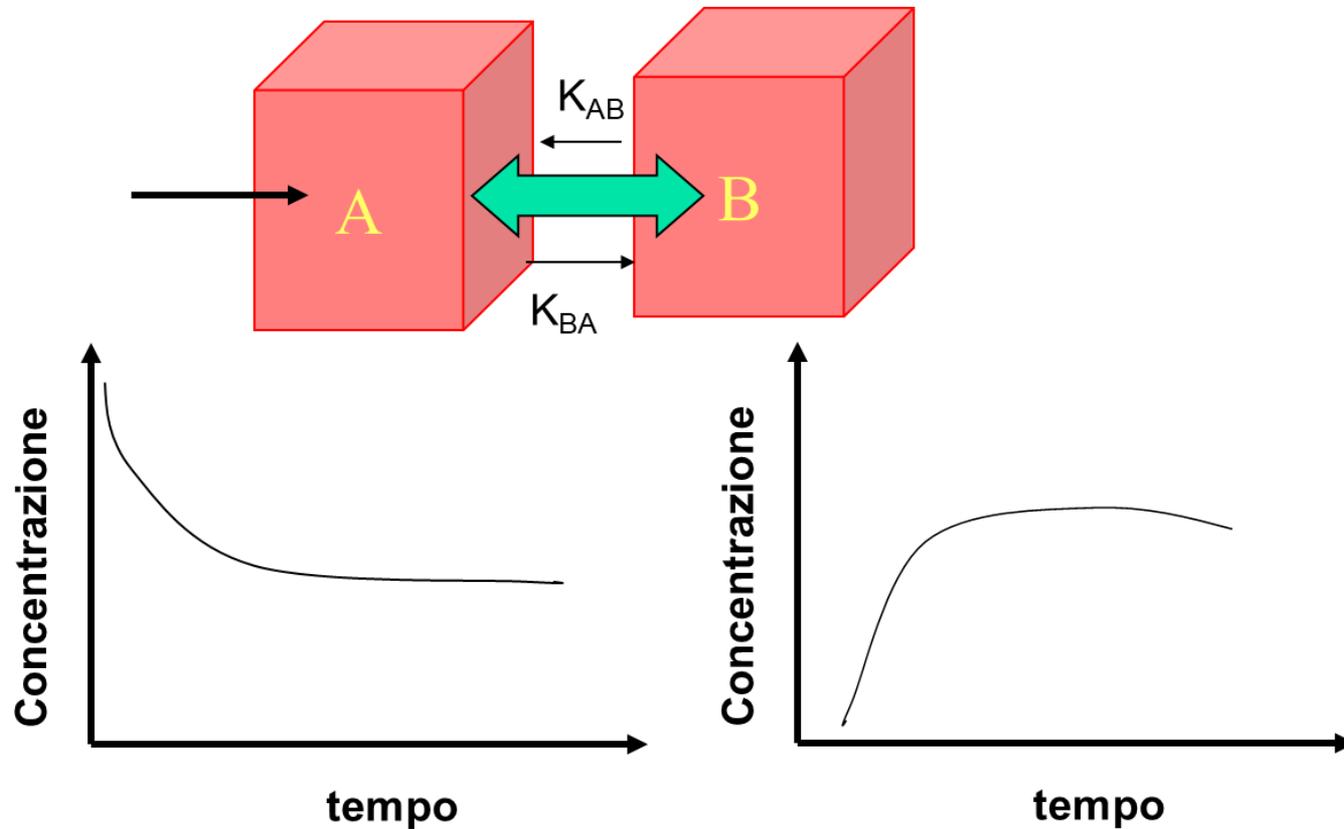
Mono compartimentale aperto (calcolo eliminazione del radiofarmaco da un compartimento)



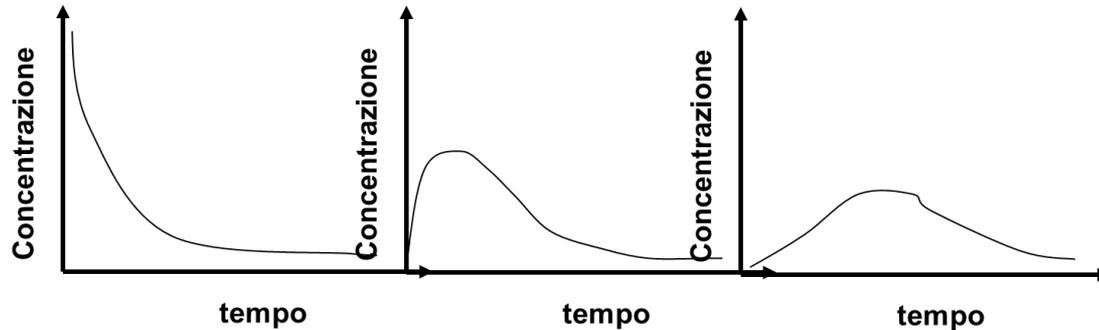
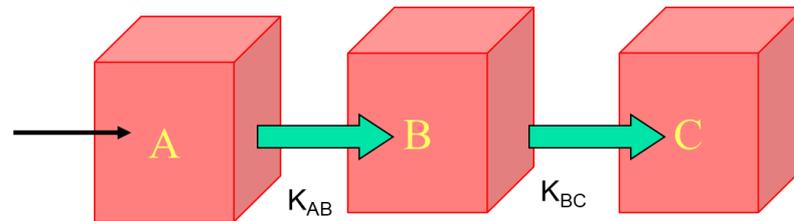
Modello Bicompartimentale chiuso con scambio irreversibile



Sistema bicompartimentale chiuso con scambio reversibile



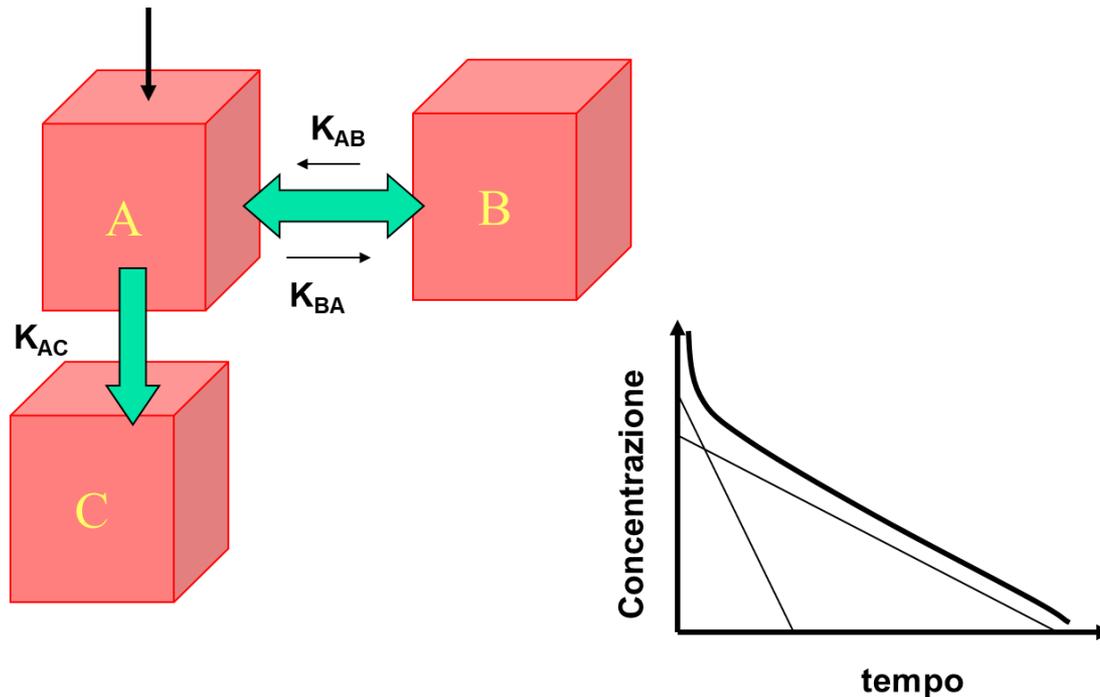
Modello multicompartimentale aperto con scambi irreversibili



ESEMPI di Sistema catenario: Clearance renale ed eliminazione biliare



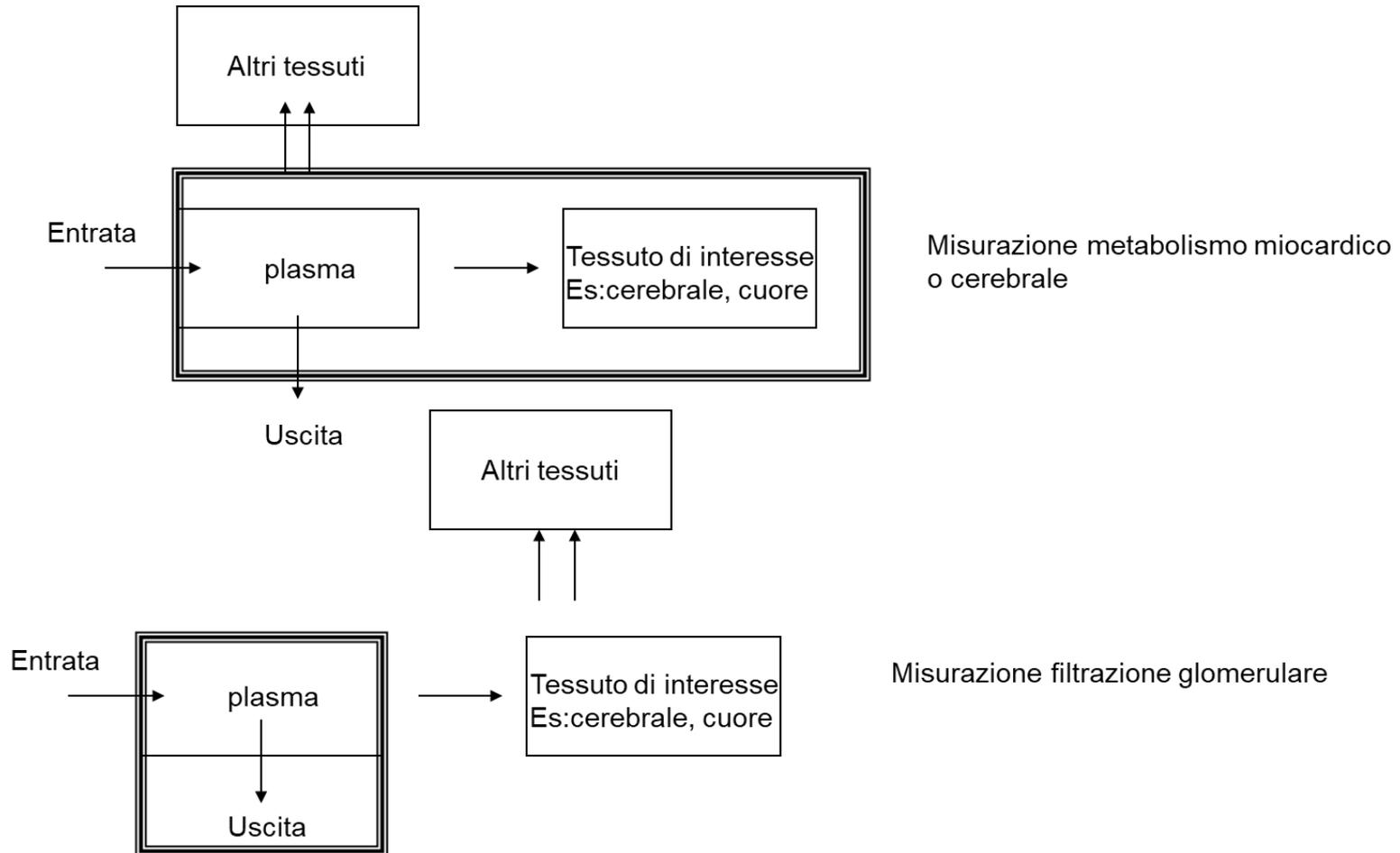
Modelli mammillari



Compartimento centrale aperto verso l'esterno che scambia in modo reversibile o meno con uno o più compartimenti periferici.



Numero di compartimenti



Definizioni riassunto

Per **distribuzione** si intende il passaggio (reversibile) del farmaco dalla circolazione sistemica ai diversi tessuti dell'organismo

Fattori che influenzano la distribuzione del farmaco

- caratteristiche chimico-fisiche dei farmaci
- permeabilità capillare
- flusso ematico tissutale
- legame alle proteine plasmatiche



DISTRIBUZIONE E TRASPORTO

- FLUSSO EMATICO
- Coeff di ESTRAZIONE: passaggio da un comp all' altro: netta e unidirezionale (PS/F)
- DIFFUSIBILITÀ: costante che indica la limitazione al raggiungimento dell' equilibrio tra le conc di un tracciante tra due comp. Dipende da permeabilità di membrana, superficie di scambio e flusso.
- CAPTAZIONE: quantità di sostanza estratta nell' unità di tempo



Flusso

- Passaggio di una sostanza attraverso una superficie nell' unità di tempo.
- F = Rappresenta la frazione trasferita da un compartimento all' altro nell' unità di tempo
- L' inverso è il tempo medio di transito
- Emivita = tempo necessario perché la quantità iniziale di sostanza nel comp. A si dimezzi.



GENERATORE



I generatori sfruttano il principio del decadimento in serie e della separazione cromatografica

il “**genitore**” a emivita fisica medio-lunga, decade in un isotopo “figlio” a emivita media-breve

il genitore è adsorbito su un supporto solido, impaccato in genere in una colonna di vetro, simile a una colonna cromatografica, da qui il nome di “colonna generatrice” spesso utilizzato al posto di “generatore”

il figlio viene generato dal decadimento del genitore

il figlio può essere separato dal generatore utilizzando un appropriato solvente che, fatto passare attraverso la colonna, lo trascina con sé

poiché il genitore ed il figlio sono elementi chimicamente differenti, il genitore rimane legato al supporto della colonna, mentre il figlio non si lega al supporto solido della colonna

pertanto il “solvente” o “eluente” discioglie il figlio , mentre il genitore continua a decadere nel “figlio”

pertanto il generatore può essere rifluito ad intervalli di tempo dipendenti dalla velocità di accrescimento del figlio fino a che tutti gli atomi del genitore non sono decaduti

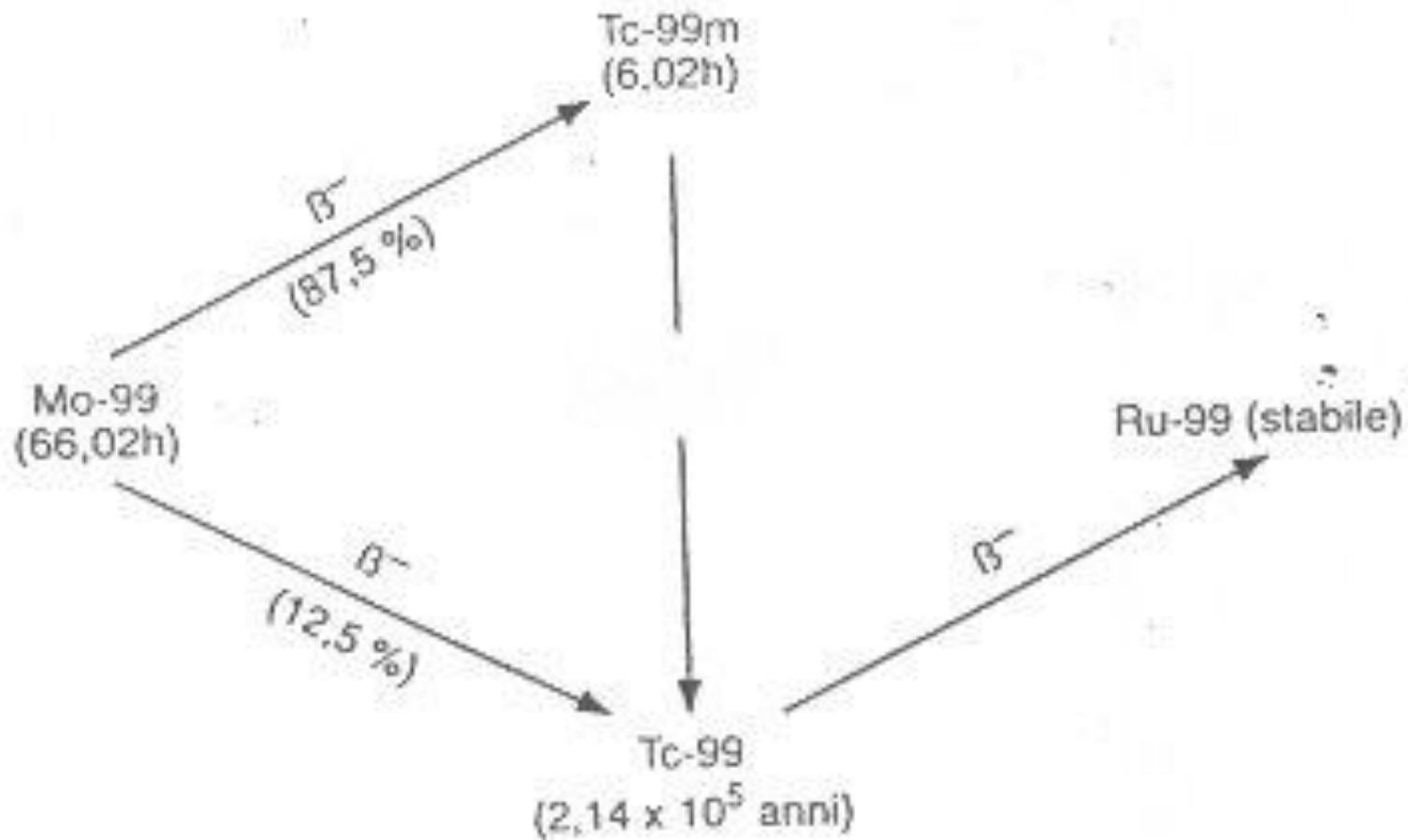


Il numero di generatori potenzialmente utilizzabile in medicina nucleare è molto ampio, sono invece abbastanza limitati quelli che soddisfano le seguenti esigenze:

1. emivita del genitore compatibile con le esigenze di produzione e trasporto all'utilizzatore
2. emivita e caratteristiche fisiche del nuclide figlio
3. solvente non tossico, iniettabile
4. non-rilascio del genitore e/o del supporto solido durante le procedure di eluizione
5. % di decadimento genitore/figlio alta
6. elevata concentrazione radioattiva dell'eluato
7. resa di eluizione elevata, ovvero la capacità di estrarre il nuclide figlio durante il passaggio dell'eluente attraverso la colonna



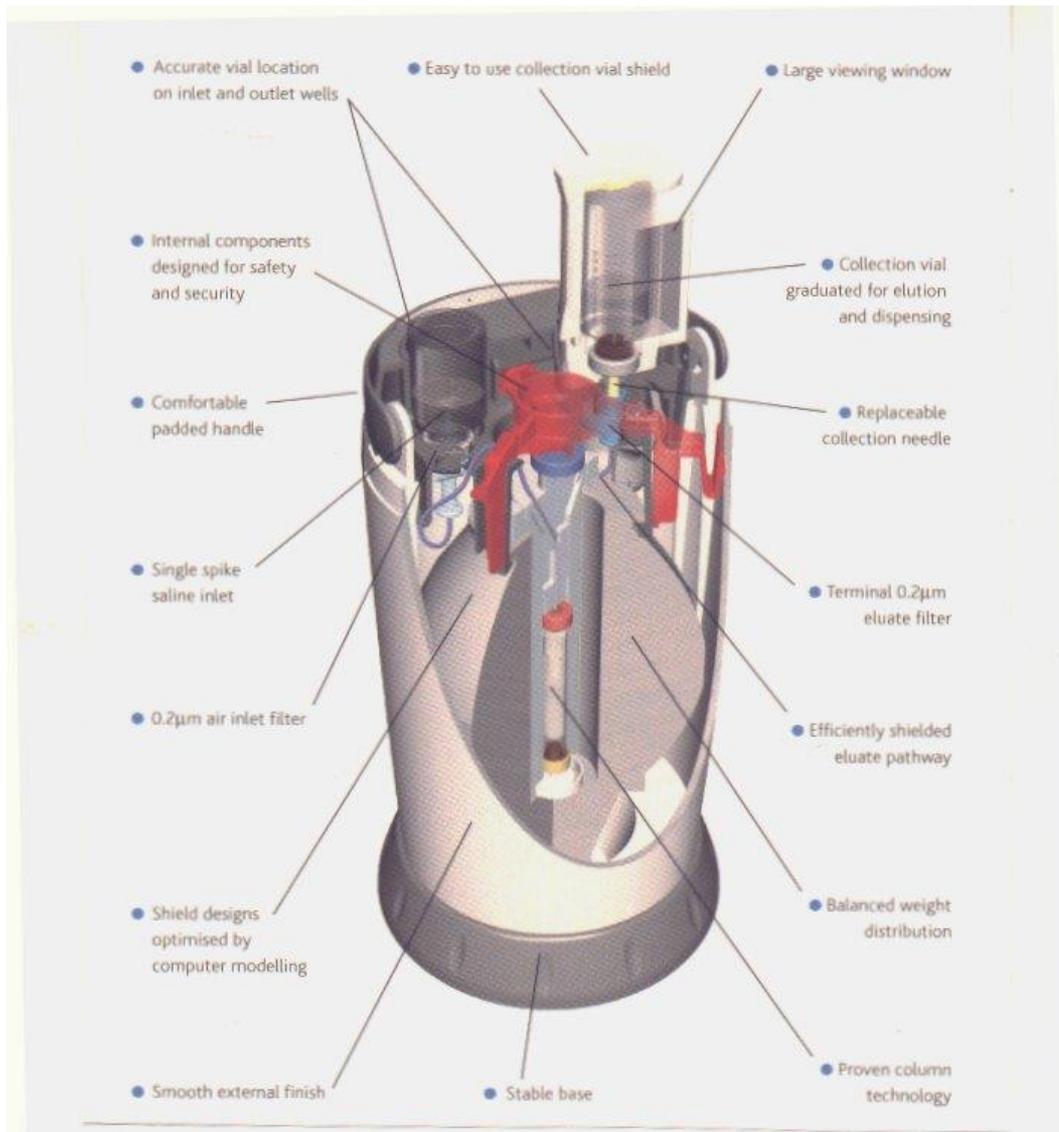
Caratteristiche di radioattività



RESA DI ELUIZIONE

100 mCi di Mo decadono a 87 di Tc 99m, il restante 12% a Tc 99.
Il Tc 99 si comporta chimicamente come il Tc99m , ma in pratica è come se fosse un elemento stabile
la resa di eluizione è di circa l'80% del Tc99m teoricamente disponibile
pertanto considerando una colonna tarata a 100 mCi di 99 Mo, otterremo un eluato contenente circa 70 mCi di 99mTc





Il Mo99 (nuclide padre) può essere ottenuto in differenti modi che caratterizzano il generatore:

Mo 99 da reattore, con purezza radionuclidica più elevata; tuttavia l'attività di questi generatori è piuttosto bassa e oggi poco utilizzati

Mo 99 da fissione hanno il vantaggio di un'attività specifica piuttosto elevata e pertanto

il volume di allumina necessario all'adsorbimento è piccolo, quindi anche le colonne hanno volume contenuto

volume di eluizione piccolo, tutta l'attività può essere eluita in 3-5 ml

essendo più compatti, la schermatura è più agevole



I generatori possono essere “umidi” o “secchi”

UMIDI: i generatori sono forniti collegati ad un reservoir contenente fisiologica che mantiene sempre umida la colonna,

quelli **SECCHI** invece sono caratterizzati dal fatto che dopo ogni eluizione la colonna viene completamente prosciugata.

Ognuno presenta vantaggi e svantaggi.



Umido:

la sacca di fisiologica (200-250 ml) consente un'elevata flessibilità di eluizione

il rischio di contaminazione batterica è ridotto

manualità semplificata

l'allumina essendo sempre umida evita il formarsi di "spaccature" con creazione di canali preferenziali per l'eluente con ridotta efficienza di eluizione

Secco

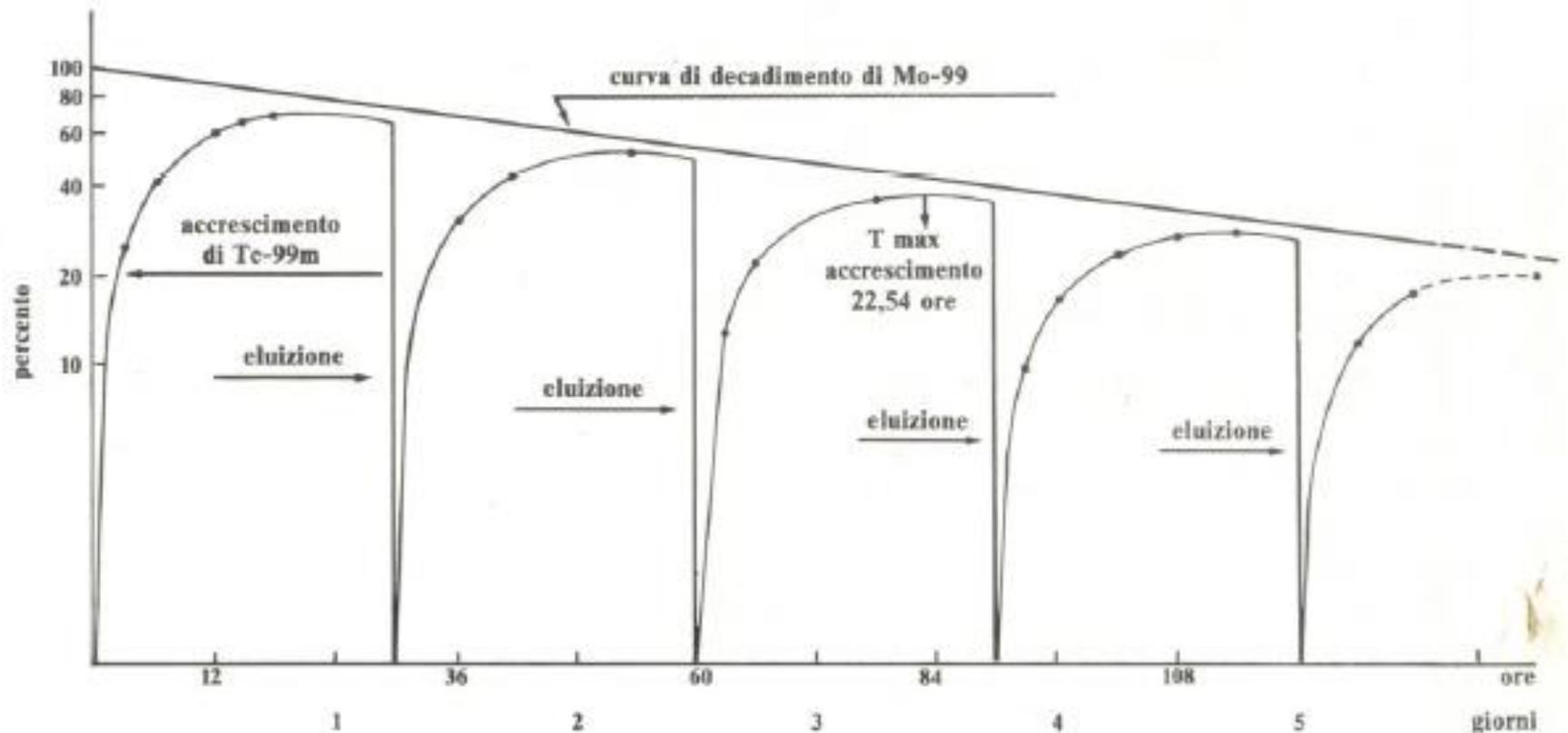
le differenze di pressione atmosferica (ad es. nelle spedizioni per via aerea) non possono determinare eluizioni spontanee

i fenomeni di autoradiolisi sono ridotti

precisione e ripetibilità dei volumi eluiti, sono elevate



Eluizioni ripetute di un generatore $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$



I KIT TECNEZIATI



KIT TECNEZIATI 1

Il Tecnezio è il primo elemento artificiale, ha una chimica molto simile a quella del renio (Re).

Ha diversi stati di ossidazione da -1 a +7.

Il +7 è il più stabile e poco reattivo ed è quello ottenuto dall'eluizione delle colonne come pertechnetato TcO_4^- .



E' necessario pertanto ridurre il pertechnetato a stati di ossidazione +4 o +5 per poterlo legare alle molecole.

L'agente riducente più largamente impiegato è il cloruro di stagno (Sn Cl_2) anidro o idrato

E' indispensabile evitare la presenza di ossigeno che ossida nuovamente il Tc ridotto a pertechnetato, quindi vanno evitati gli aghi di reazione che comportano un ingresso di aria nel vial di reazione.



il **kit di marcatura** è costituito da un vial contenente
il riducente
e la molecola complessante in forma liofila,
spesso vi è anche una soluzione tampone od altri
eccipienti.

Il vial è sottovuoto o contiene un gas inerte (ad es. argon a pressione positiva).

Il kit, come viene inviato dal produttore non è radioattivo
Dopo l'aggiunta del ^{99m}Tc diviene un radiofarmaco p.d.
Non è una semplice operazione di ricostituzione di un
liofilo, ma una reazione chimica



Dopo l'aggiunta della soluzione di ^{99m}Tc pertechnetato ($^{99m}\text{Tc O}_4^-$), si verifica una reazione tra i tre costituenti principali (pertechnetato, riducente e molecola complessate) con la formazione di:

- **RADIOFARMACO**
- **IMPURITA'**

Con l'aggiunta di $^{99m}\text{Tc O}_4^-$ si ottiene pertanto molecola di interesse a cui è legato chimicamente il Tc ridotto e costituisce il **radiofarmaco** vero e proprio che si localizzerà preferibilmente nell'organo target di interesse con un tropismo dettato dalla molecola complessate stessa,

tuttavia sono inevitabili **impurità** costituite da

Tc pertechnetato, ovvero del Tc che non è stato ridotto (Tc libero, Tc O₄⁻, free), che tenderà ad accumularsi in tiroide, stomaco, gh. Salivari ed intestino

Tc ridotto, ma non legato (ridotto idrolizzato, Tc O₂, reduced unbound) che tende a formare delle microcolloidi, che verranno captate dal sistema reticolo-endoteliale (fegato, milza, midollo osseo)

Molecole denaturate (frammenti, polimeri etc) marcate con Tc



99-mTcO_4^- costituisce l'anione di partenza per la produzione dei radiofarmaci tecneziati ed è una specie molto stabile.

Per preparare un radiofarmaco è necessario che il 99mTc formi nuovi legami di coordinazione con dei leganti (L), cioè è necessario rimuovere in parte o completamente gli atomi di ossigeno legati al metallo e sostituirli con atomi coordinanti dei nuovi leganti.

In questo processo il 99m-Tc viene ridotto (si abbassa il suo n° di ossidazione).

La reazione comunemente utilizzata nella preparazione di radiofarmaci tecneziati è la seguente:



in cui R = riducente, L = legante.



I riducenti più comunemente usati sono sali di Sn^{++}

La rimozione degli atomi di ossigeno legati al tecnezio avviene attraverso la formazione di $\text{Sn}(\text{OH})_4$.

L'atomo di tecnezio, liberato dall'ossigeno, si può coordinare con L. Il legante L deve essere scelto in modo che formi un complesso con il Tc il più stabile possibile così da non permettere di ricombinarsi con atomi di ossigeno che sono sempre presenti in soluzione: in questo modo si riformerebbero le specie ossigenate del tecnezio, $^{99}\text{-mTcO}_4^-$ e $^{99}\text{-mTcO}_2$ che costituiscono le impurezze.

Se non fosse presente il ligando la riduzione del $^{99}\text{-mTcO}_4^-$ porterebbe alla formazione del diossido termodinamicamente stabile (tecnezio colloidale, $^{99}\text{-mTcO}_2$).

Quando tutto il riducente viene consumato il complesso radiofarmaco-Tc rischia di essere ossidato a $^{99}\text{-mTcO}_4^-$; per questo è necessario usare i radiofarmaci tecneziati entro un limite di tempo relativamente breve dalla loro preparazione



MARCATURE CON ^{99m}Tc DI MOLECOLE CONTENUTE IN KIT FREDDI : NORME GENERALI

Le operazioni di marcatura di una molecola con ^{99m}Tc devono essere eseguite in modo da ottimizzare le seguenti caratteristiche:

1. Resa di marcatura , generalmente è accettabile una resa $> 95\%$
2. Purezza chimica
3. Purezza radiochimica
4. purezza radionuclidica
5. pH
6. osmolarità
7. stabilità in vitro
8. comportamento biologico
9. distribuzione nei tessuti e metabolismo
10. stabilità in vivo
11. aspetti farmaceutici

