

Mirco Meneghesso
V^aI Marconi



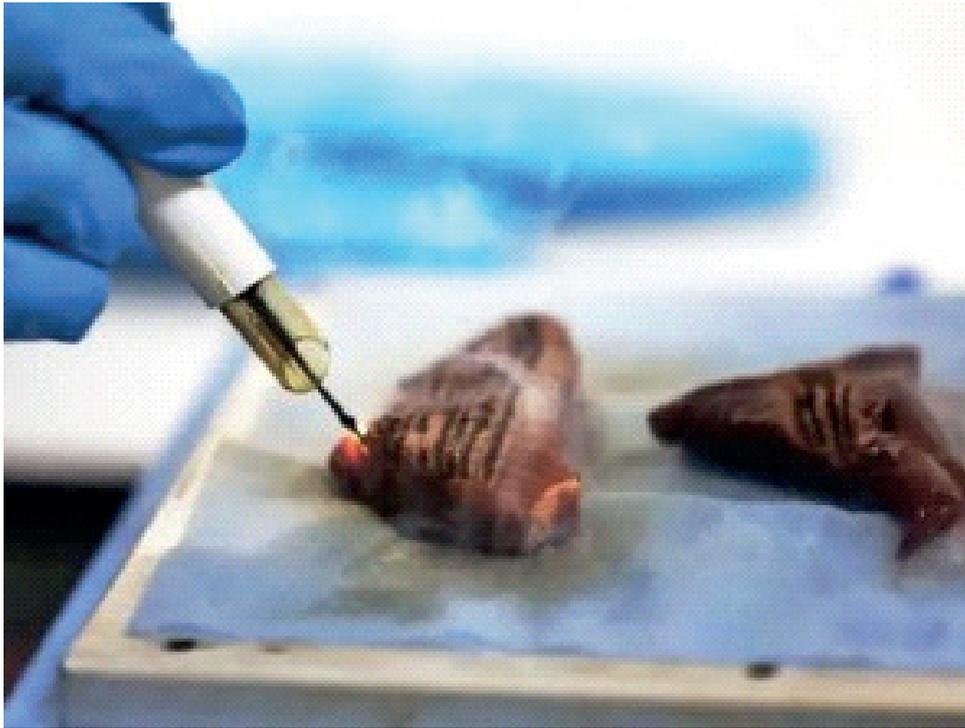
I-Knife

spettrometria in tempo reale in sala operatoria



Indice

1. Introduzione	Pg.1
2. Differenza tra cellula sana e tumorale	Pg.4
3. Soppressore di tumore	Pg.5
3.1 Telomerasi	Pg.7
4. Rintracciare un tumore	Pg.8
5. Tomografia ad emissione di positroni	Pg.10
6. Spettrometria a rapida evaporazione	Pg.13

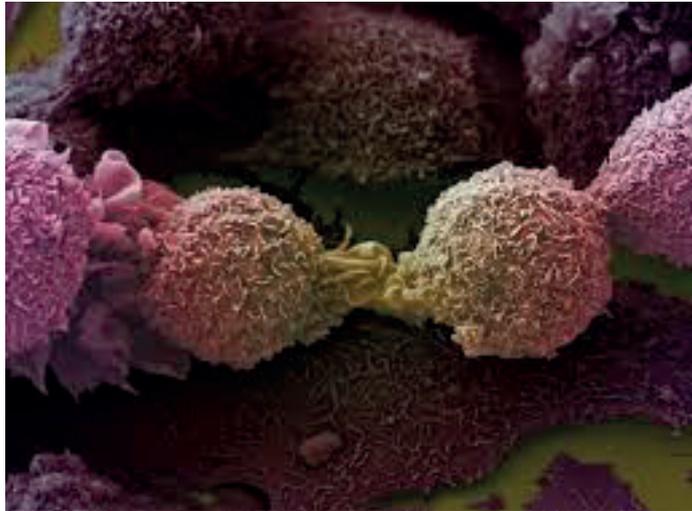


1. INTRODUZIONE

Un team di ricercatori dell' Imperial College di Londra, guidati dal dottor Zoran Takats, ha sviluppato un nuovo metodo per la diagnosi dei tessuti cancerosi. Il nuovo apparecchio è stato chiamato "bisturi intelligente" o I-Knife. Si tratta di un elettrobisturi che permette all'operatore di distinguere tra cellule sane e cellule cancerose durante l'incisione: il primo strumento chirurgico in grado di utilizzare la spettrometria di massa per inviare informazioni in tempo reale dei campioni biologici. L' I-Knife è un piccolo apparato collegato ad un elettrobisturi, che raccoglie i fumi generati dalla bruciatura dell'incisione e li invia ad uno spettrometro di massa. Lo spettrometro è connesso ad una "banca di dati" contenente più di 30000 profili lipidici di cellule tumorali note. Il software, che gestisce lo strumento, dopo il confronto con i dati registrati nel database invia immediatamente al chirurgo informazioni sul tipo di tessuti che sta incidendo.

2. MA COSA DIFFERENZIA UNA CELLULA TUMORALE DA UNA SANA?

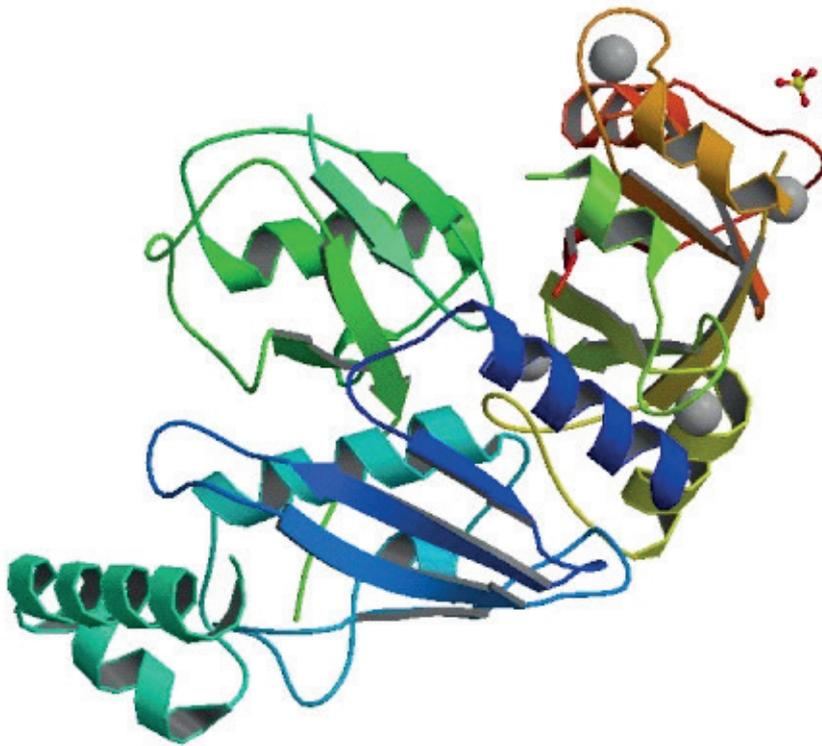
Quella tumorale viene spesso definita come una cellula impazzita, che non svolge più le sue funzioni originali, la sua “mission”, per garantire la vita dell'organismo di cui fa parte. Centinaia di migliaia sono le cellule cancerose che il nostro corpo riconosce, ed elimina, ogni giorno, basti pensare che stando un'ora sotto il sole, ci sono 10000 cellule della pelle che subiscono almeno una mutazione genetica e 9000 di queste vengono rintracciate, corrette oppure eliminate. All'interno di ogni cellula esistono, infatti, dei geni controllori chiamati proto-oncogeni, i quali sono molto simili nei vari organismi viventi. Tra quelli presenti nell'uomo e quelli negli animali o nei lieviti, con alcune piccole differenze, tutti sono però coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. In particolare, quando essi sono normalmente funzionanti, regolano la divisione o l'arresto della crescita della cellula. Se invece si alterano, possono provocare la proliferazione incontrollata delle cellule e quindi la crescita tumorale.



Cellula tumorale di un carcinoma epatico

3. SOPPRESSORE DI TUMORE

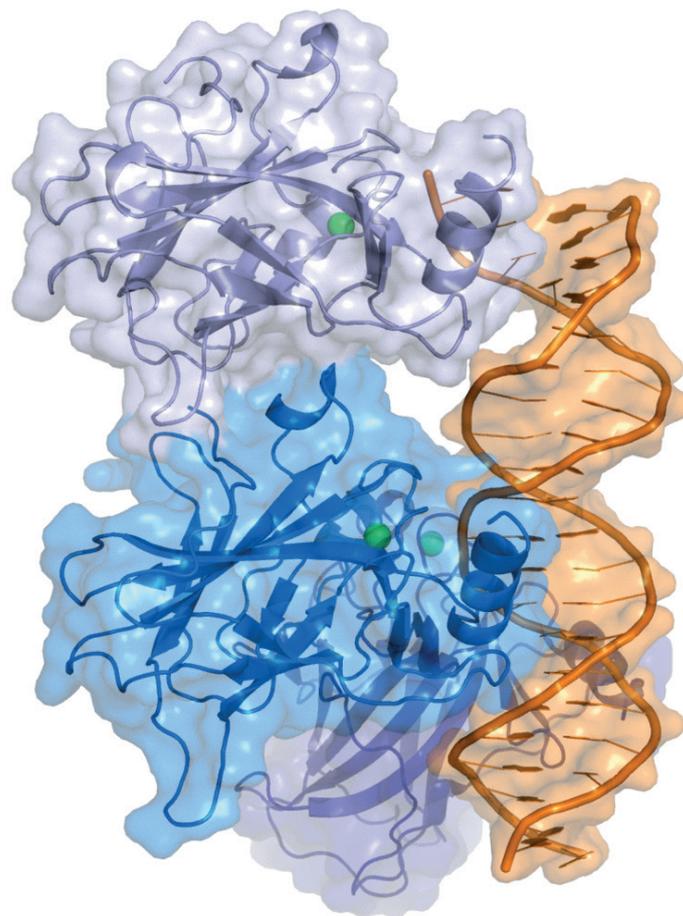
Un soppressore di tumore è la proteina P53, una delle nostre difese contro questo tipo di danno cellulare. Il soppressore di tumore P53 normalmente è presente in minima quantità. Ma quando viene rilevato un danno al DNA, i livelli di P53 aumentano facendo iniziare le misure di protezione. Il P53 si lega a molti siti di regolazione nel genoma e comincia la produzione di proteine che fermano la divisione della cellula fino a che il danno non è riparato. Quindi, può dare inizio all'apoptosi, inducendo la trascrizione di Noxa, nel caso il danno al DNA sia irreparabile; nel caso invece il DNA fosse riparabile, al termine della riparazione, P53 viene degradata da MDM2 e ne segue la ripresa del ciclo cellulare.



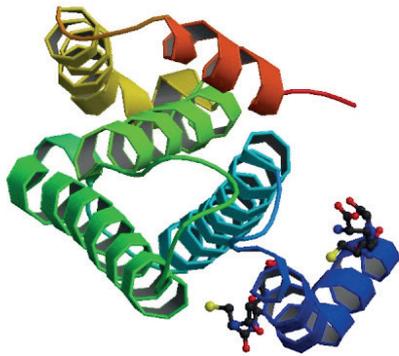
Il P53.

Si può notare la struttura secondaria ad Alfa-Elica sfruttata per reagire meglio con il DNA

Il soppressore di tumore P53 ha un ruolo centrale nella protezione dal cancro nel nostro corpo. In generale, le cellule cancerose contengono due tipi di mutazioni: le prime provocano la crescita e la moltiplicazione incontrollata delle cellule le seconde disattivano le normali difese che proteggono contro la crescita innaturale. Il P53 protegge dalla seconda categoria di anomalie perché aiuta la riparazione del DNA danneggiato fornendo codifiche corrette. La maggior parte delle mutazioni tumorali sono disattivanti, perché cambiano le informazioni nel DNA in una sua particolare posizione e costringono la cellula a sintetizzare P53 non funzionante, sostituendo un amminoacido errato in un punto della catena proteica dove è presente l' amminoacido Arg248. La normale funzione del P53 è bloccata in queste mutazioni, perché la proteina è incapace di fermare la moltiplicazione della cellula danneggiata. Se la cellula ha altre mutazioni che provocano una sua crescita incontrollata, la cellula si trasformerà in un tessuto tumorale. La moltiplicazione incontrollata delle cellule tumorali è regolata dalla telomerasi.

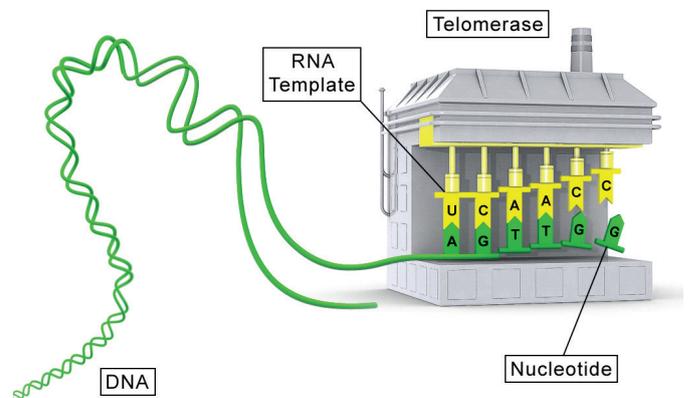


Il sito attivo del P53 (in blu) che interagisce con il DNA (arancione).



Struttura della telomerasi, la struttura blu presenta il sito attivo.

Funzionamento della telomerasi che ricostruisce il telomero in posizione 5'



3.1 TELOMERASI

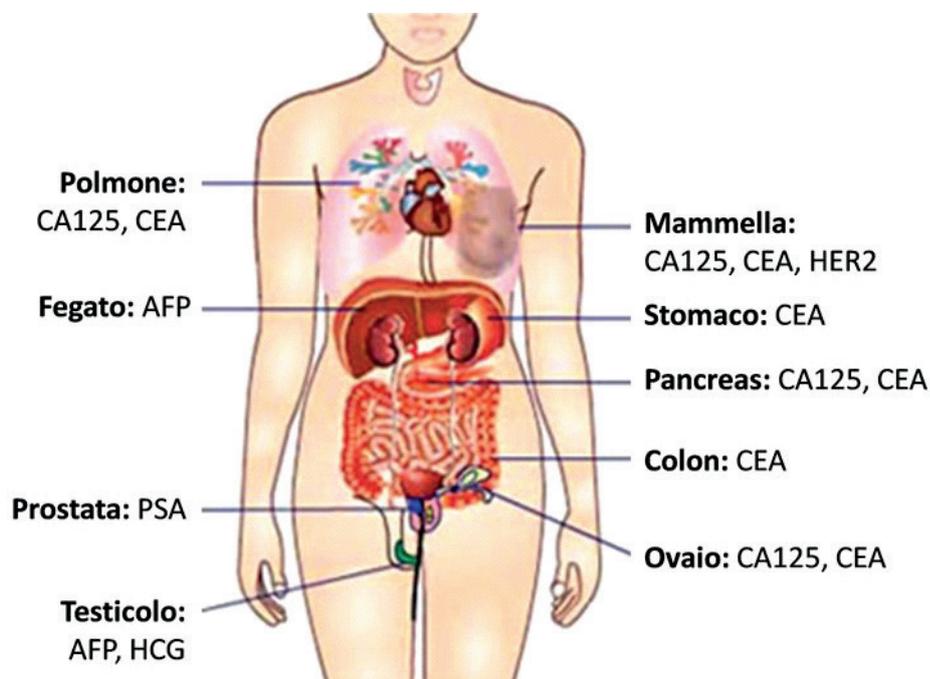
I cromosomi degli organismi superiori sono costituiti da una lunga doppia elica di DNA le cui estremità si associano a cappucci proteici formando strutture che prendono il nome di telomeri. Per ragioni intrinseche al meccanismo di duplicazione, il DNA terminale dei cromosomi non viene replicato, provocando un accorciamento delle estremità cromosomiche ad ogni ciclo di replicazione. In assenza di attività telomerasica, i telomeri dei cromosomi delle cellule in attività proliferativa si accorciano progressivamente. Quando la lunghezza dei telomeri scende sotto una soglia critica, definita, Hayflick limit, che si crede essere tra 50,70 divisioni cellulari, le cellule diventano senescenti e la divisione cellulare si ferma. Nella specie umana, la telomerasi, l'enzima che ricostruisce i telomeri, è attiva nelle cellule germinali, nelle cellule staminali e nelle cellule tumorali ma non nelle cellule somatiche.

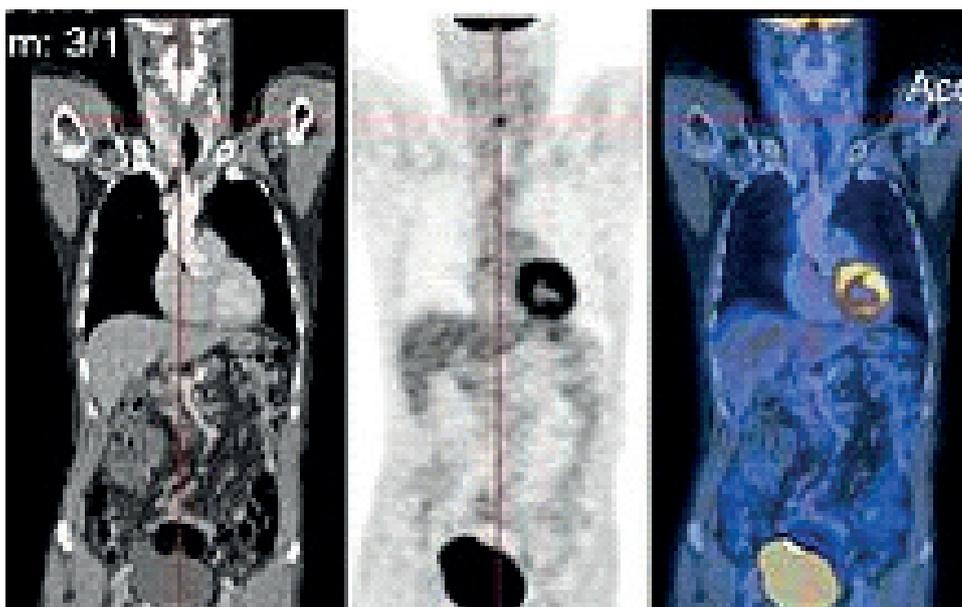
4. MA COME SI RIESCE A RINTRACCIARE UN TESSUTO TUMORALE?

Solitamente un tumore viene identificato attraverso un esame di screening tramite i marcatori tumorali. Essi sono delle sostanze riscontrabili nel sangue e meno frequentemente nel liquido ascitico, che presentano un aumento significativo della loro concentrazione in alcuni tipi di neoplasia. Un livello elevato di un marcatore tumorale può indicare la presenza di cancro, anche se possono esistere altre cause d'innalzamento dei loro valori.

I marcatori tumorali usati più di frequente sono: CEA, Ca15-3, Ca19-9, Ca125, NSE. In un esempio di marcatore specifico di un cancro è il CEA, Antigene Carcino-Embrionario o antigene carcinoembrionario, che consiste in una proteina del sangue (nello specifico è una glicoproteina di membrana il cui gene appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline), che all'inizio si pensava fosse prodotta soltanto dai tumori del sistema gastroenterico. Più tardi si è riscontrato che CEA influenza invece: il monitoraggio della progressione tumorale del cancro del colon-retto, la diagnosi differenziale delle neoplasie epatiche, il controllo post-operatorio e la determinazione di metastasi e recidive del tumore della mammella e del polmone.

Altre tipologie di marcatori invece possono presupporre soltanto il sospetto di cancro. Tra questi troviamo il PSA (antigene specifico prostatico) che pur non essendo un marcatore viene usato come tale, per identificare una disfunzione prostatica. Per accertare che questa disfunzione non sia causata da una presenza tumorale, si effettua una semplice TAC. Nel caso cui ce n'è fosse la necessità, per accertare la presenza tumorale si effettua la PET che è più specifica.



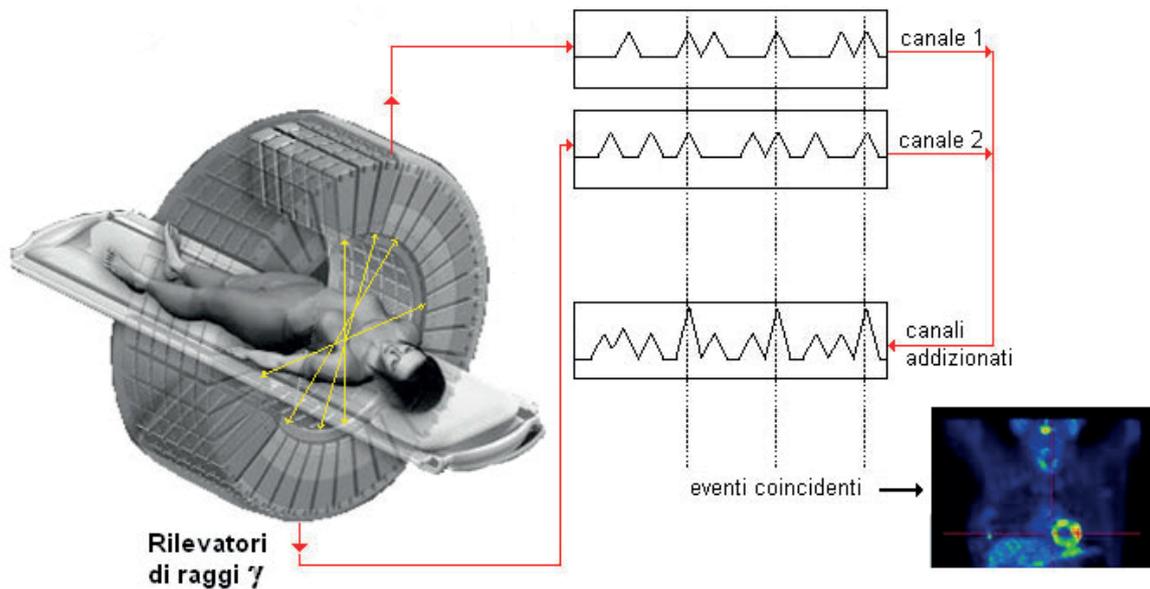


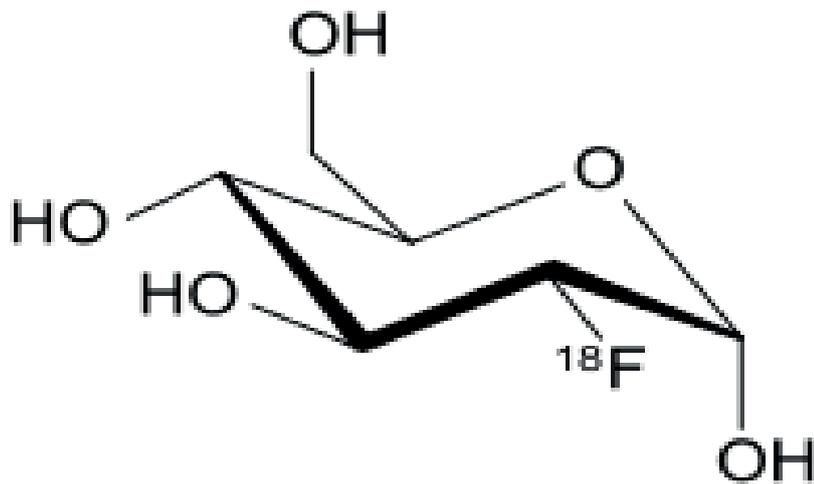
A sinistra si può vedere una TAC, a destra una PET, mentre nel mezzo una sovrapposizione delle due che mette in risalto il tessuto tumorale.

5. TOMOGRAFIA A EMISSIONE DI POSITRONI

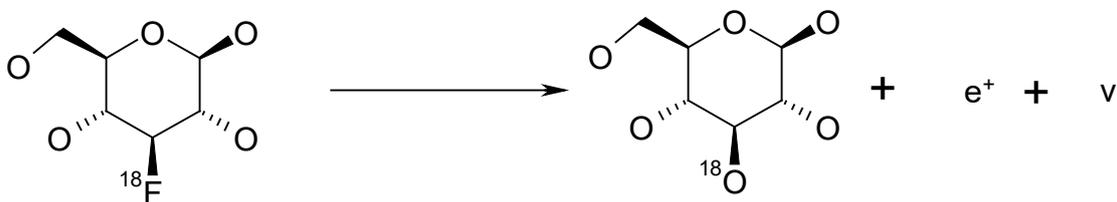
La Tomografia a Emissione di Positroni (o PET, dall'inglese Positron Emission Tomography) è una tecnica di medicina nucleare e di diagnostica medica utilizzata per la produzione di bioimmagini (immagini del corpo). La PET fornisce informazioni di tipo fisiologico, a differenza di TAC (Tomografia Assiale Computerizzata) e RMN (Risonanza Magnetica Compiuterrizzata) che invece forniscono informazioni di tipo morfologico e quantitativo del distretto anatomico esaminato. Con l'esame PET si possono ottenere anche mappe dei processi funzionali all'interno del corpo. La procedura PET inizia con l'iniezione di un radiofarmaco formato da un radio-isotopo tracciante con emivita breve, legato chimicamente a una molecola attiva a livello metabolico (vettore), ad esempio il fluorodesossiglucosio (^{18}F -FDG). Dopo un tempo di attesa, durante il quale la molecola metabolicamente attiva raggiunge una determinata concentrazione all'interno dei tessuti organici da analizzare, il soggetto viene posizionato nello scanner. L'isotopo di breve vita media decade, emettendo un positrone. Dopo un percorso che può raggiungere al massimo poche frazioni di millimetro, il positrone si annichila con un elettrone, producendo una coppia di fotoni gamma di energia 511 keV, emessi in direzioni opposte tra loro.

Questi fotoni sono rilevati quando raggiungono uno scintillatore, nel dispositivo di scansione, dove creano un lampo luminoso, rilevato attraverso dei tubi fotomoltiplicatori. Punto cruciale della tecnica è la rilevazione simultanea di coppie di fotoni: i fotoni che non raggiungono il rilevatore in coppia, non sono presi in considerazione. Dalla misurazione della posizione in cui i fotoni colpiscono il rilevatore, si può ricostruire l'ipotetica posizione del corpo da cui sono stati emessi, permettendo la determinazione dell'attività o dell'utilizzo chimico all'interno delle parti del corpo investigate. Lo scanner utilizza la rilevazione delle coppie di fotoni per mappare la densità dell'isotopo nel corpo, sotto forma di immagini di sezioni (generalmente trasverse) separate fra loro di 5 mm circa. La mappa risultante rappresenta i tessuti in cui la molecola rivelatrice si è maggiormente concentrata e viene letta e interpretata da uno specialista in medicina nucleare al fine di permettere all'oncologo di determinare una diagnosi e la scelta sul conseguente trattamento.





*Il fluorodeossiglucosio, è un analogo del glucosio.
 Il suo nome chimico completo è 2-fluoro-2-deossi-D-glucosio
 o anche 2-fluoro-2-deossi-D-glucopiranosio, abbreviato solitamente come FDG*



Decadimento del fluoro 18 che emette un positrone(anti-neutrino) diventando così ossigeno 18 assimilabile dall'organismo.

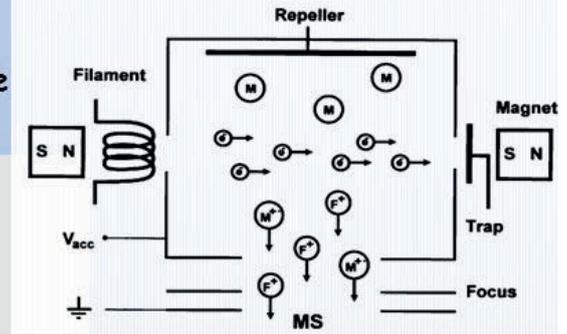
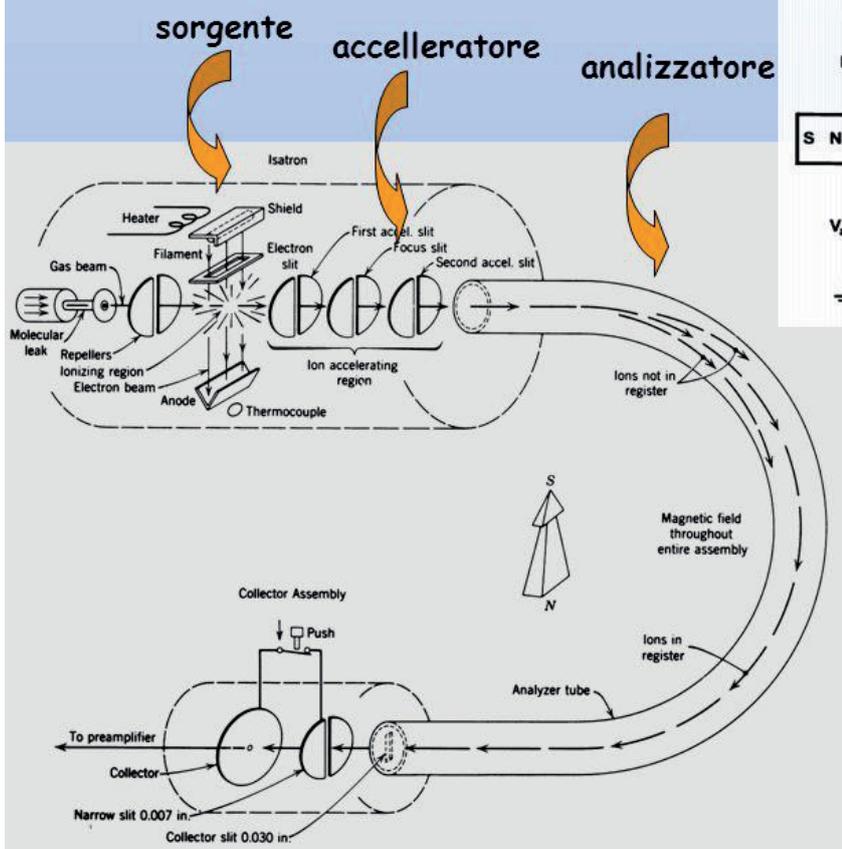
I radionuclidi utilizzati nella scansione PET sono generalmente isotopi con breve tempo di dimezzamento, come ^{11}C (~20 min), ^{13}N (~10 min), ^{15}O (~2 min) e soprattutto ^{18}F (~110 min). Per via del loro basso tempo di dimezzamento, i radioisotopi devono essere prodotti da un ciclotrone posizionato in prossimità dello scansionatore PET. Questi radionuclidi sono incorporati in composti normalmente assimilati dal corpo umano, come il glucosio, l'acqua o l'ammoniaca, e quindi iniettati nel corpo da analizzare per tracciare i luoghi in cui vengono a distribuirsi. I composti così contrassegnati vengono chiamati radiotraccianti o radiofarmaci. Ogni "famiglia" di tessuti tumorali sfrutta una determinata sostanza FDG, in quanto analogo del glucosio, viene captato più velocemente di altre dalla cellule ad alto utilizzo di glucosio, come quelle del cervello, del rene e del fegato. Viene metabolizzato in gran quantità anche dalle cellule tumorali che sono più "voraci" delle cellule sane. Come per il glucosio, all'ingresso nella cellula, l' FDG viene fosforilato in posizione 6, impedendone la fuoriuscita dalla cellula. A differenza del glucosio, tuttavia, l'FDG non può essere catabolizzato nella via glicolitica e rimane nella forma di FDG-6-fosfato fintantoché la molecola non emette positroni (e quindi resta visibile attraverso PET). Prima del decadimento del ^{18}F -FDG, infatti, la molecola non può essere utilizzata a causa dell'ingombro sterico generato dal fluoro. Il decadimento stesso, di fatto, porta il sostituito in posizione 2 da ^{18}F a ^{18}O : ciò significa che la molecola risultante è una vera e propria molecola di glucosio-6-fosfato, normalmente metabolizzabile dall'organismo. La diversa concentrazione di ^{18}F -FDG, dunque, è un ottimo metodo per valutare la biodistribuzione del glucosio e la sua fosforilazione nei diversi distretti dell'organismo. Per i motivi sopra elencati, si tratta di uno strumento estremamente preciso e pulito (in seguito al decadimento, non vi è alcun accumulo cellulare di biomolecole).

Successivamente si passa alla rimozione che può avvenire in vari metodi dall'asportazione chirurgica all'uccisione delle cellule cancerose tramite chemio-terapia, radio terapia, cioè attraverso l'utilizzo di raggi-x ad alta intensità. L'esame diretto del tessuto biologico mediante spettrometria di massa (SM) è iniziato negli anni '70. Il metodo non ha fornito alcuna informazione utile sulla composizione chimica dei campioni esaminati. La prima avventura è avvenuta con metodi di ionizzazione di desorbimento (spettrometria di massa di ionizzazione secondaria - SIMS, ionizzazione di desorbimento laser assistita a matrice - MALDI). Usando questi metodi, dopo una preparazione adeguata del campione, può essere raggiunta l'analisi chimica dei tessuti. Dalla fine degli anni '90 è emerso che i dati di spettrometria di massa negli studi di imaging hanno mostrato un elevato grado di specificità del tessuto, che l'istologia del tessuto potrebbe determinare le informazioni spettrali di massa e viceversa.

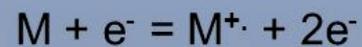
Nel caso delle proteine e dei peptidi rilevati, l'espressione specifica del tessuto delle proteine è comunemente nota. Metodi immuno histochemici precisi si basano su questo fenomeno. Il rilevamento dello spettrometro di massa, soprattutto dalle membrane cellulari e da tessuti simili, in particolare, di lipidi complessi provenienti da tessuti simili, dà risultati sorprendenti. La distribuzione delle proteine è in accordo con i modelli di distribuzione ottenuti con metodi immuno histo chemici, la distribuzione dei componenti lipidici della spettrometria di massa ionizzante diretta, precedentemente erano metodi relativi che hanno portato alla comparsa di una nuova era nello studio di campioni biologici. La ionizzazione elettrospray (DESI) è stata la prima tecnica MS, che ha permesso test non invasivi di qualsiasi organismo senza preparazione del campione, indipendentemente dalla loro forma o proprietà meccaniche.



Spettrometro di massa EI/magnetico



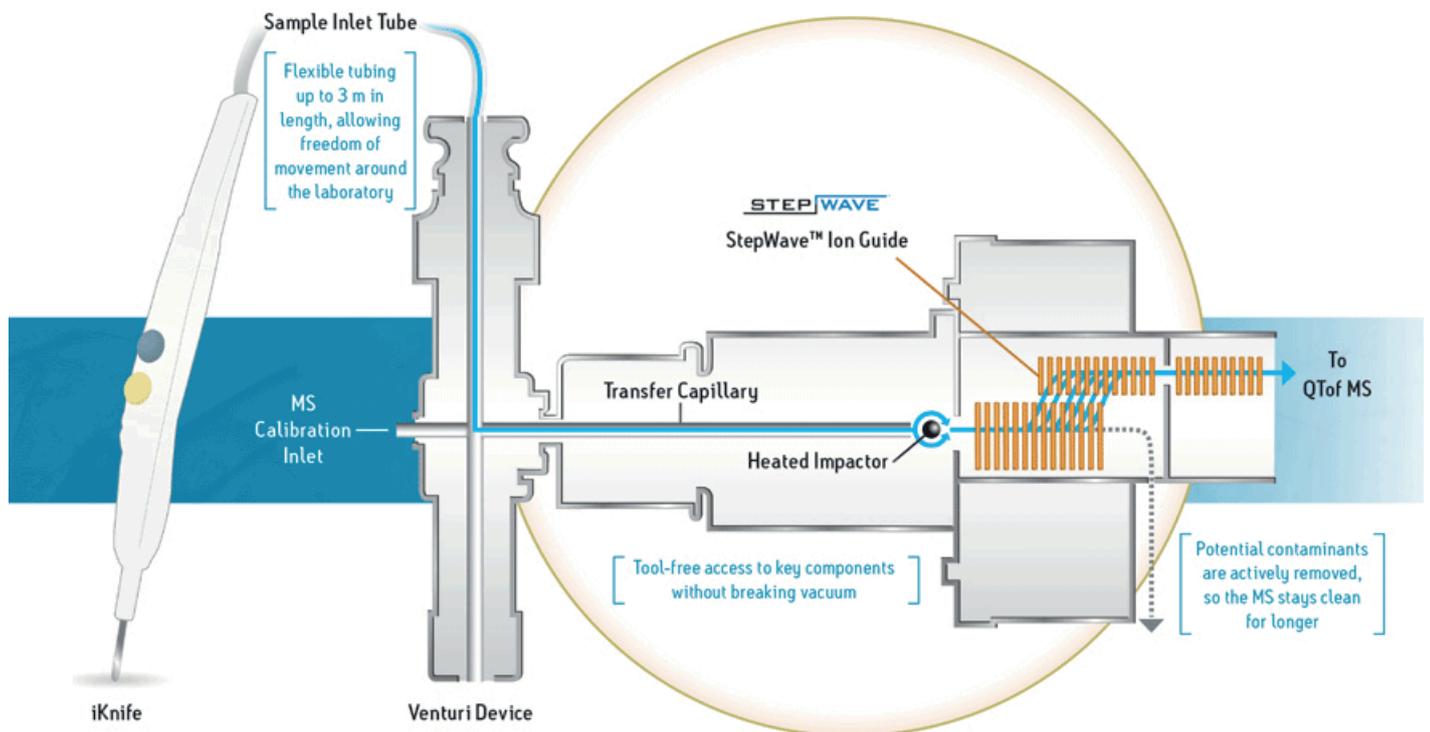
- L'apparecchio è sotto alto vuoto, con una pressione intorno ai 10^{-5} - 10^{-6} Tor.
- Il campione deve essere allo stato di vapore.
- Le molecole dal campione vaporizzato sono colpite da elettroni ad elevata energia (tipicamente 70 eV) emessi da un filamento incandescente.
- La grandissima parte degli ioni ha carica unitaria e si tratta quindi di ioni-radicali

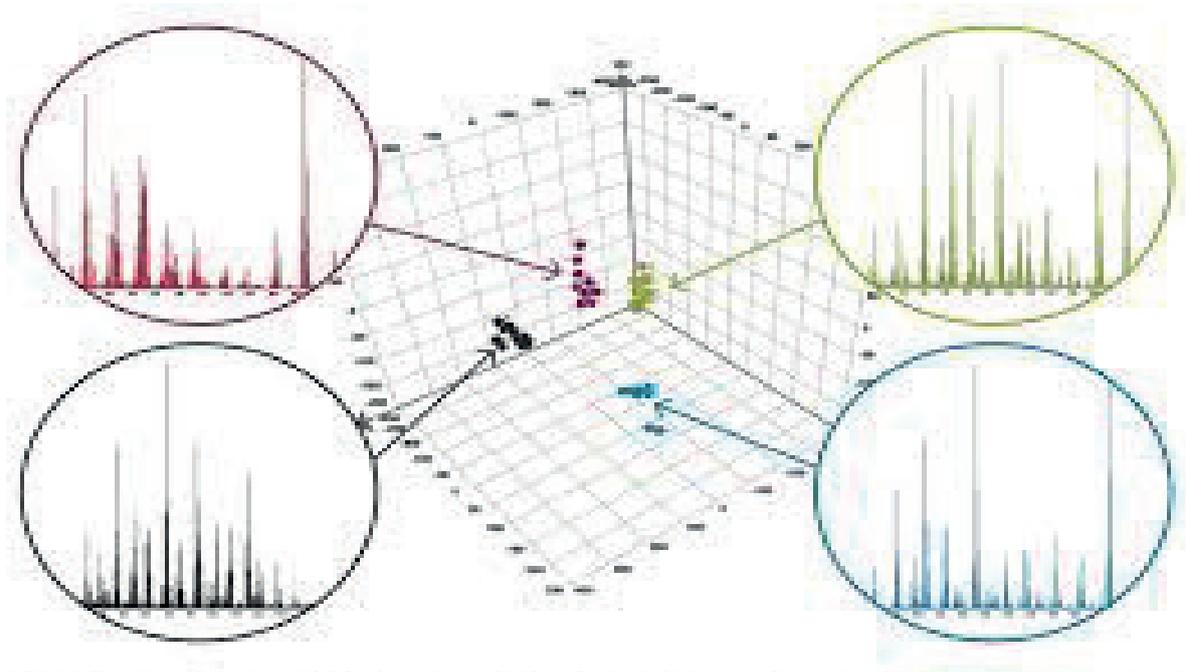


6. SPETTROMETRIA DI MASSA RAPIDA IONIZZAZIONE EVAPORATIVA

Durante l'estate del 2009 è stata descritta la spettrometria di massa di ionizzazione rapida evaporativa (REIMS). In primo luogo, i componenti lipidici dei tessuti forniscono le informazioni riguardo le caratteristiche delle cellule, ma diverse molecole di metaboliti e alcune proteine consentono anche la rilevazione di una cellula tumorale. Il vantaggio più importante della specificità dei dati di spettrometria di massa è al livello istologico. Il metodo REIMS è univoco perché è l'unico metodo che riesce a fornire tempestivamente tutte le informazioni utili dal punto di vista medico. I metodi precedenti prevedevano l'utilizzo di ioni che necessitano di tempistiche molto maggiori. Anche il metodo REIMS funziona tramite l'utilizzo di ioni che riesce a procurarsi con l'azionamento di una varietà di utensili per taglio del tessuto, ad esempio un coltello diatermico, un laser chirurgico o un atomizzatore a tessuto ad ultrasuoni, il quale forma un aerosol avente una composizione caratteristica del taglio del tessuto, che contiene anche i costrutti delle cellule ionizzate.

Tra di essi, in termini di utilizzo del metodo REIMS, sono importanti i fosfolipidi in forma di membrana intatti, che sono facilmente rilevabili mediante spettrometria di massa che contengono le combinazioni delle caratteristiche del particolare tipo di tessuto. L'analisi spettrometrica di massa, è solo una implementazione di uno sviluppo efficace del sistema di estrazione, che è stato necessario per tagliare il sito chirurgico al momento di eseguire lo spettrometro di massa aerosolato generato. A questo scopo viene utilizzato un tubo Venturi che serve per aspirare i vapori prodotti attraverso di essi. L'analisi del gas di combustione nello spettrometro di massa viene realizzata istantaneamente. Entro pochi decimi di secondo, si ottengono spettri di massa fosfolipidici specifici del tessuto, consentendo al chirurgo di avere un responso in meno di due secondi. L'analisi degli spettri raccolti è fatta di un software di valutazione speciale sviluppato a tal fine. Il software confronta continuamente i dati in ingresso durante l'operazione chirurgica, con gli spettri di massa memorizzati in un database, classificando in modo appropriato la cellula. Il risultato viene segnalato al chirurgo attraverso un segnale audio o visivo. Si stima che l'accuratezza di identificazione dei tessuti attraverso questo metodo sia superiore al 92%.





Risultato di una analisi spettrofotometrica di massa dove vengono evidenziati i veri gruppi lipidici che il computer distingue.

Pertanto, il metodo è adatto all'uso in un ambiente chirurgico per effettuare le quantificazioni di cellule tumorali in un tessuto nonché, per essere parte di un complesso sistema di identificazione dei tessuti utilizzato durante la rimozione del tumore chirurgico. Può aiutare inoltre il chirurgo nel sito operativo con esatte mappazioni istologiche. La tecnologia REIMS e la procedura elettrochirurgica aggiungono la diagnosi tissutale al principio operativo I-Knife del coltello intelligente. Determinare rapidamente le differenze all'interno dei tessuti con i dati del profilo molecolare raccolti dai campioni di tipo o origine simile è stata una rivoluzione in campo medico. Spesso non è possibile determinare differenze significative tra agglomerati cellulari sani e tumorali per ispezione visiva. Il software Progenesis QI offre un approccio intuitivo, basato sul flusso di lavoro, per elaborare grandi set di dati utilizzando metodi statistici multivariati potenti. Ciò evidenzia rapidamente le somiglianze e le differenze tra i campioni, consentendo loro di essere raggruppati in modo oggettivo e imparziale. Questo strumento ha avuto un'ottima performance durante i test, con un livello bassissimo di falsi positivi e negativi, rispettivamente dal 3.5 % e al 2.5 %. L' I-Knife permetterà di evitare i rischi associati alle tecniche di marcatura che coinvolgono marker fluorescenti. Come dichiara il responsabile del progetto :“Sarà in grado di ridurre le recidive negli interventi che tipicamente presentano neoplasie a causa di errori chirurgici, come negli interventi di rimozione di cancro al seno”.

BIBLIOGRAFIA

<http://www3.imperial.ac.uk>

<http://www.pianetachimica.it>

<https://it.wikipedia.org>

<http://www.rcsb.org>

le immagine sono state trovate nei vari link ed alcune in google

le molecole sono state disegnate con i seguenti programmi e siti :

<http://www.rcsb.org>

Symyx Draw

IsisDraw