

Calcolo delle cinetiche dei substrati: modello monocompartimentale.

Calcolare la cinetica di un substrato significa determinare la velocità di comparsa (*rate of appearance*, **Ra**) di un substrato e, perlomeno nello stato stazionario, la velocità di scomparsa dello stesso (*rate of disappearance*, **Rd**). Possono inoltre essere derivati altri parametri come l'emivita, il tempo medio di residenza e la clearance.

Infusione costante di un tracciante

Si consideri la situazione nella quale la quantità di tracciato (Q , [massa]) all'interno del corpo, considerato come un singolo pool, sia costante (stato stazionario), ossia la sua velocità comparsa (Ra , [massa]*[tempo]⁻¹) e di perdita (Rd , [massa]*[tempo]⁻¹) sono uguali. (fig. 1). Ciò può essere espresso matematicamente (eq 1) attraverso un bilancio di massa:

$$\frac{dQ(t)}{dt} = Ra(t) - Rd(t) = 0$$

Allo stato stazionario, la sola misura di Q non permette né la stima di Ra né quella di Rd . Da un punto di vista sperimentale, inoltre, ciò che viene effettivamente misurato è la concentrazione di tracciato (C , [massa]*[volume]⁻¹):

$$C = \frac{Q}{V}$$

dove V è il volume. È pertanto necessario l'uso di un tracciante.

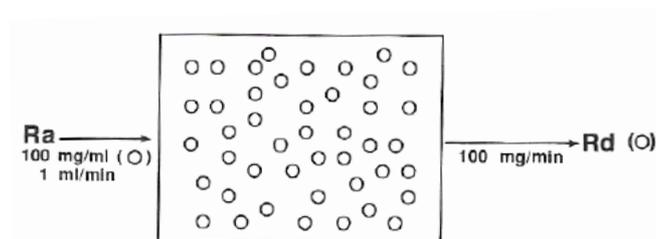


Figura 1: rappresentazione schematica di un singolo pool. Poiché viene assunto lo stato stazionario $Ra=Rd$

Al tempo $t = 0$ viene somministrato un tracciante (radioattivo o stabile), essenzialmente senza massa, che è, in sostanza, chimicamente identico al tracciato, attraverso una infusione costante (figura 2)

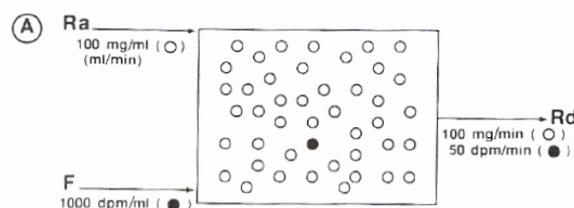


Figura 2: rappresentazione schematica della concentrazione relativa tracciante/tracciato dopo un breve intervallo dall'aggiunta di un tracciante radioattivo

Per il principio di indistinguibilità del tracciante, il suo volume di distribuzione è identico al volume di distribuzione del tracciato, V . Anche per il tracciante (q , [massa]), o decadimenti nel tempo es.

[dpm]) è valido il principio del bilancio di massa, perciò la variazione di quantità del tracciante (eq.3) nel sistema è il risultato della differenza tra la velocità di ingresso (ir , infusion rate [massa]*[tempo]⁻¹, [dpm]* [tempo]⁻¹) e la velocità di utilizzazione (rd , [massa]* [tempo]⁻¹, [dpm]* [tempo]⁻¹):

$$\frac{dq(t)}{dt} = ir(t) - rd(t)$$

Al tempo 0, non vi è tracciante nel sistema quindi $q(0) = 0$. In questa situazione, a differenza del sistema del tracciato dove Q è costante, $q(t)$ cambia con il tempo e quindi dq/dt non è più uguale a zero. Supponendo che il processo di uptake non distingua tra tracciante e tracciato non marcato (indistinguibilità isotopica), il tracciante verrà quindi perso dal compartimento corporeo ad una velocità proporzionale all'abbondanza relativa, nel compartimento corporeo, di tracciante rispetto al tracciato (eq 4):

$$\frac{rd}{q} = \frac{Rd}{Q}$$

Subito dopo l'inizio dell'infusione, la concentrazione relativa di tracciante sarà inferiore nel corpo rispetto a quella nella mistura di infusione, e quindi il tracciante lascerà il compartimento corporeo ad una velocità inferiore rispetto alla velocità alla quale appare. Ci sarà quindi un aumento nella concentrazione relativa di tracciante (attività specifica [SA]) nel compartimento corporeo (figura 3).

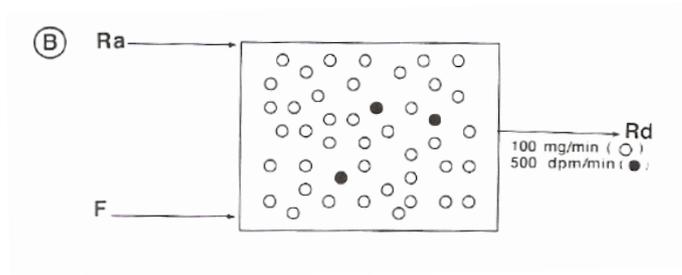


Figura 3: rappresentazione schematica dell'incremento relativo del tracciante rispetto al tracciato (da confrontare con lo schema di figura 2)

Anche il tracciante è quantificato come concentrazione $c(t)$, vista come massa di tracciante (o decadimenti per minuto) per unità di volume:

$$c(t) = \frac{q(t)}{V}$$

La quantità di tracciate viene inoltre solitamente espressa come rapporto tra tracciante e tracciato:

$$TTR(t) = \frac{q(t)}{Q}$$

Poiché il volume V è lo stesso per il tracciante e tracciato, $TTR(t)$ rappresenta anche il rapporto tra le concentrazioni di tracciante e tracciato (che è ciò che normalmente viene misurato):

$$TTR(t) = \frac{q(t)}{Q} = \frac{c(t)}{C}$$

Ad un certo istante (dipendente dalla cinetica del sistema), il tracciante sarà “perso” alla stessa velocità con la quale compare: l'utilizzazione rd di tracciante eguaglia la velocità di infusione ir :

$$\frac{dq(t)}{dt} = ir - rd = 0$$

cioè $ir = rd$, e quindi non ci saranno ulteriori cambiamenti nelle concentrazioni relative di tracciante e di tracciato sempre che l'infusione rimanga costante. Questa situazione è nota come *equilibrio isotopico*, poiché viene raggiunto un plateau nell'arricchimento del compartimento corporeo del tracciato (figura 4).

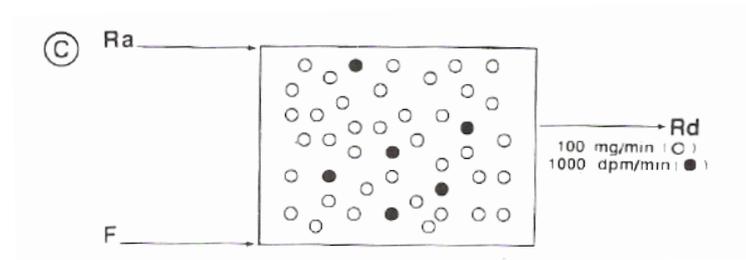


Figura 4: rappresentazione schematica dell'arricchimento isotopico

Sfruttando l'uguaglianza “a regime” tra $ir = rd$ ed il fatto che l'estrazione rd di tracciante è una frazione dell'estrazione totale del sistema tracciante + tracciato, è possibile ottenere un'espressione per Ra in funzione della velocità di infusione di tracciante e del rapporto tracciate / tracciato:

$$Ra = Rd = \frac{rd}{q} Q = \frac{rd}{TTR} = \frac{ir}{TTR}$$

È inoltre possibile ottenere il medesimo risultato attraverso la risoluzione del sistema di equazioni differenziali:

$$\begin{cases} \frac{dQ}{dt} = Ra - Rd = 0 \\ \frac{dq}{dt} = ir - rd \\ q(0) = 0 \end{cases}$$

Dividendo la seconda equazione per Q e tenendo conto delle relazioni dovute all'indistinguibilità isotopica:

$$\frac{1}{Q} \frac{dq}{dt} = \frac{ir}{Q} - \frac{rd}{Q} = \frac{ir}{Q} - \frac{1}{Q} Ra \cdot TTR = \frac{dTTR}{dt}$$

L'equazione differenziale completa è quindi

$$\frac{dTTR}{dt} = -\frac{Ra}{Q} TTR + \frac{ir}{Q}$$

La soluzione è la somma della soluzione dell'omogenea associata più la soluzione particolare:

$$TTR(t) = Ae^{-\frac{Ra}{Q}t} + \frac{ir}{Ra}$$

Il valore della costante A si ottiene imponendo la condizione iniziale $q(0)=0$, che equivale a dire $TTR(0)=0$, ottenendo per $A=-ir/Ra$:

$$TTR(t) = \frac{ir}{Ra} \left(1 - e^{-\frac{Ra}{Q}t}\right) = TTR_p \left(1 - e^{-\frac{Ra}{Q}t}\right) = TTR_p(1 - e^{-kt})$$

Dove con TTR_p si intende il valore di arricchimento “a regime” (plateau) come mostrato nel punto c di figura 5, e il rapporto Ra/Q , che dimensionalmente corrisponde all’inverso di un tempo, è indicato con k.

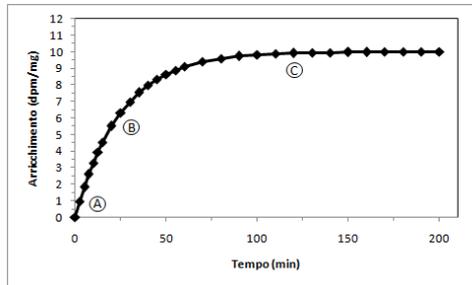


Figura 5: al punto © si ha l’arricchimento all’equilibrio (E_p)

Quindi quando viene raggiunto un plateau nella curva di arricchimento

$$TTR_p = \frac{ir}{Ra}$$

Ottenendo le medesime relazioni ottenute attraverso ragionamenti “empirici”. La curva dell’arricchimento rispetto al tempo durante un’infusione costante di isotopo è quindi una curva esponenziale i cui valori possono essere ottenuti attraverso una procedura di fitting dei punti sperimentali.

Grazie a quest’approccio più matematico è possibile calcolare altri parametri:

Emivita (tempo) $T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$

Pool Size (massa) $Q = \frac{ir}{TTR_p k}$

Tempo di turnover (tempo) $\frac{T_{1/2}}{\ln 2} = \frac{1}{k}$ (tempo medio di residenza, MRT)

Clearance (ml/min) $\frac{Rd}{\text{Tracee concentration}} = \frac{Rd}{C} = Vk$

È anche possibile predire il tempo necessario per raggiungere il plateau dell’arricchimento. Ponendo f uguale alla frazione di arricchimento raggiunta, $f = 1 - e^{-kt}$, il tempo necessario per raggiungere un particolare valore di arricchimento è

$$t = -\frac{1}{k} \ln(1 - f)$$

Bolo di tracciante

In un ideale singolo compartimento, l'iniezione di un bolo di tracciante determina un iniziale aumento nel rapporto tracciante tracciato e, in seguito, una diminuzione dello stesso rapporto nel tempo in un modo tale da essere descritto da una funzione monoesponenziale. Tale funzione può essere ottenuta risolvendo il medesimo sistema di equazioni differenziali visto per l'infusione continua cambiando le condizioni iniziali e tenendo conto che in questo caso l'infusion rate del tracciante è pari a zero:

$$\begin{cases} \frac{dQ}{dt} = Ra - Rd = 0 \\ \frac{dq}{dt} = ir - rd = -rd \\ q(0) = q_0 \end{cases}$$

Dove q_0 corrisponde alla dose fornita attraverso il bolo¹. Lavorando sulla seconda equazione secondo la modalità precedentemente vista, si ottiene:

$$TTR(t) = TTR_0 e^{-kt}$$

Dove TTR_0 è l'arricchimento a $t = 0$ e k è la velocità, costante, di eliminazione e pari a Ra/Q . Questa equazione può essere utilizzata per ottenere k . Prendendo il logaritmo naturale di entrambi i membri

$$\ln(TTR(t)) = \ln(TTR_0) - kt \rightarrow k = \frac{\ln(TTR(t)) - \ln(TTR_0)}{-t}$$

Il valore di k può essere quindi semplicemente ottenuto plottando l'arricchimento rispetto al tempo in una scala semilogaritmica, e calcolando la pendenza di questa curva. Il termine TTR_0 può essere determinato per estrapolazione nel grafico arricchimento-tempo. Partendo da questi dati possono essere calcolati i seguenti fattori:

Pool size $Q = \frac{q_0}{TTR_0} =$

Ra $Ra = kQ$

Nonché l'emivita ed il tempo medio di residenza secondo formule già viste. Nel caso in cui non si avesse a disposizione un programma di fitting, la Ra può essere calcolata valutando l'area sotto la curva dell'arricchimento rispetto al tempo che segue un bolo:

$$Ra = \frac{q_0}{\int_0^{\infty} TTR(t) dt}$$

È infine da notare che in questi tipi di esperimenti, il valore di Ra che si ottiene è lo stesso che si ricava con la tecnica di infusione costante. Le uniche variazioni dei valori possono derivare dalla precisione nell'analisi dei dati e dalla procedura di fitting delle curve, oppure da effetti che una grande dose di bolo (di un isotopo stabile ad esempio) potrebbe avere sulla cinetica del tracciato endogeno.

¹ L'iniezione di un bolo di tracciante può essere schematizzata anche attraverso una delta di Dirac $\delta(0) = q_0$

Primed constant infusion

Se la dimensione di un pool di un substrato è grande rispetto alla velocità alla quale è modificato, ci potrebbero volere diverse ore per raggiungere l'equilibrio isotopico durante un'infusione continua. È comunque spesso desiderabile raggiungere l'equilibrio isotopico nel minor tempo possibile in modo da calcolare l' Ra utilizzando l'approccio dell'arricchimento all'equilibrio. Lo stato fisiologico di un individuo potrebbe cambiare mentre viene raggiunto l'equilibrio, alterando magari la cinetica del substrato che viene studiato. Inoltre molto spesso è logisticamente impossibile studiare soggetti se l'infusione dura più di due-tre ore perché gli esperimenti potrebbero influire sulla salute dei pazienti stessi. Nel 1954 Searle et al. hanno descritto l'utilizzo di una dose di "carica" di tracciante in aggiunta ad una infusione costante di tracciante per misurare la cinetica del glucosio in un cane. Questa tecnica sostanzialmente riduce il tempo richiesto per raggiungere l'equilibrio isotopico per il glucosio plasmatico, mentre non influenza il valore finale dell'equilibrio.

L'obiettivo della dose q_0 in aggiunta all'infusione continua di tracciante è di marcare istantaneamente il pool totale miscibile del metabolita verso l'equilibrio dell'arricchimento che sarebbe stato raggiunto come conseguenza dell'infusione continua da sola. All'equilibrio isotopico, il rate of appearance del substrato non marcato è uguale all'infusion rate dell'isotopo diviso per l'arricchimento al plateau (TTR_p) del substrato secondo la già nota relazione:

$$Ra = \frac{ir}{TTR_p}$$

La quantità iniziale di bolo (q_0) che ipoteticamente permetterebbe di raggiungere l'arricchimento al plateau (TTR_p) deve soddisfare la seguente equazione:

$$TTR_p = \frac{q_0}{Q}$$

Riarrangiando le due equazioni si ottiene:

$$\frac{Q}{Ra} = \frac{q_0}{ir}$$

Quindi la priming dose, espressa in relazione con l'infusion rate, è una funzione del body pool del substrato diviso per il suo rate of appearance.

Due approcci possono essere utilizzati per determinare l'appropriata priming dose per un substrato la cui cinetica non è stata precedentemente determinata. Il primo approccio è di stimare il body pool ed il rate of appearance ed a partire da questi valori stimare l'appropriato rapporto q_0/ir . test empirici determineranno la quantità di prime corretta. La prima approssimazione della priming dose sarà in difetto, perché l'ipotesi sulla quale si basa la teoria è assumere un mixing immediato della priming dose iniettata attraverso l'interno pool miscibile del corpo, e in pratica questo non è vero sia per un bolo che per un'infusione costante.

È possibile calcolare una priming dose approssimativamente corretta, invece, effettuando uno studio preliminare utilizzando l'iniezione di un bolo. Come descritto prima, la concentrazione di una dose iniettata in un singolo pool decade esponenzialmente. L'arricchimento in qualsiasi momento è descritto dall'equazione

$$TTR(t) = TTR_0 e^{-kt}$$

Mentre nel caso di un'infusione continua lo stesso substrato marcato nel medesimo spazio fisiologico darà un arricchimento del tipo

$$TTR(t) = TTR_p(1 - e^{-kt}) = \frac{ir}{Qk}(1 - e^{-kt})$$

Dove viene sfruttata la relazione che lega la Ra del tracciato con la costante cinetica k. L'obiettivo della priming dose è di creare la situazione nella quale la somma del declino dell'arricchimento che risulta dall'iniezione di un bolo di un prime e l'aumento nell'arricchimento dovuto all'infusione continua sia uguale al plateau.

$$TTR(t) = TTR_0 e^{-kt} + \frac{ir}{Qk}(1 - e^{-kt}) = \frac{ir}{Qk}$$

E quindi

$$\frac{TTR_0 Q}{ir} = \frac{q_0}{ir} = \frac{1}{k}$$

Nel caso in cui il prime fosse in eccesso ci si trova in un declino iniziale dell'arricchimento. In tal caso, i valori iniziali possono essere utilizzati per ottenere il valore di k, mentre i valori del plateau possono essere utilizzati per calcolare il valore di Ra. Nel caso di bolo sovrastimato l'equazione per il TTR(t) vale:

$$TTR(t) = TTR_0^+ e^{-kt} + \frac{ir}{Qk}(1 - e^{-kt}) = \frac{ir}{Qk} + \left(\frac{q_0}{Q} - \frac{ir}{Qk}\right) e^{-kt} = TTR_p + \left(\frac{q_0 k - ir}{kQ}\right) e^{-kt}$$

Nel caso di prime perfetto il termine che moltiplica l'esponenziale è nullo, quindi $k = ir/q_0$.