



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Chirurgia "P. Valdoni"

**TESI DI**  
**DOTTORATO DI RICERCA IN CHIRURGIA**

Curriculum C

**VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA**  
**ALLA TERAPIA ANTIANGIOGENICA**  
**MEDIANTE TC PERFUSIONALE E PARAMETRI**  
**BIOUMORALI**  
**IN PAZIENTI AFFETTI DA METASTASI EPATICHE**

**Dottoranda:**  
Dr.ssa Sara Savelli

**Tutor:**  
Chiar.mo Prof. Luciano Izzo

Dottorato di Ricerca - XXIV ciclo

# **INDICE**

<b>CAPITOLI</b>	<b>PAGINE</b>
<b>I - Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>II - Il fenomeno della neoangiogenesi e lo sviluppo della terapia antiangiogenica</b>	<b>4</b>
<b>III - TC perfusionale</b>	<b>9</b>
<b>IV - Misure radiologiche della risposta alla terapia nei tumori solidi</b>	<b>11</b>
<b>V - Parte sperimentale</b>	<b>13</b>
<b>Scopo del lavoro di ricerca, obiettivi primari e secondari</b>	<b>13</b>
<b>Metodologia di ricerca</b>	<b>15</b>
<b>Risultati</b>	<b>21</b>
<b>Discussione</b>	<b>54</b>
<b>VI – Esempi clinici</b>	<b>59</b>
<b>VII - Bibliografia</b>	<b>71</b>

## **INTRODUZIONE**

La mia attività di ricerca nell'ambito di questo dottorato è stata rivolta alla validazione di uno strumento di imaging di tipo morfologico e funzionale, quale la TC perfusionale, per la valutazione della risposta alla terapia antitumorale con inibitori dell'angiogenesi in pazienti con metastasi epatiche.

Il fegato è il sito più comune di metastatizzazione a distanza di molti tumori solidi tra cui il tumore del colon retto [1].

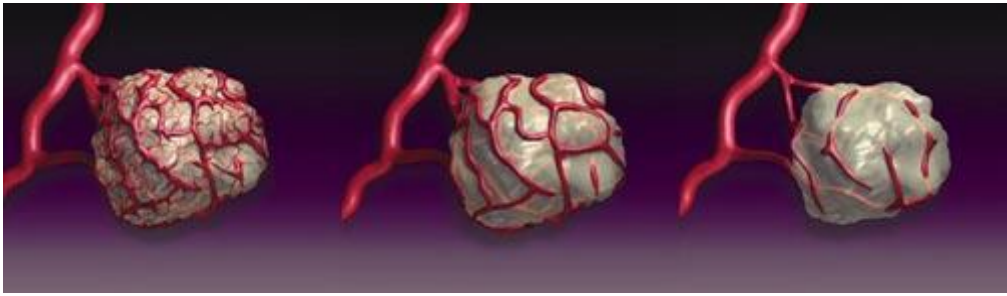
Tuttavia mentre le lesioni ripetitive epatiche singole possono essere trattate chirurgicamente o con radiofrequenza percutanea migliorando il tasso di sopravvivenza a 5 anni, la patologia metastatica multifocale è candidata al trattamento chemioterapico [2].

La terapia antitumorale classica mira ad uccidere le cellule tumorali ed in ultima analisi quindi a ridurre il numero di cellule tumorali e la dimensione del tumore.

Pertanto il monitoraggio della risposta a tale terapia citotossica, si avvale di strumenti di imaging di tipo morfologico (US, TC, RM), capaci di dimostrare la riduzione dimensionale delle lesioni. Il tipo di risposta viene inoltre classificata attraverso un sistema di valutazione internazionale che si basa sul criterio monodimensionale così come stabilito dalla conferenza europea-americana-canadese nel RECIST e successive modificazioni [3,4].

Recentemente è stata tuttavia introdotta una nuova strategia terapeutica, la terapia antiangiogenica, che mira invece ad "affamare" il tumore bloccando la capacità di creare vasi di supporto nutritivo e quindi inducendo una dormancy del tumore che inizialmente mantiene la sua dimensione originale (Figura 1) [2].

Figura 1. Meccanismo di azione dei farmaci antiangiogenici.



Per il monitoraggio della risposta a tale terapia antiangiogenica, il criterio dimensionale non sembra adeguato o perlomeno è tardivo e sottostima la risposta precoce alla terapia che in primo luogo distrugge i vasi e riduce la perfusione tumorale lasciando invece invariata la dimensione del tumore.

In base a questa osservazione si è cercato di trovare pertanto altri strumenti di imaging in grado di valutare la perfusione tumorale e di monitorare più accuratamente e precocemente la risposta alla terapia antiangiogenica. [5,6]

Ad oggi non sono ancora stati validati peraltro strumenti specifici di monitoraggio della risposta biologica a tali farmaci. I potenziali biomarker dell'angiogenesi fino a oggi utilizzati, sia immunoistochimici (conta dei microvasi, determinazione dei recettori per il fattore di crescita vascolare endoteliale) che sierici (conta delle cellule endoteliali circolanti) hanno dato risultati incoraggianti, ma poco uniformi [7].

La biopsia tissutale con la misurazione della densità microvascolare è considerata attualmente il gold standard per la quantizzazione della vascolarizzazione tissutale negli studi istologici ma è una procedura invasiva, di fatto non adatta alla pratica clinica per il monitoraggio longitudinale della risposta alla terapia [7].

Esistono peraltro anche altre tecniche non invasive per la determinazione della perfusione

tissutale come la misurazione della clearance epatica del sorbitolo o le tecniche di medicina nucleare (SPECT, PET) ma la prima è influenzata dalla presenza/assenza di alcuni enzimi e da difetti nel meccanismo di trasporto epatico del sorbitolo stesso e le seconde da una scarsa risoluzione spaziale e temporale.

La risonanza magnetica con sequenze DWI è stata anche utilizzata allo scopo di stimare la perfusione epatica ma in realtà offre un imaging della struttura cellulare delle lesioni tumorali che è correlata alla possibilità di movimento all'interno della lesione delle molecole di acqua libera e solo in parte ed in particolare per piccoli valori di  $b$  alla perfusione intratissutale [8].

La TC multidetettore e la Risonanza Magnetica con sequenze dinamiche sfruttano invece entrambe la somministrazione del mezzo di contrasto per la determinazione attraverso software dedicati dei parametri di perfusione tissutale [9,10,11].

In particolare l'imaging TC perfusionale si basa sulla valutazione del trasporto attraverso il flusso sanguigno del mezzo di contrasto iodinato al tessuto e dello scambio attraverso la diffusione di queste molecole di contrasto tra lo spazio intravascolare e lo spazio interstiziale extravascolare [12].

Grazie alla possibilità offerta dalle nuove tecnologie di visualizzare e misurare in modo semplice e ripetibile i parametri della perfusione vascolare, sembra chiaro come il monitoraggio della risposta ai farmaci antiangiogenici debba richiedere oggi anche la valutazione perfusionale [12, 13].

A causa della stretta dipendenza dall'operatore della metodica ecografica e dalla non disponibilità del software perfusionale per il calcolo della perfusione epatica in Risonanza Magnetica presso il Nostro Policlinico, la mia attenzione si è rivolta all'analisi della capacità di monitoraggio della risposta alla terapia antiangiogenica mediante TC perfusionale.

## **IL FENOMENO DELLA NEOANGIOGENESI E LO SVILUPPO DELLA TERAPIA ANTIANGIOGENICA**

Le ricerche condotte in modo pionieristico da Judah Folkman a Boston [14,15] e successivamente confermate dai più prestigiosi laboratori di ricerca oncologica internazionali [16] hanno dimostrato che l'angiogenesi è un processo fondamentale per la crescita e la diffusione a distanza dei tumori [17]. Studi clinici hanno altresì evidenziato che i tumori riccamente vascolarizzati hanno cattiva prognosi e che non sono responsivi ai trattamenti oncologici convenzionali [18].

L'angiogenesi o neoangiogenesi [19,20] consiste in particolare nella stimolazione della crescita vascolare da parte delle cellule tumorali stesse mediante la produzione di fattori di crescita vascolari che determinano la produzione di vasi neoformati collegati tra loro in modo causale, disorganizzati, aberranti in ogni aspetto della loro struttura e funzione con pori di comunicazione con l'esterno sovradimensionati. Di conseguenza questi vasi non sono in grado di mantenere un normale gradiente di pressione attraverso le loro pareti, con fuoriuscita di fluidi verso l'esterno ed aumento della pressione interstiziale, che può arrivare ad eguagliare quella interna ai vasi.

Questo innaturale gradiente di pressione impedisce ai farmaci chemioterapici di raggiungere le cellule tumorali, e in più provoca un'accumulo del liquido interstiziale producendo un rigonfiamento dentro e intorno al tessuto tumorale.

Inoltre le anomalie vascolari creano anche un microambiente innaturale nel tumore. Poiché molte aree tumorali non sono vascolarizzate e i vasi presenti non forniscono ossigeno a sufficienza ai tessuti che li circondano, si instaura uno stato generale di ipossia e di acidità. L'ipossia a sua volta provoca alterazioni nelle cellule tumorali rendendole più aggressive e propense alla metastatizzazione.

Inoltre in carenza di ossigeno le cellule immunitarie, che potrebbero contribuire a combattere il

tumore, non funzionano, e le radioterapie come pure alcuni farmaci chemioterapici, che per uccidere le cellule sfruttano processi chimici che richiedono ossigeno, non sono efficaci.

I farmaci antiangiogenici [21,22,23] sono composti in grado di bloccare la formazione dei neovasi sanguigni tumorali, rallentando così la crescita del tumore che non riceve più il nutrimento e l'ossigeno assicurato dal flusso ematico ("affamando il tumore") e contemporaneamente rendendo il tumore più permeabile all'azione della chemioterapia.

Numerosi inibitori selettivi dell'angiogenesi sono in corso di valutazione clinica nella malattia metastatica. La categoria più rappresentativa è quella degli inibitori selettivi del vascular endothelial growth factor (VEGF). [24,25]

Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) [26] è un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il VEGF, uno dei più importanti agenti proangiogenetici, la cui elevata espressione si correla ad una cattiva prognosi. Attraverso il legame a due selettivi recettori di membrana (Flt-1 [VEGFR-1] e KDR [VEGFR-2]), il VEGF attiva pathways di segnale che a livello nucleare si traducono nella stimolazione della proliferazione e nella migrazione di cellule endoteliali attivate, con conseguente induzione dell'angiogenesi e della crescita tumorale. L'anticorpo monoclonale bevacizumab lega con alta specificità il dominio extramembranario dei recettori per il VEGF, bloccando l'innescamento della trasduzione del segnale di crescita dalla membrana al nucleo. Altri farmaci anti-VEGF agiscono inibendo la fosforilazione della tirosinchinasi recettoriale specifica (PTK787, AG013736).

Nelle prove di laboratorio, e nelle sperimentazioni cliniche l'avastatin ha distrutto i vasi sanguigni nei tumori animali e in quelli umani, ma impiegata da sola, non ha prolungato la sopravvivenza dei pazienti [27]. In un trial clinico fondamentale per la sua approvazione, l'avastatin ha migliorato la sopravvivenza dei malati di cancro coloretale avanzato, ma solo se abbinata alla chemioterapia standard.

Si è visto infatti che le modifiche della vascolarizzazione tumorale non si limitavano alla semplice distruzione dei vasi. Due settimane dopo un'unica iniezione dell'avastatin, il flusso sanguigno nel tumore diminuiva dal 30 al 50 per cento. Diminuivano però anche la densità dei microvasi, il numero complessivo dei vasi sanguigni e la pressione del liquido interstiziale. Successivamente inoltre le cellule tumorali che non avevano più accesso ai vasi eliminati andavano incontro ad una forma di morte cellulare programmata, l'apoptosi, caratterizzata da mancanza di ossigeno e di nutrienti.

Il ripristino del normale funzionamento dei vasi tumorali apre quindi una finestra temporale durante la quale il trattamento con una serie di terapie antitumorali dovrebbe ottenere il massimo dell'efficacia. Per beneficiare davvero di questa nuova scoperta sulla terapia antiangiogenica abbinata a radioterapia o chemioterapia, un oncologo dovrebbe sapere quando i vasi del tumore cominciano a diventare normali e per quanto tempo rimangono in questo stato. La ricerca è tornata alla sperimentazione sui topi per caratterizzare meglio questo periodo, che è stato chiamato "la finestra di normalizzazione". Sono stati trattati tumori cerebrali negli animali con un anticorpo progettato per bloccare il principale recettore del VEGF nelle cellule endoteliali, registrando che i primi segni di normalizzazione iniziavano dopo un giorno. Durante la finestra di normalizzazione che durava cinque o sei giorni, l'ossigenazione tumorale cresceva, e la radioterapia dava gli esiti terapeutici migliori. La sperimentazione sugli uomini ha riguardato 30 pazienti con tumori cerebrali (glioblastomi) che erano ricresciuti nonostante un aggressivo trattamento chirurgico, radio e chemioterapico, pazienti che avevano una speranza di vita inferiore a sei mesi. Tutti hanno ricevuto una dose quotidiana di un farmaco sperimentale, il RECENTIN, un potente inibitore dei tre principali recettori cellulari per il VEGF.

Usando sofisticate tecniche di imaging si sono tenuti sotto controllo i tumori per verificare gli effetti della terapia. Fra i segni di normalizzazione vascolare si è registrato una riduzione del



diametro e della permeabilità dei vasi protattasi per almeno 28 giorni, mentre alcuni cambiamenti sono durati per tutti i quattro mesi dello studio. Inoltre, la normalizzazione era accompagnata da un rapido calo del gonfiore all'interno e nei dintorni del tumore, effetto che è continuato fino a quando è stato somministrato il RECENTIN.

Il colon-retto [28] è stata la prima patologia in cui il bevacizumab ha dimostrato di migliorare, di quasi 5 mesi, la sopravvivenza, se usato come trattamento di prima linea in combinazione con la chemioterapia convenzionale. La molecola è diventata, nel febbraio 2004, il primo trattamento anti-angiogenesi approvato dalla FDA per l'uso nel cancro del colon-retto avanzato o metastatico [29]. Ma importanti risultati si sono registrati anche per il trattamento del cancro alla mammella, del tumore del rene e attualmente si stanno valutando gli effetti su altri tipi di tumore, come prostata, ovaio, cervice e pancreas [30,31,32,33].

In Italia attualmente l'uso di Avastin è autorizzato nel trattamento di prima linea del carcinoma metastatico del colon-retto in associazione con 5-fluorouracile/acido folinico o 5-fluorouracile/acido folinico/irinotecan somministrati per via endovenosa, e nel trattamento di prima linea di pazienti con carcinoma mammario metastatico in associazione con paclitaxel. (G.U. della Repubblica Italiana n. 146 del 24 giugno 2008).

Recenti lavori in letteratura hanno dimostrato l'evidenza che i farmaci antiangiogenici inducono un effetto vascolare acuto (24-48 ore) con cambiamenti della vascolarizzazione tumorale (drammatica riduzione di flusso, eterogeneità intratumorale) e con la normalizzazione di alcuni vasi neoformati che nell'uomo sembra protrarsi per circa 1 mese [34,35].

Tali cambiamenti inoltre possono essere utilizzati come indice della probabilità della risposta di quel tumore alla terapia; infatti i farmaci che inducono un maggior cambiamento della perfusione tumorale determinano anche una migliore veicolazione dei farmaci chemioterapici e quindi una migliore risposta alla terapia oncologica.

## **TC PERFUSIONALE**

La perfusione è definita come il trasporto di sangue all'unità di volume di tessuto nell'unità di tempo.

La perfusione di un tessuto può essere studiata mediante l'imaging sfruttando la somministrazione di qualsiasi mezzo di contrasto che possa essere amministrato in un bolo breve e rapido [36].

La tomografia computerizzata perfusionale (PCT) è una tecnica ampiamente disponibile che permette di misurare oggettivamente la perfusione di un tessuto, attraverso l'analisi matematica dei dati di densità ottenuti da scansioni ripetute nel tempo dopo la somministrazione di mezzo di contrasto attraverso l'utilizzo di software dedicati [37].

Le basi fondamentali per l'imaging TC della neoangiogenesi sono rappresentate sia dal trasporto al tessuto attraverso il flusso ematico del mezzo di contrasto iodinato somministrato per via endovenosa che dallo scambio attraverso la diffusione di queste molecole di mezzo di contrasto tra lo spazio intravascolare e lo spazio interstiziale extravascolare [13].

Il protocollo TC perfusionale consiste nella rapida acquisizione sequenziale per singola sezione di un volume di fegato in maniera dinamica (CINE) durante la somministrazione a bolo e ad elevato flusso di un mezzo di contrasto organoiodato non ionico.

A tutt'oggi non esiste tuttavia un protocollo TC perfusionale standard in termini di kV, mA, matrice, spessore e tempo di acquisizione.

All'acquisizione segue in postprocessing su un software perfusionale dedicato l'applicazione di uno specifico algoritmo di processazione capace di individuare, mediante il posizionamento di specifiche regioni di interesse, rispettivamente l'enhancement dell'aorta, della milza e del fegato e la ricostruzione di curve di enhancement nel tempo per queste strutture [38].

L'enhancement parenchimale epatico viene suddiviso quindi in enhancement arterioso e venoso-portale assumendo che il picco di enhancement splenico coincida con l'inizio della fase portale.

I valori di perfusione epatica arteriosa e venosa vengono poi calcolati dividendo l'incremento di concentrazione del mdc durante la fase arteriosa e venosa rispettivamente per il picco di enhancement aortico.

L'indice di perfusione epatica viene ricavato dividendo il valore della perfusione arteriosa per la somma dei valori di perfusione arteriosa e venosa. Infine, attraverso l'applicazione di modelli mono o bicompartimentali di deconvoluzione espressi da complesse formule matematiche, la perfusione epatica può essere più facilmente tradotta nei parametri perfusionali del volume sanguigno, flusso sanguigno, tempo di picco e permeabilità superficiale che vengono espressi sia con valori numerici calcolati su specifiche regioni di interesse che con mappe colore [39,40,41].

## **MISURE RADIOLOGICHE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA NEI TUMORI SOLIDI**

Criteri di risposta oggettivi, consistenti, riproducibili e standardizzati sono il linguaggio comune indispensabile per la valutazione degli effetti delle nuove terapie in trial multicentrici.

La valutazione della risposta alla terapia mediante misurazioni radiologiche è evoluta negli ultimi 30 anni [3,4,5].

Nel 1979 l'Organizzazione Mondiale della Sanità introdusse i primi criteri WHO per la valutazione della risposta alla terapia basati sul criterio bidimensionale e definì 4 classi di risposta alla terapia (risposta completa, parziale, malattia stabile e progressione di malattia). Tuttavia non era prevista alcuna standardizzazione per protocollo o tecnica.

Per unificare e standardizzare i criteri di misurazione radiologica nel 2000 venne quindi introdotto da una task force europea, statunitense e canadese il RECIST (response evaluation criteria in solid tumors).

Il RECIST mantenne le 4 classi di risposta alla terapia già introdotte dal WHO ma introdusse il metodo di valutazione monodimensionale a posto di quello bidimensionale, stabilì le metodiche di imaging da utilizzare per la valutazione della risposta, i tipi di lesioni che dovevano essere scelti e valutati (lesioni misurabili e non misurabili) e il numero di lesioni da valutare (lesioni target fino a 10 -5 per organo- e non target) oltre a dare una definizione più accurata ed ampia della progressione di malattia.

Nel 2009 venne introdotta una modifica al RECIST che è ancora quella attualmente utilizzata (RECIST 1.1). Questa revisione essenzialmente si discosta dalla precedente in quanto:

- modifica il numero massimo di lesioni target da misurare da 10 a 5 (massimo 2 per organo);
- definisce più accuratamente il criterio monodimensionale differenziando le lesioni solide nelle

quali la misurazione si basa sulla valutazione del diametro massimo sul piano assiale dai linfonodi nei quali la misurazione si basa sulla valutazione dell'asse corto sul piano assiale;

- stabilisce la necessità di calcolare la somma dei diametri (massimo diametro globale) come somma di questi parametri;

- definisce il timing e la modalità per la valutazione delle stesse lesioni target nel follow up, oltre che delle lesioni non target e delle nuove lesioni;

- definisce Risposta Completa (CR), la scomparsa delle lesioni extranodali e la diminuzione a <10 mm delle lesioni linfonodali; Risposta Parziale (PR) la riduzione di almeno il 30% del massimo diametro globale rispetto alla baseline; Progressione di Malattia (PD) l'incremento di almeno il 20% del massimo diametro globale rispetto al minimo valore mai raggiunto, stabilendo anche che l'incremento debba essere di almeno 5 mm o la presenza di nuove lesioni; Malattia Stabile (SD) quando i cambiamenti riscontrati al follow up non rientrano né nei criteri definiti per la PR né per la PD.

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **Scopo del lavoro di ricerca, obiettivi primari e secondari**

Il progetto è rivolto essenzialmente al miglioramento della pratica clinica e diagnostica ed in particolare ad evidenziare l'utilità e l'efficacia dell'introduzione della TC perfusionale nell'iter diagnostico dei pazienti con metastasi epatiche che si debbano sottoporre a terapia antiangiogenica per la valutazione della risposta alla terapia.

In considerazione della carenza in letteratura di studi sistematici prospettici longitudinali con casistica di rilievo sulla validazione della TC perfusionale per la valutazione della risposta alla terapia antiangiogenica delle metastasi epatiche al momento dell'inizio del dottorato, si è costruito uno studio in cui tutti i pazienti con metastasi epatiche candidati alla terapia antiangiogenica vengono sottoposti a CT perfusionale (PTC) con protocollo standard prima e dopo l'inizio della terapia per confrontare i risultati di tale esame in termini di parametri perfusionali (flusso sanguigno, volume sanguigno, perfusione e tempo di picco) con i dati dimensionali derivanti dalla valutazione RECIST e con i dati clinico-laboratoristici.

In particolare il nostro studio si propone di monitorizzare la perfusione delle metastasi epatiche in tre tempi:

- tempo 0, prima della terapia;
- tempo I, dopo la terapia (fase precoce);
- tempo II, dopo 3 mesi (fase tardiva).

Obiettivo principale del progetto di ricerca è quello di analizzare la modificazione dei parametri vascolari calcolati all'interno delle lesioni metastatiche epatiche target in corso di terapia antiangiogenica.

Per fare questo ci si propone:

1. Alla BASELINE:

- di calcolare i principali parametri perfusionali ottenuti con TC perfusionale in corrispondenza delle metastasi epatiche di pazienti eleggibili per la terapia antiangiogenica
- di calcolare i valori dimensionali standard definiti dal RECIST per la successiva definizione della risposta alla terapia e i biomarcatori indicatori specifici di massa neoplastica.

2. Dopo l'inizio della terapia antiangiogenica:

- di registrare la variazione dei parametri perfusionali dopo la terapia antiangiogenica e di confrontare la variazione dei parametri perfusionali con la variazione dei parametri dimensionali e dei biomarcatori specifici per tumore.

Obiettivi secondari della ricerca sono:

- quello di confrontare i valori di perfusione delle lesioni epatiche con quelli del parenchima epatico sano non sede della patologia metastatica per evidenziare eventuali differenze di perfusione tra le metastasi e il parenchima epatico sano circostante;
- alla fine della terapia, valutare l'efficacia dei criteri perfusionali per la valutazione della risposta alla terapia precocemente ed evidenziare possibili fattori prognostici perfusionali predittivi di una buona risposta alla terapia, suddividendo in base alla risposta tardiva alla terapia in pazienti responders e non responders e valutando l'andamento dei parametri vascolari nei pazienti appartenenti a questi due gruppi.

## **Metodologia di ricerca**

Si tratta di uno studio clinico osservazionale, prospettico longitudinale, non randomizzato, basato sull'utilizzo della TC perfusionale nell'iter diagnostico dei pazienti con metastasi epatiche candidati a terapia antiangiogenica secondo le attuali indicazioni della farmacopea nazionale.

## **CRITERI DI INCLUSIONE**

I criteri di inclusione nello studio prevedevano:

- l'appartenenza dei pazienti ad una delle categorie di malattia metastatica per la quale è autorizzato l'utilizzo di Avastin (tumori del colon-retto metastatici, tumori della mammella metastatici in prima linea);
- la presenza di una documentata malattia metastatica epatica misurabile;
- la dimostrazione di una adeguata funzionalità epatica (bilirubina sierica  $\leq$  limite superiore del normale – ULN –, AST e ALT  $\leq 2.5 \times$  ULN, fosfatasi alcalina  $\leq$  ULN, albumina  $> 25$  g/l) e renale (creatinina sierica  $\leq 1.25 \times$  ULN, clearance della creatinina  $\geq 60$  ml/min);
- la dimostrazione di una adeguata riserva midollare (emoglobina  $\geq 6.2$  mmol/l, conta dei neutrofili assoluta (ANC)  $\geq 2.0 \times 10^9/l$ , piastrine  $\geq 100 \times 10^9/l$ );
- l'età superiore ai 18 anni;
- una aspettativa di vita  $\geq 3$  mesi;
- un punteggio dell'Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) compreso tra 0 e 2;
- l'assenza di importanti patologie concomitanti;
- l'adeguata compliance al protocollo diagnostico e terapeutico.



## CRITERI DI ESCLUSIONE

Criteri di esclusione sono stati:

- Anamnesi positiva per altri tumori (diversi da melanoma asportati, carcinomi in situ, o ogni altro tumore curato senza evidenza di malattia per  $\geq 10$  anni);
- Scompenso cardiaco o frazione di eiezione del ventricolo sinistro  $< 50\%$
- Epatopatie croniche;
- Metastasi del SNC;
- Patologie mediche non ben controllate (diabete, ipertensione, infezioni);
- Altri trattamenti chemioterapici in corso;
- Gravidanza o allattamento.

## PROTOCOLLO DI STUDIO

Tutti i pazienti così selezionati sono stati sottoposti a specifico protocollo di studio con TC perfusionale presso il Nostro Servizio di Radiologia Centrale del Policlinico Umberto I.

Seguendo le indicazioni della scuola di Volterrani e di Miles, di ogni paziente è stata eseguita una valutazione con TC perfusionale al tempo T0 (BASELINE), prima dell'inizio della terapia antiangiogenica, ed altri successivi controlli analoghi dopo l'inizio della terapia antiangiogenica (5 mg/Kg, durata 28-30 giorni) al tempo T1 (essendo ancora discusso il corretto timing della rivalutazione dopo terapia antiangiogenica in un primo tempo il tempo T1 è stato eseguito dopo circa 1 mese dalla terapia, successivamente seguendo le indicazioni della scuola di Siena (Volterrani) e di Miles, tra il 14° e il 30° giorno dopo la somministrazione della prima dose di antiangiogenico), e al tempo T2, dopo 3-6 mesi.

Lo studio TC perfusionale standardizzato per tale attività di ricerca consiste nell'acquisizione di

un esame diretto sul fegato, di una fase dinamica precoce perfusionale su tutto il volume del fegato sede della/delle metastasi e di una fase venosa-tardiva di stadiazione total body, con bassa dose.

In particolare lo studio TC perfusionale viene effettuato mediante un sistema spirale multidetettore dual source a 64 strati x 2 file di detettori (Siemens Somatom Definition Dual Source, Siemens Medical Solutions, Forchheim, Germany) con tecnica perfusionale applicata sul volume di fegato e prevede l'acquisizione sequenziale di scansioni assiali singole dinamiche ultrarapide (detector width 1,5 mm; reconstruction width 2 mm, 100 kV, 120 mAs) ripetute prima e dopo somministrazione di 70 mL di mezzo di contrasto iodato non ionico (Iomeron 400, Bracco) ad un flusso di 5.5-7 mL/s.

In particolare inizialmente si sono implementati due tipi di studi perfusionali da scegliere in base alla dimensione del fegato da studiare che comprendono i seguenti parametri:

- Tipo 1: Tempo di ciclo: 2,5 sec x 25 ripetizioni; spessore 200 mm; Tempo totale 64,38 secondi (dose 123,47 mGy vs 40-52 mGy della TC Total Body con studio trifasico)
- Tipo 2: Tempo di ciclo: 2,25 sec x 25 ripetizioni; spessore 178 mm; Tempo totale 57,94 secondi (dose 122,89 mGy).

Successivamente per ottenere una riduzione della dose è stata ottenuta una scansione nella sola direzione cranio-caudale aumentando il tempo di ciclo (da 2,5 di default a 5,0) e riducendo il numero di ripetizioni (da 25 a 15), mantenendo la massima ampiezza del FOV (dose finale da 124 mGy a 74 mGy e poi a 63.58 mGy).

Tutte le immagini acquisite sono state rielaborate nel post-processing su una workstation di lavoro (CT workplace; Siemens Healthcare, Forchheim, Germany) con un software dedicato allo studio perfusionale epatico (Volume perfusion CT body, Syngo 2008 G; Siemens Medical Solutions) e si è proceduto alla ricostruzione delle mappe funzionali quantitative a colori dei 4

principali parametri perfusionali di riferimento che comprendono il flusso (BF), il volume (BV), il tempo di picco (TTP) e la permeabilità (PMB). Il BF rappresenta il flusso attraverso i vasi della lesione, il BV il volume di sangue contenuto in 100 g di lesione, il TTP il tempo per raggiungere il massimo valore di concentrazione di mezzo di contrasto, la PMB la perfusione in 100g di lesione nell'unità di tempo. Infine vengono individuate le lesioni target come previsto dai criteri RECIST ed attraverso la definizione di una regione di interesse (ROI) nella lesione più grande vengono misurati i principali parametri vascolari e per il parenchima sano adiacente.

Per ogni paziente si è inoltre misurato il numero e le dimensioni delle lesioni target secondo i criteri RECIST.

Dal punto di vista clinico sono stati raccolti e registrati i valori dei principali biomarcatori umorali specifici per tumore.

Lo stesso protocollo e le stesse misurazioni vengono acquisite sia alla baseline (tempo 0) che al tempo 1 e 2.

Per quanto concerne l'analisi dei dati ad ogni studio TC perfusionale vengono analizzati e registrati i seguenti parametri:

- numero lesioni target (massimo due lesioni per organo secondo i criteri modificati RECIST)
- dimensioni lesioni target (criteri modificati RECIST)
- parametri della vascolarizzazione (BV, BF, TTP, PMB) per la lesione e per il tessuto epatico sano adiacente.

Allo stesso tempo viene presa nota dei principali biomarkers tumorali.

I risultati ottenuti alla baseline per le lesioni metastatiche epatiche vengono confrontati con i risultati ottenuti alla baseline per il parenchima sano.

I risultati ottenuti alla baseline per le lesioni metastatiche epatiche vengono inoltre confrontati con i risultati ottenuti al tempo 1 e 2 per le stesse lesioni dopo terapia.

Quest'ultima analisi consiste nel confronto dei dati morfologici (numero e dimensioni delle lesioni attraverso il calcolo del diametro massimo globale così come previsto dai criteri RECIST modificati), dei dati funzionali (parametri di perfusione) e dei dati bioumorali per il monitoraggio della risposta biologica alla terapia antiangiogenica.

Inoltre per la determinazione di eventuali parametri predittivi della risposta alla terapia antiangiogenica i pazienti che hanno completato lo studio, alla fine della ricerca vengono suddivisi in base alla risposta alla terapia in pazienti responders e non responders e vengono analizzate le differenze nei parametri vascolari dei pazienti appartenenti a questi due gruppi per verificare se esistano parametri in grado in alcun modo di predire la risposta alla terapia.

## ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti sono stati registrati su foglio excel (Excel 2000, Microsoft) suddiviso per paziente e per lesione target.

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il software MedCalc® versione 11.3.8.0, MedCalc software bvba.

In un primo momento è stata condotta un'analisi descrittiva per ciascuna delle variabili considerate (BF, BV, TTP, PMB, RECIST, CEA, CA19.9) alla baseline e al tempo 1 e 2. In particolare è stato effettuato il calcolo della media con lo standard error e l'intervallo di confidenza 95%, la deviazione standard, il massimo e il minimo ed i percentili 5-95 per i singoli parametri perfusionali nella lesione target e nel parenchima sano ed è stata calcolata la distribuzione dei parametri nel campione di studio mediante grafici ad istogrammi.

Successivamente è stata analizzata la differenza ottenuta alla baseline tra metastasi e parenchima sano e poi tra la baseline e il tempo 1 e 2 per singola lesione tramite confronto descrittivo tra medie e poi attraverso un'elaborazione statistica univariata con il test Wilcoxon per dati appaiati per valutare se ci fosse una differente espressione dei parametri perfusionali.

Infine la popolazione è stata suddivisa stratificandola a seconda del tipo di risposta alla terapia sia al T1 che al T2 ed i parametri perfusionali rispettivamente a T0 e a T0 e T1 sono stati analizzati con test di Mann-Whitney tra campioni indipendenti per valutare l'ipotesi di comportamenti differenti tra i due sottocampioni così ottenuti e pertanto stabilire se esistano parametri predittivi della risposta stessa.

Come di consueto il livello di significatività  $\alpha$  è stato fissato pari allo 0.05.

## **Risultati**

Nei tre anni del dottorato di ricerca, da Febbraio 2009 ad oggi, sono stati reclutati 27 pazienti con un'età media di 63 anni (range 45-86 anni) con metastasi epatiche candidati ad iniziare la terapia antiangiogenica. Successivamente 7 pazienti sono usciti dallo studio per rifiuto ad iniziare la terapia antiangiogenica (3) o per la scarsa compliance allo studio (4).

Tutti i pazienti arruolati avevano avuto una diagnosi istologica di carcinoma del colon-retto metastatico. 13 pazienti erano stati operati per il tumore primitivo ed in particolare erano state effettuate 3 emicolectomie destre, 3 resezioni anteriori del retto, 4 emicolectomie sinistre, 1 resezione segmentaria del colon trasverso e del discendente, 1 resezione segmentaria del sigma, 1 resezione del sigma e dell'ileo con parziale escissione anche della vescica. I rimanenti 7 pazienti erano risultati inoperabili alla diagnosi ma avevano effettuato biopsia del tumore.

In 13 pazienti è stata anche effettuata la valutazione del k ras che risultava wild type in 7 pazienti e mutato in 6 pazienti.

In collaborazione con il Dipartimento di Radiodiagnostica tutti i 20 pazienti, previa acquisizione del consenso informato, sono stati sottoposti a TC con studio perfusionale alla baseline (T0 n=20).

16 pazienti sono stati sottoposti a controllo TC con studio perfusionale anche al tempo 1 dopo il primo ciclo di chemioterapia tuttavia la valutazione perfusionale non è stata possibile in una paziente per la scomparsa della lesione target (T1 n=15).

12 pazienti hanno effettuato anche un ulteriore controllo TC al tempo 2 (dopo 3-6 mesi) ma anche a questo step la valutazione perfusionale non è stata possibile in una paziente per la scomparsa della lesione target (T2 n=11).

Al momento della compilazione della tesi 9 pazienti sono deceduti, 2 pazienti hanno interrotto la terapia antiangiogenica per tossicità, una paziente ha sviluppato una embolia polmonare e una paziente una fistola retto-vaginale.

## ANALISI DEI DATI ALLA BASELINE

### ANALISI PERFUSIONALE DELLE LESIONI TARGET

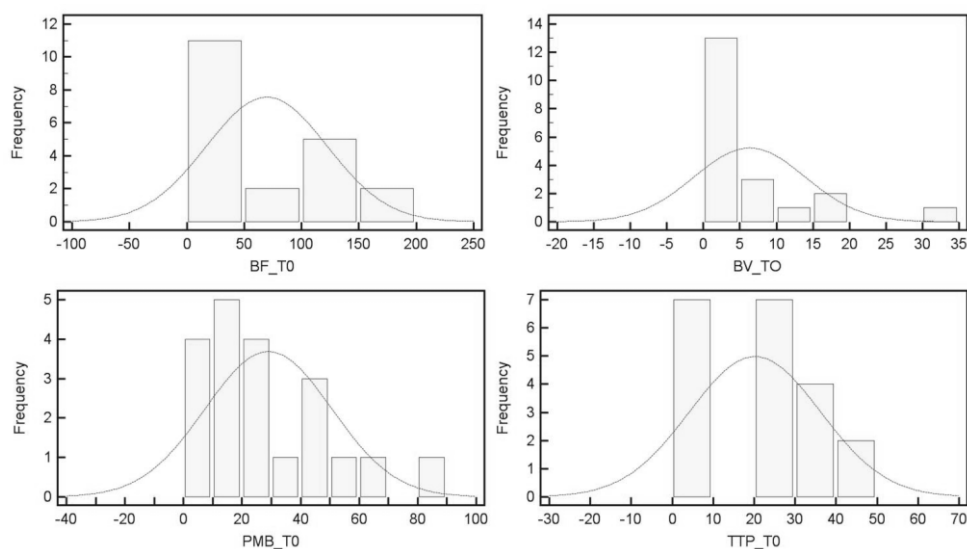
La tabella 1 e la figura 2 mostrano i principali valori statistici ed il tipo di distribuzione di frequenza espressa con istogrammi dei parametri perfusionali calcolati nelle lesioni target.

Tabella 1. Caratteristiche descrittive dei parametri perfusionali.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BF_LES	69,670	44,991 - 94,348	52,7297	11,7907	12,030	194,780	14,765 - 176,665
BV_LES	6,314	2,747 - 9,882	7,6232	1,7046	0,100	31,930	0,550 - 24,065
PMB_LES	28,989	18,856 - 39,122	21,6501	4,8411	0,100	81,070	2,710 - 74,735
TTP_LES	20,182	12,684 - 27,679	16,0190	3,5819	0,100	44,630	0,100 - 42,655

*Mean, media; 95% CI, intervallo di confidenza 95%; SD, deviazione standard; SEM, errore standard nella media; minimum, minimo; maximum, massimo; 5-95 P, 5°-95° percentile.*

Figura 2. Istogrammi della distribuzione dei parametri perfusionali nelle metastasi a T0



In particolare nelle metastasi sono stati misurati i seguenti valori:

- BF (mL/100mL/min) media  $69.67 \pm SD 52.73$ ;
- BV (mL/100mL) media  $6.31 \pm SD 7.62$ ;
- PMB (mL/100mL/min) media  $28.99 \pm SD 21.65$
- TTP (s) media  $20.18 \pm SD 16.02$ .

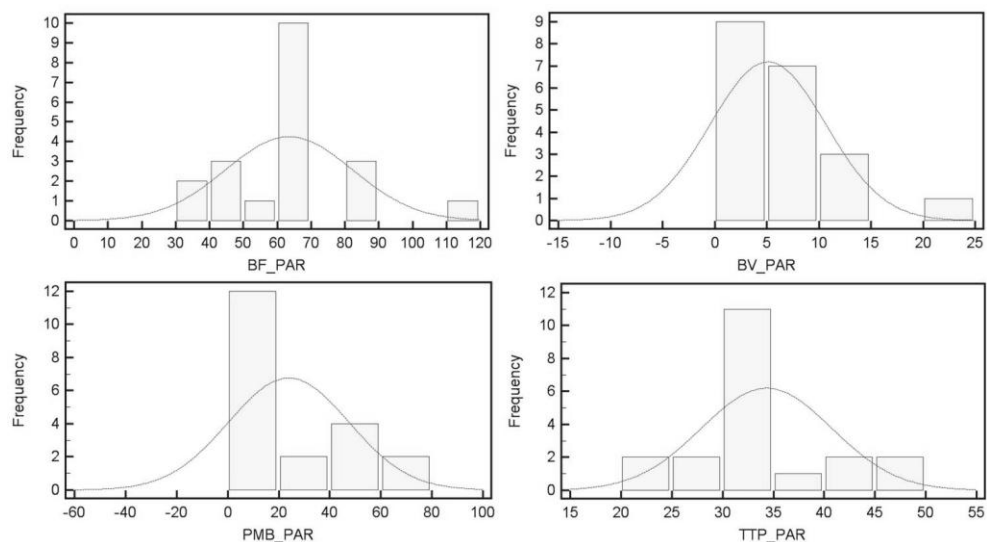
### ANALISI PERFUSIONALE DEL PARENCHIMA EPATICO

La tabella 2 e la figura 3 mostrano i principali valori statistici ed il tipo di distribuzione dei parametri perfusionali calcolati posizionando la ROI nel parenchima epatico sano.

Tabella 2. Caratteristiche descrittive dei parametri perfusionali.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BF_PAR	63,494	54,708 - 72,280	18,7729	4,1978	39,500	116,450	39,700 - 101,975
BV_PAR	5,110	2,510 - 7,710	5,5547	1,2421	0,100	22,400	0,100 - 16,750
PMB_PAR	23,880	12,838 - 34,922	23,5933	5,2756	0,300	66,500	0,300 - 65,750
TTP_PAR	34,321	31,311 - 37,332	6,4330	1,4385	20,600	48,040	22,650 - 47,220

Figura 3. Istogrammi della distribuzione dei parametri perfusionali nel parenchima sano.





In particolare i corrispondenti valori statistici dei parametri perfusionali calcolati nel parenchima sano adiacente hanno mostrato i seguenti valori:

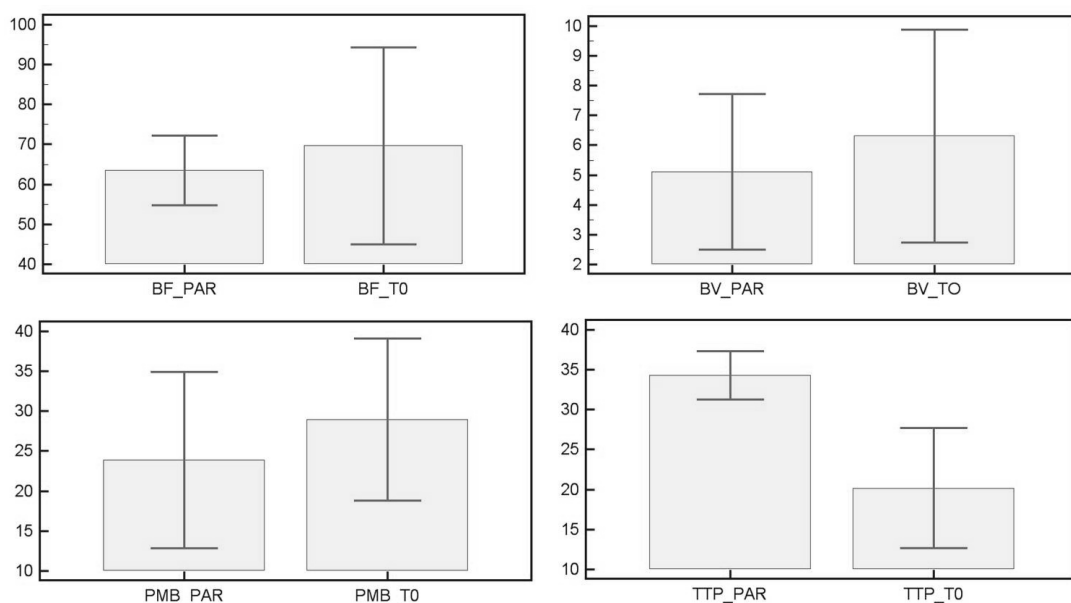
- BF (mL/100mL/min) media  $63.49 \pm SD 18.77$ ;
- BV (mL/100mL) media  $5.11 \pm SD 5.55$ ;
- PMB (mL/100mL/min) media  $23.88 \pm SD 23.59$ ;
- TTP (s) media  $34.32 \pm SD 6.43$ .

#### CONFRONTO DEI DATI PERFUSIONALI TRA METASTASI E PARENCHIMA SANO

L'analisi effettuata sui dati raccolti ha evidenziato nelle metastasi rispetto al tessuto sano:

- valori di BF più elevati in 11/20 casi (55%);
- valori di BV più elevati in 16/20 casi (80%);
- valori di PMB più elevati in 14/20 casi (70%);
- valori di TTP ridotti in 17/20 casi (85%) (Figura 4).

Figura 4. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nel parenchima sano e nelle metastasi.



Il Wilcoxon signed rank test per dati campionari appaiati ha confermato come queste differenze siano statisticamente significative solo per il TTP che è risultato minore nelle metastasi rispetto al parenchima sano con  $p=0.0004$ , mentre il BF, il BV e la PMB che sono risultati più elevati nelle metastasi rispetto al parenchima sano non hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra i due campioni con  $p=0.70$  per BF,  $p= 0.10$  per BV,  $p= 0,22$  per PMB.

#### DIAMETRO MASSIMO GLOBALE RECIST E VALORI DEI MARCATORI TUMORALI

Il diametro massimo globale delle lesioni target calcolato alla baseline secondo i criteri RECIST modificati, ha mostrato un valore medio di circa  $\text{mm } 65.3 \pm \text{SD } 42.29$ .

Il valore medio dell'antigene carcino embrionario (CEA) è risultato di circa  $133.88 \pm 408.18$ , quello del Ca 19.9 di circa  $49.44 \pm 65.32$  (Tabella 3).

Tabella 3. Caratteristiche descrittive dei valori RECIST e dei markers tumorali analizzati.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
CA19.9	49,445	18,875 - 80,015	65,3186	14,6057	0,000	260,000	0,400 - 210,500
CEA	133,878	-57,157 - 324,913	408,1826	91,2724	0,500	1800,000	1,060 - 1156,000
RECIST T0	65,300	45,504 - 85,096	42,2979	9,4581	15,100	158,100	15,200 - 147,900

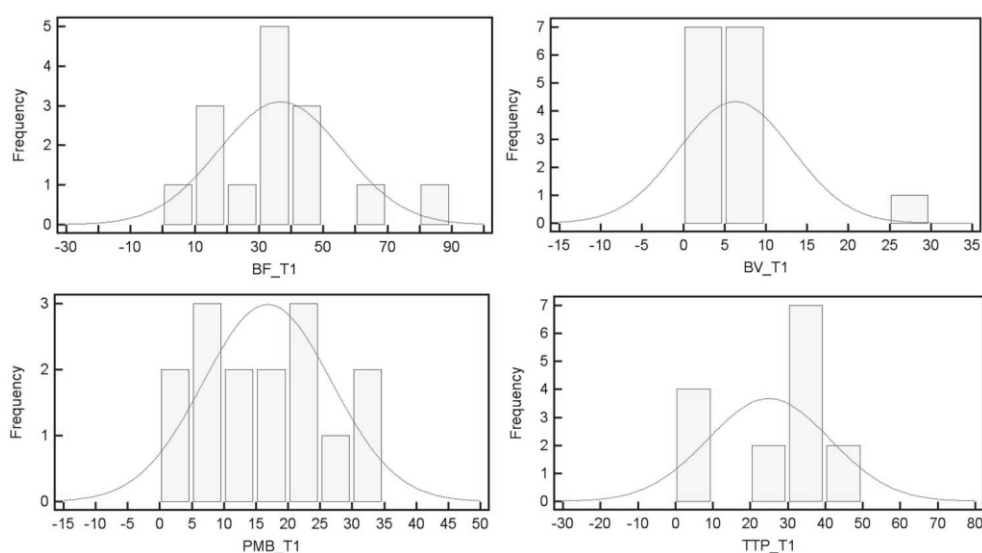
## b. ANALISI DEI DATI AL TEMPO T1

L'analisi descrittiva dei parametri perfusionali calcolati posizionando la ROI nella lesione target al T1 ha mostrato i risultati riportati in Tabella 4 e Figura 5.

Tabella 4. Caratteristiche descrittive dei parametri perfusionali analizzati al T1.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BF_T1	36,716	26,018 - 47,414	19,3175	4,9878	9,140	83,700	11,060 - 78,510
BV_T1	6,294	2,477 - 10,111	6,8919	1,7795	1,750	29,720	1,792 - 24,272
PMB_T1	16,793	11,244 - 22,341	10,0192	2,5869	3,170	34,780	3,213 - 33,960
TTP_T1	24,922	15,896 - 33,948	16,2990	4,2084	0,100	42,400	0,100 - 42,265

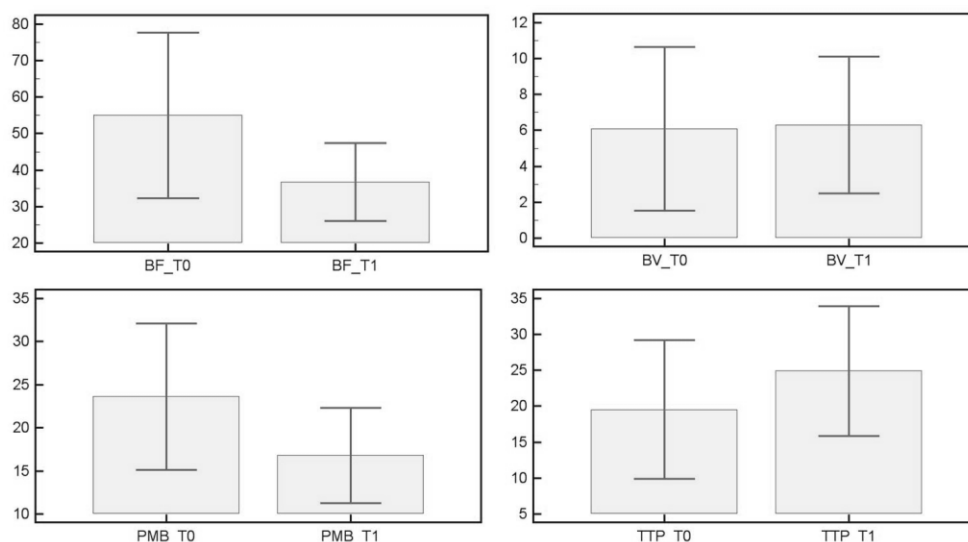
Figura 5. Istogrammi della distribuzione dei parametri perfusionali nelle lesioni target al T1



## CONFRONTO DEI DATI PERFUSIONALI DELLE METASTASI TRA T0 E T1

Il confronto dei parametri perfusionali ottenuti prima e dopo il primo ciclo di terapia antiangiogenica, a T1, ha evidenziato un decremento dei parametri di BF in 10 casi (66.7%) e di PMB in 11 pazienti (73.3%), ed un incremento di BV in 10 pazienti (66.7%) e di TTP in 10 casi (66.7%) (Figura 6).

Figura 6. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T0 e T1.



Il Wilcoxon signed rank test ha confermato una differenza statisticamente significativa per BF ( $p= 0.05$ ) e PMB ( $p=0.04$ ) che sono risultati significativamente ridotti dopo la terapia antiangiogenica. Invece il BV ( $p=0.42$ ) e il TTP ( $p=0.27$ ) che pure sono risultati più elevati dopo la terapia non hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra i due campioni.

## RECIST E MARCATORI TUMORALI

Il diametro massimo globale delle lesioni target calcolato al T1 secondo i criteri RECIST modificati, ha mostrato un valore medio di circa  $\text{mm } 67.65 \pm 55.45$ .

Il valore medio dell'antigene carcino embrionario (CEA) è risultato di circa  $155.71 \pm 444.67$ , quello del Ca 19.9 di circa  $48.81 \pm 78.49$  (Tabella 5).

Tabella 5. Caratteristiche descrittive dei valori RECIST e dei markers tumorali analizzati a T1.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
CA 19.9_T1	48,806	6,977 - 90,635	78,4987	19,6247	4,000	327,000	5,800 - 255,270
CEA_T1	155,712	-81,235 - 392,660	444,6700	111,1675	1,900	1800,000	1,960 - 1328,700
RECIST_T1	67,651	38,103 - 97,199	55,4512	13,8628	0,000	192,400	2,280 - 182,830

In particolare i valori ottenuti a T1 posti a confronto con i corrispondenti valori ottenuti a T0 sono risultati:

- RECIST: ridotti in 11 casi (68.8%), aumentati in 5 casi (31.2%) [p=0.56];
- CEA: aumentati in 8 casi (50%), ridotti in 6 casi (37.5%) e stabili in 2 casi (12.5%) [p=0.89];
- Ca19.9: aumentati in 8 casi (50%), ridotti in 7 casi (43.7%), stabili in 1 (6.3%) [p=0.98].

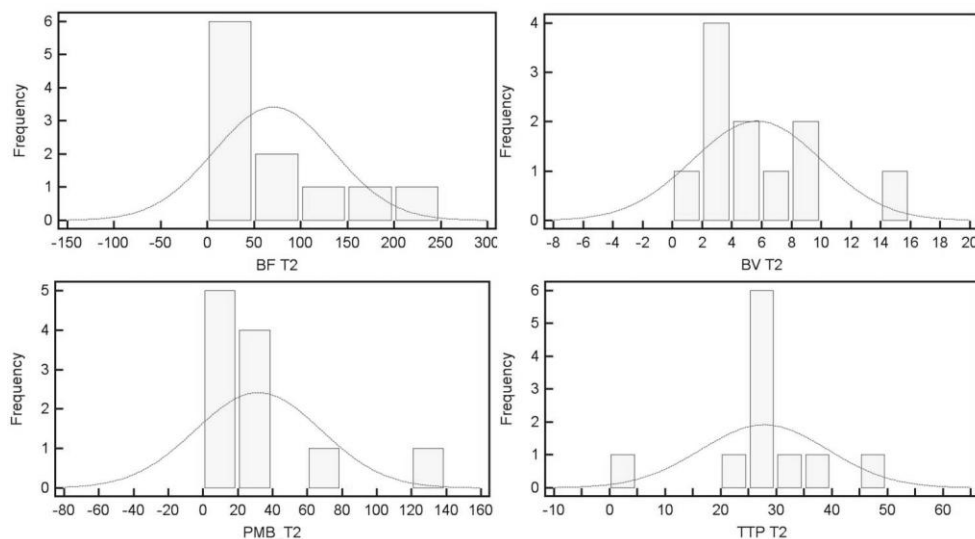
### c. ANALISI DEI DATI AL TEMPO T2

L'analisi descrittiva dei parametri perfusionali calcolati posizionando la ROI nella lesione target al T2 ha mostrato i risultati riportati in Tabella 6 e Figura 7.

Tabella 6. Caratteristiche descrittive dei parametri perfusionali analizzati al T2.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BF T2	70,715	27,627 - 113,804	64,1374	19,3382	9,970	214,880	10,331 - 211,646
BV T2	5,685	2,758 - 8,611	4,3565	1,3135	0,300	15,830	0,411 - 15,479
PMB_T2	31,714	7,328 - 56,099	36,2984	10,9444	0,400	127,880	0,737 - 124,851
TTP T2	27,849	20,150 - 35,548	11,4604	3,4554	0,100	46,810	1,240 - 46,455

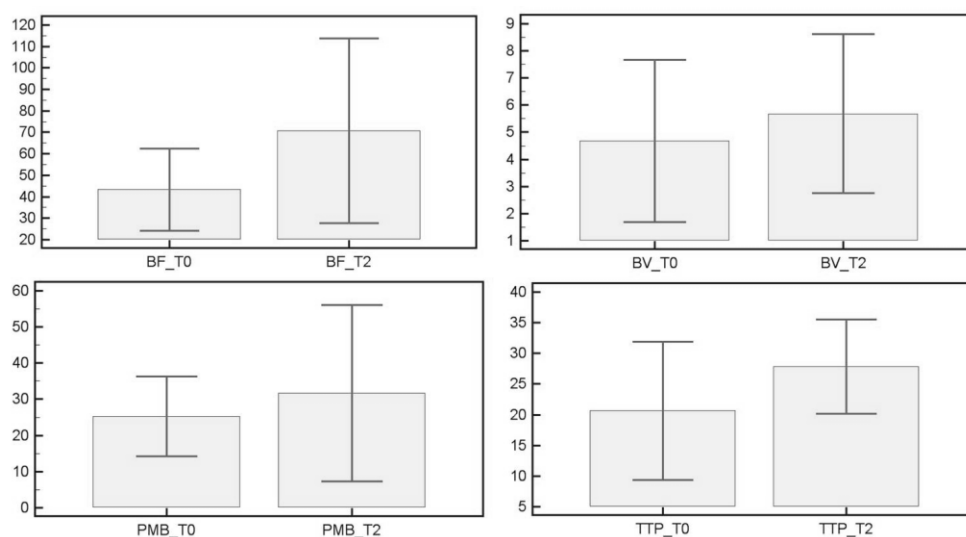
Figura 7. Istogrammi della distribuzione dei parametri perfusionali nelle lesioni target al T2



### CONFRONTO DEI DATI PERFUSIONALI DELLE METASTASI TRA T0 E T2

Il confronto dei parametri perfusionali ottenuti alla baseline e dopo il secondo ciclo di terapia antiangiogenica ha evidenziato un incremento dei parametri di BF in 7/11 pazienti (63.6%), di BV in 8/11 pazienti (72.7%), di PMB in 7/11 pazienti (63.6%), ed un incremento del TTP in 7/11 pazienti (63.6%) (Figura 8).

Figura 8. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T0 e T2.



Il Wilcoxon signed rank test ha confermato l'assenza di differenze statisticamente significative per tutti i parametri perfusionali analizzati [BF (p 0.28), BV (p 0.32), PMB (p 0.70) e TTP (0.28)] che sono risultati tutti mediamente più elevati dopo la terapia.

#### RECIST E MARCATORI TUMORALI

Il valore medio del diametro massimo globale delle lesioni target calcolato al T2 secondo i criteri RECIST modificati è risultato di circa  $mm\ 52.1 \pm 43.82$ .

Il valore medio dell'antigene carcino embrionario (CEA) è risultato di circa  $165.23 \pm 515.29$ , quello del marcatore Ca 19.9 di circa  $44.54 \pm 66.73$  nello stesso campione (Tabella 7).

Tabella 7. Caratteristiche descrittive dei valori RECIST e dei markers tumorali analizzati a T2.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
CA19.9_T2	44,538	2,143 - 86,934	66,7259	19,2621	2,500	239,800	2,550 - 224,820
CEA_T2	165,233	-162,169 - 492,635	515,2936	148,7525	1,200	1800,000	1,280 - 1626,700
RECIST_T2	52,100	24,258 - 79,942	43,8194	12,6496	0,000	156,800	0,300 - 149,610

In particolare dal confronto tra i dati ottenuti al T2 rispetto a quelli ottenuti al T0 si è osservato:

- RECIST: ridotto in 10 casi (83.3%), aumentato in 2 (16.7) [p=0.02];
- CEA: ridotto in 6 casi (50%), stabile in 1 caso (8.3%) ed aumentato in 5 casi (41.7%) [p=0.28];
- Ca19.9: ridotto in 8 casi (66.7%) ed aumentato in 4 casi (33.3%) [p=0.52].



## VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA PRECOCE ALLA TERAPIA, CONFRONTO DEI DATI TRA T0 E T1

Seguendo i criteri dimensionali RECIST modificati per la valutazione della risposta al trattamento, al T1 si è riscontrata una risposta parziale (PR) in 5 casi, una progressione di malattia (PD) in 3, mentre la malattia è risultata stabile (SD) in 7 casi; in 1 caso si è ottenuta una risposta completa (CR) e questa paziente è successivamente uscita dallo studio non potendo più calcolare i parametri perfusionali della lesione target.

In tabella 8 sono mostrati i valori medi con il 95% CI, la deviazione standard, il minimo e il massimo dei parametri perfusionali e dei valori RECIST al T1, classificati secondo il tipo di risposta alla terapia prevista secondo i criteri tradizionali.

Tabella 8. Caratteristiche descrittive dei valori perfusionali e RECIST analizzati a T1 suddivisi per classi di risposta alla terapia al T1.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BFT1_PR	37.400	16.744 - 58.056	16.6361	7.4399	16.800	62.900	16.800 - 62.900
BVT1_PR	5.280	2.312 - 8.248	2.3906	1.0691	2.400	7.930	2.400 - 7.930
PMBT1_PR	21.770	9.378 - 34.162	9.9799	4.4632	10.790	34.780	10.790 - 34.780
TTPT1_PR	26.746	6.159 - 47.333	16.5802	7.4149	0.200	42.400	0.200 - 42.400
CA19.9_PR	35.780	-3.536 - 75.096	31.6637	14.1605	4.000	87.900	4.000 - 87.900
CEAT1_PR	5.960	-1.196 - 13.116	5.7631	2.5773	1.900	16.000	1.900 - 16.000
RECISTT1_PR	20.204	6.712 - 33.696	10.8661	4.8595	7.600	30.500	7.600 - 30.500

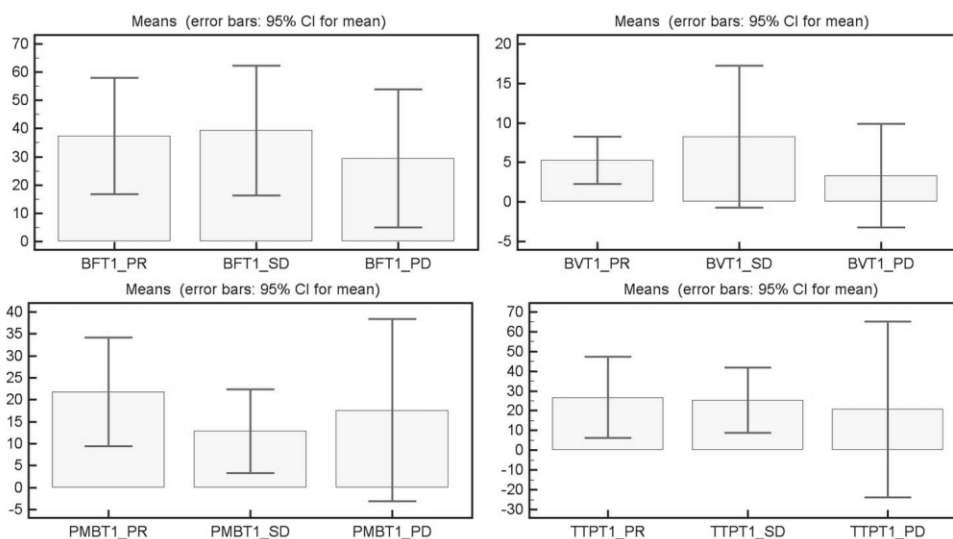
	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BFT1_SD	39.341	16.329 - 62.353	24.8819	9.4045	9.140	83.700	9.140 - 83.700
BVT1_SD	8.276	-0.736 - 17.288	9.7442	3.6830	2.110	29.720	2.110 - 29.720
PMBT1_SD	12.880	3.367 - 22.393	10.2865	3.8879	3.170	31.500	3.170 - 31.500
TTPT1_SD	25.403	8.912 - 41.894	17.8308	6.7394	0.100	41.860	0.100 - 41.860
CA19.9T1_SD	34.714	9.603 - 59.826	27.1521	10.2625	12.000	87.000	12.000 - 87.000
CEAT1_SD	272.371	-350.840 - 895.583	673.8544	254.6930	2.100	1800.000	2.100 - 1800.000
RECISTT1_SD	85.743	47.101 - 124.385	41.7824	15.7923	35.100	160.500	35.100 - 160.500

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BFT1_PD	29.453	5.082 - 53.824	9.8106	5.6642	18.260	36.560	18.260 - 36.560
BVT1_PD	3.360	-3.205 - 9.925	2.6427	1.5258	1.750	6.410	1.750 - 6.410
PMBT1_PD	17.627	-3.083 - 38.336	8.3367	4.8132	8.110	23.640	8.110 - 23.640
TTPT1_PD	20.760	-23.739 - 65.259	17.9132	10.3422	0.100	31.960	0.100 - 31.960
CA19.9T1_PD	116.333	-336.886 - 569.553	182.4454	105.3349	10.000	327.000	10.000 - 327.000
CEAT1_PD	153.667	-151.310 - 458.643	122.7694	70.8810	12.000	229.000	12.000 - 229.000
RECISTT1_PD	127.067	-14.125 - 268.259	56.8374	32.8151	89.000	192.400	89.000 - 192.400

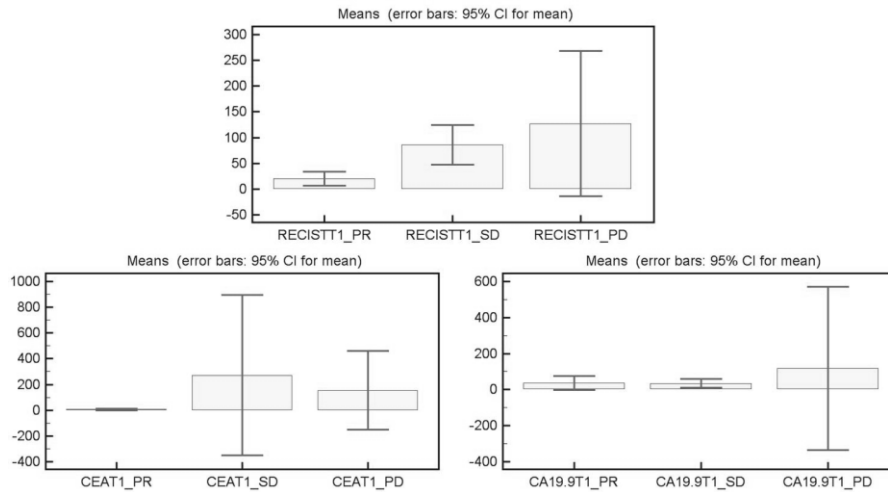
Il confronto dei parametri perfusionali ottenuti dopo il primo ciclo di terapia antiangiogenica stratificato per la risposta alla terapia non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i parametri perfusionali né nel confronto tra PR e SD [BF (0.88), BV (0.88), PMB (0.15), TTP (0.87)], né nel confronto tra PD e SD [BF (0.49), BV (0.11), PMB (0.36), TTP (0.36)], né nel confronto tra PD e PR [BF (0.57), BV (0.25), PMB (0.79), TTP (0.57)] (Figura 9).

Figura 9. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T1, suddivisi per tipo di risposta alla terapia (PR, SD, PD)



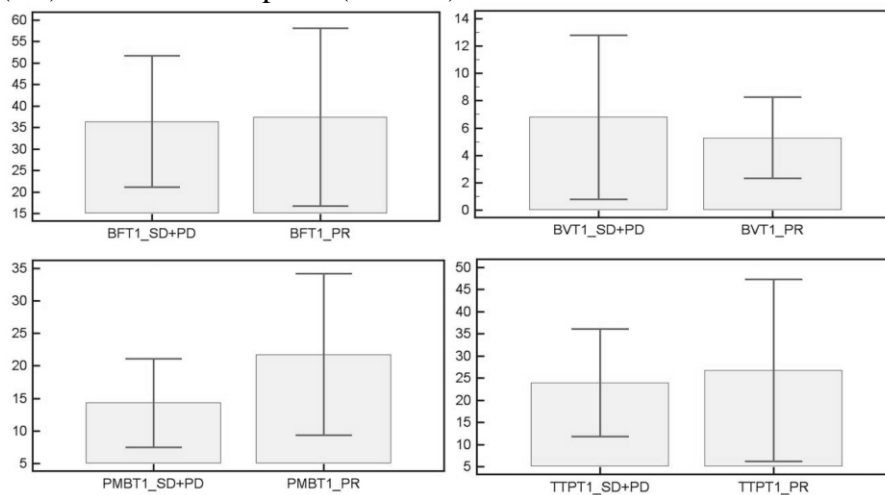
Il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei biomarcatori ottenuti dopo il primo ciclo di terapia antiangiogenica stratificato per la risposta alla terapia ha mostrato una differenza statisticamente significativa per il RECIST nel confronto tra PR e SD (0.002) e tra PR e PD (0.03) ma non tra PD e SD (0.27) mentre non ha mostrato differenze statisticamente significative per i biomarcatori né nel confronto tra PR e SD [CA19.9 (1.0), CEA (0.34)], né nel confronto tra PD e SD [CA19.9 (0.49), CEA (0.38)] né nel confronto tra PD e PR [CA19.9 (1.0), CEA (0.07)] (Figura 10).

Figura 10. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers tumorali al T1, suddivisi per tipo di risposta alla terapia (PR, SD, PD)



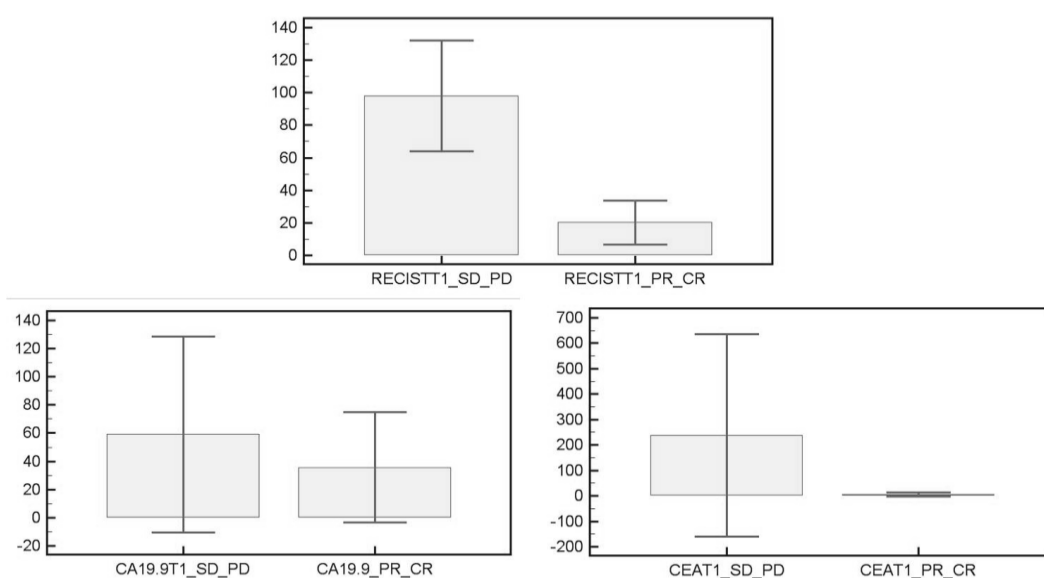
Peraltro anche dopo successivo raggruppamento in classi per la presenza o assenza di risposta precoce al trattamento (PR, SD+PD), il confronto dei parametri perfusionali ottenuti dopo il primo ciclo di terapia antiangiogenica ha evidenziato valori medi di BV più bassi, di PMB e TTP più alti e di BF sostanzialmente stabili nei pazienti con risposta alla terapia mentre (Figura 11) senza dimostrazione di differenze significative nei valori di BF (p 0.90), BV (0.46), PMB (0.18) e TTP (0.67) tra le lesioni che hanno risposto e quelle che non hanno risposto alla terapia.

Figura 11. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T1, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta (SD+PD).



Allo stesso modo anche il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei marcatori ottenuti dopo il primo ciclo di terapia antiangiogenica stratificato per la presenza o assenza di risposta precoce alla terapia ha confermato una differenza statisticamente significativa per il RECIST (0.0007) ma non per il CA19.9 (0.90) e il CEA (0.13) (Figura 12).

Figura 12. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers al T1, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta (SD+PD).



In tabella 9 sono mostrati allo stesso modo i valori medi con il 95% CI, la deviazione standard, il minimo e il massimo dei parametri perfusionali e dei diametri massimi globali RECIST al T0, stratificati secondo il tipo di risposta alla terapia al T1.

Tabella 9. Caratteristiche descrittive dei valori perfusionali e RECIST ottenuti al T0 suddivisi per classi di risposta alla terapia secondo i criteri RECIST al T1.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BFT0_PR	74,310	12,811 - 135,809	49,5297	22,1503	33,740	158,550	33,740 - 158,550
BVT0_PR	3,576	-0,396 - 7,548	3,1992	1,4307	0,100	7,300	0,100 - 7,300
PMBT0_PR	29,166	4,701 - 53,631	19,7033	8,8116	0,100	51,630	0,100 - 51,630
TTPT0_PR	16,746	-3,267 - 36,759	16,1181	7,2082	0,100	36,280	0,100 - 36,280
CA19.9T0_PR	67,560	-12,042 - 147,162	64,1092	28,6705	9,300	161,000	9,300 - 161,000
CEAT0_PR	14,060	-5,642 - 33,762	15,8672	7,0960	0,500	38,000	0,500 - 38,000
RECISTT0_PR	34,440	9,078 - 59,802	20,4254	9,1345	15,100	66,900	15,100 - 66,900

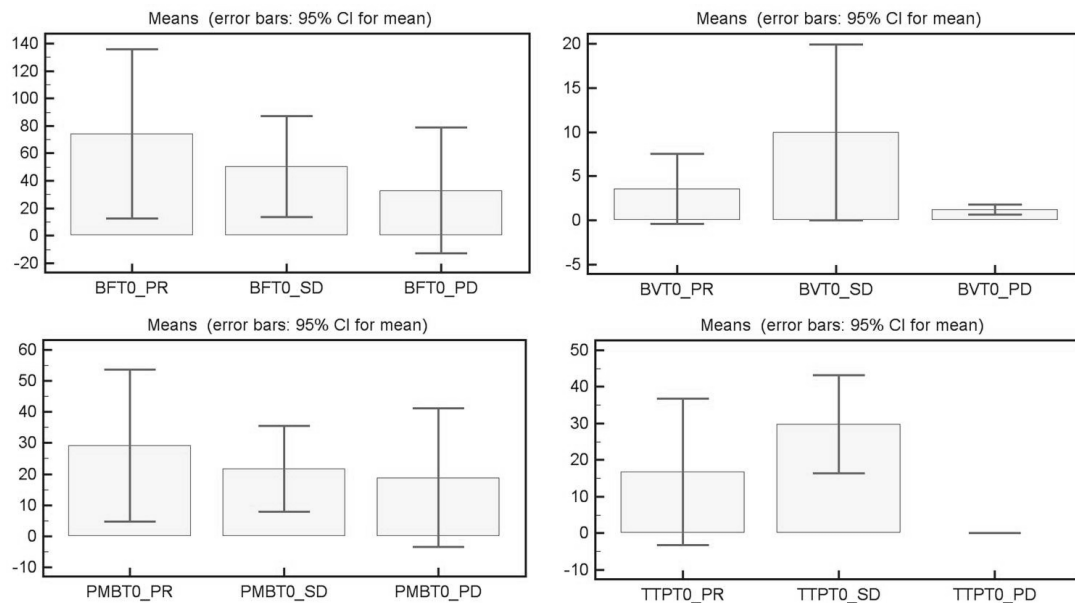
	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BFT0_SD	50,607	13,840 - 87,374	39,7551	15,0260	18,240	108,920	18,240 - 108,920
BVT0_SD	9,989	0,0189 - 19,958	10,7798	4,0744	2,290	31,930	2,290 - 31,930
PMBT0_SD	21,679	7,853 - 35,505	14,9495	5,6504	5,320	49,030	5,320 - 49,030
TTPT0_SD	29,897	16,495 - 43,299	14,4909	5,4770	0,100	44,630	0,100 - 44,630
CA19.9T0_SD	53,414	-31,726 - 138,554	92,0587	34,7949	0,800	260,000	0,800 - 260,000
CEAT0_SD	335,074	-287,231 - 957,380	672,8749	254,3228	1,620	1800,000	1,620 - 1800,000
RECISTT0_SD	94,543	61,835 - 127,251	35,3662	13,3672	48,000	137,700	48,000 - 137,700

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
BFT0_PD	33,027	-12,875 - 78,929	18,4780	10,6683	12,030	46,810	12,030 - 46,810
BVT0_PD	1,233	0,693 - 1,773	0,2173	0,1255	1,000	1,430	1,000 - 1,430
PMBT0_PD	18,880	-3,511 - 41,271	9,0134	5,2039	9,400	27,340	9,400 - 27,340
TTPT0_PD	0,100	0,100 - 0,100	0,0000	0,0000	0,100	0,100	0,100 - 0,100
CA19.9T0_PD	21,067	-28,629 - 70,763	20,0053	11,5501	7,200	44,000	7,200 - 44,000
CEAT0_PD	51,147	-103,667 - 205,960	62,3207	35,9809	11,800	123,000	11,800 - 123,000
RECISTT0_PD	91,833	-52,141 - 235,808	57,9574	33,4617	50,600	158,100	50,600 - 158,100

In particolare il confronto dei parametri perfusionali ottenuti alla baseline, stratificato per la risposta alla terapia in fase precoce a T1 ha mostrato differenze statisticamente significative per BV e TTP [BV (p0.02), TTP (p0.04)] nel confronto tra SD e PD ma non per BF e PMB [BF (p0.83), PMB (p1.0)], mentre non ha mostrato differenze statisticamente significative tra nessun parametro perfusionale nel confronto tra PR e SD [BF (p0.20), BV (p0.15), PMB (p0.53), TTP (p0.12)] e tra PD e PR [BF (p0.25), BV (p0.25), PMB (p0.39), TTP (p0.15)] (Figura 13).

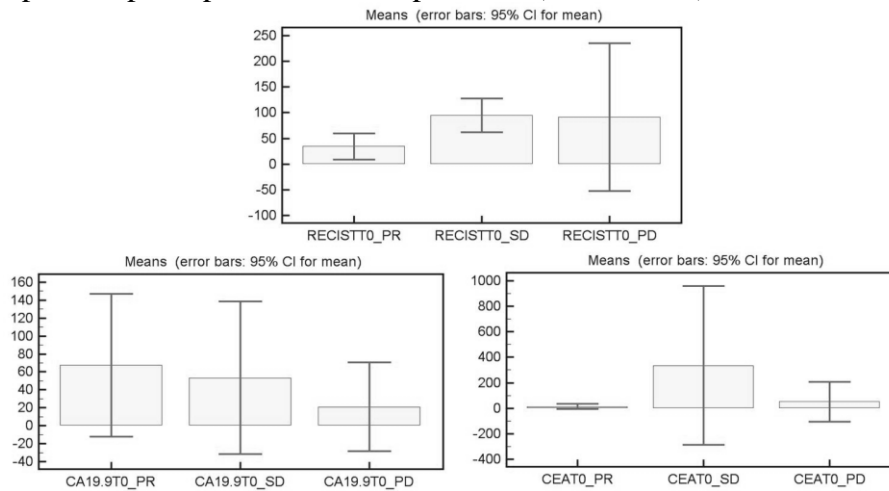
Figura 13. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T0, suddivisi per tipo di risposta precoce alla terapia a T1 (PR, SD, PD)



Il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei marcatori tumorali ottenuti a T0 stratificato per la risposta precoce alla terapia a T1 ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra il diametro massimo globale RECIST nel confronto tra PR e SD ( $p=0.01$ ) ma non tra PD e PR ( $p=0.14$ ) né tra PD e SD ( $p=1.0$ ).

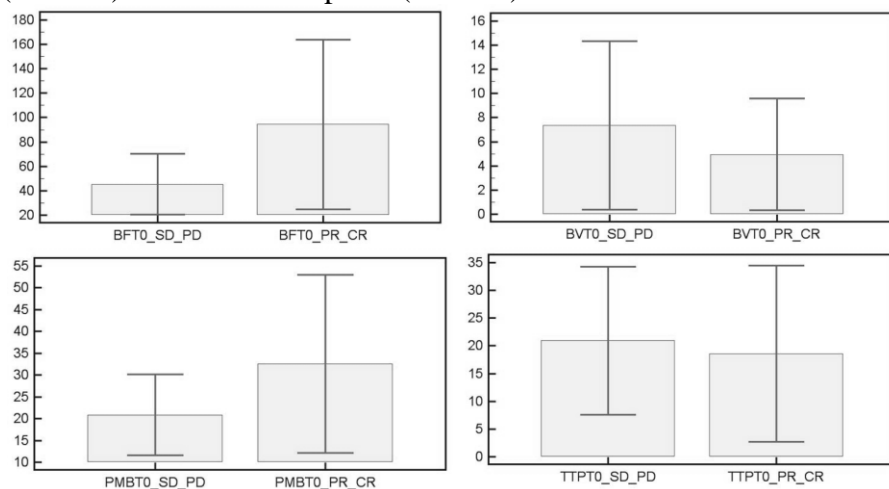
Il test Mann-Whitney per dati indipendenti non ha dimostrato differenze statisticamente significative nemmeno per i biomarcatori sia nel confronto tra PR e SD [CA19.9 ( $p=0.42$ ), CEA ( $p=0.63$ )], che nel confronto tra PD e SD [CA19.9 (0.83), CEA (0.52)] che nel confronto tra PD e PR [CA19.9 (0.39), CEA (0.39)] (Figura 14).

Figura 14. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers tumorali al T0, suddivisi per tipo di risposta precoce alla terapia al T1 (PR, SD, PD)



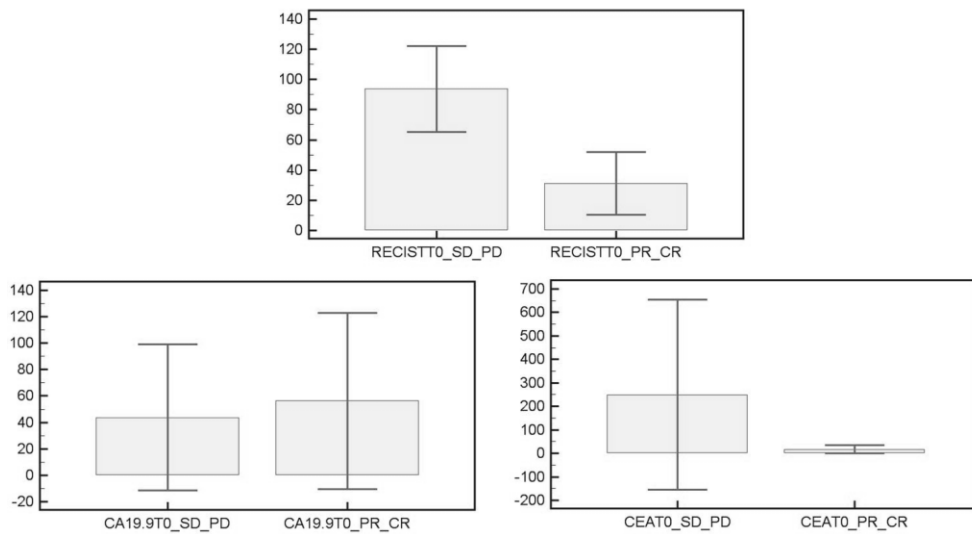
Peraltro anche dopo raggruppamento in classi, per la presenza o assenza di risposta precoce al trattamento (PR+CR o SD+PD), il confronto dei parametri perfusionali ottenuti alla baseline ha evidenziato valori di BV e TTP più bassi e valori di PMB e BF più alti nei pazienti con risposta precoce alla terapia (Figura 15) senza tuttavia dimostrazione di alcuna differenza statisticamente significativa tra i valori di BF (p0.06), BV (p0.87), PMB (p0.18) e TTP (p0.58) tra le lesioni che hanno risposto e quelle che non hanno risposto alla terapia.

Figura 15. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T0, suddivisi per presenza (PR+CR) o assenza di risposta (SD+PD) al T1.



Allo stesso modo anche il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei marcatori ottenuti alla baseline stratificato per la presenza o assenza di risposta precoce alla terapia a T1 ha evidenziato valori di diametro massimo globale RECIST più bassi, CEA più bassi e CA19.9 più alti nei pazienti con risposta precoce alla terapia rispetto a quelli senza risposta alla terapia, con una differenza statisticamente significativa per il RECIST (0.003) ma non per il CA19.9 (0.70) e il CEA (0.62) (Figura 16).

Figura 16. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers al T1, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta (SD+PD).





## VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA TARDIVA ALLA TERAPIA, CONFRONTO DEI DATI TRA T0, T1 E T2

Secondo i criteri dimensionali RECIST modificati per la valutazione della risposta al trattamento, al T2 si è riscontrata una risposta parziale (PR) in 5 casi, una progressione di malattia (PD) in 4, mentre la malattia è risultata stabile (SD) in 2 casi; in 1 caso si è ottenuta una risposta completa (CR) e non è stato possibile calcolare i parametri perfusionali.

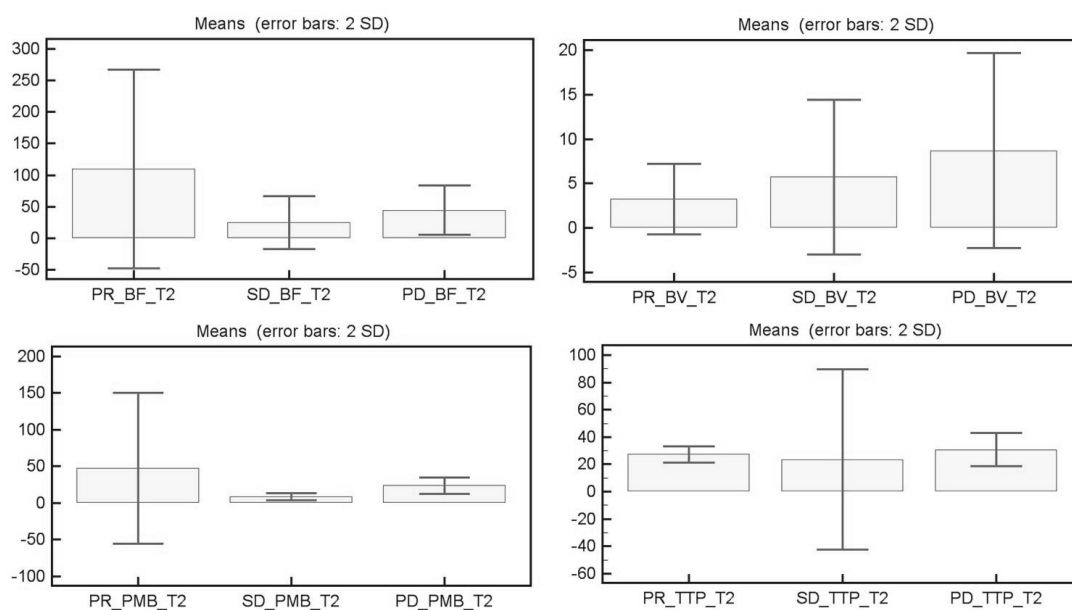
In tabella 10 sono mostrati i valori medi con il 95% CI, la deviazione standard, il minimo e il massimo dei parametri perfusionali e dei valori RECIST al T1, classificati secondo il tipo di risposta alla terapia prevista secondo i criteri tradizionali.

Tabella 10. Caratteristiche descrittive dei valori perfusionali, RECIST e dei marcatori tumorali analizzati a T2 suddivisi per classi di risposta alla terapia al T2.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
PR_BF_T2	110,166	12,452 - 207,880	78,6962	35,1940	26,600	214,880	26,600 - 214,880
PR_BV_T2	3,268	0,800 - 5,736	1,9875	0,8888	0,300	5,500	0,300 - 5,500
PR_PMB_T2	47,220	-16,639 - 111,079	51,4298	23,0001	0,400	127,880	0,400 - 127,880
PR_TTP_T2	27,256	23,507 - 31,005	3,0191	1,3502	22,900	30,400	22,900 - 30,400
PR_CA19.9_T2	21,320	0,972 - 41,668	16,3874	7,3287	8,900	50,000	8,900 - 50,000
PR_CEA_T2	6,728	-2,734 - 16,190	7,6208	3,4081	1,200	20,000	1,200 - 20,000
PR_RECIST_T2	43,220	-1,175 - 87,615	35,7540	15,9897	3,000	83,200	3,000 - 83,200
SD_BF_T2	24,865	-164,394 - 214,124	21,0647	14,8950	9,970	39,760	9,970 - 39,760
SD_BV_T2	5,740	-33,268 - 44,748	4,3416	3,0700	2,670	8,810	2,670 - 8,810
SD_PMB_T2	8,785	-12,117 - 29,687	2,3264	1,6450	7,140	10,430	7,140 - 10,430
SD_TTP_T2	23,455	-273,298 - 320,208	33,0290	23,3550	0,100	46,810	0,100 - 46,810
SD_CA19.9_T2	70,000	-184,124 - 324,124	28,2843	20,0000	50,000	90,000	50,000 - 90,000
SD_CEA_T2	933,500	-10076,426 - 11943,426	1225,4161	866,5000	67,000	1800,000	67,000 - 1800,000
SD_RECIST_T2	107,350	-520,972 - 735,672	69,9329	49,4500	57,900	156,800	57,900 - 156,800
PD_BF_T2	44,328	13,194 - 75,461	19,5658	9,7829	17,190	62,180	17,190 - 62,180
PD_BV_T2	8,678	-0,0433 - 17,398	5,4805	2,7403	2,520	15,830	2,520 - 15,830
PD_PMB_T2	23,795	15,288 - 32,302	5,3462	2,6731	17,680	30,600	17,680 - 30,600
PD_TTP_T2	30,788	21,103 - 40,472	6,0860	3,0430	26,330	39,720	26,330 - 39,720
PD_CA19.9_T2	63,075	-124,425 - 250,575	117,8339	58,9169	2,500	239,800	2,500 - 239,800
PD_CEA_T2	19,200	-21,641 - 60,041	25,6662	12,8331	2,000	56,900	2,000 - 56,900
PD_RECIST_T2	48,600	9,035 - 88,165	24,8646	12,4323	31,100	84,900	31,100 - 84,900

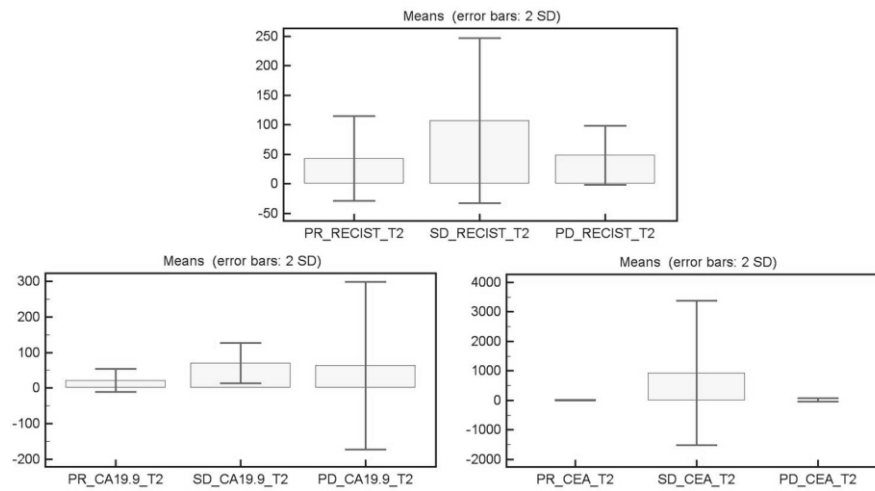
Il confronto dei parametri perfusionali ottenuti al T2 stratificato per la risposta alla terapia al T2 non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i parametri perfusionali né nel confronto tra PR e SD [BF (p0.38), BV (p0.86), PMB (p0.38), TTP (p1.0)], né nel confronto tra PD e SD [BF (p0.27), BV (p1.0), PMB (p0.13), TTP (p1.0)], né nel confronto tra PD e PR [BF (p0.41), BV (p0.19), PMB (p1.0), TTP (0.56)] (Figura 17).

Figura 17. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T1, suddivisi per tipo di risposta alla terapia (PR, SD, PD)



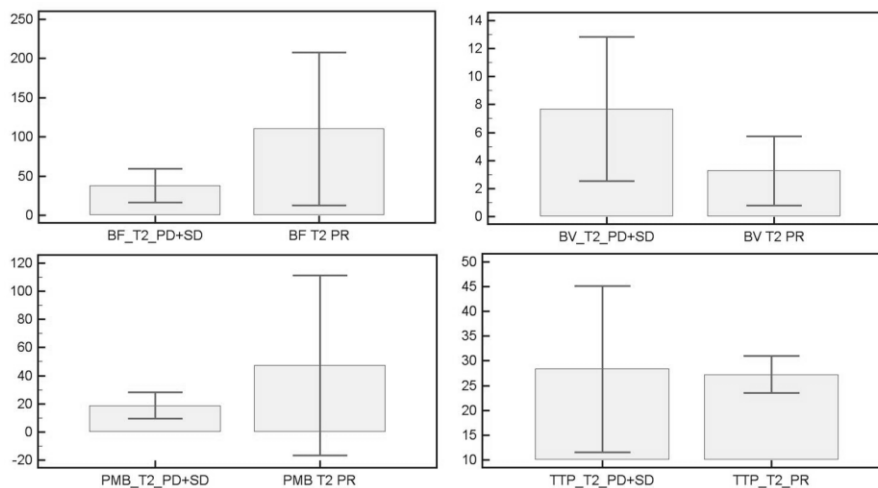
Il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei biomarcatori ottenuti al T2 stratificato per la risposta alla terapia al T2 non ha mostrato differenze statisticamente significative né per il RECIST né per i markers sia nel confronto tra PR e SD [RECIST (p0.38), CA19.9 (p0.08), CEA (0.09)] che tra PR e PD [RECIST (p0.73), CA19.9 (p0.28), CEA (p0.56)] che tra PD e SD [RECIST (p0.27), CA19.9 (0.53), CEA (0.13)] (Figura 18).

Figura 18. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers tumorali al T2, suddivisi per tipo di risposta alla terapia (PR, SD, PD) a T2.



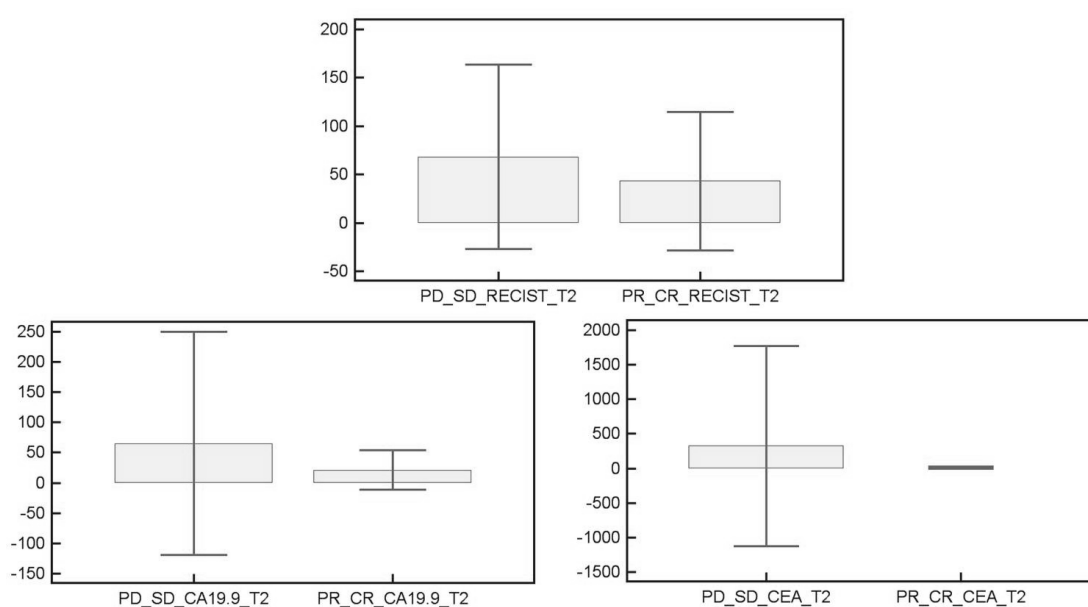
Peraltro anche dopo raggruppamento in classi di risposta al trattamento (PR+CR, SD+PD), il confronto dei parametri perfusionali a T2 ha evidenziato valori medi di BV e TTP più bassi e valori medi di BF e PMB più alti nei pazienti con risposta alla terapia (Figura 19), ma con il test di Mann-Whitney per classi indipendenti non è stata tuttavia dimostrata alcuna differenza statisticamente significativa tra i valori di BF (p0.25), BV (p0.25), PMB (p0.66) e TTP (0.66).

Figura 19. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T2, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta a T2 (SD+PD).



Allo stesso modo anche il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei marcatori ottenuti a T2 stratificato per la presenza o assenza di risposta alla terapia a T2 ha confermato valori medi di diametro globale RECIST, CA19.9 e CEA minori nei pazienti con risposta alla terapia ma tali differenze non sono risultate statisticamente significative [RECIST (p0.43), CA19.9 (p0.93), CEA (p0.18) (Figura 20).

Figura 20. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers al T2, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta (SD+PD) al T2.



## CONFRONTO DEI DATI a T0

In tabella 11 sono riportati i valori medi con il 95% di intervallo di confidenza (CI), la deviazione standard (SD), il minimo e il massimo dei parametri perfusionali, dei diametri massimi globali RECIST e dei markers tumorali al T0, stratificati secondo il tipo di risposta tardiva alla terapia riscontrata al T2.

Tabella 11. Caratteristiche descrittive dei valori perfusionali, RECIST ed umorali ottenuti al T0 suddivisi per classi di risposta alla terapia al T2.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
PR_BF_T0	55,294	12,694 - 97,894	34,3090	15,3434	23,400	108,920	23,400 - 108,920
PR_BV_T0	6,338	-1,028 - 13,704	5,9320	2,6529	1,680	16,200	1,680 - 16,200
PR_PMB_T0	34,718	15,467 - 53,969	15,5039	6,9335	14,500	51,630	14,500 - 51,630
PR_TTP_T0	21,230	-3,275 - 45,735	19,7356	8,8260	0,100	40,680	0,100 - 40,680
PR_CA19.9_T0	68,660	-65,258 - 202,578	107,8535	48,2336	9,000	260,000	9,000 - 260,000
PR_CEA_T0	104,824	-177,825 - 387,473	227,6371	101,8024	0,500	512,000	0,500 - 512,000
PR_RECIST_T0	77,460	19,176 - 135,744	46,9401	20,9923	28,600	135,500	28,600 - 135,500

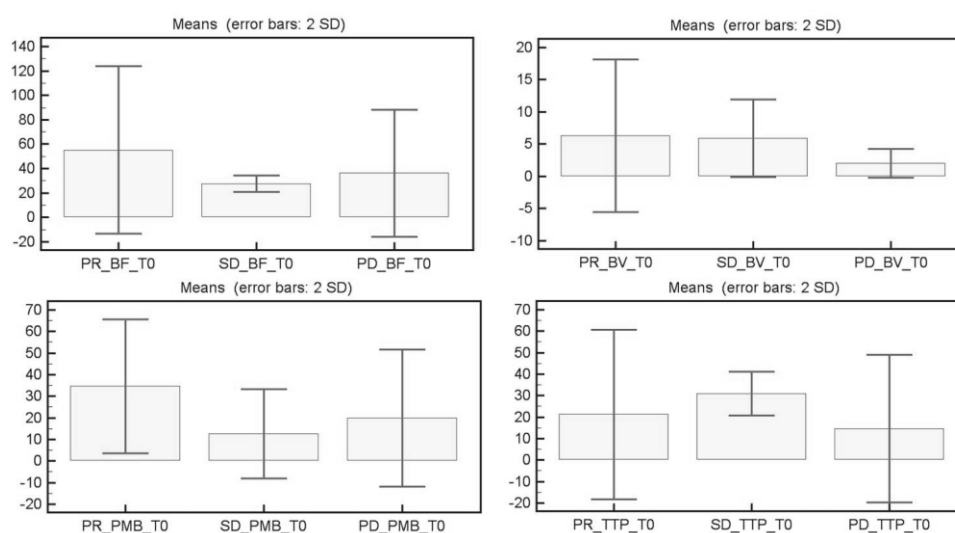
	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
SD_BF_T0	27,530	-3,092 - 58,152	3,4083	2,4100	25,120	29,940	25,120 - 29,940
SD_BV_T0	5,880	-21,184 - 32,944	3,0123	2,1300	3,750	8,010	3,750 - 8,010
SD_PMB_T0	12,600	-79,901 - 105,101	10,2955	7,2800	5,320	19,880	5,320 - 19,880
SD_TTP_T0	30,895	-14,657 - 76,447	5,0700	3,5850	27,310	34,480	27,310 - 34,480
SD_CA19.9_T0	21,900	-246,201 - 290,001	29,8399	21,1000	0,800	43,000	0,800 - 43,000
SD_CEA_T0	904,000	-10480,759 - 12288,759	1267,1354	896,0000	8,000	1800,000	8,000 - 1800,000
SD_RECIST_T0	107,850	-271,430 - 487,130	42,2143	29,8500	78,000	137,700	78,000 - 137,700

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
PD_BF_T0	36,290	-5,160 - 77,740	26,0488	13,0244	12,030	68,080	12,030 - 68,080
PD_BV_T0	2,028	0,270 - 3,785	1,1042	0,5521	1,000	3,520	1,000 - 3,520
PD_PMB_T0	19,860	-5,332 - 45,052	15,8319	7,9159	7,920	42,220	7,920 - 42,220
PD_TTP_T0	14,753	-12,592 - 42,097	17,1847	8,5923	0,100	33,090	0,100 - 33,090
PD_CA19.9_T0	37,075	-35,864 - 110,014	45,8382	22,9191	7,200	105,000	7,200 - 105,000
PD_CEA_T0	46,635	-36,904 - 130,174	52,5001	26,2500	6,900	123,000	6,900 - 123,000
PD_RECIST_T0	58,075	41,864 - 74,286	10,1880	5,0940	48,000	66,900	48,000 - 66,900

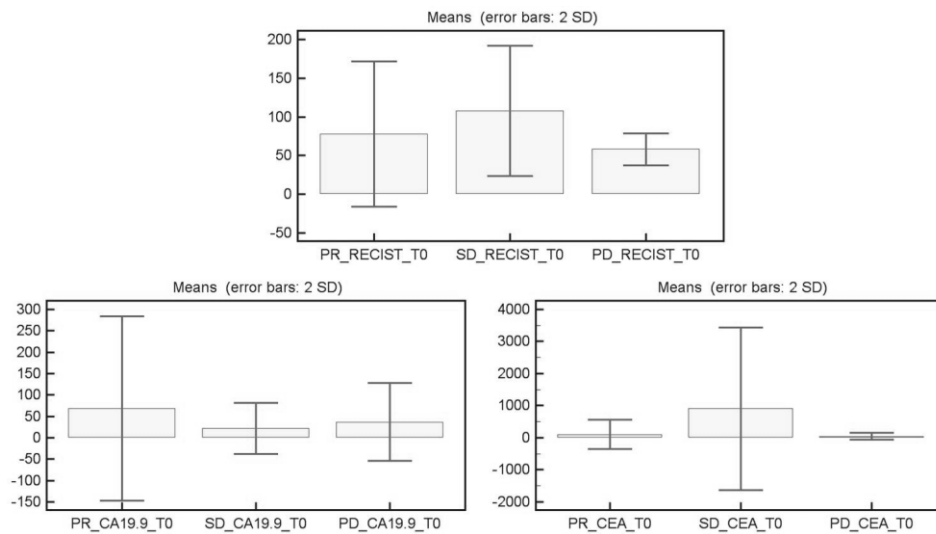
Il confronto dei parametri perfusionali ottenuti alla baseline, stratificato per la risposta alla terapia in fase tardiva, non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i parametri perfusionali né nel confronto tra PR e SD [BF (p0.38), BV (p0.86), PMB (p0.19), TTP (p1.0)], né nel confronto tra SD e PD [BF (p1.0), BV (p0.13), PMB (1.0), TTP (p0.16)], né in quello tra PD e PR [BF (p0.41), BV (p0.11), PMB (p0.19), TTP (p0.45)] (Figura 21).

Figura 21. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T0, suddivisi per tipo di risposta tardiva alla terapia a T2 (PR, SD, PD)



Il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei biomarcatori ottenuti a T0 stratificato per la risposta tardiva alla terapia a T2 non ha mostrato differenze statisticamente significative né per il RECIST né per i biomarcatori sia nel confronto tra PR e SD [RECIST (p0.38), CA19.9 (p0.56), CEA (p0.17)], che nel confronto tra PD e SD [RECIST (p1.0), CA19.9 (0.80), CEA (0.80)] che nel confronto tra PD e PR [RECIST (p1.0), CA19.9 (0.90), CEA (0.29)] (Figura 22).

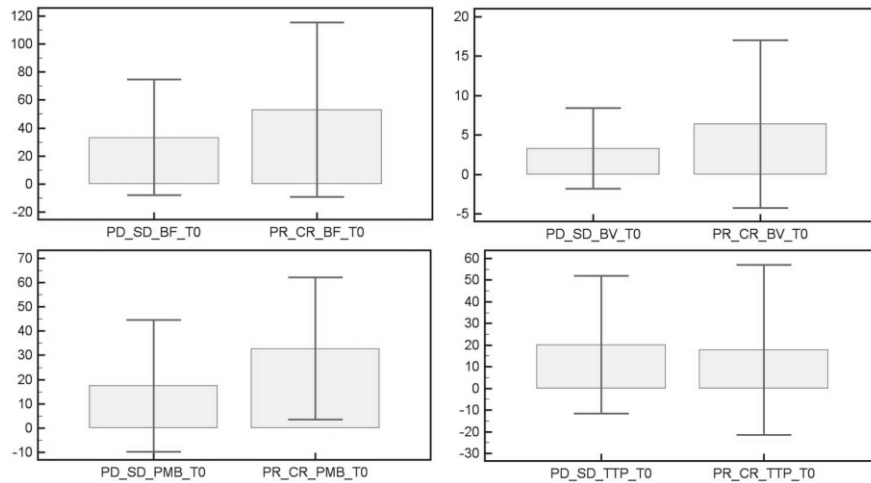
Figura 22. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers tumorali al T0, suddivisi per tipo di risposta tardiva alla terapia al T2 (PR, SD, PD)



Peraltro anche dopo la stratificazione ed il raggruppamento dei campioni in esame in due sole classi, la prima con presenza di risposta al trattamento a T2 (PR+CR) e la seconda con assenza di risposta al trattamento a T2 (SD+PD), il confronto dei parametri perfusionali misurati per le due classi alla baseline ha evidenziato valori di BF, BV e PMB più elevati mentre valori di TTP ridotti nei pazienti con risposta alla terapia rispetto a quelli senza risposta alla terapia (Figura 23).

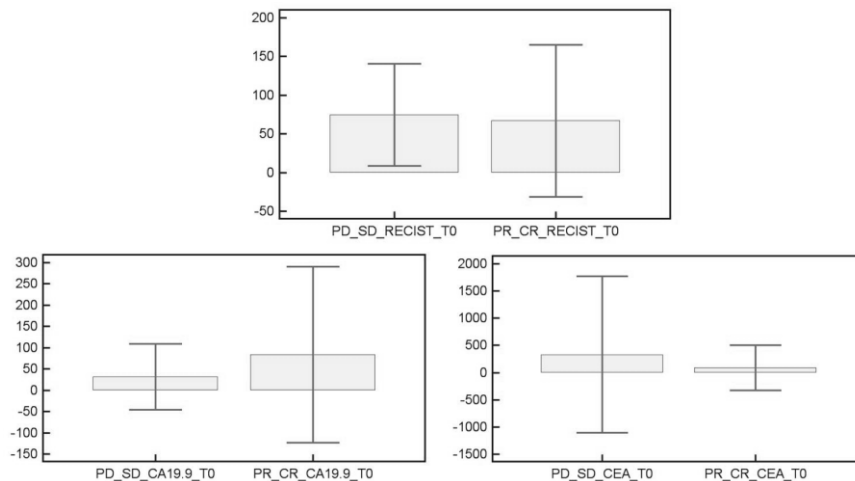
Il test Mann-Whitney per dati indipendenti non ha tuttavia dimostrato la presenza di differenze statisticamente significativa tra i valori di BF (p0.24), BV (p0.24), PMB (p0.06) e TTP (p0.87) nelle due classi cioè tra le lesioni che hanno risposto alla terapia e quelle che non hanno risposto alla terapia.

Figura 23. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T0, suddivisi per presenza (PR+CR) o assenza di risposta (SD+PD) al T2.



Allo stesso modo anche il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei marcatori ottenuti alla baseline stratificato per la presenza o assenza di risposta alla terapia a T2 ha evidenziato valori di RECIST e CEA ridotti mentre valori di CA19.9 più elevati nei pazienti con risposta alla terapia rispetto a quelli senza risposta alla terapia (Figura 24) senza tuttavia differenze statisticamente significative nè per il diametro massimo globale RECIST (p0.39), né per i valori di CA19.9 (p0.38) né per i valori dell'antigene carcino embrionario CEA (p0.17).

Figura 24. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers al T0, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta (SD+PD).





## CONFRONTO DEI DATI T1

In tabella 12 sono riportati i valori medi con il 95% di intervallo di confidenza (CI), la deviazione standard (SD), il minimo e il massimo dei parametri perfusionali, dei diametri massimi globali RECIST e dei markers tumorali al T1, stratificati secondo il tipo di risposta tardiva alla terapia riscontrata al T2.

Tabella 12. Caratteristiche descrittive dei valori perfusionali e RECIST ottenuti al T1 suddivisi per classi di risposta alla terapia secondo i criteri RECIST al T2.

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
PR_BF_T1	38,790	27,075 - 50,505	9,4347	4,2193	24,400	48,900	24,400 - 48,900
PR_BV_T1	8,922	-5,760 - 23,604	11,8247	5,2882	2,340	29,720	2,340 - 29,720
PR_PMB_T1	21,940	10,865 - 33,015	8,9198	3,9891	9,400	31,500	9,400 - 31,500
PR_TTP_T1	18,406	-2,338 - 39,150	16,7066	7,4714	0,200	32,300	0,200 - 32,300
PR_CA19.9_T1	34,800	-2,361 - 71,961	29,9282	13,3843	12,000	87,000	12,000 - 87,000
PR_CEA_T1	12,320	-13,859 - 38,499	21,0836	9,4289	1,900	50,000	1,900 - 50,000
PR_RECIST_T1	58,840	4,031 - 113,649	44,1413	19,7406	7,600	112,100	7,600 - 112,100

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
SD_BF_T1	50,980	-364,767 - 466,727	46,2731	32,7200	18,260	83,700	18,260 - 83,700
SD_BV_T1	7,030	-0,848 - 14,908	0,8768	0,6200	6,410	7,650	6,410 - 7,650
SD_PMB_T1	5,640	-25,744 - 37,024	3,4931	2,4700	3,170	8,110	3,170 - 8,110
SD_TTP_T1	19,395	-225,771 - 264,561	27,2873	19,2950	0,100	38,690	0,100 - 38,690
SD_CA19.9_T1	45,000	-18,531 - 108,531	7,0711	5,0000	40,000	50,000	40,000 - 50,000
SD_CEA_T1	916,000	-10316,285 - 12148,285	1250,1648	884,0000	32,000	1800,000	32,000 - 1800,000
SD_RECIST_T1	113,900	-478,209 - 706,009	65,9024	46,6000	67,300	160,500	67,300 - 160,500

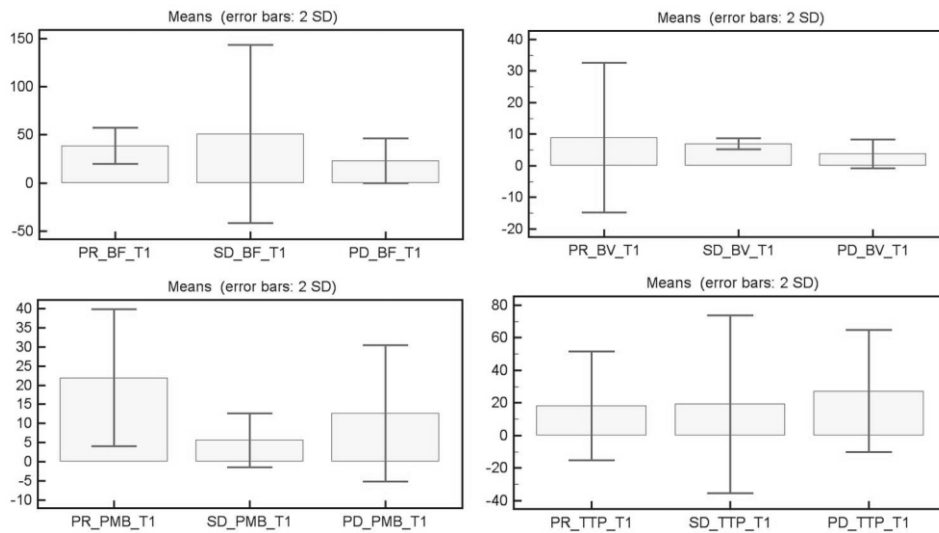
  

	Mean	95% CI	SD	SEM	Minimum	Maximum	5 - 95 P
PD_BF_T1	23,205	4,732 - 41,678	11,6096	5,8048	9,140	33,540	9,140 - 33,540
PD_BV_T1	3,817	0,223 - 7,412	2,2590	1,1295	1,750	6,410	1,750 - 6,410
PD_PMB_T1	12,668	-1,465 - 26,800	8,8817	4,4408	3,340	23,640	3,340 - 23,640
PD_TTP_T1	27,335	-2,541 - 57,211	18,7756	9,3878	0,100	41,860	0,100 - 41,860
PD_CA19.9_T1	10,000	3,125 - 16,875	4,3205	2,1602	4,000	14,000	4,000 - 14,000
PD_CEA_T1	61,875	-115,537 - 239,287	111,4943	55,7471	2,600	229,000	2,600 - 229,000
PD_RECIST_T1	63,600	6,497 - 120,703	35,8862	17,9431	30,500	99,800	30,500 - 99,800

Il confronto dei parametri perfusionali ottenuti a T1, stratificato per la risposta alla terapia in fase tardiva, non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i parametri perfusionali né nel confronto tra PR e SD [BF (p1.0), BV (p0.57), PMB (p0.09), TTP (p1.0)], né nel confronto

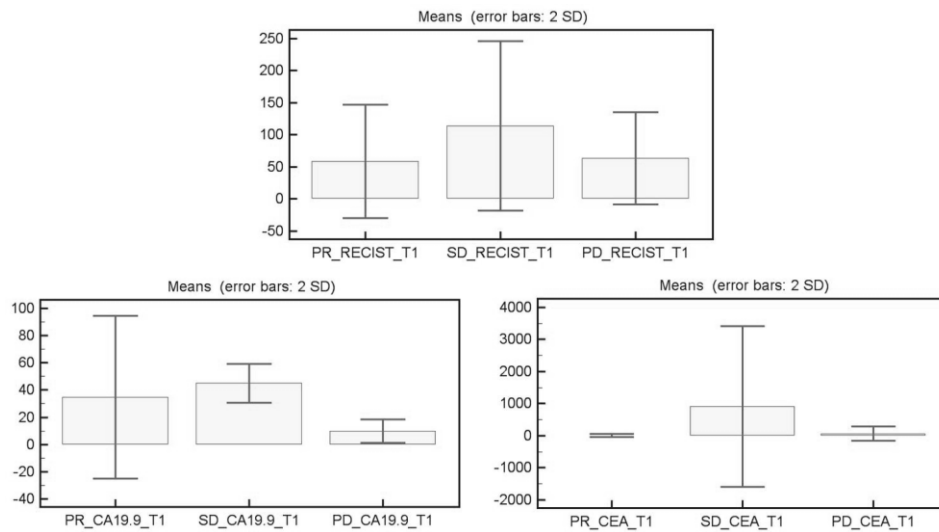
tra SD e PD [BF (p0.49), BV (p0.10), PMB (0.25), TTP (p0.82)], né in quello tra PD e PR [BF (p0.06), BV (p0.41), PMB (p0.19), TTP (p0.46)] (Figura 25).

Figura 25. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T1, suddivisi per tipo di risposta tardiva alla terapia a T2 (PR, SD, PD)



Il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei biomarcatori ottenuti a T1 stratificato per la risposta tardiva alla terapia a T2 ha mostrato unicamente una differenza statisticamente significativa tra Ca19.9 nel confronto tra PD e PR (p0.04) mentre non ha mostrato nessun'altra differenza significativa né per il RECIST né per i biomarcatori sia nel confronto tra PR e SD [RECIST (p0.38), CA19.9 (p0.38), CEA (p0.19)], che nel confronto tra PD e SD [RECIST (p0.53), CA19.9 (0.13), CEA (0.27)] che nel confronto tra PD e PR [RECIST (p0.90), CEA (0.41)] (Figura 26).

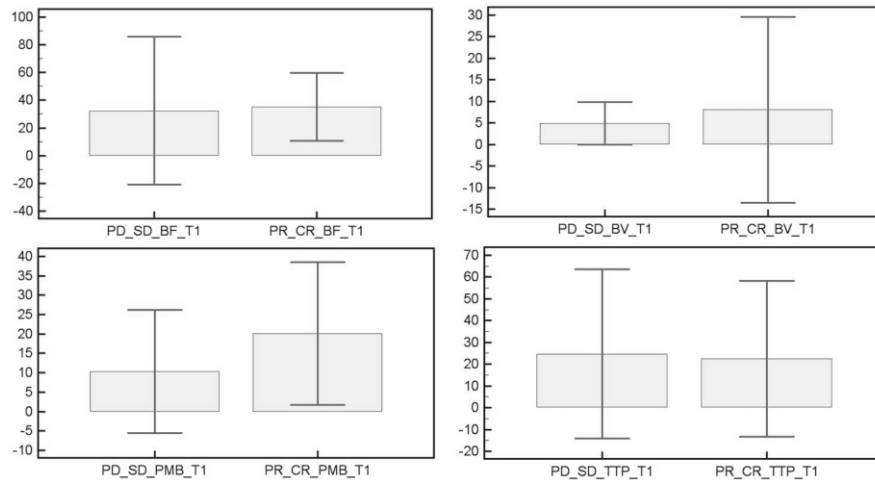
Figura 26. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers tumorali al T1, suddivisi per tipo di risposta tardiva alla terapia al T2 (PR, SD, PD)



Peraltro anche dopo la stratificazione ed il raggruppamento dei campioni in esame in due sole classi, la prima con presenza di risposta al trattamento a T2 (PR+CR) e la seconda con assenza di risposta al trattamento a T2 (SD+PD), il confronto dei parametri perfusionali misurati per le due classi a T1 ha evidenziato valori di BF, BV e PMB più elevati mentre valori di TTP ridotti nei pazienti con risposta alla terapia rispetto a quelli senza risposta alla terapia (Figura 27).

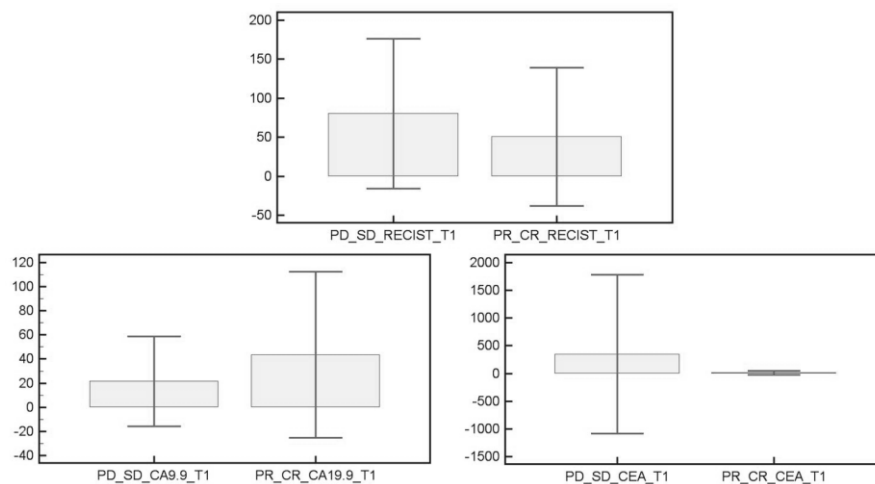
Il test Mann-Whitney per dati indipendenti ha dimostrato una differenza statisticamente significativa nel nostro campione solo per la PMB ( $p0.05$ ) mentre le differenze non sono risultate statisticamente significative tra i valori di BF ( $p0.34$ ), di BV ( $p0.87$ ) e di TTP ( $p1.0$ ) nelle due classi cioè tra le lesioni che hanno risposto alla terapia e quelle che non hanno risposto alla terapia.

Figura 27. Grafico di confronto tra i parametri perfusionali nelle lesioni target al T1, suddivisi per presenza (PR+CR) o assenza di risposta (SD+PD) al T2.



Allo stesso modo anche il confronto dei parametri dimensionali RECIST e dei marcatori ottenuti a T1 stratificato per la presenza o assenza di risposta alla terapia a T2 ha evidenziato valori di RECIST e CEA ridotti mentre valori di CA19.9 più elevati nei pazienti con risposta alla terapia rispetto a quelli senza risposta alla terapia (Figura 28) senza tuttavia differenze statisticamente significative né per il diametro massimo globale RECIST ( $p0.31$ ), né per i valori di CA19.9 ( $p0.17$ ) né per i valori dell'antigene carcino embrionario CEA ( $p0.24$ ).

Figura 28. Grafico di confronto tra i parametri dimensionali RECIST e i markers al T1, suddivisi per presenza (PR) o assenza di risposta (SD+PD) a T2.



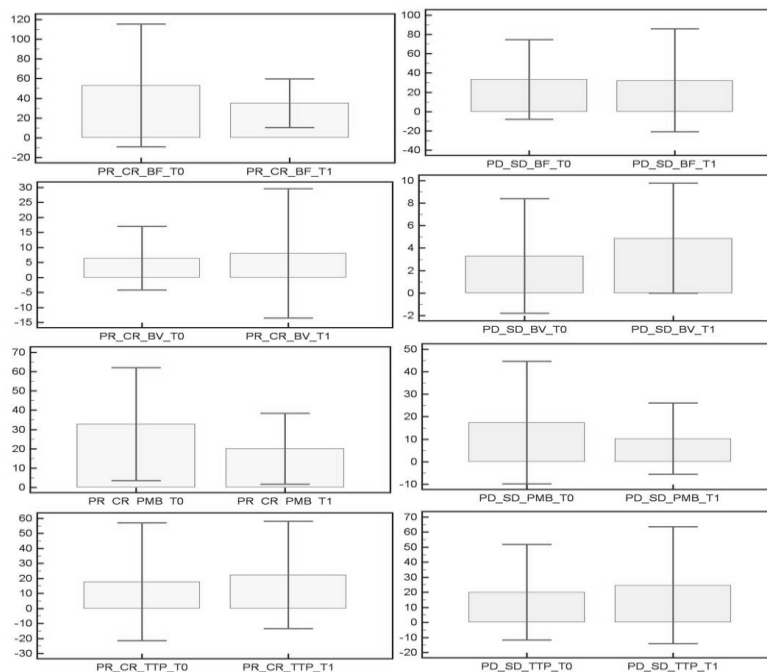
In particolare ponendo a confronto l'andamento dei parametri perfusionali tra T0 e T1 nella sola classe di lesioni che hanno mostrato risposta alla terapia al T2, si nota che (Figura 29):

- BF risulta ridotto in 3 casi e aumentato in 3 casi al T1 rispetto al T0 (p0.44);
- BV risulta aumentato in 4 casi e ridotto in 2 casi al T1 rispetto al T0 (p0.84);
- PMB risulta ridotto in 5 e aumentato in 1 caso al T1 rispetto al T0 (p0.06);
- TTP risulta aumentato in 4 casi e ridotto in 2 casi al T1 rispetto al T0 (p0.84).

Viceversa nella classe di lesioni che non hanno mostrato risposta alla terapia, si nota che:

- BF risulta ridotto in 4 casi e aumentato in 2 casi al T1 rispetto al T0 (p0.56);
- BV risulta aumentato in 4 casi e ridotto in 2 casi al T1 rispetto al T0 (p0.31);
- PMB risulta ridotto in 4 e aumentato in 2 caso al T1 rispetto al T0 (p0.31);
- TTP risulta aumentato in 4 casi e ridotto in 1 casi al T1 rispetto al T0 (p0.44).

Figura 29. Confronto tra parametri perfusionali al T1 e T0 stratificato per la presenza (giallo) o assenza (verde) di risposta alla terapia al T2.



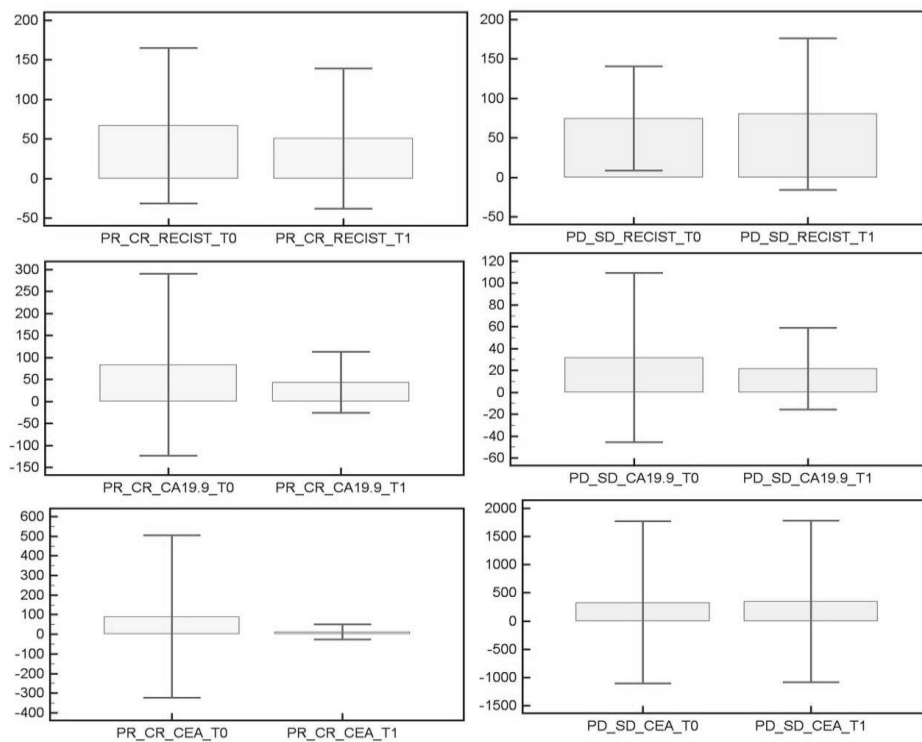
Ponendo a confronto l'andamento del diametro massimo globale RECIST e dei marcatori tumorali tra T0 e T1 nella sola classe di lesioni che hanno mostrato risposta alla terapia a T2, si nota che (Figura 30):

- Ca19.9 è ridotto in 4 casi e aumentato in 2 casi al T1 rispetto al T0 (p0.31);
- CEA è ridotto in 3 casi e aumentato in 3 casi al T1 rispetto al T0 (p0.44);
- RECIST è ridotto in tutti i 6 casi con risposta alla terapia (p0.03).

Viceversa nella classe di lesioni che non hanno mostrato risposta alla terapia, si nota che:

- Ca19.9 è aumentato in 3 casi e ridotto in 3 casi al T1 rispetto al T0 (p1.0);
- CEA è ridotto in 3 casi e aumentato in 2 casi al T1 rispetto al T0 (p1.0);
- RECIST è ridotto in 3 casi e aumentato in 3 casi al T1 rispetto al T0 (p0.69).

Figura 30. Confronto tra RECIST e marcatori tumorali al T1 e T0 stratificato per la presenza (giallo) o assenza (verde) di risposta alla terapia al T2.



## **DISCUSSIONE**

L'analisi dei nostri dati dimostra come la MDCT con l'applicazione dell'algoritmo CT perfusionale permette di acquisire un duplice risultato.

Da una parte infatti permette di ottenere un'imaging morfologico in grado di dare un bilancio spaziale della malattia metastatica epatica mediante l'analisi del numero e delle dimensioni delle lesioni metastatiche epatiche e della loro morfologia e struttura (analisi aree necrotiche); dall'altra parte permette inoltre di ottenere informazioni funzionali sulla perfusione vascolare delle stesse metastasi tramite l'analisi dei grafici enhancement-tempo e delle mappe funzionali colore del BF, BV, TTP e PS.

Tali ultime informazioni sono particolarmente utili in previsione dell'adozione di una terapia chemioterapica antiangiogenica che vada ad agire proprio sulla neovascolarizzazione tumorale affamando il tumore piuttosto che una terapia chemioterapica classica citotossica che vada ad agire direttamente sulle cellule tumorali uccidendole.

In accordo con alcune preliminari casistiche cliniche [34,35,39,40,41] che utilizzano la TC perfusionale per la valutazione dell'imaging tumorale anche i nostri dati hanno dimostrato un pattern perfusionale diverso tra le metastasi e il parenchima epatico sano circostante. In particolare in letteratura è dimostrato che i tessuti neoplastici sono caratterizzati da un elevato flusso sanguigno e volume sanguigno. In particolare i valori più elevati di BF sembrano essere correlati alla presenza di numerosi shunts artero-venosi nei neovasi maligni i quali costituiscono un flusso a bassa resistenza e determinano un incremento della velocità di flusso e conseguentemente un basso TTP. Gli elevati valori di BV indicano invece la presenza di un letto vascolare incrementato, dovuto alla formazione di nuovi vasi. Infine, una elevata PMB indica un leakage elevato attraverso i capillari, tipico dei tessuti neoplastici.

La nostra casistica conferma quanto atteso in letteratura mostrando come le lesioni metastatiche del nostro campione di studio siano caratterizzate da un flusso sanguigno, un volume sanguigno e una PMB mediamente più elevati che il parenchima sano circostante anche se tali differenze non sono risultate statisticamente significative; soprattutto tuttavia emerge che le metastasi sono caratterizzate da un valore di TTP più basso che nel parenchima sano e questa differenza è risultata statisticamente significativa.

L'ipotesi alla base della nostra ricerca è che l'analisi dei dati funzionali perfusionali ottenuti prima e dopo l'inizio della terapia chemioterapica antiangiogenica possa permettere di monitorare il cambiamento della vascolarizzazione delle metastasi epatiche indotto dalla terapia antiangiogenica e quindi di verificare la risposta alla terapia antiangiogenica in maniera più precoce, prima che i classici criteri dimensionali diano informazioni sulla stessa.

I nostri dati sembrano confermare questa ipotesi. Infatti nel nostro campione di studio la TC perfusionale ha evidenziato già al tempo T1, dopo il primo ciclo di terapia antiangiogenica, un drammatico decremento della perfusione, sostenuto da una riduzione significativa del flusso sanguigno e della permeabilità all'interno delle metastasi a fronte di un incremento del TTP e del volume sanguigno che non sono risultati invece significativi e senza una significativa riduzione del RECIST nè dei marcatori tumorali.

Successivamente, al tempo T2, tali aspetti non risultano invece più evidenti e si assiste all'incremento medio di tutti i parametri perfusionali a fronte di una riduzione significativa del RECIST e non significativa dei marcatori tumorali. Tale rilievo potrebbe essere correlato con la fine della finestra di normalizzazione indotta dalla terapia antiangiogenica che come sappiamo dapprima normalizza i vasi tumorali affamando il tumore ed agendo da facilitatore per la risposta alle altre terapie.



Poiché l'azione dei farmaci antiangiogenici determina in ultima analisi la normalizzazione dei vasi neoformati e pertanto il loro utilizzo come veicoli per la chemioterapia convenzionale inoltre ci si attendeva un netto maggiore effetto antiangiogenico nei pazienti responders rispetto ai non responders [42,43,44].

Questo dato è stato solo parzialmente confermato dall'evidenza nella nostra popolazione di studio che nei pazienti responders (secondo quanto riscontrato al T2) è stata dimostrata una riduzione precoce e prossima alla significatività già a T1 di PMB rispetto a T0 ( $p=0.06$ ) a fronte di un incremento del TTP rispetto al T0 tuttavia non significativo; questi dati risultano promettenti che necessitano di conferma in casistiche più numerose per poter essere considerati indici precoci di risposta alla terapia antiangiogenica.

Infine nei pazienti responders (al T2) retrospettivamente si sono evidenziati valori di BF, BV e PMB più elevati in valore assoluto rispetto ai pazienti non responders alla baseline ed in particolare la PMB risulta il valore più frequentemente elevato con  $p=0.06$  molto vicino alla significatività statistica a T0. Inoltre anche il diametro massimo globale RECIST è minore alla baseline nei pazienti responders ma questa differenza non è statisticamente significativa; anche questi dati risultano suggestivi e se confermati in casistiche più numerose potrebbero avere un ruolo come fattori prognostici positivi per la risposta alla terapia antiangiogenica.

La limitazione maggiore di questo lavoro di ricerca è il numero ancora contenuto di pazienti arruolati nello studio ed in particolare il numero ristretto di quelli che hanno terminato lo studio eseguendo tutte e 3 le TC perfusionali previste. Tale limitazione è correlata con le ancora ristrette indicazioni alla terapia antiangiogenica e con la scarsa compliance dei pazienti ad entrare in uno studio che prevede controlli TC più ravvicinati e con una dose di irradiazione maggiore rispetto al solito protocollo di follow up seguito per le terapie convenzionali.

Il numero limitato di pazienti rende pertanto l'analisi statistica meno potente e significativa e i nostri risultati solo dati interessanti e promettenti ma preliminari che necessitano di ulteriore conferma con casistiche più numerose.

Altra limitazione potrebbe essere considerata il cambiamento del protocollo TC durante il corso dello studio che potrebbe avere influenzato anche la capacità del software di calcolare i parametri perfusionali.. Questo cambiamento è stato tuttavia indispensabile, dettato dalla necessità di implementare un protocollo che fosse diagnostico ma che desse allo stesso tempo anche la minor dose possibile di radiazioni al paziente secondo il principio di ALARA (As Low As Reasonably Achievable) e seguendo i principi di giustificazione, limitazione e ottimizzazione. Si è pertanto passati da protocolli con CTDI (Computed Tomography Dose Index) medio di  $124.38 \pm 46.86$  mGy con DLP (Dose Length Product, CTDIvol per la lunghezza della scansione) medio di  $2271.29 \pm 905.04$  mGy/cm del 2009, a protocolli con CTDI medio di  $73.53 \pm 52.48$  mGy con DLP medio di  $1517.32 \pm 90.22$  mGy/cm del 2010 a protocolli con CTDI medio di  $64.46 \pm 1.87$  mGy con DLP medio di  $1330 \pm 38.59$  mGy/cm del 2011, per stabilirci attualmente su un protocollo con CTDI di 63.58 mGy.

Ancora altra limitazione deve essere considerata la variazione del timing di esecuzione della TC perfusionale al T1 prima eseguita dopo 1 mese dall'inizio della terapia poi dopo 14 giorni. Anche questo cambiamento è stato dettato dalla evidenza nuova in letteratura della maggiore capacità di cogliere l'effetto della terapia antiangiogenica nel breve periodo per la perdita della finestra di normalizzazione a lungo termine. Ovviamente la variazione seppure necessaria potrebbe avere influenzato le successive analisi di confronto tra parametri perfusionali.

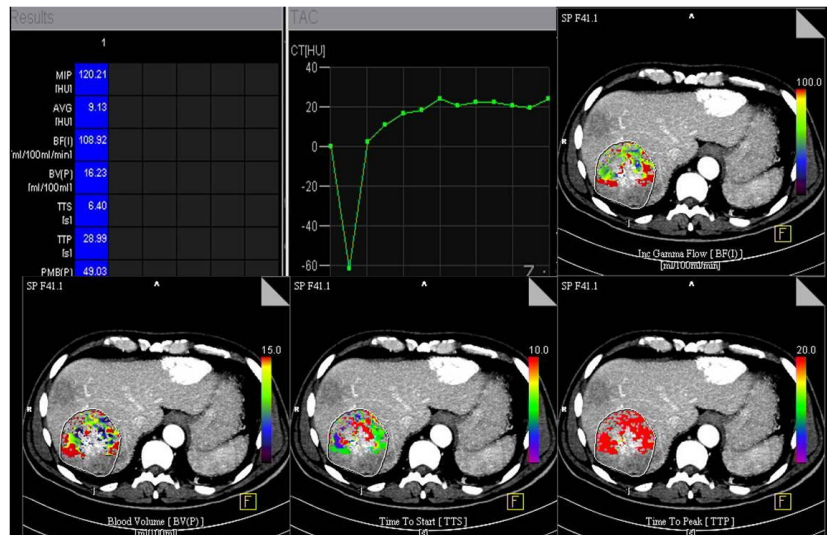
Pertanto pur con tutte le limitazioni suddette i nostri risultati appaiono in accordo con i pochi dati presenti in letteratura in materia di TC perfusionale e promettenti per quanto riguarda sia la

capacità di monitorare la risposta alla terapia antiangiogenica sia di predirne il risultato.

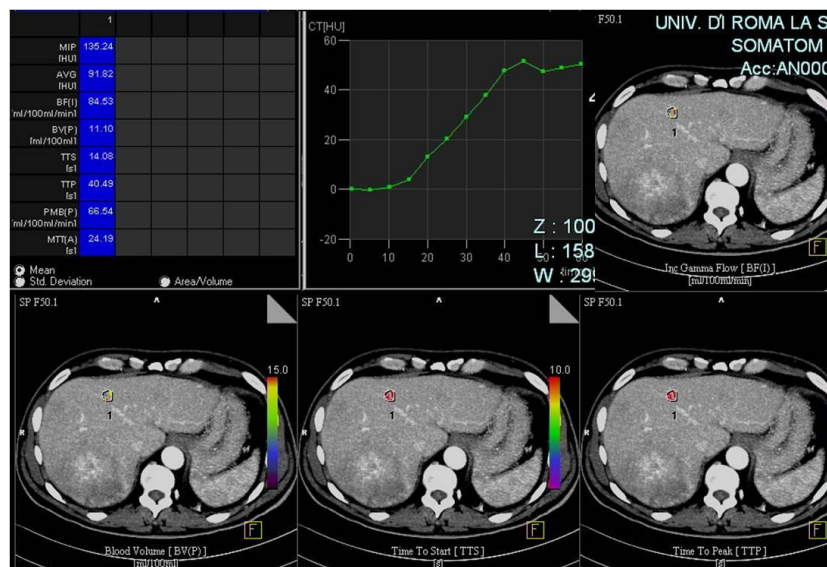
Pertanto in casi selezionati di pazienti per i quali viene disposta una strategia chemioterapica antiangiogenica la TC perfusionale appare uno strumento importante e potenzialmente utile per la valutazione della vascolarizzazione e della neoangiogenesi delle metastasi epatiche ed è applicabile per la valutazione precoce della risposta alla terapia antiangiogenica.

## ESEMPI CLINICI:

CASO 1. Confronto tra parametri perfusionali nella lesione e nel parenchima sano



Nella lesione target si evidenzia: BF 108.92, BV 16.20, TTP 28.99, PMB 49.03

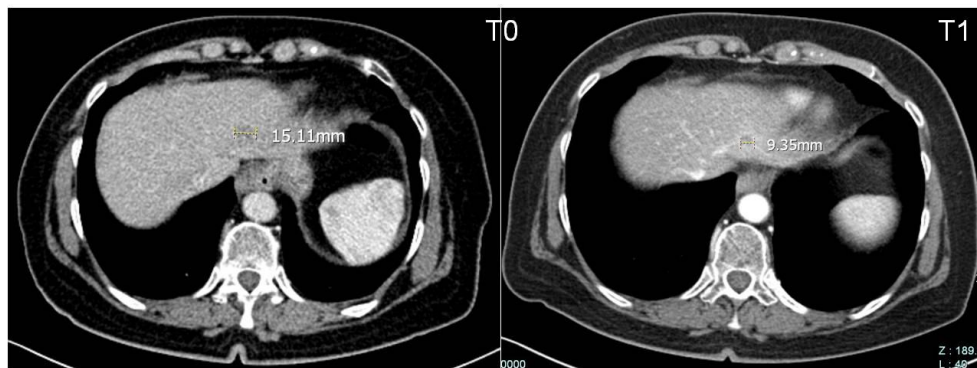


Nel parenchima sano si evidenzia: BF 84.5, BV 11.1, TTP 40.5, PMB 66.5

Come si vede in questo caso la lesione mostra BF, BV più elevati, TTP e PMB più bassi rispetto al parenchima sano circostante.

## CASO 2. Risposta Completa alla terapia a T2.

### RECIST

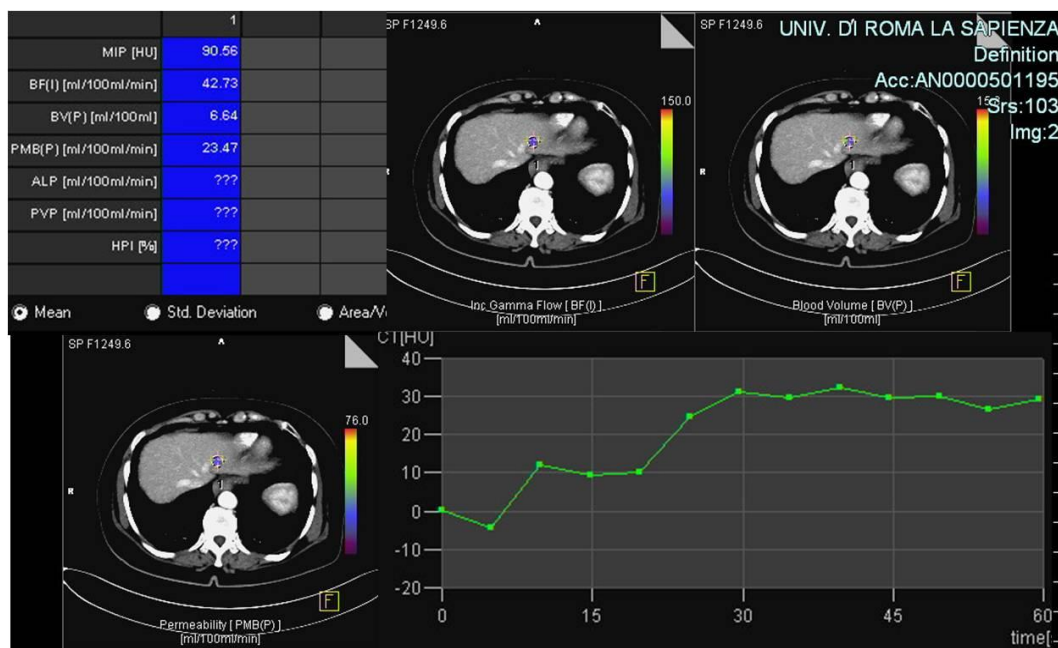


RECIST T0 = 15.1 mm  
 CA19.9 = 161  
 CEA = 22

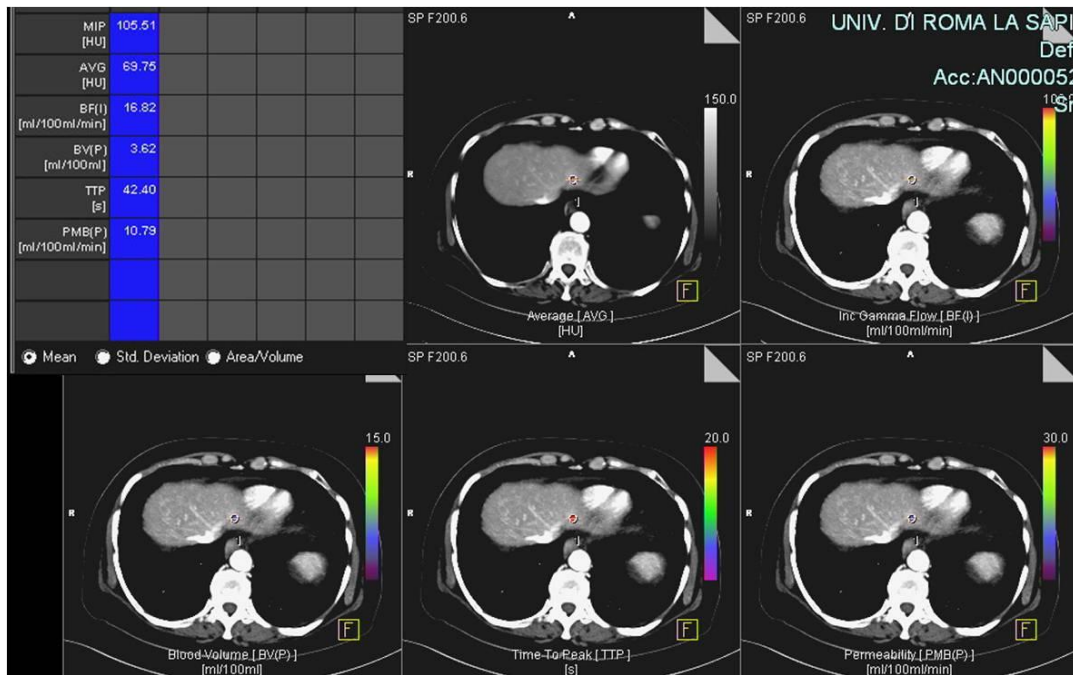
RECIST T1 = 9.3 mm  
 CA19.9 = 87.9  
 CEA = 16

RECIST T2 = 0 mm  
 CA19.9 = 35.56  
 CEA = 5.36

### BASELINE



## TEMPO 1

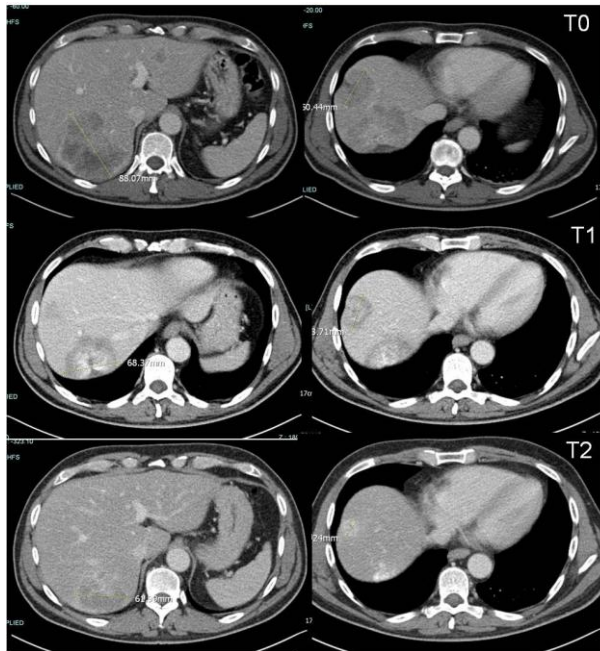


PARAMETRI	BASELINE	TEMPO 1	TEMPO 2
<b>PERFUSIONE</b>			
BF	42.73	16.82	-
BV	6.64	3.62	-
TTP	0.1	42.4	-
PMB	23.47	10.79	-

In questo caso con risposta completa al T2, vediamo che già al T1 il BF, BV e la PMB sono ridotte mentre la TTP è aumentata rispetto ai valori di partenza a T0, a fronte di un decremento del diametro massimo globale della lesione che secondo i criteri RECIST definisce una risposta parziale a T1 e una riduzione sia del Ca19.9 che del CEA.

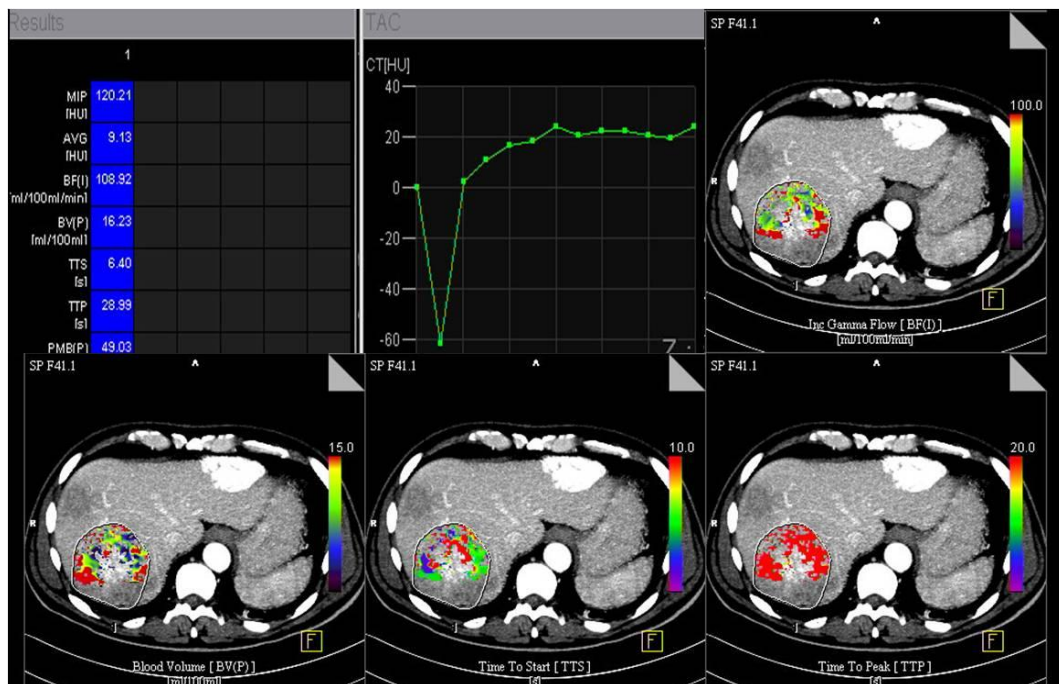
CASO 3 – Risposta parziale alla terapia a T2.

RECIST



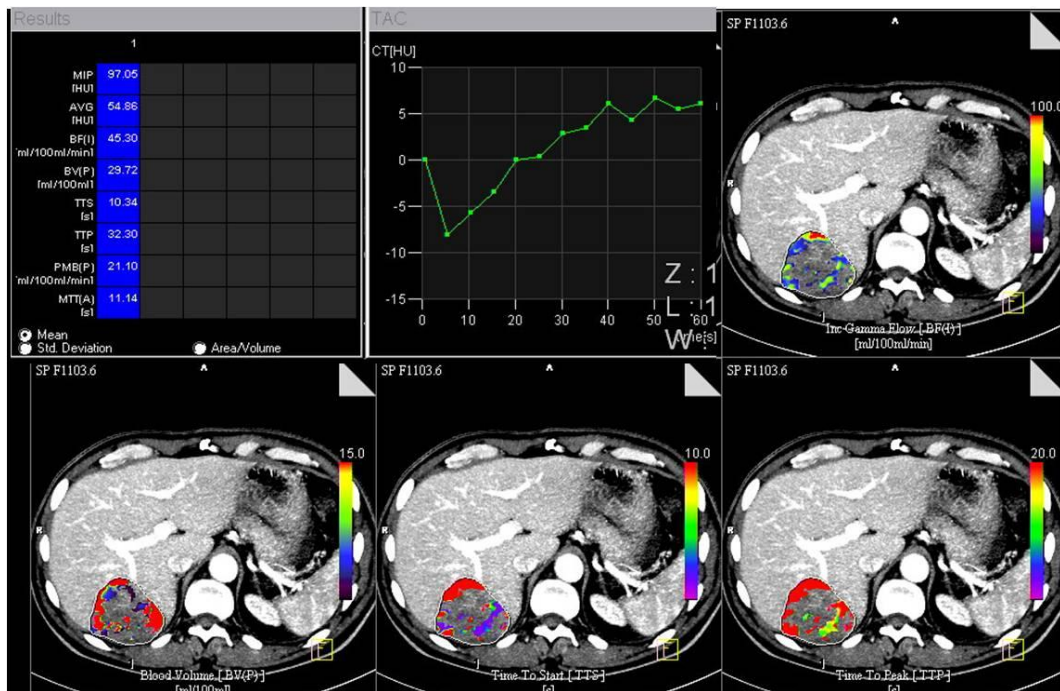
RECIST T0 = 135.5 mm
CA19.9 = 260
CEA= 512
RECIST T1 = 112.1 mm
CA19.9 = 87
CEA= 50
RECIST T2 = 83.2 mm
CA19.9 = 50
CEA= 20

BASELINE

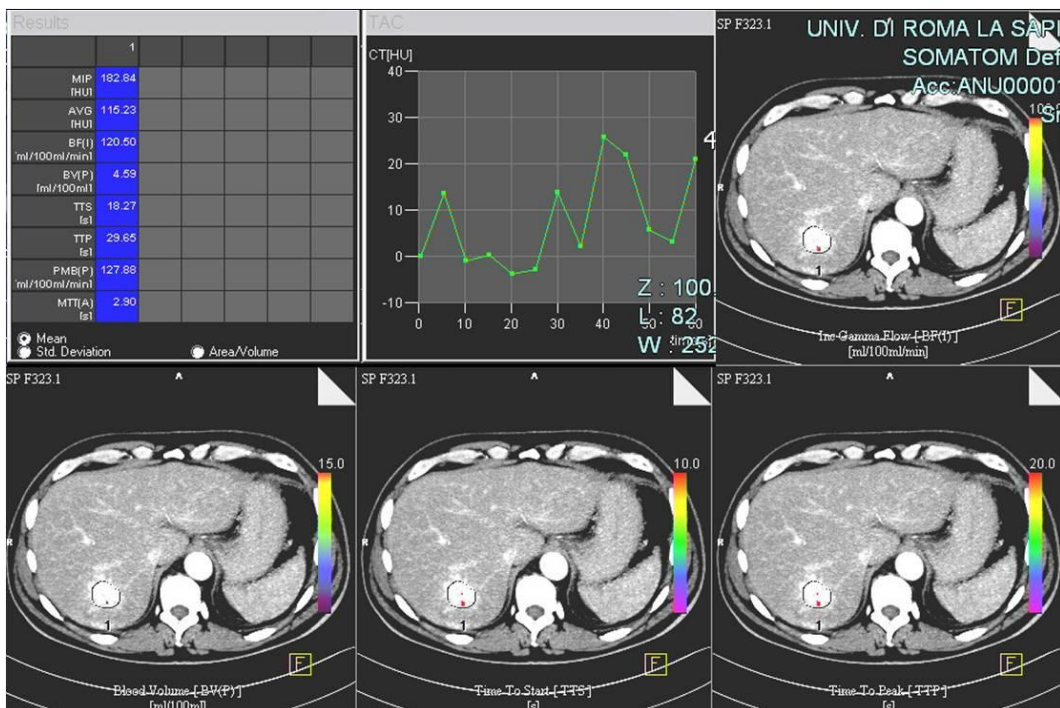




## TEMPO 1



## TEMPO 2





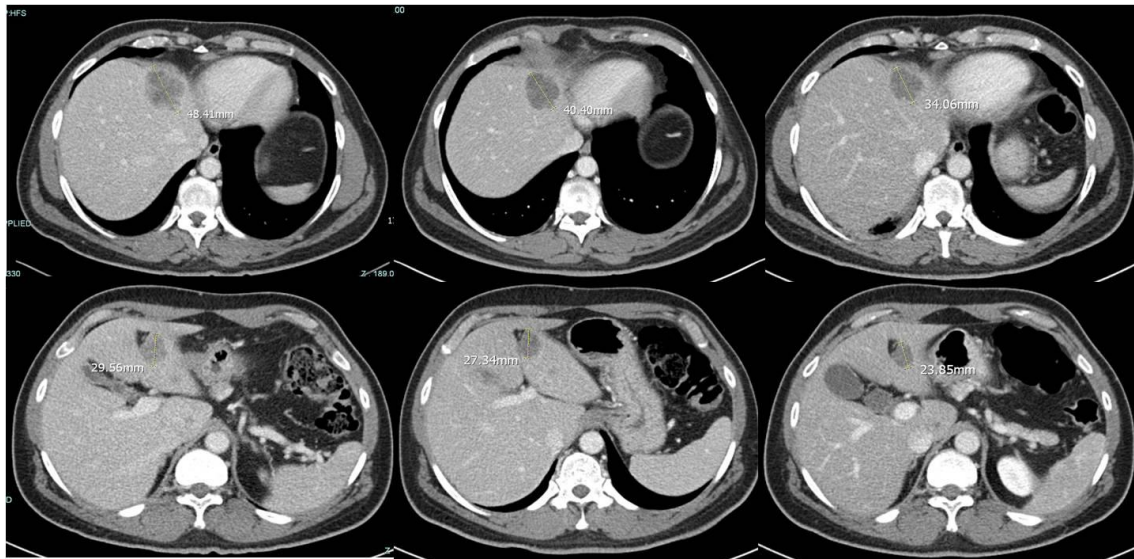
<b>PARAMETRI PERFUSIONE</b>	<b>BASELINE</b>	<b>TEMPO 1</b>	<b>TEMPO 2</b>
BF	108,92	45,30	120,5
BV	16,2	29,72	4,6
TTP	28,99	32,30	29,65
PMB	49,03	21,10	127,88

In questo caso con risposta parziale al T2 secondo i criteri RECIST modificati, vediamo che già al T1 il BF e la PMB sono ridotte mentre la TTP è aumentata rispetto ai valori di partenza a T0, a fronte di un decremento del diametro massimo globale della lesione che secondo i criteri RECIST definisce una malattia stabile a T1 e una riduzione sia del Ca19.9 che del CEA.

Come si vede invece a T2 si ha un incremento di BF e PMB oltre che di TTP rispetto a T0 con una riduzione del volume sanguigno, a fronte di un decremento del diametro massimo globale della lesione che secondo i criteri RECIST definisce una risposta parziale a T2 e una riduzione sia del Ca19.9 che del CEA.

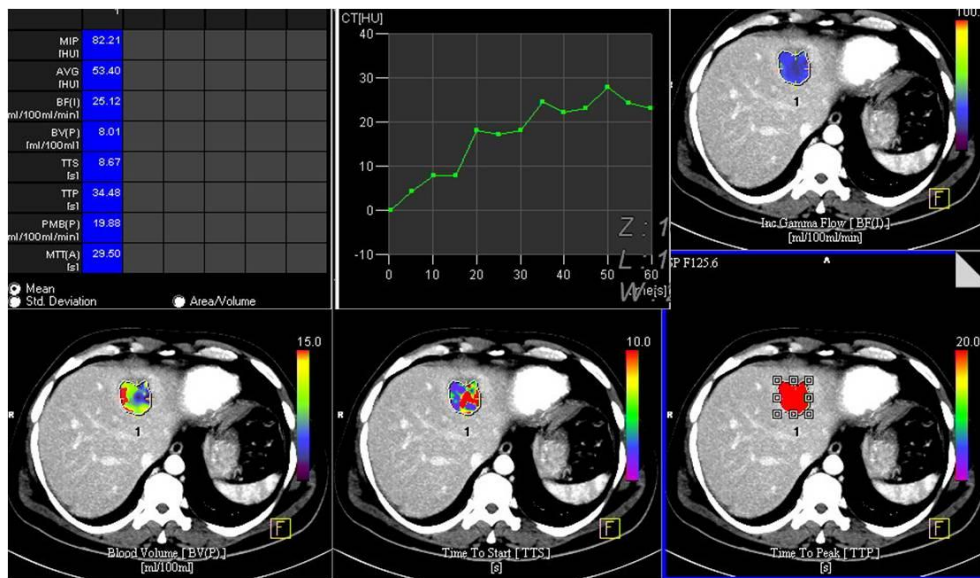
CASO 4 – Malattia stabile

RECIST

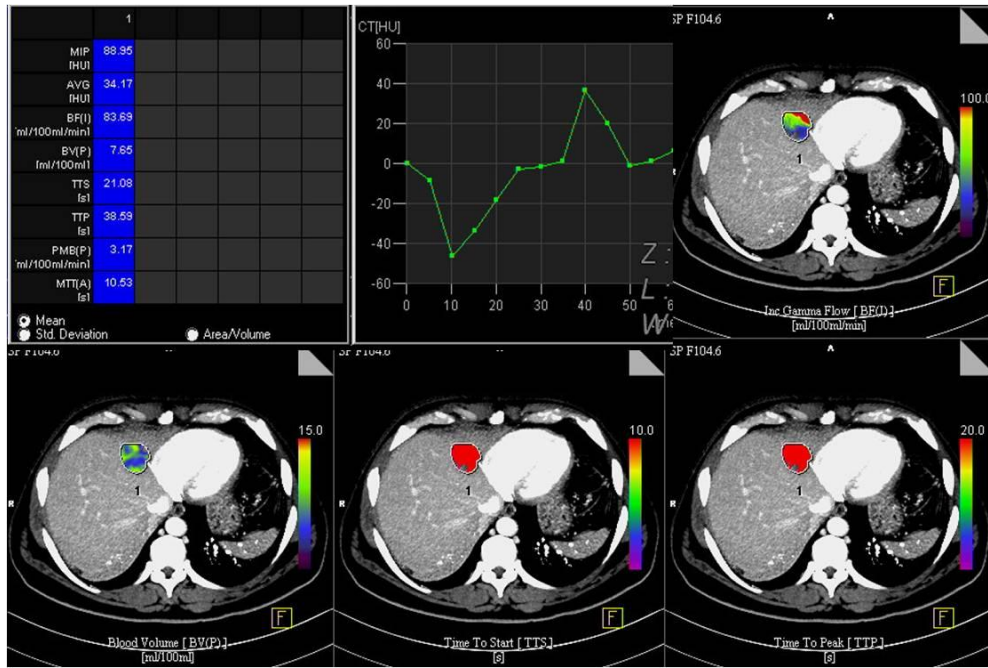


RECIST T0 = 78 mm	RECIST T1 = 67.3 mm	RECIST T2 = 57.9 mm
CA19.9 = 0.80	CA19.9 = 40	CA19.9 = 50
CEA = 1800	CEA = 1800	CEA = 1800

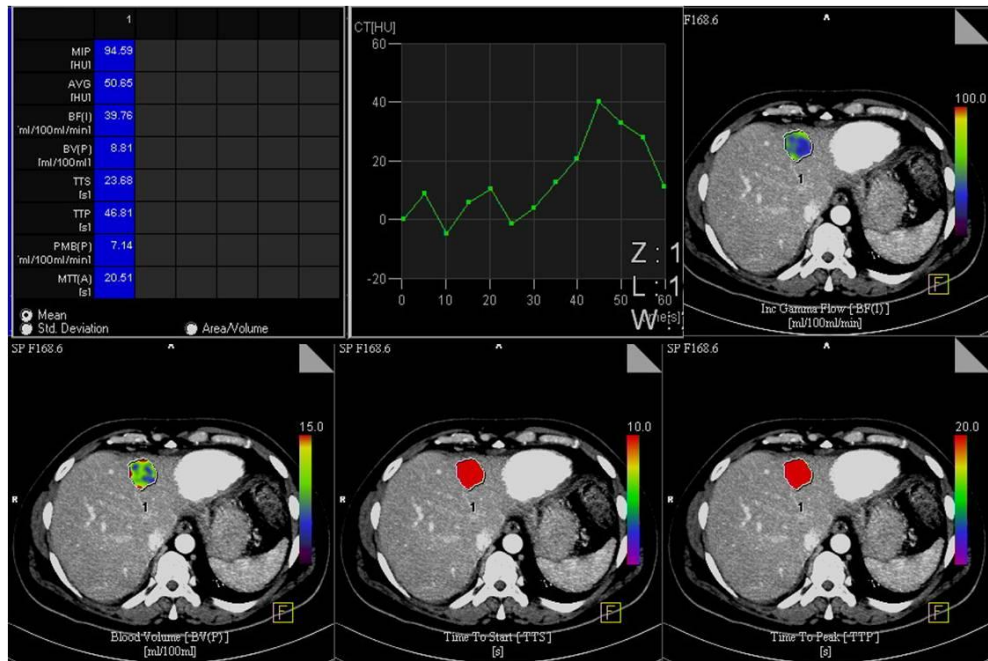
BASELINE



# TEMPO 1



# TEMPO 2



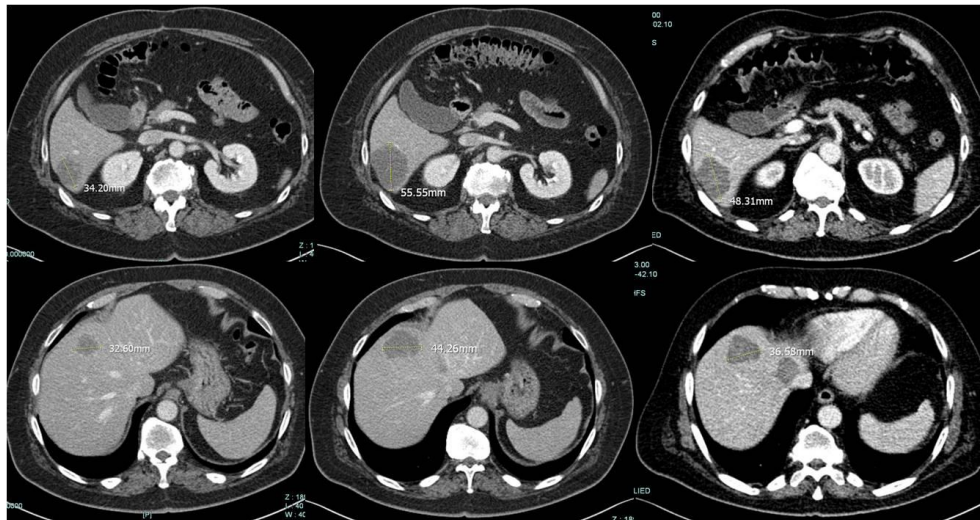
<b>PARAMETRI PERFUSIONE</b>	<b>BASELINE</b>	<b>TEMPO 1</b>	<b>TEMPO 2</b>
BF	25,12	83,7	39,76
BV	8,01	7,65	8,81
TTP	34,48	38,69	46,81
PMB	19,88	3,17	7,14

In questo caso con malattia stabile al T2 come classificato con i criteri RECIST modificati, vediamo che al T1 il BF e la TTP aumentano, mentre il BV e la PMB sono ridotti rispetto ai valori di partenza a T0, a fronte di un decremento del diametro massimo globale della lesione che secondo i criteri RECIST definisce una malattia stabile a T1, un incremento del Ca19.9 e una stabilità del CEA.

Come si vede invece a T2 si ha un incremento di BF, BV e TTP ed una riduzione di PMB rispetto a T0, a fronte di un decremento del diametro massimo globale della lesione che secondo i criteri RECIST definisce una malattia stabile a T2, un incremento del Ca19.9 e una stabilità del CEA.

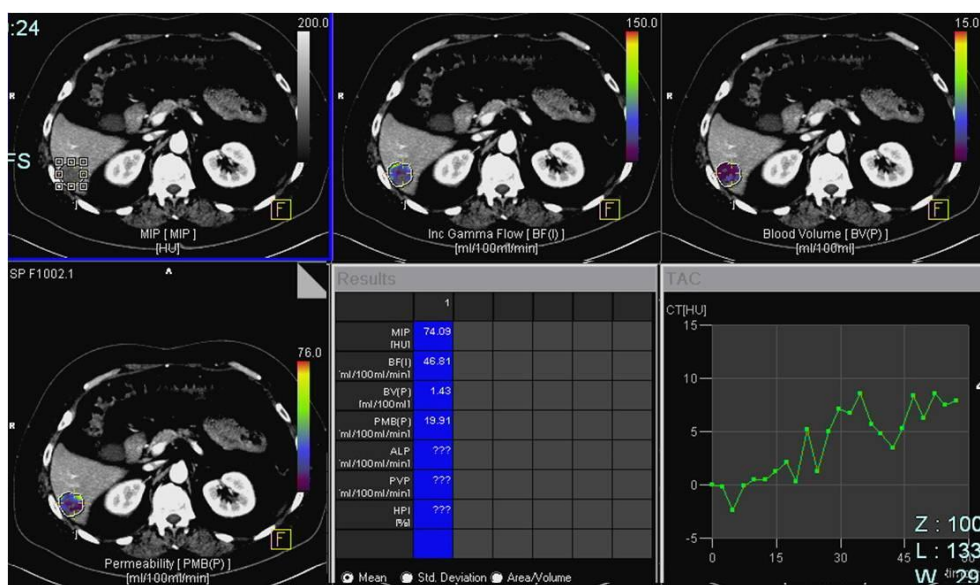
## CASO 5 – Progressione di Malattia

### RECIST



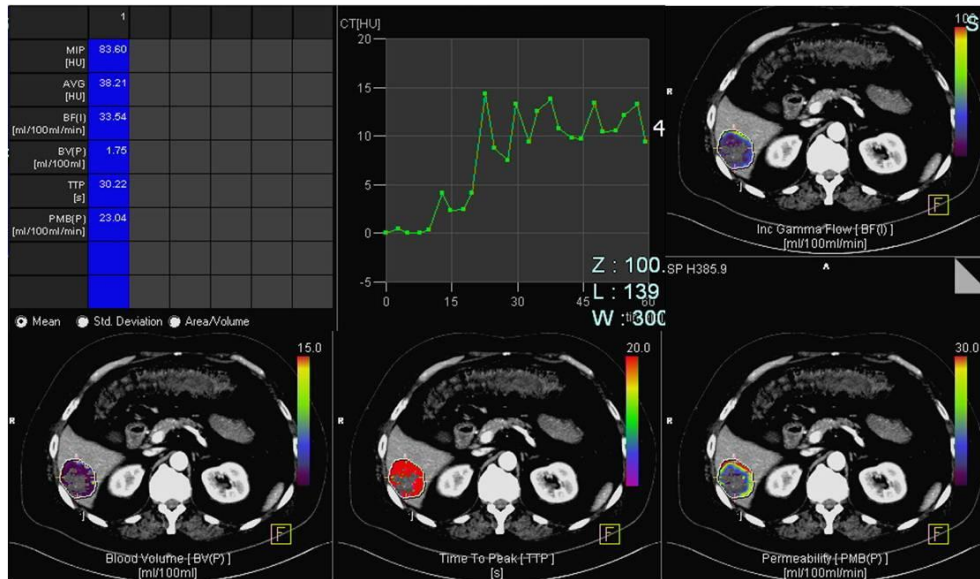
RECIST T0 = 66.8 mm	RECIST T1 = 99.8 mm*	RECIST T2 = 84.9 mm*
CA19.9 = 7.2	CA19.9 = 12	CA19.9 = 2.5
CEA = 123	CEA = 229	CEA = 56.9

### BASELINE

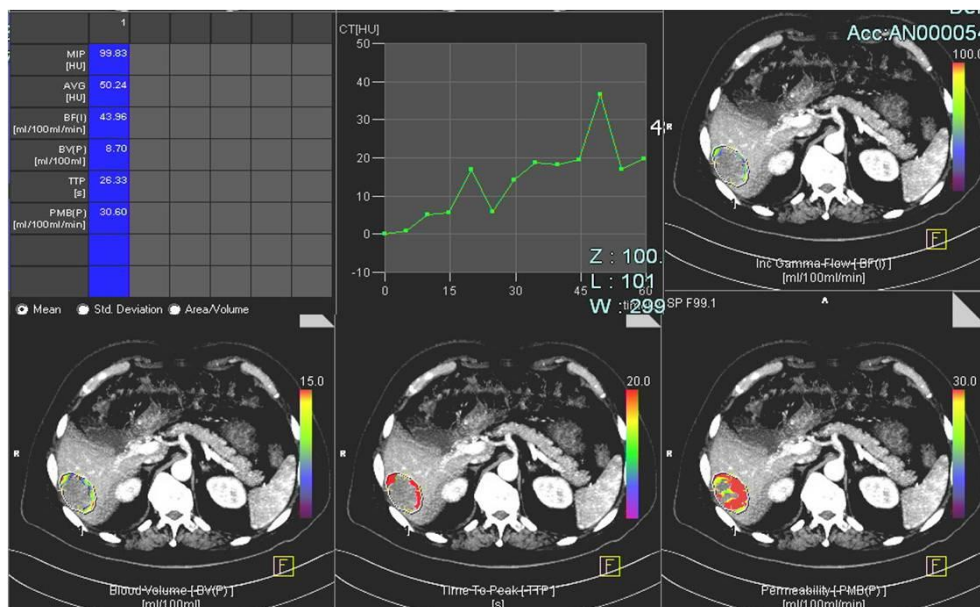




## TEMPO 1



## TEMPO 2



<b>PARAMETRI PERFUSIONE</b>	<b>BASELINE</b>	<b>TEMPO 1</b>	<b>TEMPO 2</b>
BF	46,81	33,54	43,96
BV	1,43	1,75	8,70
TTP	0,1	30,22	26,33
PMB	19,9	23,64	30,60

In questo caso con progressione di malattia al T2 come classificato con i criteri RECIST modificati, vediamo che al T1 il BV, la PMB e il TTP aumentano, mentre il BF è ridotto rispetto ai valori di partenza a T0, a fronte di un incremento del diametro massimo globale delle lesioni e la comparsa di nuove lesioni che secondo i criteri RECIST definiscono una progressione di malattia a T1, una riduzione del Ca19.9 e un incremento del CEA.

Come si vede invece a T2 si ha un decremento di BF ed un incremento degli altri parametri BV, TTP e PMB rispetto a T0, ma un incremento di BF e una riduzione di TTP rispetto a T1, a fronte di un incremento del diametro massimo globale delle lesioni e comparsa di altre nuove lesioni che secondo i criteri RECIST definiscono unaprogessione di malattia a T2, una riduzione del Ca19.9 e un incremento del CEA.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Paschos KA, Bird N. Current diagnostic and therapeutic approaches for colorectal cancer liver metastasis. *Hippokratia*. 2008; 12: 132-138
2. Welch S, Spithoff K, Rumble RB, et al. Gastrointestinal Cancer Disease Site Group. Bevacizumab combined with chemotherapy for patients with advanced colorectal cancer: a systematic review. *Ann Oncol*. 2010; 21: 1152-1162
3. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228-47.
4. Therasse P, Eisenhauer EA, Verweij J. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur J Cancer*. 2006 May;42(8):1031-9.
5. Gehan EA, Tefft MC. Will there be resistance to the RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)? *J Natl Cancer Inst*. 2000 Feb 2;92(3):179-81.
6. Charnley N, Donaldson S, Price P. Imaging angiogenesis. *Methods Mol Biol*. 2009;467:25-51.
7. Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jun 19;94(12):883-93.
8. Le Bihan D. Intravoxel incoherent motion perfusion MR imaging: a wake-up call. *Radiology*. 2008 Dec;249(3):748-52.



9. Cuenod CA, Fournier L, Balvay D, Guinebretière JM. Tumor angiogenesis: pathophysiology and implications for contrast-enhanced MRI and CT assessment. *Abdom Imaging*. 2006 Mar-Apr;31(2):188-93.
10. Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, Griffiths JR, Horsman MR, Jackson A, Jayson GC, Judson IR, Knopp MV, Maxwell RJ, McIntyre D, Padhani AR, Price P, Rathbone R, Rustin GJ, Tofts PS, Tozer GM, Vennart W, Waterton JC, Williams SR, Workman P; Pharmacodynamic/Pharmacokinetic Technologies Advisory Committee, Drug Development Office, Cancer Research UK. The assessment of antiangiogenic and antivascular therapies in early-stage clinical trials using magnetic resonance imaging: issues and recommendations. *Br J Cancer*. 2005 May 9;92(9):1599-610.
11. Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, Griffiths JR, Horsman MR, Jackson A, Jayson G, Judson IR, Knopp MV, Maxwell RJ, McIntyre D, Padhani AR, Price P, Rathbone R, Rustin G, Tofts PS, Tozer GM, Vennart W, Waterton JC, Williams SR, Workman P. Assessment of antiangiogenic and antivascular therapeutics using MRI: recommendations for appropriate methodology for clinical trials. *Br J Radiol*. 2003;76 Spec No 1:S87-91.
12. Pandharipande PV, Krinsky GA, Rusinek H, Lee VS. Perfusion imaging of the liver: current challenges and future goals. *Radiology*. 2005 Mar;234(3):661-73.
13. Lee TY, Purdie TG, Stewart E (2003) CT imaging of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47:171–187
14. Folkman J. Tumor angiogenesis: role in regulation of tumor growth. *Symp Soc Dev Biol*. 1974;30(0):43-52.
15. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.

16. Cao Y, Langer R. A review of Judah Folkman's remarkable achievements in biomedicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13203-5. Epub 2008 Sep 4.
17. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*. 1992 Apr;3(2):65-71.
18. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43:175-203.
19. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*. 2006;57:1-18.
20. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Apr;6(4):273-86.
21. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*. 2006 Mar 10;312(5):594-607. Epub 2005 Dec 22.
22. Folkman J. Angiogenesis inhibitors: a new class of drugs. *Cancer Biol Ther*. 2003 Jul-Aug;2(4 Suppl 1):S127-33.
23. Pourgholami MH, Morris DL. Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008 Oct;6(4):343-7.
24. Mross K. Inhibition of the VEGF receptor system with tyrosine kinase inhibitors. *Angiogenesis inhibition in oncology. Pharm Unserer Zeit*. 2008;37(5):404-15.
25. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):579-91. Epub 2008 Jul 3.
26. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther*. 2006 Nov;28(11):1779-802.
27. Jiang HJ, Zhang ZR, Shen BZ, Wan Y, Guo H, Li JP. Quantification of angiogenesis by CT perfusion imaging in liver tumor of rabbit. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009 Apr;8(2):168-73.

28. Lemmens L, Claes V, Uzzell M. Managing patients with metastatic colorectal cancer on bevacizumab. *Br J Nurs*. 2008 Aug 14-Sep 10;17(15):944-9.
29. Zondor SD, Medina PJ. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Ann Pharmacother*. 2004 Jul-Aug;38(7-8):1258-64.
30. de Gramont A, Van Cutsem E. Investigating the potential of bevacizumab in other indications: metastatic renal cell, non-small cell lung, pancreatic and breast cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:46-56.
31. Sachdev JC, Jahanzeb M. Evolution of bevacizumab-based therapy in the management of breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2008 Oct;8(5):402-10.
32. Chowdhury S, Larkin JM, Gore ME. Recent advances in the treatment of renal cell carcinoma and the role of targeted therapies. *Eur J Cancer*. 2008 Oct;44(15):2152-61.
33. Amir E, Hughes S, Blackhall F, Thatcher N, Ostoros G, Timar J, Tovari J, Kovacs G, Dome B. Targeting blood vessels for the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Aug;8(5):392-403.
34. Sabir A, Schor-Bardach R, Wilcox CJ, Rahmanuddin S, Atkins MB, Kruskal JB, Signoretti S, Raptopoulos VD, Goldberg SN. Perfusion MDCT enables early detection of therapeutic response to antiangiogenic therapy. *AJR Am J Roentgenol*. 2008 Jul;191(1):133-9.
35. Anzidei M, Napoli A, Zaccagna F, et al. Liver metastases from colorectal cancer treated with conventional and antiangiogenic chemotherapy: evaluation with liver computed tomography perfusion and magnetic resonance diffusion-weighted imaging. *J Comput Assist Tomogr*. 2011; 35: 690-696.
36. Goh V, Padhani AR. Imaging tumor angiogenesis: functional assessment using MDCT or MRI?. *Abdom Imaging*. 2006; 31: 194-199.

37. Goh V, Halligan S, Hugill JA, et al. Quantitative assessment of tissue perfusion using MDCT: comparison of colorectal cancer and skeletal muscle measurement reproducibility. *AJR Am J Roentgenol.* 2006; 187: 164-169.
38. Lupescu IG, Grasu M, Capsa R, Pitrop A, Georgescu SA. Hepatic perfusion disorders: Computer-tomographic and magnetic resonance imaging. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2006 Sep;15(3):273-9.
39. Zhong L, Wang WJ, Xu JR. Clinical application of hepatic CT perfusion. *World J Gastroenterol.* 2009 Feb 28;15(8):907-11.
40. Jiang HJ, Zhang ZR, Shen BZ, Wan Y, Guo H, Shu SJ. Functional CT for assessment of early vascular physiology in liver tumors. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2008 Oct;7(5):497-502.
41. Ganeshan B, Miles KA, Young RC, Chatwin CR. Hepatic enhancement in colorectal cancer: texture analysis correlates with hepatic hemodynamics and patient survival. *Acad Radiol.* 2007 Dec;14(12):1520-30.
42. Folkman J, Beckner K. Angiogenesis imaging. *Acad Radiol.* 2000 Oct;7(10):783-5.
43. O'Connor JP, Jackson A, Parker GJ, Jayson GC. DCE-MRI biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents. *Br J Cancer.* 2007 Jan 29;96(2):189-95.
44. Donald M McDonald, Peter L Choyke. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature Medicine* 2003; 9: 713-725