



Doctoral Thesis

Multimodality approach to study the fractal physiology of tumor angiogenesis

Author(s):

Dominietto, Marco D.

Publication Date:

2011

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-007133206> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETHZ. N° 19881

MULTIMODALITY APPROACH TO STUDY
THE FRACTAL PHYSIOLOGY OF TUMOR
ANGIOGENESIS

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

presented by
Marco Diego DOMINIETTO
M. Sc. - University of Torino
born March 2, 1975
citizen of Italy

accepted on the recommendation of
Prof. Markus Rudin
Prof. Bert Müller

Zurich - 2011

Summary

Angiogenesis is one fundamental element of tumor progression, since it is the process through which tumor develops its own vessel network and uses it to recruit nutrients from the host tissue. It is composed of several sub-processes that happen at different scales. Different mechanisms work first at a molecular and cellular level to promote the formation of the smaller capillaries, then others enables the maturation of the vessels and the organizations in a network structure. The link with the vascular network of the host tissue and the delivery of blood and nutrients complete the process. But, because the physiological effects acts as feedback, usually positive, at a molecular level, angiogenesis can be consider as a never-ending process.

A multimodality approach has been chosen to study the different process at a different scale: magnetic resonance imaging to study the vascular architecture and physiology non-invasively, positron emission tomography to analyze the molecular processes involving glucose and oxygen. In addition to these in-vivo approaches, ex-vivo technique as synchrotron radiation-based μ computer tomography is needed to visualize vessel at a capillary level as well as immuno-histochemistry to study the physiological process at cellular level.

The aim of this thesis was to apply the concept of fractal physiology together with a multi-modality image approach to study the tumor angiogenesis in mouse model.

The project has been structures in two parts: in the first part, the experimental setup together with the protocols for different image modalities was developed: magnetic resonance imaging MRI, synchrotron radiation based micro-computer tomography SR μ CT, positron emission tomography PET and immune histochemistry IHC.

The second part focused on developing a framework to perform the analysis of the acquired images which takes into account the fractal physiology concepts.

After testing different lines of tumor cells either *in-vitro* or *in-vivo*, C51-

colon cancer cell line was chosen and used in all experiments that were performed with balb/c nude mice. After the s.c. inoculation (day 0), experiments were carried out at day 6, 8, 10 and 12 to follow the evolution of angiogenesis. The following physiological parameters were measured *in-vivo*: hypoxia and glucose metabolism (PET); tumor haemodynamic, vessel permeability, vessel size index and anatomy (MRI). At the last stage of the tumor, day 12, tumor were explanted and prepared for the *ex-vivo* measurements: angiography (SR μ CT); endothelial cells distribution and perfusion (IHC). Because of the repeated measurements in a short period of time, it was impossible to put animal under anaesthesia for more than 3 hours, including animal preparation, for each experiments. Due to this limitations, five different protocols had been implemented to combine the different image techniques.

Data have been analysed using either pattern analysis and histogram analysis techniques by means of *in-house* developed code in C++ and Matlab languages.

The result section is organized in four parts that corresponds to the four levels of the tumor hierarchy: molecular level, vascular network structure, physiological effects and interface with the host tissue.

a) Molecular level: tumor hypoxia and glucose metabolism have been studied by means F-MISO-PET and FDG-PET respectively. In all subjects, tumor were found to be hypoxic. At day 6, a great portion of tumor was hypoxic while, during tumor growth, we observed an heterogeneous distribution of the radiotracer with the formation of hypoxic and non-hypoxic regions that coexist together.

Similarly, FDG study showed a more homogeneous glucose distribution at day 6 compared to day 12. Because the presence of glucose is an indicator of cellular activity, it is reasonable suppose that, during tumor growth, only few parts of the tumor remains metabolically active because of the formation of the vascular network.

In-vivo findings were confirmed by the IHC experiments, analyzing the relative distribution of endothelial cells, perfused cells and hypoxic cells. Metabolically active tumor cells were observed in regions with endothelial cells but not in hypoxic regions.

b) Vessel network architecture has been investigated by means of SR μ CT. Two different acquisition modes had been used: absorption contrast and phase contrast. The acquired 3D data set clearly showed a chaotic structure of the tumor vessel. Fractal analysis yielded a Fractal Dimension

FD of 2.78 ± 0.03 (N=6) versus 2.23 ± 0.02 measured in brain sample. The smaller FD means a more simple and organized geometrical structure, which is a property of the healthy organs. On the contrary, higher value of FD are synonymous of complex system, and in case of tumor not hierarchical structure.

The absence of hierarchy in the organization of tumor vessel is also proved by the Vessel Size Index VSI readouts, measured by MRI. VSI, defined as the average vessel diameter on the vessels in the voxel, allows to measure the distribution of the vessel diameters distribution during tumor growth. Longitudinal measurements showed very similar distribution with a prevalency of capillaries (5-20 μm). The number of such capillaries appreciably increases with the tumor growth, which means the formation of new angiogenic capillaries. Despite the increase of the capillaries, a reduced number of arterioles or venules (20-100 μm) are formed by angiogenic process. Bigger vessel as arteries or veins (100-200 μm) are not present in any stage of the tumor growth. This lack of organization of tumor vessels is an explanation of the heterogeneous growth of tumor tissue. A non uniform delivery of blood, and consequently of oxygen and glucose, means a non uniform availability of nutrients. Only regions perfused by blood have the possibility to replicate cells and therefore to growth. Other regions can remain in a dormant state, develop angiogenesis or become necrotic according to the environmental conditions.

c) Physiological effects. Such anatomical features have important implications on the tumor physiology: first, tumor haemodynamic will be determined by the vascular anatomy. The measurement of Tumor Blood Volume TBV by means of MRI showed an heterogeneous distribution of these parameters. High values of TBV in different regions of the tumor during its growth, indicate the formation of new vessel and therefore that the angiogenic process is taking place. To better quantify the heterogeneity, FD has been computed over the TBV maps. Longitudinal results indicates change in the FD values which, from a physiological point of view, means a change in the TBV distribution and therefore a change in the structure of the vessel network.

Second, the functionality of the vessels has been evaluated measuring their permeability by means of MRI. It defines the velocity and quantity of the blood that extravasates through the capillaries. Also in this case, different regions with different permeability values has been detected. The spatial quantification of the extravasated maps has been done evaluating of lacunarity which describes the gap between the distribution of the extravasated volume patterns, the higher the lacunarity, the higher the variability of its gaps and therefore the higher the heterogeneity of blood distribution. We

observed oscillating trend that we interpreted as a continuous rearrangement of the vascular network during angiogenic process. Such re-arrangement, together with the continuous formation of capillaries prevents their maturation to bigger vessels to form a functional network.

A consequence of this abnormal anatomy is that the delivery of the therapeutic drugs is not efficient, therefore non vascularized regions of the tumor will not receive the appropriated amount of drugs. Recent treatment strategies propose, first, to stabilize the vessel network by a pro-angiogenic drug and then to administer the tumor-toxic drug. We therefore evaluated the effects of a pro-angiogenic treatment on the stabilization/maturation of tumor vasculature. Animals were treated with DMOG, which leads to an activation of hypoxia signalling and hence can be considered pro-angiogenic. Analyzing TBV maps no difference has been observed using conventional analysis methods as histogram analysis; however significant differences have been observed by using shape and texture quantifications. This results indicate that tumor heterogeneity needs to be accounted for the evaluation of therapy response.

Angiogenesis leads to the formation of a chaotic tumor vascular architecture with important physiological consequences. Longitudinal studies demonstrates that tumor does not growth in a homeostatic behaviour, but rather in a dynamic continuous rearrangements.

Tumor treatment, and anti-angiogenic treatments in particular, are directly influenced by the angiogenic properties. The leakiness of the vessels and its chaotic structure does not allow a uniform drug distribution. In this regards, measurements of spatial distribution, as fractal dimension and lacunarity, allow to quantify the homogeneity or heterogeneity of the drug delivery. This allows either to guess about the success of the treatment or to monitor individually its efficacy.

One of the of the great advantages of this *research framework* is the immediate possibility to implement it into existing clinic environment at a relatively low cost. MRI and PET are established techniques used daily in the hospitals as well as the histological examinations performed after tumor surgery. The implementation of pattern analysis to evaluate shapes and texture of tumor images is a straightforward process based on software tools which can be easily added to other on computer analyses constantly already performed in hospital medical imaging.

Last but not the least, this work is an example that research in oncology could profit extensively from the interaction, and the sharing of the knowledge of experts from different and complementary fields, working for a common task.

Sommario

L'angiogenesi, cioè la formazione di nuovi vasi sanguigni, è un passo fondamentale nello sviluppo tumorale. Mediante tali vasi, infatti, il tessuto tumorale è in grado di reperire i nutrienti necessari alla sua crescita dai tessuti limitrofi.

Il processo di angiogenesi è composto da molteplici processi secondari che hanno luogo a diversi livelli: alcuni meccanismi promuovono la formazione di piccoli capillari a livello molecolare e cellulare, successivamente altri ne permettono la maturazione e l'organizzazione. Il passo finale è costituito dall'unione tra questa rete vascolare e quella dei tessuti limitrofi permettendo al tumore di assorbire nutrienti dal tessuto che li ospita. L'interazione tra i due sistemi vascolari genera tuttavia dei feedback, solitamente positivi, a livello molecolare influenzandone i processi che hanno originato i capillari e rendendo l'angiogenesi tumorale un processo senza fine.

In questo lavoro, è stato scelto un approccio multimodale per studiare i processi a differenti livelli: mediante risonanza magnetica (MRI) si sono investigate le proprietà della struttura vascolare, con tomografia ad emissione di positroni (PET) si sono analizzati i processi molecolari legati al metabolismo dell'ossigeno e del glucosio. In aggiunta a queste tecniche in-vivo, altre metodiche ex-vivo con maggiore risoluzione spaziale come la tomografia computerizzata basata sulla radiazione di sincrotrone (SR μ CT) ed esami istologici (IHC) condotti al microscopio fluorescente sono stati necessari per la visualizzazione dei singoli capillari e per lo studio dei processi a livello cellulare.

Lo scopo di questa tesi è lo studio dell'angiogenesi tumorale in modelli animali mediante l'uso di un approccio multi-modale e l'applicazione dei concetti della fisiologia frattale.

Il progetto è stato strutturato in due parti. Nella prima parte è stato sviluppato il setup sperimentale e i vari protocolli per le diverse metodiche utilizzate: risonanza magnetica, tomografia computerizzata basata sulla radi-

azione di sincrotrone, tomografia ad emissione di positrone e esami istologici. La seconda parte è invece stata focalizzata sullo sviluppo di un framework che implementasse i concetti della fisiologia frattale per l'analisi dei dati acquisiti.

In seguito a test in-vitro e in-vivo di differenti linee cellulari, la linea C51 corrispondente al carcinoma del colon è stata scelta ed usata in tutti gli esperimenti in combinazione con topi nudi di tipo balb/c. Le cellule tumorali sono state iniettate sotto cute all'inizio di ogni esperimento (giorno 0) e le misure sono state eseguite nei giorni 6, 8, 10 e 12 per seguire l'evoluzione dell'angiogenesi. I seguenti parametri fisiologici sono stati misurati in-vivo: ipossia e distribuzione del glucosio (PET), emodinamica del tessuto tumorale, permeabilità dei vasi, indice di dimensione vascolare e struttura anatomica (MRI). Al giorno 12, corrispondente all'ultimo stadio dello sviluppo tumorale, i tumori sono stati espianati e preparati per gli esperimenti ex-vivo: SR μ CT per la visualizzazione della rete vascolare e IHC per determinare la distribuzione di cellule endoteliali e di cellule perfuse. A causa dei ripetuti esperimenti in brevi periodi di tempo, non è stato possibile sottoporre gli animali per più di 3 ore per ogni sessione di misura. A causa di questa limitazione cinque differenti protocolli sono stati studiati per combinare insieme i differenti metodi di misura.

I dati sono stati analizzati utilizzando sia tecniche di pattern analysis che sistemi di histogram analysis per mezzo di codici sviluppati in linguaggio C++ e Matlab.

I risultati sono stati organizzati in quattro parti che corrispondono ai quattro livelli del processo di angiogenesi: effetti a livello molecolare, struttura della rete vascolare, effetti fisiologici e interazione con i tessuti circostanti.

a) Effetti a livello molecolare. L'ipossia tumorale e il metabolismo del glucosio sono stati studiati rispettivamente per mezzo di F-MISO-PET e FDG-PET. In tutti i soggetti, i tumori sono risultati ipossici. Nella prima fase dello sviluppo, corrispondente al giorno 6, una predominante porzione del tumore era ipossica, mentre durante le fasi di crescita è stata osservata una eterogenea distribuzione del tracciante corrispondente a una continua formazione di zone ipossiche e non-ipossiche.

Similmente, lo studio della distribuzione di FDG ha mostrato una distribuzione più omogenea al giorno 6 che al giorno 12. Siccome la presenza di glucosio è un indice di attività cellulare, è ragionevole supporre che, durante la crescita tumorale, solo alcune regioni del tumore rimangono metabolicamente attive a causa della formazione del nuovo sistema vascolare.

I risultati ottenuti in-vivo sono stati confermati dagli esami istologici, anal-

izzando le distribuzioni relative di cellule endoteliali, di cellule perfuse e di cellule ipossiche. Cellule perfuse metabolicamente attive sono state trovate nelle vicinanze di cellule endoteliali ma non in corrispondenza di cellule ipossiche.

b) Struttura della rete vascolare. La struttura della rete vascolare è stata studiata in prima istanza per mezzo di SR μ CT usando sia la tecnica a contrasto di fase che quella a contrasto di assorbimento. Le immagini 3D acquisite mostrano chiaramente una struttura caotica dei vasi. La dimensione frattale FD è risultata essere 2.78 ± 0.03 (N=6) contro 2.23 ± 0.02 misurata in campioni cerebrali. Una FD più piccola significa una più semplice struttura geometrica che è propria degli organi sani. Al contrario, valori più elevati di FD sono sinonimi di sistemi più complessi e, nel caso dei tumori, di una struttura non gerarchica.

L'assenza di una struttura gerarchica nell'organizzazione della rete vascolare tumorale è stata dimostrata anche per mezzo dell'indice di dimensione vascolare VSI misurato per mezzo della MRI. L'indice VSI, che è definito come il diametro medio dei vasi presenti in un voxel, permette la misura della distribuzione del diametro dei vasi durante la crescita tumorale. Gli studi longitudinale mostrano una distribuzione molto simile con una prevalenza di capillari (5-20 μ m). Il numero di tali capillari cresce sensibilmente durante lo sviluppo del tumore e ciò implica la formazione di una densa rete di capillari. Nonostante questo, solo un piccolo numero di arteriole o venule (20-100 μ m) sono state osservate durante il processo di angiogenesi. Vasi più grandi come arterie o vene (100-200 μ m) non sono state osservate in nessun stadio della crescita tumorale.

Questa mancanza di organizzazione del del sistema vascolare può spiegare la crescita eterogenea del tumore. Una non uniforme irrorazione sanguigna del tessuto tumorale comporta una distribuzione non uniforme di ossigeno e nutrienti. Solo alcune regioni irrorate dal sangue avranno la disponibilità di garantire il metabolismo cellulare e di conseguenza la replicazione cellulare. Le altre regioni possono rimanere in uno stato dormiente, dare origine al processo di angiogenesi o diventare necrotiche a seconda delle condizioni ambientale.

c) Effetti fisiologici. Le caratteristiche anatomiche precedentemente descritte hanno importanti implicazioni nella fisiologia dei tumori: ad esempio l'intera emodinamica sarà determinata dalla struttura anatomica della rete vascolare. La distribuzione del volume di sangue tumorale TBV, misurato per mezzo di MRI, è risultata essere eterogenea. Elevati valori di TBV in differenti regioni del tumore durante la sua crescita, indicano la presenza di

nuovi vasi e quindi che l'angiogenesi è in atto. Per quantificare l'eterogeneità, è stata calcolata la dimensione frattale FD della mappa TBV. Misure longitudinali hanno mostrato variazioni di FD durante lo sviluppo del tumore che, da un punto di vista fisiologico significa un cambiamento della distribuzione del volum di sangue TBV e quindi della struttura vascolare.

La funzionalità dei vasi è stata studiata misurando la loro permeabilità mediante MRI. La permeabilità definisce la velocità e la quantità di sangue che esce dai capillari. Anche in questo caso sono stati osservati differenti regioni con differenti livelli di permeabilità. La quantificazione spaziale delle mappe di permeabilità è stata effettuata valutandone la lacunarità che descrive la distribuzione dei gap tra i vari pattern presenti nella mappa di permeabilità. alti valori di lacunarità corrispondono a grandi variazioni dei gap e conseguentemente a un elevato livello di eterogeneità della distribuzione. È stato osservato un andamento oscillatorio del valore di lacunarità che può essere interpretato come un continuo rimodellamento della rete vascolare durante il processo di angiogenesi. Tale rimodellamento, insieme alla continua formazione di nuovi capillari, ne impedisce la loro maturazione e quindi la trasformazione in vasi più grandi rendendo l'intera struttura poco funzionale. Questa mancanza di funzionalità del sistema vascolare del tumore ha ripercussioni negative anche nella sua cura. Tale anomalia rende infatti inefficiente il rilascio dei farmaci tumorali in quanto, solo alcune parti del tumore saranno adeguatamente perfuse dal farmaco. Per ovviare a tale problema, recenti strategie propongono prima di amministrare un farmaco pro-angiogenico che stabilizzi la funzionalità dei vasi e successivamente il farmaco citotossico. Per testare questa possibilità, abbiamo valutato i cambiamenti indotti da un farmaco pro-angiogenico, chiamato DMOG, che induce un attivazione dei segnali cellulari legati allo stato di ipossia ed è quindi considerato un trigger dell'angiogenesi. Analizzando le mappe TBV mediante tecniche convenzionali come la histogram analysis non è stata trovata alcuna differenza tra il gruppo trattato e quello di controllo. Invece, differenze significative sono emerse usando la pattern analysis che permette la valutazione dei parametri di forma e di texture. Questi risultati indicano che l'eterogeneità del tessuto deve essere presa in considerazione per la valutazione dell'efficacia del trattamento terapeutico.

L'angiogenesi tumorale porta alla formazione di una struttura vascolare caotica con importanti conseguenze fisiologiche. Gli studi longitudinali dimostrano che il tumore non cresce in un modo omeostatico, piuttosto è soggetto a continui rimodellamenti.

Le terapie, ed in particolare le terapie anti-angiogeniche sono direttamente influenzate dal processo di angiogenesi. La porosità dei vasi e la loro struttura

caotica non consente una distribuzione omogenea dei farmaci citotossici. Per questo, la valutazione di parametri come la dimensione frattale o la lacunarità permettono di quantificare l'omogeneità o l'eterogeneità della distribuzione del farmaco, permettendo da un lato di valutarne l'efficacia e, dall'altro di monitorare individualmente ogni singolo paziente.

Uno dei grandi vantaggi di questo innovativo metodo di analisi è la semplice implementazione in ambiente clinico a basso costo. MRI e PET e esami istologici sono metodi di imaging che vengono usati giornalmente per la stadiazione e il follow-up di pazienti. L'implementazione di tecniche di pattern analysis consiste semplicemente nell'installazione di codici software sulle normali workstation usate per l'analisi delle immagini.