

## LE MICROBOLLE: ATTUALITÀ E PROSPETTIVE FUTURE

**Antonio Granata<sup>1</sup>, Fulvio Floccari<sup>2</sup>, Giuseppe Daidone<sup>3</sup>, Viviana R. Scarfia<sup>1</sup>, Luca Di Lullo<sup>4</sup>, Antonio Basile<sup>5</sup>, Giorgio Battaglia<sup>6</sup>, Fulvio Fiorini<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "San Giovanni di Dio", Agrigento

<sup>2</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "S. Paolo", Civitavecchia, Roma

<sup>3</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "Umberto I", Siracusa

<sup>4</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "L. Parodi Delfino", Colferro, Roma

<sup>5</sup>U.O.C. Radiologia, ARNAS "Garibaldi", Catania

<sup>6</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "S. Marta e S. Venera", Acireale, Catania

<sup>7</sup>U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale "S. Maria della Misericordia", Rovigo

### Microbubbles: current state and future prospects

*Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) represents one of the most interesting applications of traditional medical sonography. Ultrasound contrast agents are classified into first- and second-generation agents depending on the gas (nitrogen, perfluorocarbon or sulfur hexafluoride) in the microbubbles. Both generations are characterized by an excellent safety profile, with low hepatic and renal toxicity and rare central nervous system reactions. The respiratory and hepatic elimination of the gases explains the low nephrotoxicity. CEUS has been successfully employed in drug and gene delivery. Indeed, new molecules such as liposomes, micelles and perfluorocarbon nanoparticles have been recently proposed as ultrasound contrast agents. Possible future applications of liposomes are the treatment of hypertension complications (given the possibility to fill them with nitric oxide), the treatment of cerebral disease with xenon, and the treatment of breast and liver cancer with doxorubicin. Micelles have been demonstrated to be effective in cancer treatment as well. Finally, perfluorocarbon nanoparticles can be used in oncological settings and in pancreatic islet transplantation in patients with type I diabetes.*

Conflict of interest: None

Financial support: None

### KEY WORDS:

Ultrasonography,  
Contrast-enhanced  
ultrasonography,  
Renal disease

### PAROLE CHIAVE:

Ecografia,  
Ecocontrastografia,  
Malattia renale

### Indirizzo degli autori:

Dr. Antonio Granata  
Via F. Paradiso 78/a  
95024 Acireale (CT)  
e-mail: antonio.granata4@tin.it

## INTRODUZIONE

Circa mezzo secolo è ormai trascorso da quando Gramiak R. e Shah P.M. notarono un incremento transitorio dell'ecogenicità del sangue durante la somministrazione di soluzione fisiologica in un paziente sottoposto a cateterismo cardiaco (1). Solo negli anni successivi, l'aumento transitorio dell'ecogenicità del sangue fu correlato con la produzione di microbolle di aria durante la somministrazione di soluzione fisiologica grazie ad un fenomeno fisico noto come cavitazione. Iniziò così, ad opera delle varie in-

dustrie produttrici di mezzi di contrasto, la corsa a creare delle microbolle che potessero avere delle applicazioni cliniche. Corsa che evidenziò subito alcuni importanti problemi legati alla stabilità ed alla persistenza delle microbolle nel circolo sanguigno. La creazione di microbolle con diametro inferiore ai 6-8  $\mu\text{m}$ , capaci di attraversare il microcircolo polmonare, e dotate di una capsula a base di fosfolipidi hanno permesso ai giorni nostri di avere microbolle altamente stabili, persistenti (oltre 10-15 minuti), sicure e capaci di attraversare agevolmente il filtro polmonare. Oggi, l'ecocontrastografia rappresenta una

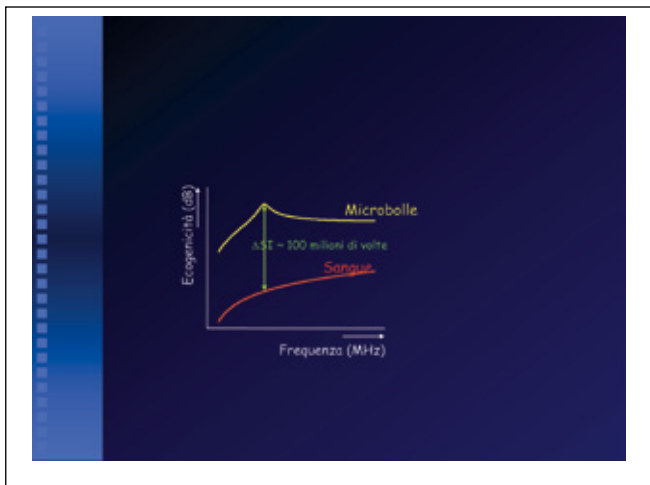


Fig. 1 - Le microbolle iniettate per via ev restano confinate all'interno dei vasi sanguigni ("blood-pool") amplificando, una volta insonate, il segnale ecografico proveniente dal sangue di circa 100.000 milioni di volte.

delle applicazioni cliniche più interessanti e promettenti dell'imaging ecografico e, grazie all'assenza di radiazioni ionizzanti, alla mancanza di nefrotossicità, alla ripetibilità e ai costi contenuti, possiede tutte le potenzialità per diventare nel prossimo futuro una metodica d'imaging di riferimento.

Il suo corretto utilizzo presuppone l'adeguata conoscenza delle proprietà fisiche dei mezzi di contrasto ecografici e delle loro interazioni con gli ultrasuoni. L'effetto ecoamplificatore (Fig. 1) dipende infatti da molteplici fattori legati alle caratteristiche del fascio ultrasonoro, alle proprietà del mezzo di contrasto utilizzato e alle modalità d'insonazione (2).

## MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI

Classicamente vengono distinti in I e II generazione. I mezzi di contrasto di I generazione sono caratterizzati da un rivestimento rigido che amplifica il segnale, ma non lo modifica e l'insonazione determina una pressione (elevato indice meccanico, IM) che porta alla rottura delle bolle (3). Quelli di II generazione hanno invece una capsula molto soffice. Grazie a questa loro caratteristica sono in grado di oscillare in risposta allo stimolo acustico, generando onde riflesse in risposta a pressioni anche molto ridotte (basso IM) (3). Tali onde generate, modificano in maniera rilevante la morfologia dell'onda riflessa. Ed è proprio su questa loro capacità di generare una risposta armonica a bassa pressione che si basa la possibilità di distinguere gli echi generati dagli ecoamplificatori da quelli di origine tissutale (4).

I mezzi di contrasto ecografici sono costituiti da microbolle di dimensioni inferiori ai globuli rossi, con

diametro compreso tra 3  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ , contenenti gas e rivestite ("stabilizzate") da una capsula periferica generalmente costituita da materiale biocompatibile e biodegradabile composto da lipidi, galattosio, albumina, cianoacrilato e/o proteine. I mezzi di contrasto a base di microbolle sono classificati in base al gas che le costituisce che può essere aria (azoto), perfluorocarburo o esafluoruro di zolfo (3, 4) (Tab. I).

Contrariamente a quanto osservato con i mezzi di contrasto iodati e paramagnetici utilizzati in TC e in RM che attraversano il filtro capillare (possiedono, cioè, una fase interstiziale ed escretoria), i mezzi di contrasto ecografici, dopo essere stati iniettati per via endovenosa non presentano una fase tissutale interstiziale ma permangono all'interno dei vasi comportandosi come mezzi di contrasto *blood-pool*, non vengono escreti nelle urine e quindi non è possibile ottenere informazioni sulla funzione escretoria e sulle strutture calcipieliche (3-5). Alcuni mezzi di contrasto ecografici presentano una captazione epato-splenica elettiva determinata dall'accumulo delle microbolle nel sistema reticolo-endoteliale o dall'adesione a livello dei sinusoidi epatici (6).

Una volta preparata la soluzione, l'iniezione endovenosa deve essere eseguita attraverso una cannula di calibro adeguato (18 Gauge) al fine di ridurre la distruzione legata alle turbolenze (effetto Venturi) create in corrispondenza dell'uscita dell'ago nel caso si usino cannule di calibro più piccolo (5).

La somministrazione può essere eseguita in bolo (2-4 mL/sec) oppure mediante iniezione lenta (0.5-1 mL/sec) e ad essa deve seguire il lavaggio della cannula con 5-10 mL di soluzione fisiologica. Nell'iniezione in bolo si ha, da un lato, l'incremento della riflettività in misura direttamente proporzionale alla dose, dall'altro la possibilità di incorrere in artefatti durante il picco di concentrazione. Nell'iniezione

TABELLA I - SI UTILIZZANO MICROBOLLE DI GAS PERCHÉ IL GAS RISPETTO AI LIQUIDI HA COMPRESSIBILITÀ DI CIRCA 20.000 VOLTE RISPETTO AI LIQUIDI

Mezzi di contrasto ecografici: Classificazione in base al gas		
Aria (Azoto)	Perfluorocarburanti	Esafluoruro di zolfo
Albunex	BR14	SonoVue
Echovist	Definity	
Levovist	Echogen	
Myomap	Imagent	
Quantison	Optison	
Sonavist	Sonazoid	

lenta, invece, dalla somministrazione l'enhancement è stabile, e nella curva tempo-intensità si osserva un plateau a 1-2 minuti. Negli studi relativi alla quantizzazione della perfusione parenchimale per mantenere stazionari i livelli delle microbolle può essere eseguita utilizzando uno speciale iniettore automatico. Dopo la somministrazione, le microbolle vengono eliminate dall'organismo per via respiratoria ed epatica (il contenuto gassoso delle microbolle viene comunemente eliminato attraverso i polmoni mediante la respirazione mentre i componenti utilizzati come stabilizzatori "di solito fosfolipidi" vengono metabolizzati dal fegato); la mancanza di escrezione renale spiega l'assenza di nefrotossicità che ne permette l'utilizzo anche nei pazienti nefropatici (6, 7).

I mezzi di contrasto ecografici sono dotati di un eccellente profilo di sicurezza senza tossicità a carico del fegato, dell'encefalo e dei reni. Le reazioni avverse sono rare e, generalmente, quando si verificano sono transitorie e di media intensità. Nel sito d'iniezione e/o lungo il decorso del vaso utilizzato, si può osservare una transitoria sensazione di dolore, freddo o calore e/o irritazione tissutale. Si deve prestare particolare attenzione ad evitare somministrazioni "fuori vena" delle microbolle poiché le reazioni sopra riportate sono più serie. A causa dell'iperosmolarità delle microbolle può riscontrarsi transitoria e aspecifica irritazione dell'endotelio sede di venipuntura. Recentemente, alcuni autori (8) hanno riportato un'incidenza di reazioni avverse dopo la somministrazione di esafluoruro di zolfo pari a circa 0.009% e quindi di molto inferiore alle percentuali riportate per i mezzi di contrasto iodati ionici (0.09%-0.22%), non ionici (0.02%-0.1%) e a base di gadolinio (0.1%-0.2%). Sono stati riportati, tuttavia, casi isolati di ipo o ipertensione, cefalea (2.3%), nausea, vomito, disgeusia, dolore toracico, dispnea, reazioni nel sito d'iniezione inclusi ematoma, sensazione di bruciore e parestesia (1.7%) e dolore nel sito d'iniezione (1.4%) (Tab. II). La principale causa degli effetti avversi delle microbolle sugli animali (ad esempio: emolisi, trombosi ed endotelio-patie) è rappresentata dal fenomeno della cavitazione inerziale facente seguito alla rapida formazione, crescita e collasso di una microbolla di gas all'interno di un liquido, come risultato dell'esposizione al fascio ultrasonoro (5). Significativi effetti biologici sono stati ottenuti sperimentalmente creando condizioni estreme d'insonazione (elevato IM, prolungata esposizione alle onde ultrasonore, dosi elevate di microbolle). A tal fine, criteri protezionistici consigliano di impiegare il più basso IM possibile, il più basso tempo di esposizione possibile, la frequenza più alta possibile e la più bassa dose di ecocontrasto possibile, il tutto compatibilmente con l'ottenimento di adeguate

informazioni diagnostiche (9). Condizioni controindicanti la somministrazione delle microbolle sono, oltre all'ipersensibilità verso il prodotto (tuttavia, non sono state descritte reazioni d'ipersensibilità), l'uso in pazienti con *shunt* destro-sinistro, grave ipertensione polmonare (>90 mmHg), ipertensione arteriosa non controllata, patologia coronarica acuta, angina instabile e la sindrome da distress respiratorio (ARDS). Particolare attenzione va prestata quando l'ecoamplificatore va somministrato nei pazienti con grave scompenso cardiaco (classe IV NYHA) e patologia polmonare clinicamente significativa, inclusa la broncopneumopatia cronica ostruttiva grave (9).

## PROPRIETÀ FISICHE DEI MEZZI DI CONTRASTO ECOGRAFICI

Le proprietà fisiche delle microbolle sono correlate al tipo di gas contenuto, alla composizione della capsula di rivestimento, alla frequenza d'insonazione, alla frequenza di ripetizione dell'impulso ultrasonoro ed alla potenza d'insonazione acustica.

Il meccanismo con cui le microbolle esaltano il segnale che origina dal sangue circolante è l'amplificazione dello *scattering*, cioè degli echi che originano dalla semplice dispersione della parte corpuscolata del sangue. Le microbolle amplificano lo *scattering* in quanto aumentano la superficie o capacità di riflessione del sangue circolante per la contemporanea presenza in sospensione nel plasma degli eritrociti e delle microbolle di gas (4, 7).

Quando un'onda ultrasonora incontra un'interfaccia tra 2 oggetti viene riflessa, rifratta o diffusa in maniera proporzionale alla differenza della loro impedenza acustica. Gli echi riflessi e diffusi

**TABELLA II - PRINCIPALI EFFETTI COLLATERALI SECONDARI ALLA SOMMINISTRAZIONE DEL CONTRASTO ECOGRAFICO**

Eventi avversi	Somministrazione di ecocontrasto: frequenza degli eventi avversi	
	1 - 5%	< 1%
Sistemici	Cefalea	Dolore addominale
	Ipersensibilità nel sito di iniezione	Stanchezza
App. Cardiovascolare	Iperensione	Algie diffuse, fatica
		Fibrillazione Atriale
		Cardiopalmi, Tachicardia
App. Gastrointestinale	Nausea	Anoressia, Diarrea, Dispepsia
App. Muscoloscheletrico		Crampi muscolari
SNC	Vertigini	Parestesia
	Secchezza fauci	
	Vasodilatazione	
App. Respiratorio		Dispnea
Cute e appendice		Sudorazione, Rash, Prurito
Altro	Alterazioni del gusto e dell'odore	

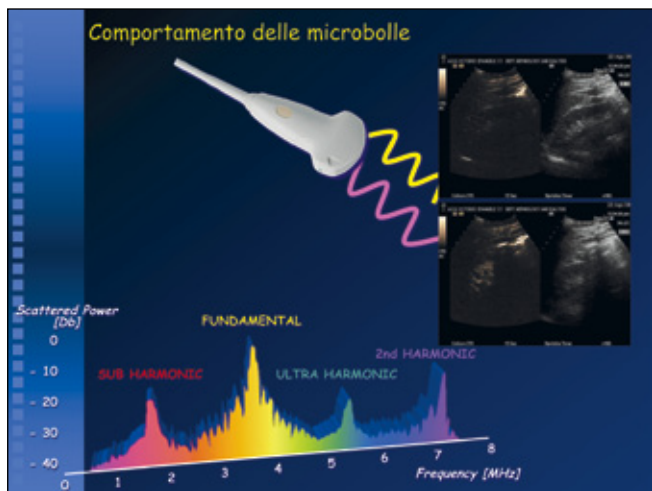


Fig. 2 - Spettro delle frequenze generate all'insonazione delle microbolle o dei tessuti. Quando insonata, la microbolla oscilla e produce frequenze sia fondamentali che armoniche.

sono alla base della formazione dell'immagine ecografica; tanto maggiore è la differenza d'impedenza acustica tra le interfacce che generano gli echi, tanto maggiore è la loro intensità.

I mezzi di contrasto ecografici sono degli ottimi ecoamplificatori in quanto le microbolle di gas hanno impedenza acustica molto diversa da quella del sangue. Durante la propagazione degli ultrasuoni le microbolle oscillano variando di dimensioni con comportamenti differenti a seconda della potenza acustica (Fig. 2). Alle potenze del fascio utilizzate per l'*imaging* ecocontrastografico il loro comportamento non è lineare ma è caratterizzato da oscillazioni asimmetriche, con la tendenza all'espansione maggiore della compressione. Questo comportamento è alla base del segnale contrasto-specifico delle microbolle, ed è particolarmente accentuato quando la frequenza del fascio ultrasonoro ingenera fenomeni di risonanza. La frequenza di risonanza delle microbolle dipende dalle caratteristiche fisiche del gas e del mezzo circostante ed è inversamente proporzionale al suo raggio. Poiché nei mezzi di contrasto ecografici si ritrovano microbolle con raggi diversi (da 1 a 10  $\mu\text{m}$ ), anche il fenomeno della risonanza avviene su un *range* di frequenze piuttosto ampio (3, 10).

La maggior parte delle microbolle risuona entro il *range* di frequenze utilizzato per l'*imaging* addominale (Fig. 3), ma esiste una quota di microbolle più piccole che risuona a frequenze maggiori e rende possibile l'*imaging* contrasto-specifico anche per lo studio dei tessuti superficiali. Sono attualmente in fase di studio mezzi di contrasto con microbolle molto piccole, dedicate per l'*imaging* ecocontrastografico

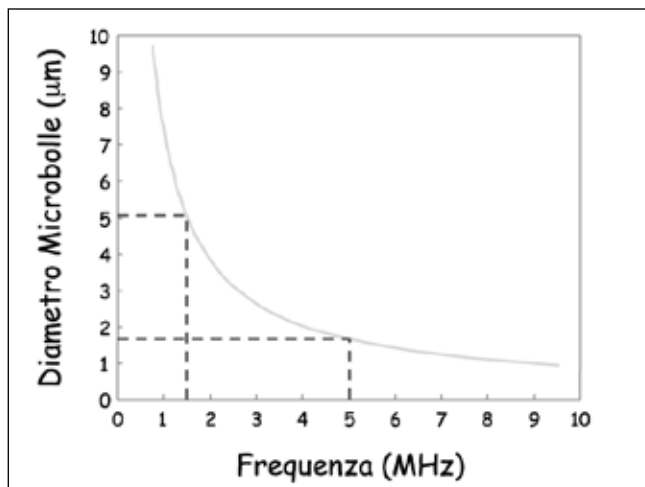
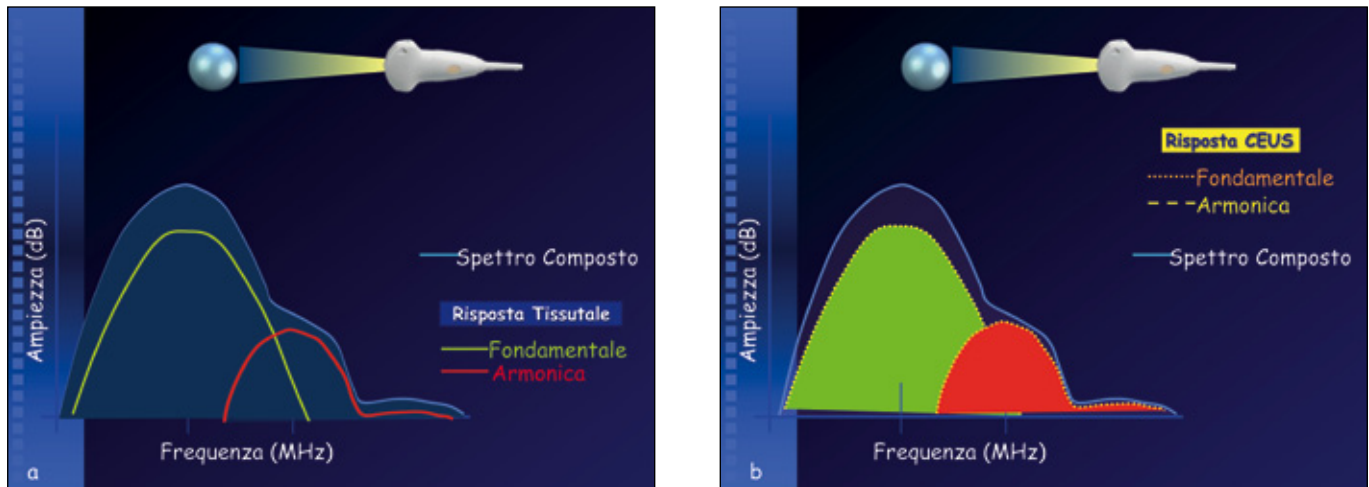


Fig. 3 - Comportamento acustico delle microbolle. La maggior parte di esse va incontro a risonanza entro il range di frequenze utilizzato per l'*imaging* addominale.

grafico dei tessuti superficiali. A bassa potenza acustica d'insonazione (tra 10 e 20 kPa, minore di quella utilizzata per l'*imaging* contrasto specifico;  $IM < 0.1$ ) le microbolle che vengono sottoposte ad una pressione acustica positiva (compressione) e negativa (dilatazione), presentano un comportamento lineare e producono un segnale ecografico generato dalla riflessione delle microbolle e dalla marcata differenza d'impedenza acustica tra le microbolle ed il sangue circostante. A potenze del fascio ultrasonografico maggiori (tra 40 e 50 kPa, pari a quelle attualmente utilizzate per l'*imaging* ecocontrastografico) l'espansione delle microbolle è più intensa ed asimmetrica, cioè la riduzione del diametro della microbolla è maggiore durante la fase di compressione rispetto all'aumento del diametro durante la fase di decompressione (3). A seguito dell'asimmetrica oscillazione, le microbolle producono frequenze armoniche (non-lineari) multiple della frequenza di risonanza (Fig. 4). Aumentando ulteriormente la potenza del fascio d'insonazione (fino ad 1 MPa) si ha l'eccessiva espansione del raggio della microbolla a cui fa seguito l'esplosione e la produzione di un segnale transitorio molto intenso a banda ampia (10). La vita di una microbolla può essere modificata agendo su ognuno dei fattori riportati in Figura 5; in pratica, l'unica possibilità è quella di usare un gas diverso dall'aria.

## INDICE MECCANICO

La potenza acustica con cui le microbolle vengono insonate viene di solito espressa da un



**Fig. 4** - L'insonazione dei tessuti e delle microbolle da luogo a risposte fondamentali ed armoniche lineari (a) e non-lineari (b). L'uso di software particolari permette di annullare il segnale proveniente dai tessuti, quindi la fondamentale e l'armonica lineare enfatizzando il segnale proveniente dalla microbolle.



**Fig. 5** - Non essendo possibile modificare il raggio della microbolla, (mancato passaggio attraverso il filtro trans-polmonare, diametro ~ 6 mm, e frequenza di risonanza a valori sotto 1 MHz), si modifica il gas in essa contenuto. La scelta, pertanto, ricade su un gas poco diffusibile, inerte, più denso e meno solubile in acqua rispetto all'aria.

parametro definito indice meccanico (IM). L'IM utilizzato dalla piattaforma ecografica varia a seconda dell'azienda produttrice e viene indicato sul monitor insieme all'indice termico. La risposta delle microbolle al fascio di ultrasuoni è direttamente legata al picco di pressione negativa che, se molto elevata, può dar luogo a fenomeni di cavitazione cioè alla formazione e confluenza di microbolle nei tessuti insonati. Questi fenomeni si verificano tanto più facilmente quanto più prolungato ed ampio è il picco di pressione negativa.

Questa grandezza, utile per valutare le caratteristiche dell'interazione tra le microbolle e il fascio di ultrasuoni, esprime la probabilità che

le microbolle esplodano durante l'insonazione. Essa dipende dalla pressione di picco dell'onda ultrasonora e dalla frequenza centrale del fascio (11). Le tecniche ecografiche contrasto-specifiche distruttive, ad alto IM, estesamente utilizzate in passato sfruttavano il segnale prodotto dalla rottura delle microbolle utilizzando fasci di ultrasuoni con potenza elevata (I generazione). Le tecniche ecografiche contrasto-specifiche non distruttive, utilizzate attualmente, lavorano a basso IM e sfruttano il segnale prodotto dall'oscillazione armonica delle microbolle (II generazione). Con queste tecniche la persistenza del segnale permette l'esecuzione di una scansione ecografica in tempo reale migliorando la confidenza diagnostica nel riconoscere sia lesioni focali che difetti di perfusione. In effetti il criterio di distinzione in base all'alto o al basso IM è improprio: l'IM di un fascio ultrasonoro è infatti la misura della possibilità che questo ha di determinare effetti biologicamente dannosi sui tessuti e non si tratta di una misura specifica della pressione acustica, anche se con questa è direttamente correlato. Le onde generate dalla risonanza delle microbolle, modificano in maniera rilevante la morfologia dell'onda riflessa. Ed è proprio su questa loro capacità di generare una risposta armonica a bassa pressione che si basa la possibilità di distinguere gli echi generati dagli ecoamplificatori da quelli di origine tissutale. Per poter differenziare gli echi tissutali da quelli originati dalle microbolle, numerosi algoritmi matematici e tecnologie sono state sviluppate (12) e di seguito, brevemente, saranno riportate.

**TABELLA III - CLASSIFICAZIONE DELLE PRINCIPALI TECNICHE ECOGRAFICHE CONTRASTO-SPECIFICHE SECONDO LA TECNICA DI TRASMISSIONE DELL'IMPULSO E DI ELABORAZIONE DEL SEGNALE**

<i>Classificazione delle Tecniche Ecografiche Contrasto-Specifiche</i>				
Pseudo-Doppler Modulazione	Imaging Armonico	Modulazione di fase	Modulazione di ampiezza	Modulazione di fase e di ampiezza
<input type="checkbox"/> Stimulated	<b>1. Tecniche in scala di grigi:</b>	<b>1. Tecniche in scala di grigi:</b>	<input type="checkbox"/> Power modulation	<input type="checkbox"/> Cadence
Acoustic Emission (SAE)	<input type="checkbox"/> Second harmonic imaging	<input type="checkbox"/> Pulse inversion		<input type="checkbox"/> Contrast Pulse Sequencing (CPS)
<input type="checkbox"/> Cadence Agent Detection Imaging (ADI)	<input type="checkbox"/> cCube imaging	<input type="checkbox"/> Microflow imaging		
<input type="checkbox"/> Advanced Dynamic Folw (ADF) (ePHD)	<input type="checkbox"/> Flash echo imaging	<input type="checkbox"/> Contrast Tissue discriminator (CTD)		
<input type="checkbox"/> Tissue Signature Imaging (TSI)	<input type="checkbox"/> Extended pure armonic detection	<input type="checkbox"/> Coherent Contrast Imaging		
	<input type="checkbox"/> Contrast Tuned Imaging (CnTI)	<b>2. Tecniche Doppler</b>		
	<input type="checkbox"/> Ultra-armonic imaging	<input type="checkbox"/> Power Pulse inversion		
	<input type="checkbox"/> 1.5 harmonic imaging	<input type="checkbox"/> Vascular Recognition Imaging (VRI)		
	<b>2. Tecniche Doppler</b>	<input type="checkbox"/> Low MI color Flow contrast		
	<input type="checkbox"/> Harmonic power Doppler			

Le tecniche pseudo-Doppler consistono in tecniche di insonazione multi-impulso e ad alta potenza e sfruttano il fenomeno della SAE cioè dell'emissione acustica stimolata corrispondente all'emissione di un segnale armonico ad ampia banda quando le microbolle vengono distrutte. Comunque tutte le metodiche ambiscono allo stesso scopo: distinguere/separare il segnale proveniente dal tessuto da quello proveniente dal mezzo di contrasto.

### TECNICHE UTILIZZATE PER DISTINGUERE IL SEGNALE TESSUTI/MICROBOLLE

Per poter differenziare gli echi provenienti dai tessuti da quelli originati dalla risonanza delle microbolle sono state proposte numerose tecnologie contrasto-specifiche basate su tecniche di filtraggio in trasmissione, in ricezione o di sottrazione del segnale (Tab. III). Esse, in base al loro principio di funzionamento si possono distinguere in: tecniche pseudo-Doppler, armoniche, a modulazione di fase, a modulazione di ampiezza ed a modulazione di fase e di ampiezza. Le tecniche pseudo-Doppler si basano sull'iniziale identificazione delle microbolle da parte del primo impulso e sulla loro immediata distruzione con conseguente mancata identificazione da parte degli impulsi successivi. Poiché nei sistemi Doppler il segnale è rilevato confrontando treni successivi d'impulsi con algoritmi di correlazione, la scomparsa delle microbolle, conseguente alla loro rottura, è rilevata come una brusca perdita di correlazione tra gli impulsi e interpretata come un forte segnale Doppler transitorio. Con queste tecniche è possibile acquisire contemporaneamente il segnale

e l'immagine in scala di grigi ottenendo una rappresentazione indipendente della morfologia degli organi e della distribuzione del mezzo di contrasto. Gli svantaggi sono dovuti alla scarsa risoluzione spaziale e alla dipendenza dell'intensità del segnale dalle caratteristiche e dalla focalizzazione del fascio. La presenza di artefatti e la scarsa persistenza del segnale ne hanno significativamente limitato l'uso. Le tecniche armoniche (ad esempio *Contrast Tuned Imaging*, *C-cube*, etc.) utilizzano le proprietà fisiche non lineari delle microbolle per sopprimere il segnale prodotto dai tessuti stazionari. La seconda armonica, che presenta frequenza doppia alla frequenza fondamentale, è quella di maggior importanza per l'*imaging* contrasto-specifico poiché possiede la maggiore ampiezza tra le frequenze armoniche prodotte. Queste tecniche, tuttavia, sono limitate dal comportamento non lineare dei tessuti stazionari, che è presente se viene impiegata un'alta potenza d'insonazione. Ne consegue la riduzione della risoluzione di contrasto della tecnica. Le tecniche a modulazione di fase (ad esempio, *pulse inversion*, *power pulse inversion*, *microflow imaging*, etc.) hanno lo scopo di differen-

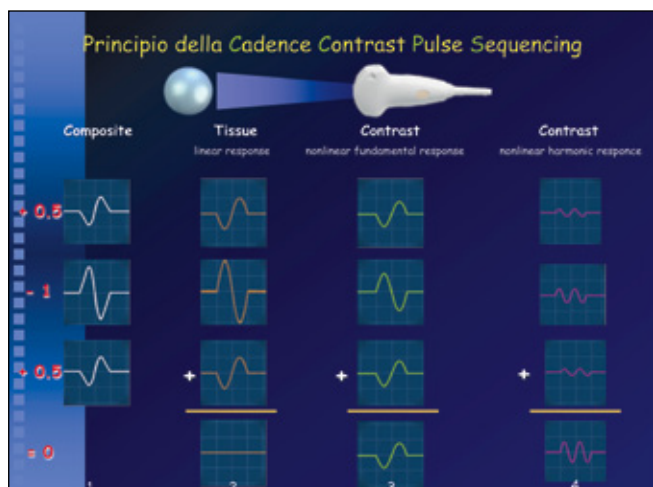


Fig. 6 - Tre impulsi in successione vengono inviati in ogni linea di vista, il primo e l'ultimo impulso possiedono la metà dell'ampiezza del secondo impulso che presenta fase invertita rispetto agli altri (1) e gli echi rispettivamente vengono sommati; 2) per un mezzo lineare la somma risultante è zero. Per un mezzo non lineare come le microbolle la somma produce un risultato diverso da zero, sia per le frequenze fondamentali (3) che per le frequenze armoniche non lineari.

TABELLA IV - PRINCIPALI VIE DI APPLICAZIONI FUTURE DELLE MICROBOLLE IN ULTRASONOLOGIA

Mezzi di contrasto ecografici: Il Futuro
• Stretta sinergia con i produttori di tecnologie ecografiche per sistemi sempre più efficienti e sensibili
• Ampliamento delle indicazioni (MCE, Artrite Reumatoide / Lesioni Panno Sinoviale, Traumi, Gyn/Ob, etc.)
• Quantificazione & Imaging Parametrico (Perfusione, Curve di wash-in/wash-out)
• Microbolle di Terza Generazione per Real-Time Imaging ad alta pressione acustica
• MdC-US Targeted
• Drug & Gene Delivery

ziare il segnale lineare prodotto dai tessuti stazionari da quello non lineare prodotto dalle microbolle con il fine di aumentare la risoluzione di contrasto ed il rapporto segnale/rumore. Queste tecniche utilizzano basse potenze acustiche d'insonazione e consentono una lunga persistenza del segnale prodotto dalle microbolle con la possibilità di eseguire l'esame in *real-time*. La "pulse inversion", per esempio, si basa sul rapido invio di segnali ultrasuoni di fase opposta, in maniera tale che nella risultante registrata, questi vengano a sommarsi o ad annullarsi. Infatti, grazie al fatto che le microbolle interagiscono con il fascio ultrasonoro in maniera

complessa e quindi con un comportamento di tipo "non lineare", gli echi di ritorno che determinano la formazione dell'immagine, si sommano, risaltando meglio e ben differenziandosi da quelli tissutali che, essendo in "contrasto di fase", tendono invece ad annullarsi. Le tecniche che si basano sul principio della modulazione di ampiezza utilizzano 2 impulsi consecutivi ad ampiezze differenti. La somma dei rispettivi echi consente di cancellare il segnale lineare dei tessuti ed esaltare il segnale non-lineare prodotto dalle microbolle.

Le tecniche a modulazione di fase e di ampiezza presentano un'elevata sensibilità per il segnale armonico non lineare generato dalle microbolle, un'eccellente soppressione del segnale lineare prodotto dai tessuti stazionari, un'ottima omogeneità dell'*enhancement* ed un'elevata risoluzione di contrasto rispetto alle altre tecniche, nonché una drastica riduzione degli artefatti da movimento e del *clutter* (segnale Doppler a bassa frequenza prodotto dai tessuti stazionari che si sovrappone al segnale Doppler reale). La tecnica a modulazione di fase e di ampiezza si avvale della *cadence contrast pulse sequencing* (CPS) il cui principio è rappresentato in Figura 6.

### APPLICAZIONI FUTURE

Le indicazioni cliniche delle microbolle sono in continuo aumento e nel prossimo futuro numerose altre applicazioni saranno possibili (Tab. IV). Uno dei principali limiti della terapia genica e biologica è la tossicità dei farmaci utilizzati che hanno una biodistribuzione sistemica. In studi sperimentali la CEUS si è dimostrata una metodica promettente per rendere tali terapie selettive ed aumentarne l'efficacia (13, 14). La somministrazione del farmaco biologico può essere effettuata subito dopo l'infusione delle microbolle o contestualmente ad essa. Nel primo caso è possibile sfruttare gli effetti della cavitazione delle microbolle indotta focalizzando il fascio ultrasonoro nel tessuto bersaglio per aumentare la permeabilità delle membrane cellulari e favorire la penetrazione intracellulare di materiale genetico o farmaci (15). L'effetto di cavitazione (inerziale o stabile) necessario per migliorare la permeabilità è infatti ottenibile con le microbolle esogene a pressioni acustiche notevolmente inferiori e con intensità inferiori a quelle utilizzate per indurre effetti termici tali da provocare necrosi. La rottura delle microbolle indotta dagli ultrasuoni in prossimità delle membrane cellulari provoca microcorrenti fluide ad alta velocità che determinano un'aumentata permeabilità delle membrane biologiche tramite formazioni di pori. Questo effetto noto come sonoporazione transi-

toria incrementa da un lato la permeabilità cellulare mentre dall'altro, per effetto termico, la produzione di radicali liberi. Entrambi gli effetti hanno come esito finale l'apoptosi cellulare (15, 16). Nel secondo caso il farmaco è legato al guscio della microbolla ed è rilasciato non appena queste vengono distrutte insonando l'organo bersaglio con un fascio di ultrasuoni di caratteristiche opportune. Si ottiene il rilascio selettivo del farmaco nel tessuto bersaglio a cui si aggiunge l'aumentata permeabilità capillare e stravasamento negli spazi interstiziali. Quest'ultimo effetto dipende dalla concentrazione, dalla dimensione delle micromolecole e dalla pressione e frequenza del fascio acustico (14). Per potenziare gli effetti terapeutici è necessario inserire dei ligandi nel guscio della microbolla per permettere adeguate concentrazioni di farmaco nei tessuti bersaglio. Il principale vantaggio dell'utilizzo delle microbolle quali *carriers* di farmaci o di geni è determinato dalle loro oscillazioni che favoriscono sia l'interazione tra i ligandi presenti nel guscio ed il tessuto bersaglio sia la permeabilità transmembrana ed extravascolare. Il principale svantaggio è invece rappresentato dalla loro breve emivita e dalla possibilità di concentrare scarse quantità di farmaco nel guscio di ogni singola microbolla con la conseguente necessità di aumentare la concentrazione totale di microbolle in circolo (17, 18). A tale proposito le microbolle aventi guscio polimerico sarebbero preferibili ai fini terapeutici poiché più resistenti e ad emivita più lunga. Altre sostanze adiuvanti possono venire attivate dagli effetti termici e meccanici degli ultrasuoni, tra queste quelle più studiate sono i liposomi, le micelle e le nanoparticelle di perfluorocarbonio (19). I liposomi sono vescicole con dimensioni estremamente ridotte (65-120 nm) delimitate da doppia membrana fosfolipidica stabilizzata da lunghe catene aciliche che racchiudono fluido. Esse hanno trovato un'ampia gamma di applicazioni mediche grazie alla possibilità di poter veicolare sia sostanze idrofile nella fase liquida che idrofobe dentro il doppio strato fosfolipidico. I liposomi determinano il rilascio del farmaco interagendo con gli ultrasuoni per effetto delle minime quantità di aria che è possibile intrappolare al loro interno a seguito dei processi di liofilizzazione con reidratazione cui vengono sottoposti (20). Il grande vantaggio derivante dall'utilizzo dei liposomi è determinato dalla notevole efficienza nel trasporto di farmaci che avviene nel core del liposoma e dalla loro capacità intrinseca di fondersi con le membrane cellulari. I liposomi ecogenici rispetto alle microbolle hanno trovato minore fortuna in ecocontrastografia e infrequenti sono le descrizioni di tale utilizzo in letteratura (19, 21). A differenza delle microbolle, che vengono attivate dalle oscillazioni generate solo dagli ultrasuoni, i liposomi vengono attivati dal calore

generato non solo dagli ultrasuoni, ma anche da altri sistemi come le radiofrequenze (RDF) o le microonde (MW). Essi pertanto possono essere adoperati anche con sistemi combinati come HIFU e termometria a RM (22). Per produrre la lieve ipertermia necessaria per il loro utilizzo con ultrasuoni sono state ideate sonde colineari multifrequenza che assemblano nella stessa sonda una fila centrale di materiale piezoceramico per l'imaging, a frequenza media di 5.3 MHz, con 2 file esterne settate per sviluppare lieve ipertermia con frequenza di 1.54 MHz, capaci di emettere in 100 secondi circa 4 Watt di potenza (23).

Attualmente sono in corso trials clinici con utilizzo di doxorubicina veicolata da liposomi termosensibili (*thermodox*) associati ad ipertermia (con RFA o MW) nel trattamento di carcinomi mammari recidivati nella parete toracica e nel trattamento delle lesioni secondarie e primitive del fegato ([www.celsion.com/trials.cfm](http://www.celsion.com/trials.cfm)). Autori hanno dimostrato che per i liposomi termosensibili il rilascio del farmaco inizia a 38°C con il massimo rilascio a 42°C e che in tali condizioni in soli 12 minuti si aveva il 100% del rilascio del farmaco (16, 24). Liposomi veicolanti doxorubicina ma non termosensibili sono stati utilizzati nella terapia del carcinoma ovarico refrattario, nel sarcoma di Kaposi e nel mieloma multiplo ([www.doxil.com](http://www.doxil.com)) con risultati promettenti (25, 26). I liposomi non termosensibili presentano maggiore emivita per effetto dell'inglobamento di polietilenglicolato nella membrana che li rende più stabili preservandoli dall'azione del sistema reticoloendoteliale e dall'interazione con le proteine del plasma. Altri autori, ne hanno dimostrato una maggiore concentrazione nel tessuto neoplastico rispetto ai liposomi termosensibili qualora associati ad ipertermia prolungata volta ad incrementare la permeabilità vascolare (26, 27).

Un'altra interessante applicazione futura dei liposomi riguarda la possibilità di inserirvi ad alta pressione e a bassa temperatura ossido nitrico, un potente vasodilatatore, anti-infiammatorio, antitrombotico ed inibitore della proliferazione cellulare, per il trattamento l'iperplasia miointimale complicanza dell'ipertensione arteriosa ma anche dell'angioplastica (21, 28). Ai liposomi si potrebbe aggiungere anche Argon per rallentare e prolungare il rilascio dell'ossido nitrico nelle fibrocellule muscolari lisce (29). Tale associazione con rilascio elettivo sperimentata in vitro su colture cellulari, qualora associata in vivo ad ultrasuoni, potrebbe permettere di limitare notevolmente gli effetti collaterali sistemici dell'ossido nitrico (30, 31).

Attraverso lo stesso sistema, alte pressioni e bassa temperatura, si può inglobare nei liposomi lo Xenon che ha un'azione protettiva nei confronti del sistema nervoso centrale, e il suo passaggio attraverso la barriera ematoencefalica verrebbe favorito



dall'insonazione (32). Le micelle sono aggregati biodegradabili di copolimeri che veicolano nel core, al pari dei liposomi, farmaci lipofili (ad esempio doxorubicina, etc.). Studi sperimentali hanno dimostrato un miglioramento almeno transitorio dell'azione terapeutica oncologica, per effetto della vaporizzazione mediata dagli ultrasuoni sui vasi neoplastici. Questo si verifica anche in assenza di ligandi per la maggiore permeabilità dei vasi neoplastici neoformati rispetto ai vasi normali (per particelle inferiori a 750 nm) (33).

Oltre ai liposomi e alle micelle sono state inoltre descritte altre microparticelle con diametro variabile tra 10 e 100 nm il cui principale vantaggio è la loro diffusibilità legata alle dimensioni estremamente ridotte. A tale proposito è stato riportato in lavori sperimentali su topi come nanoparticelle di perfluorocarbonio ricoperto da guscio polimerico, già utilizzate in passato quale mdc per ecografia e per RM, combinate con micelle polimeriche veicolanti doxorubicina abbiano notevolmente migliorato l'effetto delle terapie oncologiche (34, 35). Di recente, le particelle di perfluorocarbonio, sono state utilizzate con discreti risultati nel trapianto di insule pancreatiche nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 (36, 37). L'incapsulamento delle insule pancreatiche con membrane semipermeabili, se da un lato permette di evitare l'interazione con il sistema immunitario, permettendo il passaggio delle sostanze terapeutiche di derivazione cellulare (insulina) e dei metaboliti (glucosio, etc.), dall'altro impediscono il mantenimento di adeguate tensioni di ossigeno con conseguente necrosi delle insule trapiantate. Tale problema sembra essere in parte superato inglobando emulsioni di perfluorocarbonio che presentano un'elevata affinità per l'ossigeno (38). Numerose nuove nanoparticelle e combinazioni nanoparticelle/ultrasuoni sono in via di studio dando luogo a potenziali interventi terapeutici fino a pochi anni orsono ritenuti impensabili.

## RIASSUNTO

*L'utilizzo dei mezzi di contrasto rappresenta una delle applicazioni cliniche più promettenti e interessanti dell'imaging ecografico. Si distinguono mezzi di contrasto ecografici di I e II generazione, classificati in base al gas che li costituisce (azoto, perfluorocarbonio o esafluoruro di zolfo). Entrambi sono dotati di un eccellente profilo di sicurezza con ridotta tossicità epatica, cerebrale e renale. L'eliminazione avviene per via respiratoria ed epatica e la mancanza di escrezione renale spiega l'assenza di nefrotossicità. L'ecocontrastografia si è dimostrata promettente nell'ambito della terapia genica e biologica. Infatti, sono state introdotte nuove sostanze, tra cui liposomi, micelle e nanoparticelle di perfluorocarbonio. Una delle applicazioni future dei liposomi riguarda la possibilità d'inserirvi l'ossido nitrico per trattare le complicanze dell'ipertensione arteriosa, lo Xenon dotato di un'azione protettiva nei confronti del sistema nervoso centrale, o la doxorubicina in caso di carcinoma mammario o neoplasie epatiche. Anche le micelle hanno dimostrato azioni terapeutiche in campo oncologico. Infine, le nanoparticelle di perfluorocarbonio possono essere utilizzate sia in ambito oncologico sia nel trapianto di insule pancreatiche nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1.*

## DICHIARAZIONE DI CONFLITTO DI INTERESSI

Gli Autori dichiarano di non avere conflitto di interessi.

## CONTRIBUTI ECONOMICI AGLI AUTORI

Gli Autori dichiarano di non aver ricevuto sponsorizzazioni economiche per la preparazione dell'articolo.

## BIBLIOGRAFIA

- Gramiak R, Shah PM. Detection of intracardiac blood flow by pulsed echo-ranging ultrasound. *Radiology* 1971; 100: 415-8.
- Katlyar A, Sarkar K, Forsberg F. Modeling subharmonic response from contrast microbubbles as a function of ambient static pressure. *J Acoust Soc Am* 2011; 129: 2325-35.
- Bertolotto M, Catalano O. Contrast-enhanced ultrasound: past, present, and future. *Ultrasound Clinics* 2009; 4: 339-67.
- Voigt JU. Ultrasound molecular imaging. *Methods* 2009; 48: 92-7.
- Claudon M, Cosgrove D, Albrecht T, et al. Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) - update 2008. *Ultraschall Med* 2008; 29: 28-44.
- Dijkmans PA, Juffermans LJ, Musters RJ, et al. Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *Eur J Echocardiogr* 2004; 5: 245-56.
- Sboros V. Response of contrast agents to ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1117-36.
- Piscaglia F, Bolondi L. The safety of Sonovue in abdominal applications: retrospective analysis of 23188 investigations. *Ultrasound Med Biol* 2006; 32: 1369-75.
- Piscaglia F, Nolsøe C, Dietrich CF, et al. The EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical practice of contrast enhanced ultrasound (ceus): update 2011 on non-hepatic applications. *Ultraschall Med* 2012; 33: 33-59.
- Kang ST, Yeh CK. Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design. *Chang Gung Med J* 2012; 35: 125-39.
- Wilson SR, Burns PN. Microbubble-enhanced US in body imaging: what role? *Radiology* 2010; 257: 24-39.
- Quaia E. Contrast-specific ultrasound techniques. *Radiol Med*

- 2007; 112: 473-90.
13. Yin T, Wang P, Zheng R, et al. Nanobubbles for enhanced ultrasound imaging of tumors. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 895-904.
  14. Chadderdon SM, Kaul S. Molecular imaging with contrast enhanced ultrasound. *J Nucl Cardiol* 2010; 17: 667-77.
  15. Lancellotti P, Piérard LA, Voigt JU, et al. EuroEcho and other imaging modalities: highlights. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2012; 13: 127-31.
  16. Martz TD, Bardin D, Sheeran PS, et al. Microfluidic generation of acoustically active nanodroplets. *Small* 2012; 8: 1876-9.
  17. Kaufmann BA, Lindner JR. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 11-6.
  18. Eisenbrey JR, Forsberg F. Contrast-enhanced ultrasound for molecular imaging of angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: S138-46.
  19. Herget-Rosenthal S. Imaging techniques in the management of chronic kidney disease: current developments and future perspectives. *Semin Nephrol* 2011; 31: 283-90.
  20. van der Veldt AA, Meijerink MR, van den Eertwegh AJ, et al. Targeted therapies in renal cell cancer: recent developments in imaging. *Target Oncol* 2010; 5: 95-112.
  21. Glaudemans AW, Slart RH, Bozzao A, et al. Molecular imaging in atherosclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; 37: 2381-97.
  22. Piedra M, Allroggen A, Lindner JR. Molecular imaging with targeted contrast ultrasound. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27: 66-74.
  23. Kiessling F, Huppert J, Palmowski M. Functional and molecular ultrasound imaging: concepts and contrast agents. *Curr Med Chem* 2009; 16: 627-42.
  24. Talu E, Hettiarachchi K, Zhao S, et al. Tailoring the size distribution of ultrasound contrast agents: possible method for improving sensitivity in molecular imaging. *Mol Imaging* 2007; 6: 384-92.
  25. Cavalieri F, Zhou M, Ashokkumar M. The design of multifunctional microbubbles for ultrasound image-guided cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2010; 10: 1198-210.
  26. Klibanov AL. Preparation of targeted microbubbles: ultrasound contrast agents for molecular imaging. *Med Biol Eng Comput* 2009; 47: 875-82.
  27. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol* 2010; 65: 500-16.
  28. O' Donoghue PM, McSweeney SE, Jhaveri K. Genitourinary imaging: current and emerging applications. *J Postgrad Med* 2010; 56: 131-9.
  29. Sheffield P, Trehan A, Boyd B, et al. Microbubbles as ultrasound contrast agents and in targeted drug delivery. *Crit Rev Biomed Eng* 2008; 36: 225-55.
  30. Kiessling F, Fokong S, Koczera P, et al. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *J Nucl Med* 2012; 53: 345-8.
  31. Sheeran PS, Dayton PA. Phase-change contrast agents for imaging and therapy. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 2152-65.
  32. Sheeran PS, Luois SH, Mullin LB, et al. Design of ultrasonically-activatable nanoparticles using low boiling point perfluorocarbons. *Biomaterials* 2012; 33: 3262-9.
  33. Sheeran PS, Wong VP, Luois S, et al. Decafluorobutane as a phase-change contrast agent for low-energy extravascular ultrasonic imaging. *Ultrasound Med Biol* 2011; 37: 1518-30.
  34. Feingold S, Gessner R, Guracar IM, et al. Quantitative volumetric perfusion mapping of the microvasculature using contrast ultrasound. *Invest Radiol* 2010; 45: 669-74.
  35. Gessner R, Dayton PA. Advances in molecular imaging with ultrasound. *Mol Imaging* 2010; 9: 117-27.
  36. Kircher MF, Willmann JK. Molecular Body Imaging: MR Imaging, CT, and US. Part II. Applications. *Radiology* 2012; 264: 349-68.
  37. Kircher MF, Willmann JK. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. part I. principles. *Radiology* 2012; 263: 633-43.
  38. Deshpande N, Needles A, Willmann JK. Molecular ultrasound imaging: current status and future directions. *Clin Radiol* 2010; 65: 567-81.