



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

**Caratterizzazione tramite SPM12 delle lesioni cerebrali
da sclerosi multipla: analisi di un caso clinico**

**Characterization by SPM12 of multiple sclerosis brain lesions:
a case report**

Relatore:

Prof.ssa Laura Burattini

Tesi di Laurea di:

Chiara Bentifece

Correlatori:

Dott.ssa Ilaria Marcantoni

Dott.ssa Selene Tomassini

Anno Accademico 2022/2023

*C'è una forza motrice più forte del vapore,
dell'elettricità e dell'energia atomica: la volontà.*

~ Albert Einstein ~

Abstract

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa che colpisce il sistema nervoso centrale. Il sistema immunitario danneggia la mielina che avvolge le fibre nervose, provocando delle lesioni che prendono il nome di placche. Le placche evolvono da una fase infiammatoria iniziale ad una fase cronica in cui l'aspetto è simile a quello delle cicatrici, dette appunto sclerosi. In base al numero, alle dimensioni ed alla localizzazione delle lesioni, la malattia può presentarsi in diverse forme, dalla meno alla più grave. Una diagnosi veloce ed accurata è molto importante, in quanto permette di scegliere la terapia più efficace per il singolo paziente. Uno degli strumenti più potenti nella diagnosi e nello studio del decorso della malattia è la risonanza magnetica (RM). Nella SM, una RM con contrasto permette di visualizzare meglio le lesioni, aiutando il clinico nella diagnosi e nella scelta della terapia. In questo contesto si colloca la necessità di disporre di un metodo che riesca ad individuare le lesioni con precisione. Nella letteratura sono stati analizzati e studiati diversi software per la segmentazione semi-automatica delle lesioni, mostrandosi sì accurati ma non senza limitazioni. La presente tesi si pone due obiettivi: (1) segmentare semi-automaticamente i tessuti cerebrali e le lesioni dovute dalla SM, (2) valutare comparativamente due RM consecutive dello stesso paziente. Come software è stato scelto SPM, in particolare la sua versione più recente SPM12, ed è stato utilizzato su tre RM di un paziente con diagnosi di SM recidiva-remittente. Nello specifico, per segmentare le lesioni è stato utilizzato il toolbox LST di SPM. Esso si è mostrato affidabile nel rilevamento e nella localizzazione delle lesioni, fornendone il numero ed il volume corrispondente per ogni RM. È stato quindi possibile effettuare un'analisi comparativa tra due RM successive e consecutive. In questo modo, si è potuto valutare il decorso della malattia tra le due RM in termini di volume, numero e localizzazione delle lesioni. È importante evidenziare il ruolo essenziale dell'analisi condotta in questa tesi nel contesto della comprensione e della gestione della malattia. La precisione nella valutazione e quantificazione delle lesioni attraverso la segmentazione, infatti, consente ai clinici di prendere decisioni più accurate sulla scelta della terapia, aspetto molto significativo, considerando che al momento non esiste una cura definitiva.

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1	1
Sistema nervoso	1
1.1 Introduzione al sistema nervoso	1
1.2 Unità funzionali: i neuroni	2
1.3 Mielina e trasmissione del segnale	2
1.4 Sistema nervoso centrale: la sostanza bianca	7
Capitolo 2	10
Sclerosi multipla	10
2.1 Descrizione della malattia	10
2.2 Studio delle lesioni	12
2.3 Tipologie	12
2.4 Diagnosi	13
2.5 Terapia	14
Capitolo 3	16
Risonanza magnetica	16
3.1 Principio di funzionamento	16
3.2 Sequenze di eccitazione	18
3.3 Risonanza magnetica con contrasto	21
Capitolo 4	23
Stato dell'arte	23
4.1 Principali software di segmentazione	23
4.2 Metodologia	25
4.3 Risultati	25
4.3.1 Chunjie G et al. (2018)	29
4.3.2 Valverde S et al. (2015)	35
4.3.3 Chard DT et al. (2010)	39
4.3.4 Rummel C et al. (2018)	41
4.3.5 Cabezas M et al. (2014)	42
4.4 Discussione e conclusioni	46
Capitolo 5	48
Caratterizzazione tramite SPM12 delle lesioni cerebrali da sclerosi multipla: analisi di un caso clinico	48
5.1 Introduzione a statistical parametric mapping	48

5.2 Dati.....	49
5.3 Metodologia.....	49
5.3.1 Processamento delle immagini tramite software	54
5.3.1.1 Segmentazione dei tessuti.....	56
5.3.1.2 Segmentazione delle lesioni.....	60
5.3.2 Valutazione comparativa delle immagini.....	66
5.4 Risultati	66
5.4.1 Risultati relativi al processamento delle immagini tramite software.....	66
5.4.2 Risultati relativi alla valutazione comparativa delle immagini.....	69
5.5 Discussione dei risultati.....	71
Conclusione	II
Bibliografia.....	III
Sitografia	VI
Ringraziamenti	VIII

Introduzione

La sclerosi multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa del sistema nervoso centrale (SNC) in cui il sistema immunitario attacca il SNC, per questo rientra tra le malattie autoimmuni. Essa viene definita come una malattia infiammatoria e demielinizzante; il sistema immunitario, infatti, danneggia la mielina che avvolge le fibre nervose, provocando delle lesioni che prendono il nome di placche. Le placche evolvono da una fase infiammatoria iniziale ad una fase cronica in cui l'aspetto è simile a quello delle cicatrici, dette appunto sclerosi. La SM, di cui ancora non è stata trovata una cura, è una malattia che colpisce fortemente i giovani e può condurre anche alla disabilità. I sintomi della SM sono svariati ed influenzano fortemente la qualità della vita dei pazienti, non solo fisicamente ma anche psicologicamente.

Poiché non esiste una cura definitiva, ogni paziente è sottoposto ad una specifica terapia scelta dai medici sulla base della personale situazione clinica attraverso la valutazione e la quantificazione delle lesioni, permettendo così di scegliere la terapia più adeguata possibile. È possibile capire quindi come lo studio delle lesioni sia di fondamentale importanza per comprendere al meglio la malattia.

In questo contesto, la presente tesi si pone due obiettivi: il primo consiste nella segmentazione dei tessuti cerebrali e nell'identificare e segmentare le lesioni causate dalla SM da una scansione di risonanza magnetica (RM), attraverso l'utilizzo di un software semi-automatico, permettendo di distinguerle dal tessuto circostante e quindi di localizzarle meglio. Il secondo obiettivo, invece, consiste nella valutazione comparativa, sia quantitativa sia qualitativa, dell'entità delle lesioni tra due scansioni di RM successive, al fine di analizzare il decorso della malattia.

Capitolo 1

Sistema nervoso

1.1 Introduzione al sistema nervoso

Il sistema nervoso è uno degli apparati che si occupa del mantenimento della coordinazione interna del corpo umano. Esso si occupa di trasmettere i messaggi da cellula a cellula avvalendosi di segnali elettrochimici. Questo suo compito di coordinatore lo svolge a tre livelli fondamentali: in un primo livello le informazioni vengono raccolte tramite gli organi di senso e le terminazioni nervose sensitive semplici che, successivamente, trasmettono messaggi codificati al midollo spinale e all'encefalo; questi ultimi, nel secondo livello, elaborano le informazioni e determinano quale risposta sia meglio adatta alle circostanze. Infine, nel terzo livello, per formulare le risposte, il midollo spinale e l'encefalo si occupano di inviare i comandi a ghiandole e muscoli [1].

Il sistema nervoso si divide in: sistema nervoso centrale costituito dal midollo spinale ed encefalo, e sistema nervoso periferico (SNP) costituito dai nervi e gangli (Fig.1.1) [1]. Per lo scopo di questa tesi verrà approfondito soltanto il SNC.

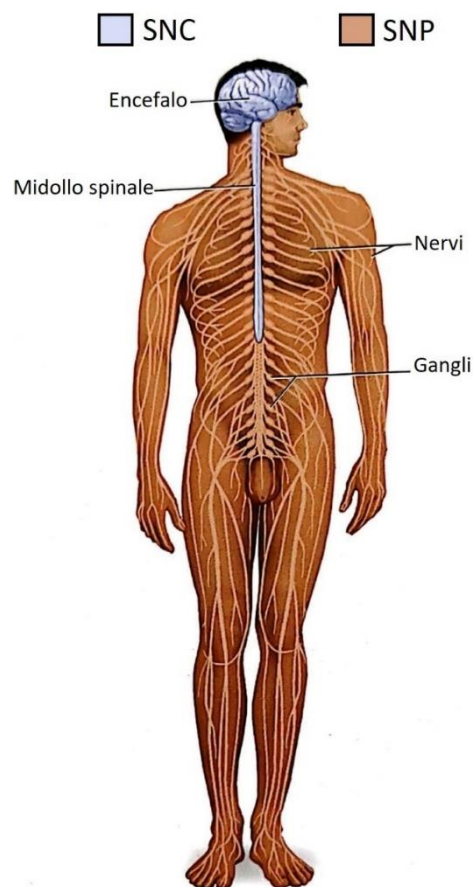


Fig. 1.1: Sistema nervoso [1].

1.2 Unità funzionali: i neuroni

I neuroni rappresentano l'unità funzionale del sistema nervoso, la loro funzione principale è quella di svolgere un ruolo comunicativo nel sistema. Essi presentano tre proprietà fondamentali:

- eccitabilità: rappresenta la capacità delle cellule di rispondere a stimoli;
- conducibilità: rispondendo agli stimoli, i neuroni generano dei segnali elettrici che vengono trasmessi velocemente ad altre cellule;
- secrezione: il neurone, una volta raggiunta la terminazione di una fibra nervosa, secerne un neurotrasmettitore chimico che, dopo aver attraversato la fessura sinaptica, stimola la cellula vicina.

Per quanto riguarda la struttura, un neurone è costituito da: un corpo cellulare chiamato soma, dai dendriti (sito principale per la ricezione dei segnali), e dall'assone che conduce gli impulsi. I neuroni sono supportati da cellule che prendono il nome di cellule gliali, esse aiutano i neuroni nella loro funzione e li proteggono [1]. Il prolungamento del neurone prende il nome di fibra nervosa, ed è costituito dall'assone e dalle guaine che lo rivestono. Le fibre nervose si distinguono in fibre amieliniche e fibre mieliniche, a seconda che sia presente o meno una guaina chiamata guaina mielinica o mielina [5].

1.3 Mielina e trasmissione del segnale

Il termine mielina fu coniato da Rudolf Virchow nel 1854, e deriva dalla parola greca 'myelos' il cui significato è 'midollo' che stava ad indicare la struttura particolarmente abbondante nel nucleo del cervello. Egli ipotizzò che la mielina fosse secreta dai neuroni ed agisse come una massa isolante. Un secolo più tardi, le colorazioni istologiche di Pio Del Rio Hortega e di Wilder Penfield dimostrarono che la mielina non è di origine neuronale, bensì è formata da oligodendrociti, mentre Betty Ben Geren dimostrò che la mielina è un'estensione membranosa continua delle cellule di Schwann. Gli oligodendrociti generano fino ad 80 guaine mieliniche differenti al fine di favorire una rapida conduzione saltatoria tra vari nodi, chiamati nodi di Ranvier. Quest'ultima si riteneva essere l'unica funzione della mielina; in realtà con il passare del tempo si è scoperto che essa ricopre molti più ruoli, come ad esempio per i cambiamenti plastici degli oligodendrociti che formano la mielina stessa e per un supporto metabolico fornito ai neuroni. Questo aspetto è molto importante per capire al meglio che ruolo ricopre la mielina in diverse patologie neurologiche [15].

La mielina è uno strato isolante che avvolge le fibre nervose. Essa è formata da cellule gliali che, nel SNC sono oligodendrociti, mentre nel SNP sono cellule di Schwann. Per quanto riguarda la sua composizione, essa consiste di circa il 20% di proteine e 80% di lipidi. Essa fornisce un colore bianco lucido ad alcune zone del tessuto nervoso, come per esempio alla sostanza bianca del midollo spinale e dell'encefalo [1].

Il processo di produzione di mielina prende il nome di mielinizzazione: nel SNP questo processo prevede che una cellula di Schwann si avvolga a spirale attorno alla fibra nervosa (dall'interno verso l'esterno), formando una serie di strati che costituiscono la membrana mielinica; nel SNC invece, l'oligodendrocita non può avvolgersi allo stesso modo di una cellula di Schwann, in quanto esso riveste non una singola fibra nervosa, bensì molte più fibre che si trovano nelle vicinanze. Esso quindi si avvolge attorno agli assoni dei vari neuroni dall'esterno verso l'interno. Poiché una fibra nervosa risulta essere più lunga rispetto alle cellule gliali (sia nel SNP che nel SNC), è necessario che molte di queste ricoprano una singola fibra nervosa. Per questo motivo la guaina mielinica è segmentata: i segmenti rivestiti da mielina prendono il nome di internodi, mentre gli intervalli tra i vari segmenti si chiamano nodi di Ranvier (Fig.1.2) [1].

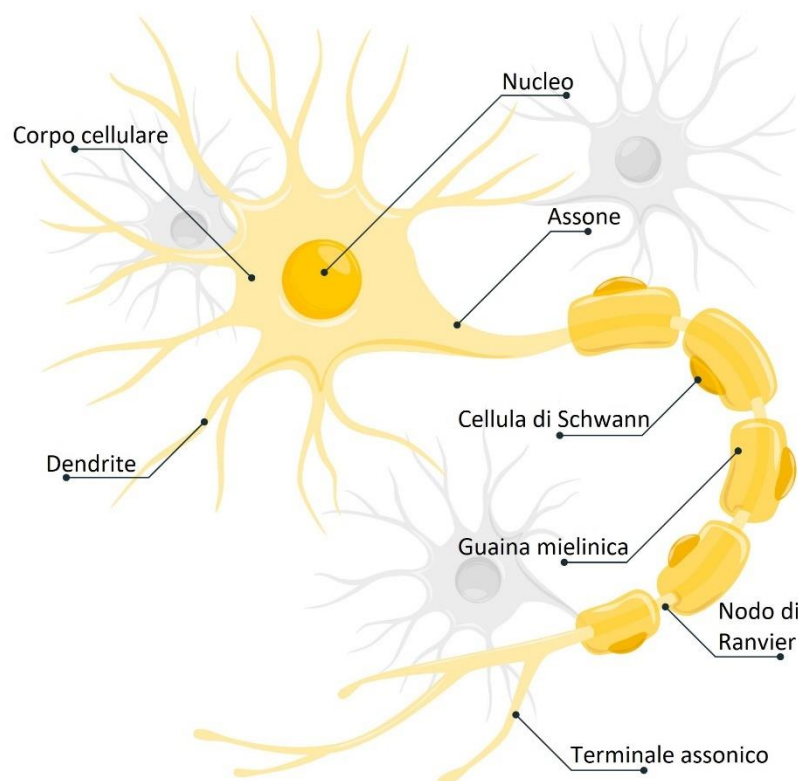


Fig.1.2: Neurone con assone ricoperto da mielina {4}.

La presenza o meno di mielina insieme al diametro della fibra nervosa influisce la conduzione del segnale. La conduzione del segnale avviene lungo la superficie esterna della fibra nervosa, fibre con un diametro elevato conducono i segnali più velocemente in quanto hanno un'area di superficie più estesa. La mielina conferisce ulteriore velocità alla conduzione del segnale, questo è molto importante quando si tratta di inviare comandi motori a muscoli scheletrici e per segnali sensitivi per la vista e l'equilibrio [1].

L'isolamento elettrico, che costituisce la proprietà biofisica più importante della mielina, è conferito dai lipidi; le proteine invece rivestono un ruolo molto importante per quanto riguarda la formazione e/o la stabilità del rivestimento mielinico. Nonostante durante il processo di mielinizzazione il citoplasma delle cellule gliali è progressivamente estruso (attraverso un processo di compattazione), una piccola parte di esso sopravvive e si colloca in tre zone del manicotto mielinico: nei bordi della guaina mielinica, nell'ultimo giro a contatto con il neurone e nel giro più esterno. Questa piccola quantità di citoplasma permette di mantenere il trofismo (nutrizione) della guaina fino agli strati più interni, attraverso un processo di continuo ricircolo del citoplasma stesso [5].

Il processo di formazione della mielina suddivide l'assone in zone differenti dal punto di vista funzionale: segmento internodale (o internodo), nodi di Ranvier, paranodo e juxtaparanodo (Fig.1.3). Il segmento internodale è quella parte di assone che si trova a diretto contatto con la mielina compatta: esso è elettricamente isolato dall'ambiente circostante grazie al manicotto mielinico; questo fa sì che in questo segmento la conduzione del potenziale elettrico avvenga come in un cavo. I nodi di Ranvier invece, sono quelle zone che si interpongono tra un segmento internodale e l'altro e sono rivestite dai prolungamenti delle cellule di Schwann (nel SNP) oppure da un prolungamento di un astrocita perinodale (nel SNC). Nei nodi di Ranvier, vi è un'alta concentrazione di canali ionici sodio (Na^+) e potassio (K^+) voltaggio-dipendenti nella membrana dell'assone; tali canali, consentono la conduzione saltatoria da un nodo ai 4÷7 nodi successivi attraverso una rigenerazione del potenziale d'azione. Questo si spiega dall'elevato numero di nodi per unità di lunghezza dell'assone, con una frequenza circa tre volte superiore a quella necessaria per rigenerare in maniera efficace il potenziale. Le ultime due zone (il paranodo e lo juxtaparanodo) si collocano tra il nodo di Ranvier ed il segmento internodale. La zona paranodale è costituita da sistemi giunzionali cellula-cellula chiamati 'giunzioni settate' che svolgono tre funzioni:

- favorire la rigenerazione del potenziale attraverso la formazione di un blocco alla diffusione di ioni verso l'assone mielinizzato;
- rappresentare un ancoraggio per la mielina periferica del segmento internodale per impedire lo slaminamento;

- costituire una barriera per impedire la diffusione delle proteine assionali e mantenerle compartimentalizzate {5}.

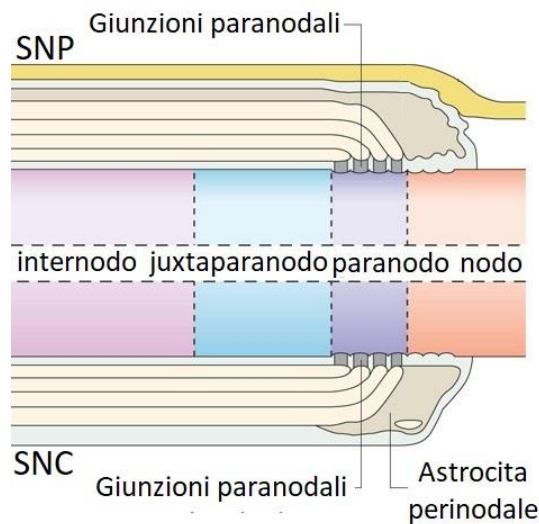


Fig.1.3: Suddivisione dell'assone {5}.

La mielinizzazione avviene secondo una sequenza topografica e cronologica relativamente fissa: il processo inizia nelle aree che riguardano l'omeostasi di base, continua nelle regioni riguardanti task più complessi, per poi concludersi nelle aree necessarie per le funzioni intellettuali più elevate. Questo processo, di solito, procede dal distale al prossimale all'interno di una via neuronale, e, dal centro verso i poli all'interno di una regione cerebrale. Di solito, i sistemi di fibre che si occupano della ricezione degli input sensoriali vengono mielinizzati prima rispetto ai sistemi di fibre che si occupano della trasmissione degli output motori. È possibile capire quindi, che, la mielinizzazione, non solo avanza rispettando un ordine basato sulla crescente complessità delle funzioni del sistema nervoso, ma anche che gli assoni delle regioni che vengono mielinizzate prima, vengono mielinizzati in maniera più rapida e completa. Un esempio è fornito dal nervo ottico e dalla corteccia frontale: mentre gli assoni del primo appaiono tutti mielinizzati rapidamente e precocemente, gli assoni della seconda sono soggetti ad una mielinizzazione lenta, tardiva ed incompleta [15]

Nella corteccia però, oltre ad assoni mielinizzati e non, ci sono anche assoni parzialmente mielinizzati. È lecito domandarsi quindi in che modo gli oligodendrociti selezionino gli assoni (e loro porzioni) da mielinizzare. Sono stati condotti degli esperimenti in cui è stato possibile notare la capacità degli oligodendrociti di rivestire e/o avvolgere la mielina intorno a substrati polimerici o in vetro: questi esperimenti hanno permesso di capire come le dimensioni di un assone potessero influenzare il processo di regolazione della mielinizzazione. In particolare, è possibile dire che: gli assoni con un largo calibro e con un diametro di almeno $1\mu\text{m}$, sono i primi ad essere mielinizzati e la loro mielinizzazione è completa; assoni con un diametro pari o minore di $0.2\mu\text{m}$ sono completamente

non mielinizzati. Tale meccanismo può essere spiegato dall'incapacità della mielina di piegarsi oltre una certa curvatura, per questo l'avvolgimento con un diametro piccolo è più difficoltoso [15].

Ovviamente il diametro non può essere l'unico fattore che influenza il processo di mielinizzazione; gli oligodendrociti, infatti, campionano di continuo l'ambiente in cui si trovano tramite dei processi dinamici, in cui ci sono molecole di tipo sensoriale che però non sono state ancora identificate. Queste molecole interagiscono con le membrane, e sono in grado di attuare un allontanamento (ritiro), oppure di stabilizzare il contatto una volta individuato l'assone appropriato [15]

Betty Ben Geren (citata nel paragrafo 1.3) riuscì a dimostrare la dipendenza che c'è tra lo spessore della guaina mielinica ed il numero delle lamelle concentriche, e che più giovane è la fibra, minore è il numero di strati. Bunge (e altri) invece, dimostrarono che la mielina è responsabile dello spostamento delle cellule di Schwann. Questi studi hanno stabilito il modello 'rotolo di gelatina o strisciante sul tappeto' dall'inglese 'jelly roll or carpet crawler' con riferimento all'avvolgimento a spirale nel SNP. Per quanto riguarda il SNC, invece, l'associazione tra oligodendrociti e mielina è di difficile osservazione; il laboratorio di Bunge è riuscito a scoprire che un oligodendrocita riesce a generare più internodi di mielina avvolti attorno a differenti assoni. Sono stati proposti diversi modelli per spiegare ciò: un modello si basa sul fatto che la fusione delle membrane intracitoplasmatiche conduca alla formazione della mielina, oppure sul fatto che essa si generi attraverso la fusione dei processi gliali provenienti da uno o più oligodendrociti differenti. Un altro modello, invece, prevede che l'avvolgimento della mielina avvenga come un croissant: aggiunta di nuovi strati sopra a quelli interni. Esiste anche un altro modello, chiamato modello yo-yo, che vede l'avvolgimento della mielina come un movimento a bobina (o a vite) attorno all'assone (simile ad una spirale). L'esistenza di tutti questi modelli è dovuta principalmente alla complicata struttura che la mielina assume nel SNC, ma è anche legata al numero di strati che la caratterizzano: infatti, mentre nel SNP il numero di strati è pressoché uniforme durante tutte le fasi della formazione, nel SNC questo numero varia procedendo lungo il segmento mielinizzato (varia cioè, lungo la sua lunghezza) [15].

Combinando diverse tecniche come microscopia elettronica tridimensionale e congelamento ad alta pressione, è possibile studiare la struttura della mielina dallo sviluppo alla maturazione, in un volume sufficientemente grande. A tal proposito, esiste un modello che presenta delle caratteristiche comuni ai modelli precedentemente citati: questo modello prevede che la mielina cresca in direzione del nodo in un processo in cui essa avvolge il bordo anteriore della lingua interna attorno all'assone, tale avvolgimento avviene sotto la membrana precedentemente depositata (Fig.1.4). Il motivo a spirale precedentemente descritto è motivato dal fatto che ogni strato rimane sempre in stretto contatto con l'assone che sta avvolgendo, anche se ancora non è noto come gli strati rimangano fissati [15].

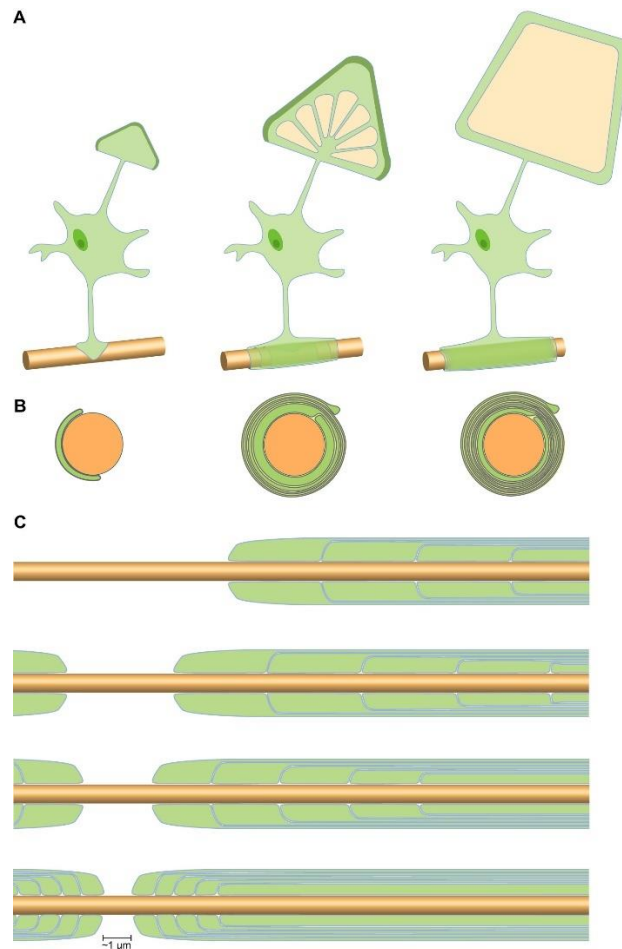


Fig.1.4: Modello di mielinizzazione nel SNC. A: viene mostrato un oligodendrocita in diverse fasi della mielinizzazione. Il pannello superiore mostra una guaina mielinica virtualmente srotolata, con le aree compatte mostrate in arancione e le aree non compatte in verde. B: sezioni trasversali corrispondenti sono raffigurate sotto l'assone. C: viene mostrata la vista longitudinale di un assone mielinizzato in diverse fasi del processo [15].

Come già specificato all'inizio del paragrafo, la mielina conferisce un colore bianco lucido alla sostanza bianca del midollo spinale e dell'encefalo.

1.4 Sistema nervoso centrale: la sostanza bianca

Il SNC è composto da midollo spinale ed encefalo. L'encefalo presenta quattro cavità chiamate ventricoli ed appare diviso in tre componenti: cervello, cervelletto e tronco encefalico (Fig.1.5). Il cervello costituisce l'83% del volume encefalico ed è diviso in due emisferi cerebrali separati da un'invaginazione molto profonda chiamata fessura longitudinale. Gli emisferi, sul fondo di questa fessura sono connessi dal corpo calloso, un fascio di fibre nervose. Il cervelletto occupa la fossa cranica posteriore ed è la seconda porzione più estesa dell'encefalo. Il tronco encefalico è definito come ciò che rimane dell'encefalo oltre il cervello e il cervelletto, esso è formato da: diencefalo, mesencefalo, ponte e midollo allungato [1].

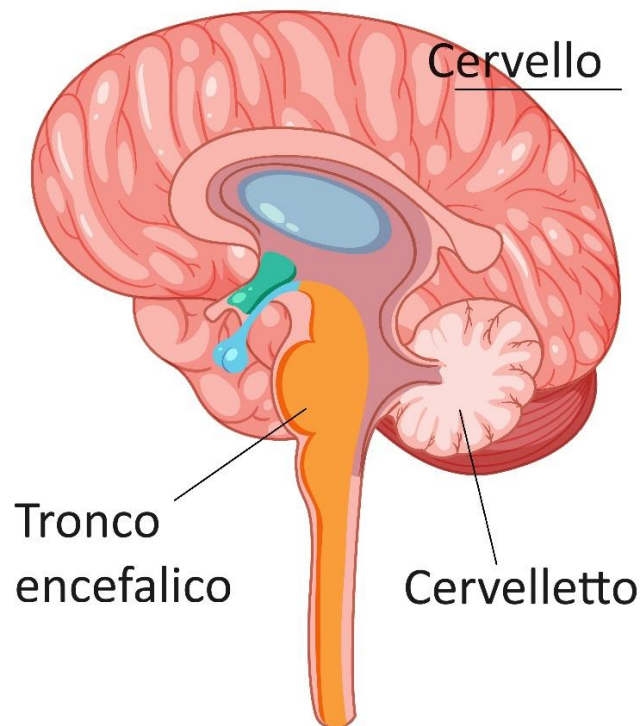


Fig. 1.5: Componenti encefalo: cervello, cervelletto e tronco encefalico [22].

Sia il midollo spinale che l'encefalo sono costituiti da due tipi di tessuto nervoso: sostanza grigia e sostanza bianca. Il loro nome deriva dal colore che assumono, infatti la sostanza grigia ha una colorazione scura in quanto presenta una scarsa quantità di mielina, mentre la sostanza bianca si presenta con una tonalità più chiara, essendo caratterizzata da un'alta quantità di mielina. Le regioni interessate dalla sostanza grigia rappresentano il luogo in cui si realizza l'integrazione sinaptica (elaborazione delle informazioni), la sostanza bianca invece è formata da fasci di assoni che hanno il compito di trasportare i segnali [1].

Nel midollo spinale, la sostanza bianca circonda la grigia, e fornisce delle vie di comunicazione tra i vari livelli del SNC attraverso dei fasci di assoni (sia ascendenti che discendenti) che attraversano il midollo spinale. Nell'encefalo invece, nella maggior parte dei casi la sostanza bianca si localizza profondamente alla sostanza grigia corticale. Come nel midollo spinale essa è composta da fasci che, in questo caso connettono una parte dell'encefalo all'altra e al midollo spinale [1].

I miliardi di neuroni che costituiscono il cervello, e i loro collegamenti (sinapsi) sono considerati il deposito della funzione cognitiva. Poiché circa metà del cervello umano è occupato dalla sostanza bianca, è ragionevole domandarsi in che modo l'analisi e la raccolta di questa sostanza potrebbe contribuire allo studio della cognizione. Le prove della neurologia clinica stanno dimostrando l'importante ruolo della sostanza bianca nell'organizzazione delle reti neurali distribuite che sono ora considerate come la base dei comportamenti umani evoluti [2].

Lo sviluppo della risonanza magnetica negli ultimi decenni ha permesso di studiare meglio la sostanza bianca, dimostrando come le sue lesioni disturbino la cognizione; essa, infatti ha permesso di capire come le differenze nella sua normale struttura siano correlate alle prestazioni in un'ampia varietà di funzioni cognitive. Infatti, la sostanza bianca è vista come responsabile del trasferimento delle informazioni, di conseguenza un suo danneggiamento si traduce in modo evidente nel rallentamento cognitivo. Le reti neurali sono organizzate in modo da mediare disturbi della cognizione come: linguaggio, memoria, attenzione, abilità visuospatiali e funzione esecutiva; essi dipendono dalla connettività strutturale fornita dai sistemi mielinizzati [2].

Una delle malattie, in cui il disturbo cognitivo è presente a seguito di lesioni della sostanza bianca è la sclerosi multipla: nei pazienti affetti da questa malattia, infatti, un certo livello di deficit cognitivo si manifesta nel 60% dei casi. Si parla di disturbi dell'attenzione, della memoria, del ragionamento e delle funzioni esecutive {1}.

Capitolo 2

Sclerosi multipla

2.1 Descrizione della malattia

La sclerosi multipla è una malattia neurodegenerativa del SNC in cui il sistema immunitario attacca il SNC, per questo rientra tra le malattie autoimmuni. Essa viene definita come una malattia infiammatoria e demielinizzante; il sistema immunitario, infatti, danneggia la mielina che avvolge le fibre nervose, provocando delle lesioni che prendono il nome di placche (Fig.2.1). Le placche evolvono da una fase infiammatoria iniziale ad una fase cronica in cui l'aspetto è simile a quello delle cicatrici, dette appunto sclerosi. La malattia si manifesta più comunemente tra i 20 e i 40 anni, e le persone stimate al mondo sono circa 2,8 milioni, di cui 1.200.000 in Europa e circa 133.000 in Italia. Inoltre, il numero di donne con SM è quasi il triplo rispetto agli uomini [2].

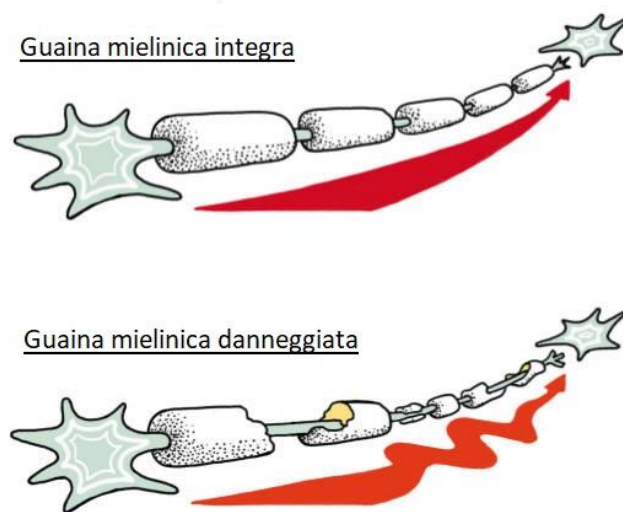


Fig. 2.1: Guaina mielinica integra e guaina mielinica danneggiata [3].

Ci sono pazienti con nessuna perdita neurologica, alcuni con sintomi occasionali, altri che invece peggiorano progressivamente. I sintomi della SM dipendono dalle regioni affette dalle lesioni, i più comuni sono: cecità mon oculare, diplopia, debolezza o paralisi, vertigini, sensazioni somatiche anomale. Questi sintomi sono dovuti al fatto che la perdita della mielina compromette la conduzione del potenziale d'azione, e l'anormale conduzione nervosa produce molti dei deficit che caratterizzano la malattia [3].

L'eziologia della malattia è ancora oggi sconosciuta, ma sono state fatte diverse ipotesi che riguardano tre fattori principali (Fig.2.2):

- fattori immunitari;
- fattori ambientali;
- genetica.

Il primo fattore è la causa più ipotizzata dai ricercatori: essi ipotizzano che ci sia un agente sconosciuto che inneschi e attivi i linfociti Th1 e Th17 i quali si attaccano all'endotelio dell'SNC, attraversano la barriera emato-encefalica, provocando un attacco immunitario. Per quanto riguarda i fattori ambientali, si è ipotizzato che una carenza di vitamina D possa rappresentare una causa per la predisposizione della popolazione colpita alle latitudini più elevate. Dal punto di vista genetico, c'è un rischio elevato in persone aventi parenti con SM; l'ereditarietà è stata stimata essere tra il 35% e il 75%, nonostante ciò, non esiste una forma mendeliana che lo dimostri [4].

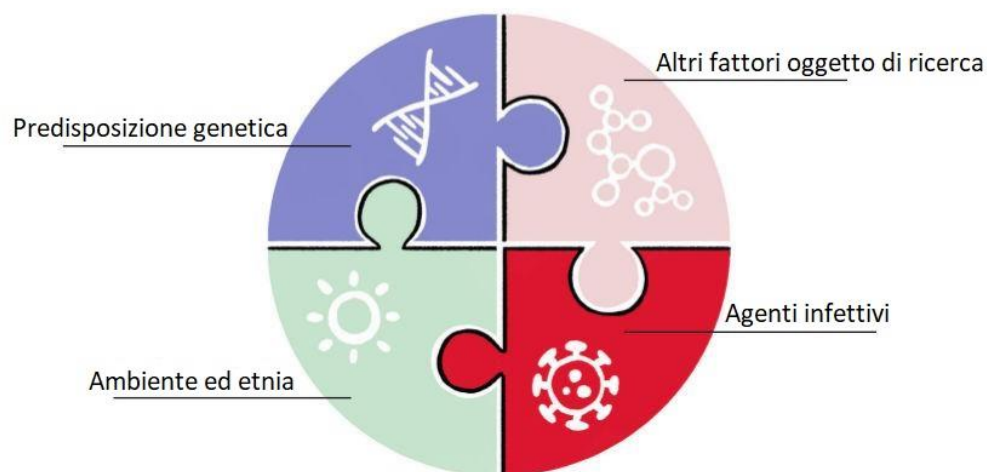


Fig. 2.2: Cause della SM {3}.

2.2 Studio delle lesioni

Le lesioni che caratterizzano questa malattia di solito sono di forma ovoidale o rotonda e il loro diametro varia da pochi millimetri a più di uno o due centimetri. Per soddisfare i criteri diagnostici di solito, esse dovrebbero essere di almeno 3 mm nel loro asse lungo, nonostante ciò, bisogna considerarne la topografia; alcune lesioni infatti sono considerate anormali anche se non soddisfano questo criterio. Generalmente, per evitare artefatti o iperintensità, le lesioni devono essere visibili su almeno due sezioni (immagini di taglio) consecutive; nelle acquisizioni con uno spessore della sezione maggiore però, lesioni più piccole potrebbero essere visibili su una sola sezione. Le lesioni, solitamente, si sviluppano in entrambi gli emisferi del cervello, ma nelle fasi iniziali la loro distribuzione appare leggermente asimmetrica [5].

Rispetto ad altri disturbi caratterizzati da lesioni della materia bianca, dove le lesioni possono interessare qualsiasi regione del SNC, nella SM esse interessano regioni specifiche, come: corpo calloso, zona infratentoriale (specialmente il ponte e il cervelletto), midollo spinale, zona periventricolare e iuxtacorticale [5].

2.3 Tipologie

È possibile classificare la malattia in diversi gruppi, in base al suo decorso:

- Recidiva-remittente (RR): dal 70 all'80% dei pazienti con la malattia presenta questo decorso, che mostrano: sintomi nuovi o ricorrenti coerenti con la malattia, questi sintomi durano dalle 24 alle 48 ore, e si sviluppano nel corso di giorni o settimane;
- Primaria progressiva (PP): i pazienti mostrano un graduale peggioramento, senza recidive;
- Secondaria progressiva (SP): caratterizzata da un peggioramento neurologico graduale dopo un decorso iniziale di RR, ci possono essere anche delle recidive sovrapposte;
- Progressiva-ricidivante (PR): nel 5% dei pazienti si ha un graduale peggioramento con recidive sovrapposte.

Altre tre categorie sono, a volte, incluse nello spettro della SM:

- Sindrome clinicamente isolata (CIS): spesso definita come un singolo episodio di demielinizzazione infiammatoria del SNC;
- Fulminante: caratterizzata da SM grave con multiple recidive ed una progressione rapida verso la disabilità;
- Benigna: caratterizzata da una disabilità complessiva lieve con rare ricadute.

La forma RR ha un'elevata prevalenza tra i pazienti affetti, per questo i clinici, quando si parla di SM descrivono più spesso questa forma. Spesso le ricadute si riprendono parzialmente o completamente

nel corso di mesi o settimane, molte volte senza trattamento. Nel tempo, i sintomi accumulati lasciati dalle ricadute senza un recupero totale, possono contribuire alla disabilità. La forma RR si diagnostica quando ci sono almeno due eventi infiammatori del SNC. Nonostante ci siano diversi criteri per diagnosticare la SM, il principio su cui si basa la diagnosi della forma RR ha portato alla definizione di episodi separati in tempo e spazio [4].

Una diagnosi veloce è molto importante, in quanto permette di scegliere una terapia in modo precoce. L'obiettivo del trattamento è quello di ridurre le recidive e l'attività della risonanza magnetica [4].

2.4 Diagnosi

In base ai loro sintomi, i pazienti inizialmente possono rivolgersi a qualsiasi dottore (per esempio il medico di base), se questi dottori sospettano la malattia, allora i pazienti vengono indirizzati al neurologo. È importante capire l'esordio e l'evoluzione dei sintomi correnti, ma anche di quelli precedenti; così facendo è possibile capire un attacco precedente non riconosciuto ed aiuta a stabilire la diagnosi e il corso della malattia. Quando un paziente presenta dei sintomi che suggeriscono la SM, una risonanza magnetica cerebrale è raccomandata, non solo per essere sicuri della diagnosi della SM ma anche per escludere altre malattie. L'80-90% di pazienti con SM presenta lesioni a livello del midollo spinale. Le lesioni che riguardano il cervello e il midollo spinale possono essere meglio individuate dopo la somministrazione di gadolinio utilizzato come mezzo di contrasto. Un altro esame che può aiutare nella diagnosi è l'esame del fluido cerebrospinale (CSF); esso non è sempre necessario ma può fornire prove a supporto della SM. La diagnosi della SM richiede che ci siano lesioni disseminate nel tempo e nello spazio, e che qualsiasi altra diagnosi riguardante altre malattie sia esclusa. Storicamente, la disseminazione nel tempo e nello spazio è stata basata su riscontri clinici, che richiedono due attacchi distinti con segni di due o più lesioni [6].

Da anni ormai, per la diagnosi della malattia si utilizzano i criteri di McDonald (in particolare la revisione del 2010, ma c'è anche la revisione del 2017); una schematizzazione di questi criteri è rappresentata nella tabella 2.1. Questi criteri permettono una diagnosi precoce della malattia; essi però sono utilizzati se la malattia è sospettata clinicamente, e non per differenziare la SM da un altro disturbo neurologico. Sono stati testati e sviluppati in pazienti con sintomi tipici della SM, e non devono essere utilizzati in pazienti che non presentano questo genere di sintomi [6].

Tabella 2.1: Tabella semplificata dei criteri di McDonald [7].

Numero di attacchi clinici	Numero di lesioni confermate clinicamente	Dati aggiuntivi necessari
≥ 2	≥ 2	Nessuno
≥ 2	1 (con altro attacco recente che coinvolge una lesione in una posizione anatomica distinta)	Nessuno
≥ 2	1	Disseminazione nello spazio dimostrata da un ulteriore attacco clinico in un diverso sito del SNC o da RM
1	≥ 2	Disseminazione nel tempo dimostrata da un ulteriore attacco clinico o da RM, oppure dimostrazione di bande oligoclonali nel fluido cerebrospinale
1	1	Disseminazione nello spazio dimostrata da un ulteriore attacco clinico in un diverso sito del SNC o da RM E Disseminazione nel tempo dimostrata da un ulteriore attacco clinico o da RM, oppure dimostrazione di bande oligoclonali nel fluido cerebrospinale

2.5 Terapia

Il trattamento della patologia comprende tre categorie: trattamento delle riacutizzazioni (aggravamento), terapie sintomatiche e rallentamento della progressione della malattia con terapie modificanti la malattia stessa (DMT) [8].

La gestione della malattia sta diventando sempre più complessa con lo sviluppo di nuove terapie modificanti che, come quelle meno recenti contribuiscono a ridurre l'accumulo delle lesioni, della frequenza e della gravità delle recidive. Per prevenire l'accumulo di disabilità, è consigliato iniziare la terapia all'inizio del decorso della malattia. Tuttavia, ci sono poche linee guida cliniche che aiutano i medici a scegliere il trattamento più adatto. Quest'ultimo dipende dalla diagnosi che viene fatta, e comprende tre aree: gestione delle recidive, modificazione della malattia e gestione dei sintomi [8].

Una pratica consolidata dai neurologi è il trattamento delle acutizzazioni con cicli a breve termine di agenti anti-infiammatori, come ad esempio corticosteroidi per via endovenosa od orale ad alte dosi. Nonostante questi non influiscano sul decorso della malattia, è stato dimostrato che essi risultino efficaci in quanto migliorano la funzione motoria, riducono i sintomi e accorciano i tempi di recupero dagli attacchi acuti [8].

Per quanto riguarda le terapie modificanti, esse si dividono in:

- DMT auto-iniettate: interferone beta - 1a, interferone beta – 1b, peginterferone beta – 1° e glatiramer acetato;
- DMT orali: dimetilfumarato, fingolimod e teriflunomide;
- agenti endovenosi: alemtuzumab, natalizumab, mitoxantrone.

La gestione dei sintomi mira a migliorarli o ad eliminarli, per permettere al paziente di condurre una vita il più normale possibile [8].

Uno degli strumenti più potenti non solo nella diagnosi della SM, ma anche nello studio del decorso della malattia, è la risonanza magnetica.

Capitolo 3

Risonanza magnetica

3.1 Principio di funzionamento

Tutti i materiali sono formati da nuclei che hanno al loro interno particelle che prendono il nome di neutroni e protoni. I nuclei che hanno un numero dispari di queste particelle sono caratterizzati da un momento magnetico, e da uno ‘spin’ (movimento rotatorio) nucleare. I momenti magnetici che compongono i materiali sono allineati in modo casuale ed hanno una magnetizzazione netta (M) nulla ($M=0$) [9].

Quando un materiale è posto in un campo magnetico le particelle tendono ad allinearsi con esso; lo stato usuale prevede che il campo di queste particelle cariche si allinei da N (polo nord del campo della singola particella) a S (polo sud del campo esterno). Nonostante ciò, è possibile in alcuni casi che le particelle non siano allineate da N a S ma da N a N, avendo allo stesso tempo la proprietà di tornare allo stato di energia inferiore (da N a S) a seguito di una leggera perturbazione, restituendo in questo modo energia al sistema. Si parla di stato di energia inferiore con riferimento all’allineamento da N a S (stato normale o stato di riposo) in quanto l’allineamento da N a N corrisponde ad uno stato ad alta energia (stato eccitato). In ogni istante, ci sono particelle allo stato di riposo e particelle allo stato eccitato. Questi due stati sono anche chiamati anche: stato parallelo e stato antiparallelo. Il rapporto tra particelle eccitate e particelle a riposo, è funzione della temperatura e della differenza di energia tra gli stati. La differenza di energia quantistica è data dalla (3.1), dove f è la frequenza e h è la costante di Planck.

$$\Delta E = hf \quad (3.1)$$

Indicando con N_n il numero di particelle allo stato normale, e con N_e il numero di particelle allo stato eccitato, con h la costante di Planck, f la frequenza, T la temperatura e k la costante di Boltzmann, è possibile calcolare il rapporto tra particelle normali e particelle eccitate (3.2).

$$N_n / N_e = e^{hf/kT} \quad (3.2)$$

È importante sottolineare che gli assi delle particelle rotanti non rimangono fissi nel campo magnetico ma compiono un moto di precessione (Fig.3.1) oppure oscillano come fa una trottola in un campo gravitazionale. Indicando con γ il rapporto giromagnetico (proprietà della particella) e con B il campo magnetico, è possibile calcolare la frequenza di Larmor ω , così chiamata in quanto ricavabile dalla relazione di Larmor (3.3) [10].

$$\omega = \gamma B \quad (3.3)$$

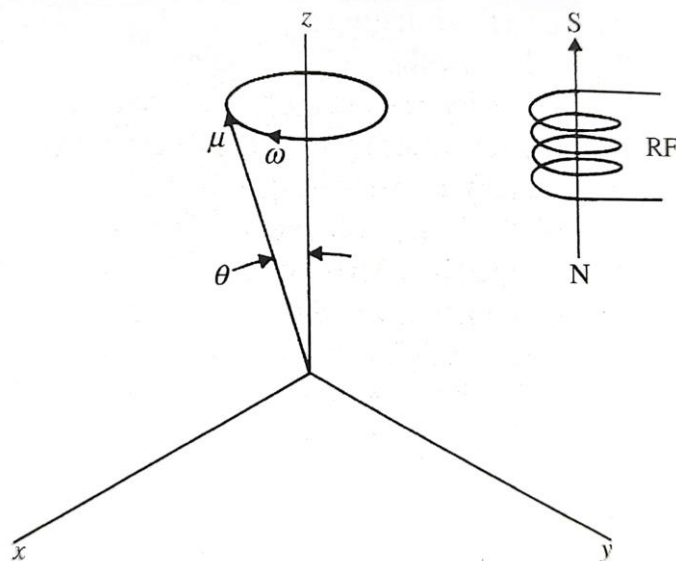


Fig. 3.1: Precessione delle particelle cariche in un campo magnetico [10].

La frequenza di Larmor è 2π volte la frequenza di precessione. Quando l'energia di radiofrequenza (RF) è applicata alla frequenza di Larmor, le particelle cambiano stato e si eccitano (assorbimento di energia); inoltre si ha un cambiamento anche dal punto di vista della rotazione degli assi. Le particelle, infatti esistono in uno spazio tridimensionale (asse x, asse y, asse z), ed è possibile assumere che il campo magnetico sia lungo l'asse z, lo stesso vale per la precessione. Se al sistema viene applicato un impulso di energia RF, le particelle assorbono energia con conseguente rotazione degli assi di precessione. Questi ultimi potrebbero ruotare di 90° oppure di 180° , ovvero fino al punto in cui invertono con precisione la direzione di allineamento. Poiché questo spostamento angolare è determinato dall'energia RF e dall'ampiezza dell'impulso, gli impulsi sono chiamati semplicemente impulsi RF a 90° o 180° . Dopo l'impulso le particelle tornano al rapporto di equilibrio ad una velocità che dipende dallo scambio di energia magnetica tra particelle eccitate e non eccitate e dall'accoppiamento termico al reticolo. Si parla di due tipi di decadimento energetico: decadimento spin-reticolo con costante di tempo T_1 , e decadimento spin-spin con costante di tempo T_2 . T_1 e T_2 dipendono dal tipo di particelle e dal materiale che le circonda, esse possono variare da qualche millisecondo a secondi; è possibile, inoltre determinare i loro valori facendo variare il posizionamento delle bobine del ricevitore, il tempo tra gli impulsi RF ed il loro tipo [10].

È possibile dare una spiegazione più approfondita alle costanti T_1 e T_2 :

- T_1 indica il tempo necessario ai nuclei perturbati per riallinearsi con la struttura reticolare del materiale, inoltre descrive il recupero della componente z di M (indicata con Z) al suo valore

di equilibrio che è lungo la direzione del campo applicato, per questo T1 è anche detto rilassamento longitudinale

- T2 indica il tempo necessario affinché gli spin in fase e perturbati si sfasino l'uno rispetto all'altro, esso è correlato al decadimento della componente di M nel piano X-Y la quale è perpendicolare alla direzione del campo magnetico applicato (o all'asse Z), per questo T1 è anche detto rilassamento trasversale [9].

T2 sarà sempre più piccolo rispetto a T1, questo perché il rilassamento longitudinale è più lento del rilassamento trasversale. Questi processi di rilassamento hanno un ruolo importante nella risonanza magnetica, le loro variazioni tra i diversi tipi di tessuto biologico, infatti, permettono di avere a disposizione un meccanismo di contrasto chiave per la discriminazione anatomica. Nel caso di una malattia, le differenze tra questi due tempi rispetto ai valori normali possono essere superiori al 100%, per questo la RM è un potente strumento per la diagnosi [9].

I principi fisici appena descritti sono alla base della RM e della formazione delle relative immagini.

3.2 Sequenze di eccitazione

Le sequenze di eccitazione utilizzate nella risonanza magnetica dipendono da diversi parametri, che si dividono in intrinseci ed estrinseci. I parametri intrinseci dipendono dalle caratteristiche del singolo tessuto, i più importanti sono: T1, T2, densità dei protoni e la velocità con cui essi si muovono; i parametri estrinseci invece sono quelli scelti dal personale durante l'esecuzione dell'esame, i più importanti sono: tempo di eco TE, tempo di ripetizione TR, campo visivo, spessore della porzione (fetta) e risoluzione. Il TE è definito come il tempo che intercorre tra l'applicazione dell'impulso a 90° ed il picco del segnale rilevato, mentre il TR è definito come il tempo tra due impulsi a 90°. Di seguito verranno riportate solamente alcune delle sequenze di eccitazione usate nella diagnosi di malattie del sistema nervoso [11].

Sequenze Spin Echo (SE): nell'ambito della neuroradiologia, sono le sequenze maggiormente utilizzate, con esse è possibile ottenere immagini T1-pesate, T2-pesate e PD-pesate (densità protonica) tramite due impulsi: un impulso a 90° che crea la magnetizzazione rilevabile, seguito da un impulso a 180° che la rifocalizza al TE, più numerosi impulsi del gradiente di campo magnetico che codificano la frequenza e la fase rispetto alla posizione spaziale. La scelta di TE o TR determina l'immagine risultante (tabella 3.1). Le immagini T1-pesate permettono di vedere molto bene i dettagli anatomici, mentre le immagini T2-pesate sono superiori per quanto riguarda la visualizzazione di condizioni patologiche [11].

Tabella 3.1: Immagini ottenute utilizzando le sequenze SE. I valori tra parentesi sono espressi in millisecondi [11].

IMMAGINI PESATE	TE	TR
T1-pesate	Breve (15-25)	Breve (500-700)
T2-pesate	Lungo (80-100)	Lungo (2500-3500)
PD-pesate	Breve (15-25)	Lungo (2500-3500)

Sequenze SE veloci: permettono di ottenere le stesse immagini ottenute con le SE ma in tempi ridotti, questo si ottiene codificando in fase un numero di echi durante un dato TR, piuttosto che un singolo eco come accade nelle SE; il numero degli echi codificati prende il nome di lunghezza dell'eco-treno (ETL) [11].

Sequenze di impulsi eco richiamati dal gradiente (GRE): queste sequenze sono più veloci per ottenere le immagini pesate; senza andare troppo nel dettaglio è possibile dire che l'aspetto principale che le differenzia dalle sequenze Spin Echo è la mancanza dell'impulso a 180° , inoltre il singolo impulso RF di queste sequenze è inferiore all'impulso a 90° usato nelle sequenze Spin Echo. Questa peculiarità permette una riduzione del tempo di scansione, ma può aumentare il rumore e gli artefatti a causa dei cambiamenti nella suscettibilità magnetica tra tessuti [11].

Sequenze FLAIR (Fluid-Attenuated Inversion Recovery): le sequenze FLAIR usano un ulteriore impulso RF applicato in uno specifico momento, ovvero il tempo di inversione prima della sequenza SE convenzionale. Il tempo di inversione e l'ampiezza dell'impulso sono scelti in modo tale che i fluidi come il liquido cerebrospinale sono fortemente attenuati, mentre il segnale proveniente dal tessuto cerebrale è minimamente colpito. Un vantaggio fondamentale di queste sequenze sta nella migliore visibilità delle lesioni periventricolari, come per esempio le placche della SM [11].

Sequenze di impulsi pesate in diffusione: con determinati impulsi di gradiente di campo aggiunti durante il tempo di eco, è possibile ottenere una sequenza SE che enfatizza l'effetto della diffusione. Di solito le immagini T2-pesate sono acquisite sia con gradienti di sensibilizzazione alla diffusione sia senza; rispetto all'immagine senza gradiente, nell'immagine sensibilizzata dalla diffusione i fluidi che hanno spin che si diffondono liberamente appaiono ipotesi [11].

La RM è considerata un'eccellente tecnica di imaging per studiare il cervello. Nella SM, attraverso la risonanza magnetica è possibile visualizzare al meglio le lesioni presenti; essa inoltre fornisce una valutazione quantitativa del carico lesionale e dell'attività infiammatoria [13].

La RM non solo è utilizzata come strumento per la diagnosi della malattia, ma permette anche di studiare il suo decorso e di monitorare l'efficacia di un determinato trattamento. La disseminazione nello spazio e nel tempo delle lesioni sono criteri fondamentali per la diagnosi, per questo identificarle al meglio possibile è molto importante; in particolare la loro segmentazione permette un'identificazione più precisa e più chiara [13].

I protocolli di risonanza magnetica più utilizzati per rilevare le lesioni sono sequenze di tipo: T1-pesate (T1-w), T2-pesate(T2-w), PD-pesate(PD-w, basate sulla densità dei protoni) e le T2-FLAIR. Le lesioni della SM mostrano le seguenti caratteristiche: ipointensità nelle sequenze T1-w ed iperintensità nelle sequenze T2-w, PD-w e T2-FLAIR, rispetto alle intensità normali. La Fig.3.2 mostra quattro immagini di un cervello con lesioni da sclerosi multipla [13].

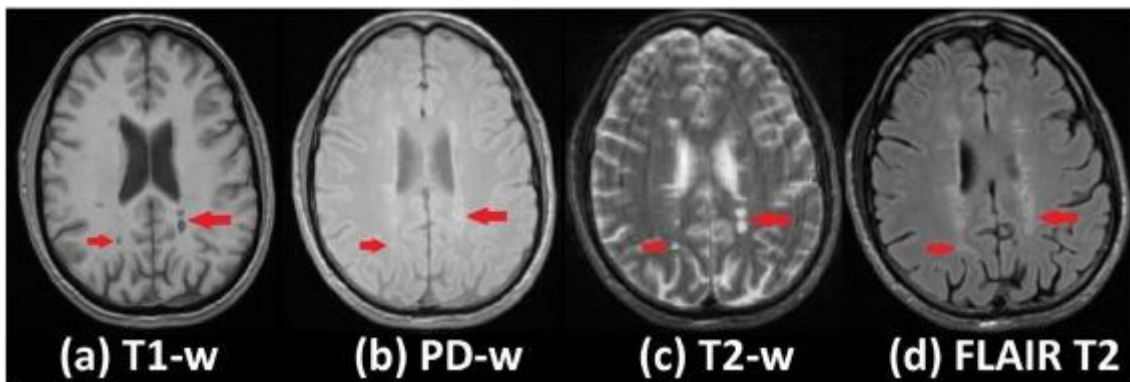


Fig. 3.2: (a) T1-w, (b) PD-w, (c) T2-w, (d) T2-FLAIR immagini di un cervello danneggiato. Le lesioni sono indicate dalle frecce rosse [13].

3.3 Risonanza magnetica con contrasto

Nella SM, la RM con contrasto può aiutare a visualizzare meglio le lesioni attive. Un agente di contrasto paramagnetico come il gadolinio, infatti, permette di ridurre il T1 dei tessuti con cui esso è in contatto; in questo modo è possibile far risaltare le zone raggiunte dalla sostanza {6}. In particolare, il gadolinio è utilizzato per ottenere una distinzione più netta tra lesioni vecchie e lesioni nuove, oltre a identificare le lesioni attive; esso viene somministrato per via endovenosa e viene espulso tramite le urine. Questo agente, però, potrebbe portare a degli effetti collaterali, ovvero potrebbe causare dei fastidi nel paziente a cui viene somministrato. Nel 2018, infatti, l'EMA (Agenzia Europea del Farmaco) ha scoperto che l'uso di mezzi di contrasto a base di gadolinio porta ad un deposito di piccole quantità della sostanza all'interno dei tessuti cerebrali. Nonostante non siano stati riscontrati danni nei pazienti a cui viene somministrato il gadolinio, l'EMA ha raccomandato di sospendere alcuni tipi di farmaci contenenti questo agente {7}.

A supporto di quanto affermato, è riportato di seguito lo studio condotto dall'Istituto di Neurologia e dall'Ospedale Nazionale per Neurologia e Neurochirurgia, situati a Londra.

L'uso del Gadolinio (Gd-DTPA) come mezzo di contrasto permette di aumentare l'affidabilità e la sensibilità nel riconoscere le lesioni attive. In questo studio sono stati analizzati tre metodi per aumentare ulteriormente la sensibilità: singola dose (0.1 mmol/Kg) confrontata con tripla dose (0.3 mmol/Kg) di gadolinio (Gd-DTPA), imaging con contrasto di trasferimento di magnetizzazione (MT) ed il terzo metodo consiste nell'introdurre un ritardo tra il primo e il secondo. L'imaging con contrasto di trasferimento di magnetizzazione si basa sulla diminuzione del segnale del tessuto cerebrale circostante; in un cervello normale questo si traduce in una diminuzione dell'intensità del segnale soprattutto nella materia bianca [12].

I soggetti dello studio sono 50 pazienti di età compresa tra i 24 e i 56 anni di cui: 14 con la forma recidiva-remittente, 7 con la forma benigna, 10 con la secondaria-progressiva, 16 con la primaria-progressiva, 3 con la sindrome clinicamente isolata [12].

Per quanto riguarda il protocollo seguito, le immagini sono state ottenute con un sistema superconduttore a 1.5 Tesla con una bobina ad inquadratura; le acquisizioni sono state fatte in due giorni separati: il primo giorno è stata somministrata tripla dose di Gd-DTPA (prima sessione), mentre il secondo giorno è stata somministrata una singola dose (seconda sessione). Durante una prima fase sono state acquisite le immagini T2 e PD pesate tramite l'utilizzo di una doppia sequenza di Spin Echo veloce, successivamente è stata inserita una cannula intravenosa collegata ad un tubo lavato con soluzione fisiologica normale. Sono state ottenute un paio di immagini T1-pesate con sequenze SE, acquisite separatamente senza (8min 11s) e con (10min 18s) MT. Successivamente il Gd-DTPA è

stato iniettato come bolo seguito da 5ml di soluzione fisiologica normale tramite il tubo precedentemente inserito. Sono state ottenute immagini T1-pesate identiche a quelle ottenute prima dell'iniezione, alternando MT e non-MT nell'arco di un'ora. Questo ha permesso di ottenere coppie di studi a tre punti temporali: presto (primi 20min), ritardo breve (20-40 min) e lungo ritardo (40-60min) per ciascuna dose di Gd-DTPA. Il miglioramento delle immagini è iniziato con o senza MT in pazienti alternati, inoltre tale sequenza si è mantenuta costante in entrambe le sessioni [12].

I pazienti non erano a conoscenza dell'iniezione di Gd-DTPA per la prima sessione, ed è stato chiesto loro se avessero manifestato qualche fastidio subito dopo l'acquisizione ed anche alla seconda sessione (dopo 24-72 ore). Prima di fare quest'ultima però, i pazienti che avevano mostrato dei fastidi od eventi avversi durante la prima sessione, sono stati messi a conoscenza della sostanza iniettata prima dell'inizio della seconda sessione. Tutte le immagini sono state valutate da un neuro-radiologo, il quale era ignaro dell'identità del paziente, di tutte le informazioni cliniche, della dose di Gd-DTPA e dei dettagli dell'immagine (ritardo e MT). Sono state valutate le immagini T1-pesate non migliorate e non-MT acquisite durante la seconda sessione, e nessun paziente ha mostrato un miglioramento residuo di Gd-DTPA, poi sono state valutate le immagini T1-pesate non migliorate preparate con MT, per vedere se era presente un segnale di lesione elevato che potrebbe rendere più difficoltoso lo studio con mezzo di contrasto. Questo è stato trovato in 3 pazienti ma riguardava una singola lesione, mentre in 5 pazienti la sostanza bianca circostante le lesioni appariva come un debole bordo luminoso; esso appariva anche in alcune immagini T1-pesate non-MT ma era meno evidente. Successivamente sono state studiate le immagini migliorate MT e non-MT, queste immagini sono state confrontate con le precedenti per mettere in evidenza le lesioni migliorative. Tutti i dati sono stati analizzati con il test di Wilcoxon [12].

Combinando i tre metodi proposti all'inizio del paragrafo, e considerando che 19 pazienti non hanno completato il protocollo, è stato possibile fare le seguenti considerazioni: la tripla dose di Gd-DTPA rispetto alla singola dose, ha mostrato un aumento del 75% nel numero di lesioni migliorative, la combinazione di MT e ritardo breve ha mostrato un aumento del 47% nel caso della singola dose, e del 27% nel caso di dose tripla. L'utilizzo di MT o del ritardo non combinati tra loro non ha mostrato significativi cambiamenti né con la singola né con la tripla dose. La combinazione migliore è risultata essere l'utilizzo di MT con ritardo lungo dopo la somministrazione di dose tripla di Gd-DTPA con rilevamento del 126% in più di lesioni rispetto alla somministrazione di dose singola. Queste considerazioni però, valgono per tutte le forme di malattia eccetto che per la primaria-progressiva [12].

Capitolo 4

Stato dell'arte

Prima dell'utilizzo del computer in radiologia, le lesioni erano identificate direttamente dal clinico, si parlava quindi di segmentazione manuale, ma questo risulta essere un processo tedioso. Inoltre, la segmentazione manuale è fortemente soggetta all'errore umano ed è influenzata dalla soggettività del singolo clinico; per questo per i neuroradiologi, raggiungere una tecnica che permetta una segmentazione automatica è molto importante. L'obiettivo finale è proprio quello di ottenere un metodo di segmentazione automatica che permetta un'elaborazione efficiente delle informazioni presenti all'interno di una risonanza magnetica. Nel corso degli anni, diversi metodi di segmentazione sono stati proposti, ma al giorno d'oggi ancora nessun metodo si è affermato; questo perché i diversi metodi incontrano ancora numerosi ostacoli. Una delle maggiori difficoltà è data dalla sovrapposizione delle distribuzioni di intensità delle lesioni con la sostanza grigia; dovuto al fatto che le lesioni sono eterogenee, ma anche alla risoluzione finita delle immagini e alla forma complicata dei tessuti cerebrali [13].

4.1 Principali software di segmentazione

In questo paragrafo verranno descritti i tre software principali utilizzati nella segmentazione. Verrà inoltre descritto in che modo essi vengono utilizzati nello studio riportato nel paragrafo 4.3.1.

FreeSurfer: FreeSurfer è un insieme di tool (strumenti) per l'analisi dei dati di neuroimaging che mette a disposizione una serie di algoritmi per studiare proprietà funzionali, di connessione e strutturali del cervello. Esso inizialmente nasceva come un pacchetto che mirava a generare rappresentazioni superficiali della corteccia cerebrale, successivamente si è evoluto in un pacchetto che crea automaticamente modelli della maggior parte delle strutture visibili macroscopicamente del cervello. Questa funzione è svolta a partire da immagini T1 pesate come input. Si parla di analisi automatizzata delle caratteristiche del cervello, come ad esempio: segmentazione, costruzione di modelli della corteccia cerebrale, mappatura dello spessore della materia grigia corticale. Si tratta di un software liberamente disponibile, è open source e funziona su una vasta gamma di hardware e software [32].

Nello studio riportato nel paragrafo 4.3.1: è stata utilizzata la versione 6.0.0. Come stima del volume cerebrale ottenuta da questo software è stata utilizzata la variabile "Brain Segmentation Volume Without Ventricles from Surf", che esclude il tronco encefalico. La stima del volume della sostanza grigia è stata ottenuta con la variabile "Total grey matter volume". Per quanto riguarda il volume della sostanza bianca, invece, una sua stima è stata ottenuta sommando diverse variabili: "cerebral

WM”, “cerebellar WM”, “brainstem” e “corpo callosum”. È importante notare che FreeSurfer segmenta specificatamente le ipointensità della sostanza bianca; inoltre, il volume cerebrale, della materia grigia e della materia bianca, sono stati divisi per “Estimated Total Intracranial Volume”, per scopi di normalizzazione [14].

FSL-SIENAX: la libreria software FMRIB (FSL) è un pacchetto software sviluppato dai membri dell’Oxford Centre for Functional MRI of the brain. Esso comprende strumenti di analisi delle immagini e di statistica per lo studio dei dati di neuroimaging. Esiste un apposito tool per la segmentazione dei tessuti cerebrali chiamato FAST (FMRIB Automated Segmentation Tool) [33].

Nello studio riportato nel paragrafo 4.3.1, è stato utilizzato il metodo SIENAX implementato in FSL 5.0, per una valutazione automatizzata dei volumi (cerebrale, sostanza grigia e sostanza bianca), con una normalizzazione automatica delle dimensioni della testa attraverso un fattore di scalatura apposito per ciascun soggetto. Il programma è stato eseguito con parametri di estrazione cerebrale ottimizzati “-B -f 0.1” [14].

SPM: SPM (Statistical Parametric Mapping) rappresenta l’implementazione dei concetti teorici di mappatura statistica parametrica, ed è reso liberamente disponibile alla comunità di neuroimaging per favorire la collaborazione tra i laboratori {8}. La mappatura statistica parametrica viene utilizzata per identificare determinati effetti delle regioni nei dati di neuroimaging allo scopo di caratterizzare i cambiamenti correlati alle malattie e l’anatomia funzionale {9}.

Nello studio riportato nel paragrafo 4.3.1 è stato utilizzato SPM12 per la valutazione automatizzata dei volumi della sostanza grigia (GM), della sostanza bianca (WM) e del volume totale del liquido cerebrospinale (CSF). Nell’SPM il volume cerebrale è definito come la somma dei volumi della sostanza grigia e bianca. Il volume intracranico, dato dalla somma dei tre volumi (GM, WM e CSF), è stato utilizzato per la normalizzazione. Inoltre, la segmentazione è stata eseguita utilizzando le impostazioni predefinite [14].

SPM-CAT: è un’estensione di SPM12, anche in questo caso (studio del paragrafo 4.3.1) la segmentazione è stata eseguita utilizzando le impostazioni predefinite, e per la normalizzazione è stato utilizzato il volume intracranico totale. La differenza con SPM12, è che in SPM-CAT il volume cerebrale è dato dalla somma dei volumi di WM e GM [14].

4.2 Metodologia

Poiché lo scopo di questa tesi è quello di fare una segmentazione delle lesioni attraverso l'utilizzo di uno dei software sopra citati, è stata utilizzata una query che contenesse come parole chiave: risonanza magnetica, sostanza bianca, sclerosi multipla, segmentazione, software; ed escludendo: segmentazione manuale, intelligenza artificiale, machine learning, deep learning, e studi antecedenti il 2000.

4.3 Risultati

Dei 17 articoli risultanti, 9 sono stati esclusi in base al titolo:

- [20]: Deficit delle reti cerebrali a riposo nei partecipanti con sclerosi multipla: evidenze dall'elettroencefalografia e dall'analisi grafica teorica;
- [21]: Precisione della sequenza 3D-FLAIR accelerata di rilevamento compresso per il rilevamento di placche MS a 3T;
- [22]: La trattografia anatomicamente vincolata facilita la ricostruzione delle fibre biologicamente plausibili della radiazione ottica nella SM;
- [23]: L'imaging a 7 T rivela un gradiente nella distribuzione delle lesioni del midollo spinale nella sclerosi multipla;
- [24]: Un sistema di misurazione semi-automatica delle anomalie dell'imaging a risonanza magnetica della diffusione e della perfusione cerebrale nei pazienti con sclerosi multipla basato sull'integrazione di procedure di coregistrazione e segmentazione dei tessuti;
- [25]: Perdita di volume cerebrale durante il primo anno di trattamento con interferone-beta nella sclerosi multipla: infiammazione iniziale e dinamiche del volume cerebrale regionale;
- [26]: Ricostruzione della corteccia cerebrale umana robusta alle lesioni della sostanza bianca: metodo e validazione;
- [27]: Istogrammi di trasferimento di magnetizzazione nelle sindromi clinicamente isolate suggestive di sclerosi multipla.
- [28]: Variabilità intra- e inter-scanner della volumetria basata sull'imaging a risonanza magnetica nella sclerosi multipla.

Questi 9 articoli sono stati esclusi in quanto non inerenti allo scopo di questa tesi.

Degli 8 rimanenti, due sono stati scartati in base all'obiettivo che si ponevano:

- [29]: l'obiettivo che si poneva era quello di studiare l'associazione tra i volumi cerebrali rilevati da RM e i punteggi cognitivi tramite valutazioni cognitive computerizzate in persone con SM;

- [30]: lo scopo di questo studio era presentare un algoritmo efficace per calcolare la trasformata di Stockwell polare discreta (PST), investigare le sue uniche caratteristiche multiscale e multi-orientazione ed esplorare potenziali nuove applicazioni, inclusa la riduzione del rumore e la segmentazione dei tessuti.

Un articolo [31] dei sei rimasti, non era convenzionato con l'università, e quindi è stato escluso. Dei restanti cinque, uno [14] mette a confronto (in termini di robustezza) i tre software principalmente utilizzati per la segmentazione, due ([16] e [17]) si concentrano su come le lesioni della materia bianca possano influenzare i diversi metodi di segmentazione, uno [18] invece, fornisce una pipeline di analisi di immagini volumetriche completamente automatica basata su due software specifici, e l'ultimo [19] presenta un algoritmo per la rilevazione delle lesioni da SM. Di seguito sono riportate due tabelle (4.1 e 4.2) riepilogative degli studi selezionati, di cui si andrà a parlare nei paragrafi successivi. Per ogni studio selezionato viene dapprima fatta un'introduzione allo studio, successivamente vengono riportati il dataset, il protocollo utilizzato e le rispettive conclusioni.

Tabella 4.1: Prima tabella riepilogativa dello stato dell'arte. Di ogni studio vengono riportati: obiettivo, database e protocollo.

<u>STUDIO</u>	<u>OBIETTIVO</u>	<u>DATABASE</u>	<u>PROTOCOLLO</u>
1	Comparare FreeSurfer, FSL-SIENAX, SPM, SPM-CAT	Nove pazienti con SM: 6 femmine, 3 maschi, età media 38 ± 13	Scansionati due volte nello stesso giorno su tre sistemi di RM. È stata fatta due volte un'acquisizione di una sequenza 3D T1-pesata con riposizionamento intermedio, per un totale di sei volumi T1 pesati per soggetto. è stata acquisita anche una sequenza 3D T2-pesata FLAIR
2	Valutare gli effetti delle lesioni su 6 metodi di segmentazione	Trenta pazienti con SM in tre ospedali diversi (10 per ogni ospedale)	T1-w, T2-w, FLAIR e attenuazione dei protoni pesate, acquisite con uno scanner diverso per ogni ospedale
3	Sviluppare una tecnica automatica di riempimento di lesioni che riduce il bias della segmentazione	Tre volontari sani	Immagini 3D FSPGR
4	Fornire una pipeline di analisi completamente automatica basata sui software gratuiti FLS e FreeSurfer	55 acquisizioni in 5 pazienti affetti da SM-RR sotto il trattamento del farmaco Natalizumab. Questi dati sono stati comparati con un dataset di soggetti sani (HCs) i cui dati sono stati ottenuti da 323 dataset di immagini T1-w di 267 neurologicamente sani	Questi dati sono stati comparati con un dataset di soggetti sani (HCs) i cui dati sono stati ottenuti da 323 dataset di immagini T1-w di 267 neurologicamente sani. Ulteriori dettagli a cui fare riferimento: 21 soggetti sono stati sottoposti a scansioni due volte, 2 soggetti tre o quattro volte, 5 soggetti cinque volte e 1 soggetto sei volte con un intervallo inferiore a due anni
5	Rilevamento delle lesioni tramite soglia su immagini FLAIR	Immagini di 15 pazienti SM per ogni ospedale (3) utilizzando lo stesso protocollo (T1-w, T2-w, PD-w e FLAIR). Le immagini sono state acquisite con vista assiale e con uno spessore di taglio di 3 mm	T1-w, T2-w, PD-w e FLAIR. Le immagini sono state acquisite con vista assiale e con uno spessore di taglio di 3 mm

Tabella 4.2: Seconda tabella riepilogativa dello stato dell'arte. Di ogni studio vengono riportati: macchinario utilizzato, tecniche/software, risultati e limiti.

<u>STUDIO</u>	<u>MACCHINARIO UTILIZZATO</u>	<u>TECNICHE/SO FTWARE</u>	<u>RISULTATI</u>	<u>LIMITI</u>
1	Siemens Aera (1,5 T), Avanto (1,5 T) e Trio (3,0 T) (Siemens Healthcare, Erlangen, Germania)	FreeSurfer, FSL- SIENAX, SPM, SPM-CAT	SPM ha mostrato una migliore ripetibilità e riproducibilità (eccetto per la sostanza bianca in cui FreeSurfer è risultato più robusto)	Campione poco ampio, macchinari dello stesso produttore, solo segmentazione trasversale
2	H1: 1.5T Magnetom Symphony Quantum (Siemens,Erlangen, Germany) H2: 1.5 T scanner (R12) (Philips Healthcare, Best, the Netherlands) H3: 1.5T Signa HDxt scanner (GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin)	ANN, FCM, FANTASM, FAST, SPM5, SPM8	SPM8 ha mostrato una minore influenza delle lesioni nella stima del volume, FCM ha sovrastimato più di tutti il volume della GM. Per quanto riguarda l'influenza delle lesioni al di fuori delle regioni prive di lesioni, tutti i metodi sono stati influenzati, soprattutto FCM e FAST. Nonostante il preprocessing, tutti i metodi tendono a sovrastimare il volume di GM	Mancanza di annotazioni da parte di esperti di tessuti, sensibilità dei metodi di segmentazione ai cambiamenti nella maschera di rimozione del cranio, difficoltà nel comparare gli studi precedenti, a causa della diversità dei protocolli di acquisizione
3	1.5 T GE Signa scanner (General Electric, Milwaukee, WI)	SPM5, LEAP	Entrambi i metodi di correzione forniscono frazioni di GM e WM che sono vicini ai valori originali. Le misure dei volumi di GM e WM ottenute tramite SPM sono influenzate dalle lesioni della sostanza bianca, ma gli errori possono essere corretti dalla tecnica LEAP in quanto si è mostrata essere la più efficiente	Non è detto che i risultati siano così per ogni campione analizzato e per ogni macchinario utilizzato. Bisogna tenere in considerazione fattori che possono influenzare la sua efficacia, come ad esempio: tipo di bobina di acquisizione, sequenze di immagini diverse, diverse apparecchiature o parametri diversi
4	Verio, Trio	FSL, FreeSurfer	Fattibilità della pipeline proposta	Campioni poco ampi. Limitato solo ai due software
5	1.5T Siemens Sim- phony Quantum, 1.5T Philips Intera (R12), 1.5T GE Signa HDxt	Soglia FLAIR	I risultati di rilevamento si sono mostrati migliori rispetto alla segmentazione iniziale dei tessuti grazie al passaggio di riduzione dei falsi positivi	

4.3.1 Chunjie G et al. (2018)

In questo primo studio, sono stati messi a confronto tre software ed è stata eseguita la segmentazione su immagini pesate in T1 in quanto compatibili con l'utilizzo di tali software [14].

Nella SM, il volume delle lesioni è correlato al carico infiammatorio, mentre le misure legate all'atrofia permettono di quantificare gli aspetti neurodegenerativi della malattia. La volumetria, quindi, può ritenersi utile per comprendere al meglio la SM. Ottenere dei biomarcatori robusti per valutare il decorso della malattia in termini di carico infiammatorio e neurodegenerativo è ancora oggi una sfida. Questo perché la volumetria cerebrale è influenzata da alcuni fattori, quali: terapia clinica, infiammazione e stato di idratazione del soggetto, ma anche da fattori tecnici come l'intensità del campo magnetico ed il modello dello scanner. Esistono diversi tool disponibili per effettuare la segmentazione, alcuni di questi sono: FreeSurfer, SIENAX e SPM. Questi software sono in grado di pre-elaborare e segmentare automaticamente le immagini T1 pesate [14].

L'approccio di FreeSurfer si basa su modelli che forniscono una frammentazione e segmentazione dettagliate della corteccia e delle strutture sottocorticali, ma ha un costo computazionale impegnativo. SIENAX, parte della libreria software FMRIB (FSL), invece ha un minor costo computazionale, ma fornisce solo misurazioni dei volumi di tessuto lordo (complessivo); FSL-SIENAX fornisce una segmentazione basata sull'intensità, la fase di registrazione fornisce un fattore di scala usato per la normalizzazione. SPM invece si basa sulla registrazione non lineare del cervello e permette di segmentare i tessuti cerebrali assegnando probabilità di tessuto per ogni voxel. I metodi basati su SPM, proprio come FSL-SIENAX, hanno un costo computazionale non impegnativo ma permette solo di misurare il volume lordo del tessuto [14].

Lo scopo principale di questo studio è confrontare i diversi software di segmentazione basandosi sulla ripetibilità sullo stesso scanner e sulla riproducibilità su diversi scanner per la segmentazione del tessuto cerebrale. Un obiettivo secondario è ridurre il bias di segmentazione del tessuto cerebrale correlato alla lesione di SM tramite riempimento automatizzato della lesione [14].

Dataset: i soggetti dello studio sono: nove pazienti con SM (sei femmine e tre maschi; età media 38 ± 13 anni; durata media della malattia $7,3 \pm 5,2$ anni) la cui diagnosi è stata fatta seguendo i criteri di McDonald 2010. Essi sono stati reclutati presso il Dipartimento di Neurologia, Karolinska University Hospital di Huddinge, Stoccolma, Svezia, tra pazienti consecutivi sottoposti a risonanza magnetica clinica. Sei partecipanti presentavano la forma recidivante-remittente, due secondaria-progressiva e uno primaria-progressiva [14].

Protocollo: i soggetti sono stati scansionati due volte nello stesso giorno su tre sistemi di RM: Siemens Aera (1,5 T), Avanto (1,5 T) e Trio (3,0 T) (Siemens Healthcare, Erlangen, Germania). È

stata fatta due volte un'acquisizione di una sequenza 3D T1-pesata con riposizionamento intermedio, per un totale di sei volumi T1 pesati per soggetto (riportati in Fig.4.1). Inoltre, su ciascuno scanner è stata acquisita anche una sequenza 3D T2-pesata FLAIR [14].

Analisi delle immagini: Ognuno dei sei volumi di ogni soggetto è stato analizzato in sezione trasversale ed elaborato nei software FreeSurfer, FSL-SIENAX, SPM e SPM-CAT (un'estensione di SPM). Le immagini ottenute sono riportate in Fig.4.2 [14].

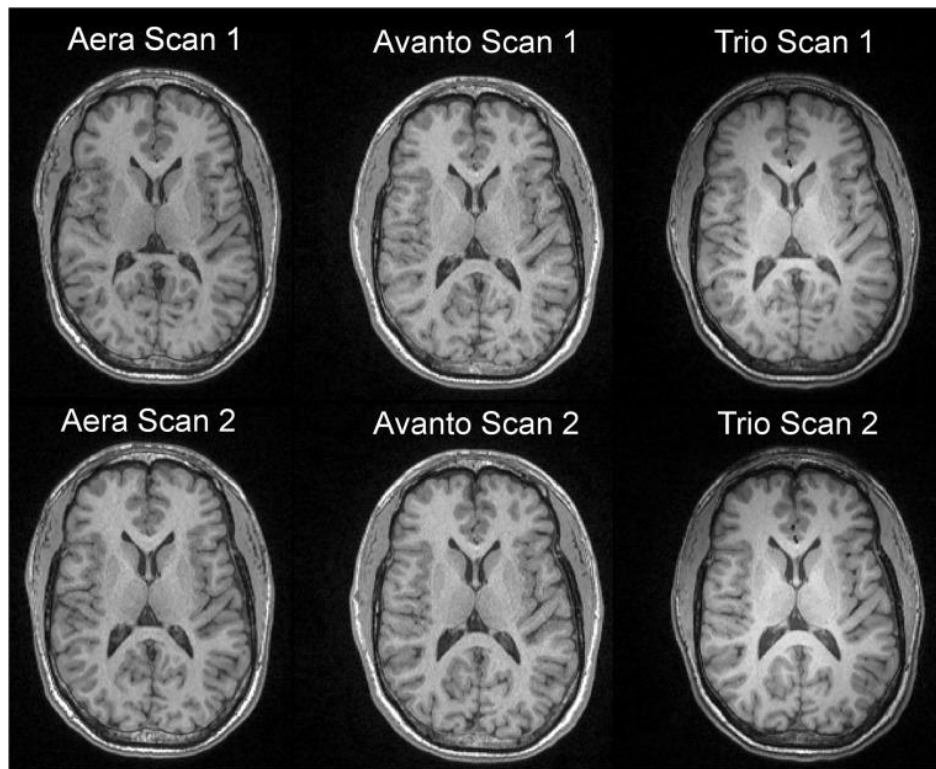


Fig. 4.1: Esempio di fette medio-assiali dalle sei acquisizioni 3D pesate in T1 in un maschio di 35 anni con sclerosi multipla recidivante-remittente e un punteggio della scala dello stato di disabilità estesa di 2.0. Per ciascuno dei tre scanner sono state effettuate due acquisizioni con riposizionamento intermedio [14].

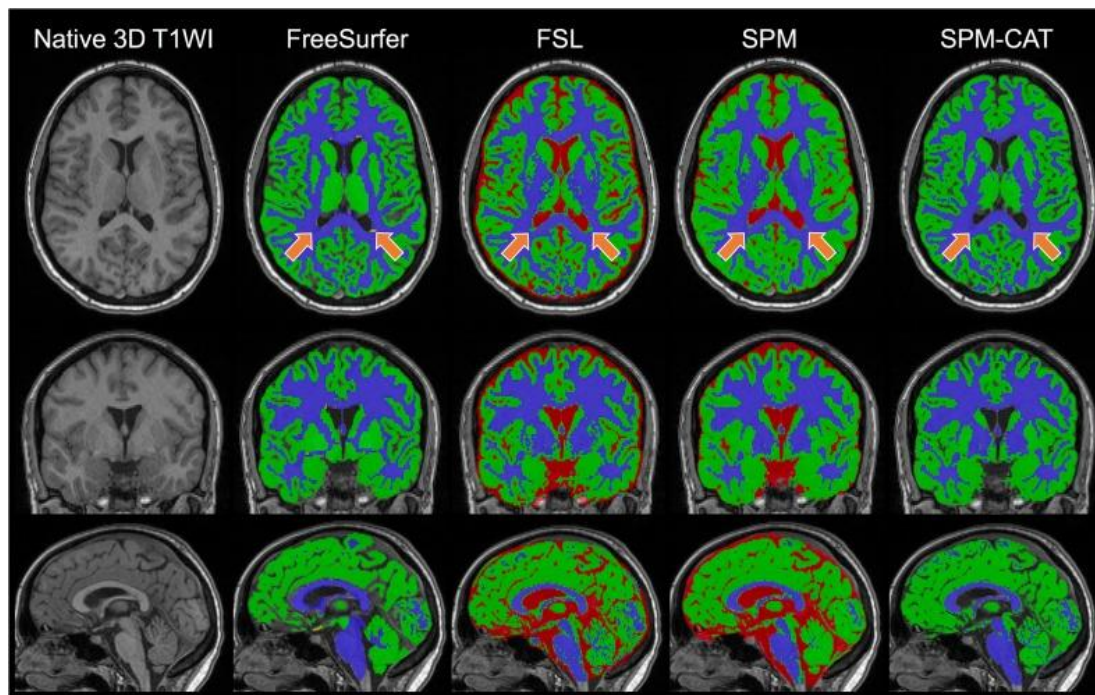


Fig. 4.2: Segmentazioni volumetriche in FreeSurfer 6.0.0, FSL-SIENAX 5.0, SPM 12 e SPM-CAT12 in una donna di 20 anni con sclerosi multipla recidivante-remittente e una scala estesa dello stato di disabilità punteggio di 1.0. La sostanza grigia è visualizzata in verde, la sostanza bianca in blu e il liquido cerebrospinale in rosso. Le segmentazioni esemplificate erano basate sulla prima scansione sullo scanner Aera per questo soggetto, che era la scansione con il volume di lesione più basso (0,33 ml) nello studio. Si prega di notare che FreeSurfer segmenta specificamente le ipointensità della materia bianca (gialle), evidenziate con frecce arancioni, e le include nel volume del cervello, ma non nel volume della sostanza bianca. Nel frattempo, FSL-SIENAX, SPM e SPM-CAT classificano le ipointensità della sostanza bianca come materia grigia e/o liquido cerebrospinale (frecce arancioni). CAT, libreria software FSL-SIENAX FMRIB valutazione dell'immagine strutturale con normalizzazione dell'atrofia sezione trasversale, mappatura parametrica statistica SPM, imaging T1WI pesato in T1 [14].

Per quanto riguarda i software utilizzati, maggiori dettagli su come sono stati utilizzati sono forniti nel paragrafo 4.1. Per ridurre il bias di segmentazione del tessuto cerebrale, che, come già detto all'inizio del paragrafo, è un obiettivo secondario, è stato applicato il riempimento delle lesioni, in particolare: è stato utilizzato l'algoritmo di probabilità delle lesioni nella Lesion Segmentation Toolbox 2.0.10 (LST) su tutti i volumi 3D FLAIR in SPM12. LST fornisce un tipo di segmentazione sviluppata appositamente per la SM, si tratta di una segmentazione automatizzata delle lesioni basata su probabilità. Per eseguire il riempimento delle lesioni sui corrispondenti volumi pesati in T1 dello stesso scanner, sono state utilizzate le mappe di probabilità delle lesioni FLAIR (Fig.4.3) [14].

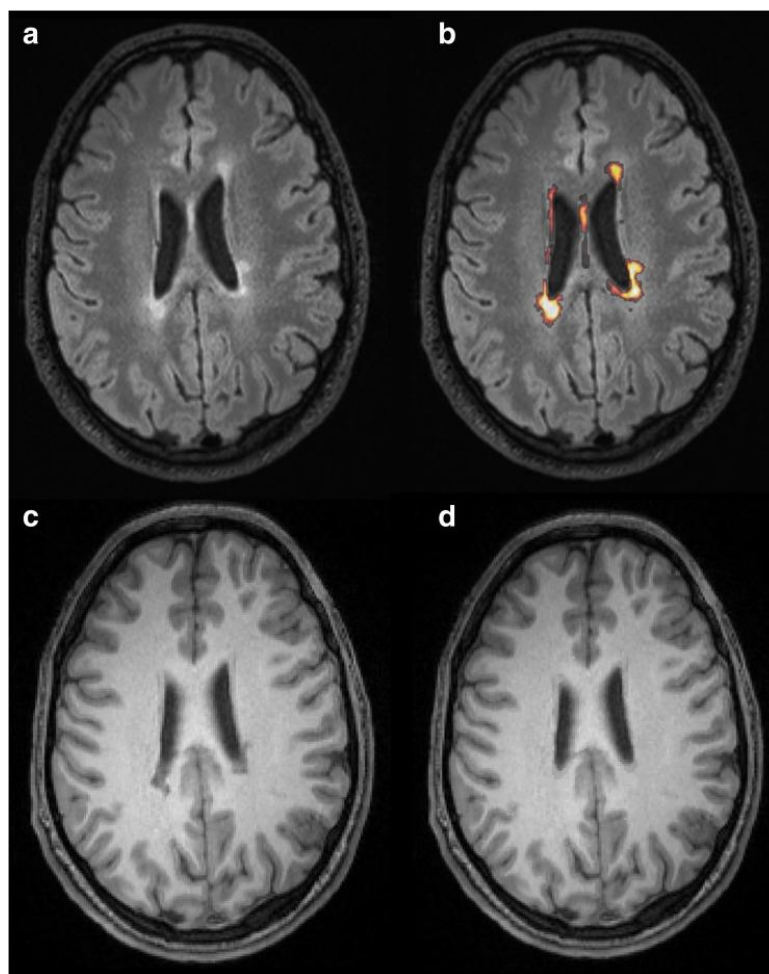


Fig. 4.3: La figura mostra la procedura di segmentazione e riempimento delle lesioni in un uomo di 34 anni affetto da SM RR e con un punteggio di scala di disabilit  estesa pari a 1.5. Questa scansione   stata acquisita con uno scanner Siemens Trio da 3.0 T e ha fornito il volume medio delle lesioni del campione (1.8 ml). L'immagine 3D pesata in T2 FLAIR (**a**)   stata utilizzata per la segmentazione delle lesioni nel toolbox Lesion Segmentation, ottenendo una maschera di lesione probabilistica (**b**, visualizzata come una mappa di calore sovrapposta ad **a**). La maschera   stata utilizzata per riempire le lesioni nell'immagine 3D pesata in T1, ottenendo un'immagine 3D pesata in T1 con lesioni riempite (**d**) [14].

I risultati sono stati sottoposti ad analisi statistica, utilizzando SPSS Statistics 24.0. I dati sono stati considerati non parametrici a causa delle dimensioni limitate del campione; per valutare la robustezza delle misure ripetute   stato utilizzato il coefficiente di variazione (CoV) entro soggetto. Poich  lo scopo principale di questo studio era quello di valutare la ripetibilit  sullo stesso scanner e la riproducibilit  su diversi scanner per la segmentazione del tessuto cerebrale, confrontando i diversi software,   importante capire come i risultati ottenuti possano permettere di dire qualcosa su queste valutazioni, in particolare:

- per la ripetibilit  intra-scanner:   stata utilizzata la media dei dati provenienti dalla prima e dalla seconda acquisizione sullo stesso scanner, in particolare:

$$\text{CoVIntra-scanner} = \text{SD} / (\text{media Scan 1 e Scan 2})$$

- per la riproducibilità inter-scanner: è stata utilizzata la media dei dati provenienti dalla prima acquisizione fatta sui tre scanner:

$$\text{CoVInterscanner} = \text{SD} / (\text{media di Scan1Aera, Scan1Avanto e Scan1Trio})$$

Sono stati utilizzati diversi test: il test dei ranghi con segni di Wilcoxon con significatività bilaterale (a due code) esatta è stato utilizzato per testare le comparazioni appaiate, il test di Friedman è stato utilizzato per testare le comparazioni di gruppo tra i quattro software, e, in caso di differenze significative tra i software, sono state eseguite ulteriori analisi utilizzando il test dei ranghi con segni di Wilcoxon, chiamate analisi appaiate post hoc. Per quanto riguarda le comparazioni multiple, la loro correzione è stata fatta utilizzando la procedura di Benjamini – HochBerg per CoVIntra-scanner, CoVInterscanner e per ognuna delle analisi post hoc.

Indicando con p il livello di significatività statistica (chiamato anche p -value), è importante dire che: un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo. In particolare, a seguito della correzione per le comparazioni multiple, tutti i valori di p sono stati considerati statisticamente significativi, a meno che specificato diversamente. I risultati sono riportati nella Tabella 4.1 [14].

Tabella 4.1: Volumi di tessuto cerebrale con e senza normalizzazione e con e senza LST [14].

	FreeSurfer		FSL-SIENAX		SPM		SPM-CAT	
	Originale	LST	Originale	LST	Originale	LST	Originale	LST
Volume cervello	1223±101	1222±94.0 <i>p</i> =0.83	1300±117	1299±117 <i>p</i> <0.001	1213±94.0	1217±94.0 <i>p</i> <0.001	1211±97.0	1212±98.0 <i>p</i> <0.001
Volume sostanza bianca	558±60.1	557±58.6 <i>p</i> =0.63	642±71.6	643±71.1 <i>p</i> =0.015	451±43.0	457±39.6 <i>p</i> <0.001	534±46.0	535±54.0 <i>p</i> <0.001
Volume sostanza grigia	684±71.8	681±70.5 <i>p</i> =0.67	658±52.3	658±56.7 <i>p</i> <0.001	783±85.2	786±85.4 <i>p</i> =0.74	672±81.0	671±83.0 <i>p</i> <0.001
Volume cervello normali zzato	72.2±3.7	72.0±4.0 <i>p</i> =0.46	1582±84.0	1576±84.0 <i>p</i> =0.34	78.4±7.9	78.5±7.9 <i>p</i> <0.001	76.1±9.0	76.2±8.9 <i>p</i> <0.001
Volume sostanza bianca normali zzato	32.5±1.2	32.4±1.4 <i>p</i> =0.43	785±38.8	782±30.1 <i>p</i> =0.039*	29.5±2.9	29.5±3.0 <i>p</i> <0.001	33.5±3.7	33.7±3.4 <i>p</i> <0.001
Volume sostanza grigia	40.8±3.6	40.9±3.7 <i>p</i> =0.92	782±109	783±112 <i>p</i> =0.013	48.7±6.1	48.6±6.2 <i>p</i> =0.50	41.7±6.4	41.5±6.3 <i>p</i> <0.001

*Non statisticamente significativo dopo la correzione per confronti multipli [14].

Le misure sono riportate come mediana ± range interquartile. Le misure non normalizzate e FSL-SIENEX sono espresse in millilitri. Le misurazioni normalizzate di FreeSurfer e SPM sono fornite come frazioni di tessuto senza unità in %. I valori *p* rappresentano il confronto dei volumi originali e con riempimento di lesioni mediante il test dei ranghi con segno di Wilcoxon (significatività esatta, a due code).

Lo studio presente ha permesso di mettere a confronto i quattro software in termini di robustezza, essendo essi gli strumenti più comuni di segmentazione gratuiti per la volumetria cerebrale nella SM. Esso, inoltre, ha permesso di agevolare una scelta adeguata del software per quanto riguarda gli studi volumetrici. Analizzando i risultati volumetrici ottenuti, infatti, sono state riscontrate differenze, il che era attendibile visto le diversità tecniche tra i quattro software [14].

Conclusioni: è risultato che le misurazioni volumetriche sullo stesso scanner hanno una variabilità minore rispetto alle misurazioni su diversi scanner. Per quanto riguarda i tassi di atrofia cerebrale, che, come già detto nel paragrafo 4.2, permettono di quantificare gli aspetti neurodegenerativi della malattia, è possibile dire che: poiché i pazienti con SM trattati hanno tassi di atrofia di circa 0.5% all'anno, è necessario avere una variabilità inferiore. Per la variabilità intra-scanner ed inter-scanner, i CoV ottenuti sono rispettivamente 0.17-0.92% e 0.65-5.0%: questi valori suggeriscono che, per catturare l'atrofia sullo stesso scanner siano necessari 1-2 anni per i metodi più robusti, mentre su scanner diversi sono necessari più anni [14].

Tra i 4 software, SPM ha mostrato una migliore ripetibilità e riproducibilità (eccetto per la sostanza bianca in cui FreeSurfer è risultato più robusto), ma è possibile dire che, nonostante i risultati ottenuti dai diversi software differiscano tra di loro, essi permettono comunque una segmentazione del volume cerebrale trasversale con una robustezza intra-scanner simile. Questo studio però ha delle limitazioni:

- il campione preso in considerazione non era molto grande,
- i diversi scanner erano tutti dello stesso produttore, e quindi ci si aspetta una variabilità minore tra di essi, rispetto a scanner di produttori diversi;
- esso si è concentrato solamente su metodi di segmentazione trasversale.

Nonostante SPM abbia prodotto dei risultati più consistenti, FreeSurfer non solo è risultato più robusto per la segmentazione della materia bianca, ma è anche il software che è stato meno influenzato dalla presenza di lesioni da SM [14].

Quest'ultimo è un aspetto molto importante quando si parla di software per la segmentazione; la presenza di lesioni della WM, che, come abbiamo visto, sono tipiche della SM, possono influenzare negativamente i diversi software, producendo dei risultati che si discostano da quelli reali. Nei prossimi due paragrafi verrà analizzato questo aspetto e verrà descritto un metodo (proposto in letteratura) che riduca al minimo gli effetti delle lesioni sulla segmentazione.

4.3.2 Valverde S et al. (2015)

Diversi studi hanno approfondito quest'ultimo tema, utilizzando tecniche di segmentazione comune, come SPM5. Un esempio è rappresentato dallo studio di Chared et al. (2010), il quale ha prodotto dei risultati che mostravano una sovrastima della GM ed una sottostima della WM, in acquisizioni con il 15% di lesioni simulate. Battaglini et al. (2012), invece, hanno condotto uno studio simile ma utilizzando il software FAST, giungendo ad un risultato simile al precedente: con l'aumentare del carico lesionale nelle immagini segmentate con lesioni simulate, il volume di GM tendeva ad aumentare, esso quindi risultava sovrastimato. Uno studio analogo è stato condotto da Gelineau-

Morel et al. (2012): essi hanno studiato gli effetti delle lesioni simulate e reali sulla volumetria dei tessuti al di fuori delle regioni interessate dalle lesioni attraverso l'utilizzo del software FAST. Esso ha sottostimato il volume della GM nelle immagini con lesioni simulate al di fuori delle regioni affette da lesioni, a mano a mano che il volume delle lesioni aumentava e le loro intensità si avvicinavano a quelle della GM. La WM nelle acquisizioni reali invece, si mostrava meno affetta dalle lesioni, ma il software sottostimava comunque la GM con l'aumentare del carico lesionale. Questi ultimi due studi citati permettono anche di dire che, includere le lesioni nella segmentazione dei tessuti può nascondere una parte dell'atrofia cerebrale, che è molto importante nel valutare la progressione della disabilità in pazienti affetti da SM [16].

Lo studio di S. Valverde et al. (2015), ha come obiettivo quello di vedere che impatto hanno le lesioni su ben sei tecniche di segmentazione ben conosciute.

Dataset: 30 immagini di pazienti affetti da SM provenienti da tre ospedali diversi (10 pazienti per ogni ospedale), indicati con H1, H2 e H3 [16].

Protocollo: il protocollo utilizzato è stato lo stesso per tutti i soggetti: acquisizione di immagini FLAIR, T1-w, T2-w e attenuazione dei protoni pesate. Per ogni ospedale sono stati utilizzati scanner diversi (uno per ogni ospedale). Le immagini sono state acquisite in sezione assiale con uno spessore di sezione di 3 mm. Prima di procedere con la segmentazione, le immagini sono state preprocessate secondo il seguente schema (Fig.4.4) [16]:

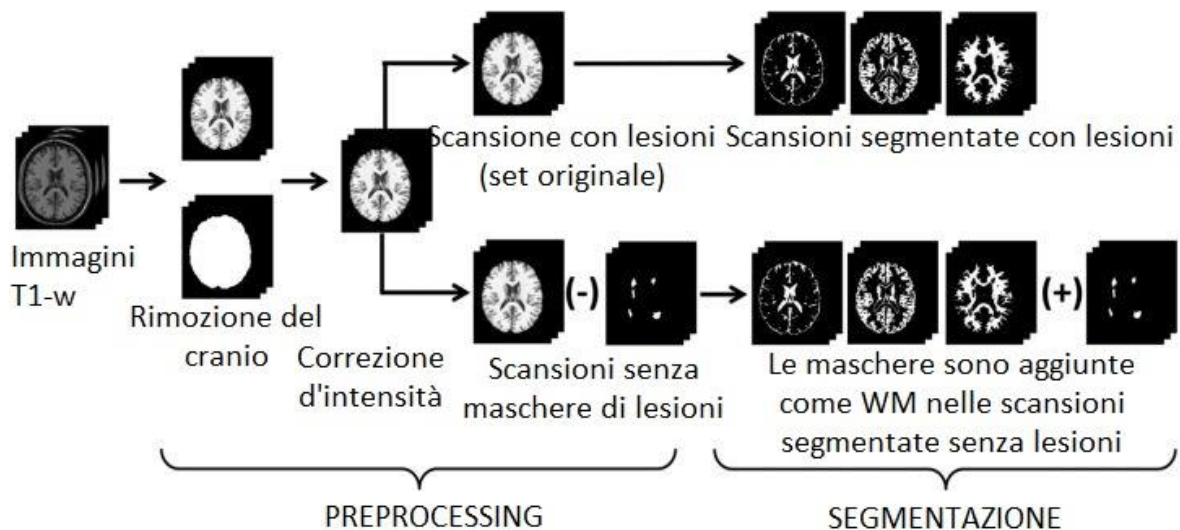


Fig. 4.4: Dalle 30 scansioni pesate in T1 di pazienti con SM, vengono rimosse le parti non cerebrali e i voxel cerebrali vengono corretti per le inomogeneità di intensità. Da questo stesso set corretto (originale), viene generato un nuovo set rimuovendo le maschere delle lesioni della WM (masked) prima della segmentazione. Le scansioni di entrambi i set vengono segmentate in una delle tre classi di tessuto (GM, WM e CSF). I voxel delle lesioni vengono aggiunti come materia bianca dopo la segmentazione sulle immagini masked [16].

I sei metodi di segmentazione utilizzati sono: ANN (Artificial Neural Network), FCM (fuzzy C-means), FANTASM (Fuzzy And Noise Tolerant Adaptive Segmentation Method), FAST, SPM5 e SPM8. Tutti i metodi sono stati eseguiti con parametri di default. Essi sono stati utilizzati per segmentare nelle classi di tessuto GM, WM e CSF sia le immagini del set originale, sia quelle del set masked. Dopo di che, sono stati calcolati i volumi normalizzati dei tessuti, dati dal rapporto tra il numero di voxel classificati come GM, WM e CSF, rispettivamente, ed il numero totale dei voxel. Su questi dati sono state effettuate tre analisi diverse [16].

In un primo momento, è stato visto come ciascun metodo di segmentazione avesse classificato i voxel delle lesioni, al fine di determinare in che misura ci si possano aspettare delle differenze tra i volumi dei tessuti riportati da ogni algoritmo sulle immagini originali e sulle immagini masked. Successivamente, sono state calcolate le differenze nel volume totale dei tessuti come percentuale di variazione tra le immagini originali e masked, per analizzare l'effetto diretto delle lesioni nella stima del volume totale. Infine, sono stati valutati gli effetti indiretti delle lesioni al di fuori delle regioni interessate dalle lesioni, nel resto del volume [16].

Per quanto riguarda l'analisi statistica, è stato utilizzato il coefficiente di correlazione lineare di Pearson per calcolare la correlazione tra i diversi fattori (differenze nel volume dei tessuti, carico delle lesioni e intensità delle lesioni). Il livello di significatività α , fissato a 0.05, è stato utilizzato per il test t a due code per la significatività al 95% e per il calcolo dell'intervallo di confidenza [16].

I risultati ottenuti e le differenze tra i sei metodi di segmentazione sono riportati in Fig.4.5 e in Fig.4.6 [16].

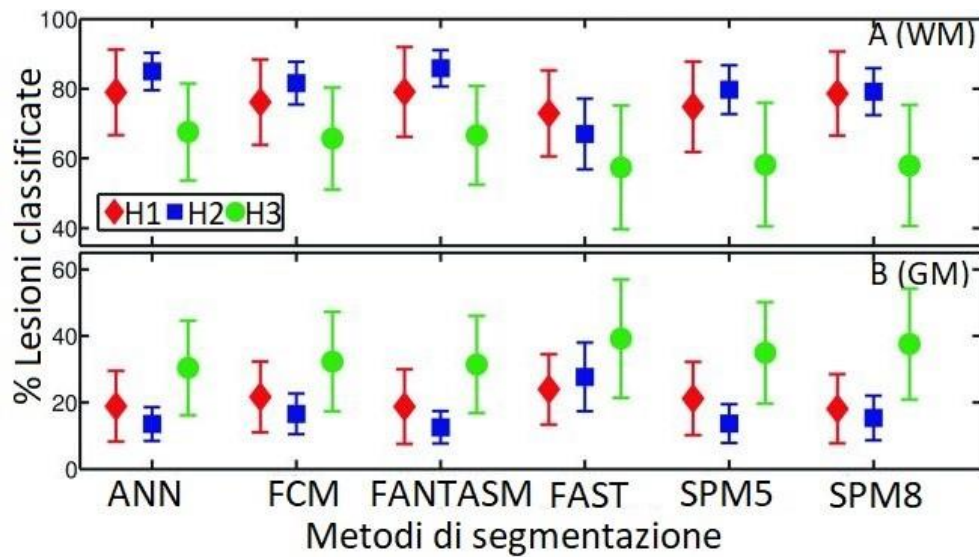


Fig. 4.5: La percentuale di voxel nelle regioni delle lesioni della sostanza bianca che sono stati classificati come sostanza grigia (parte superiore) e sostanza bianca (parte inferiore) è riportata per ciascun metodo di segmentazione e ospedale. I valori riportati sono medie e deviazioni standard [16].

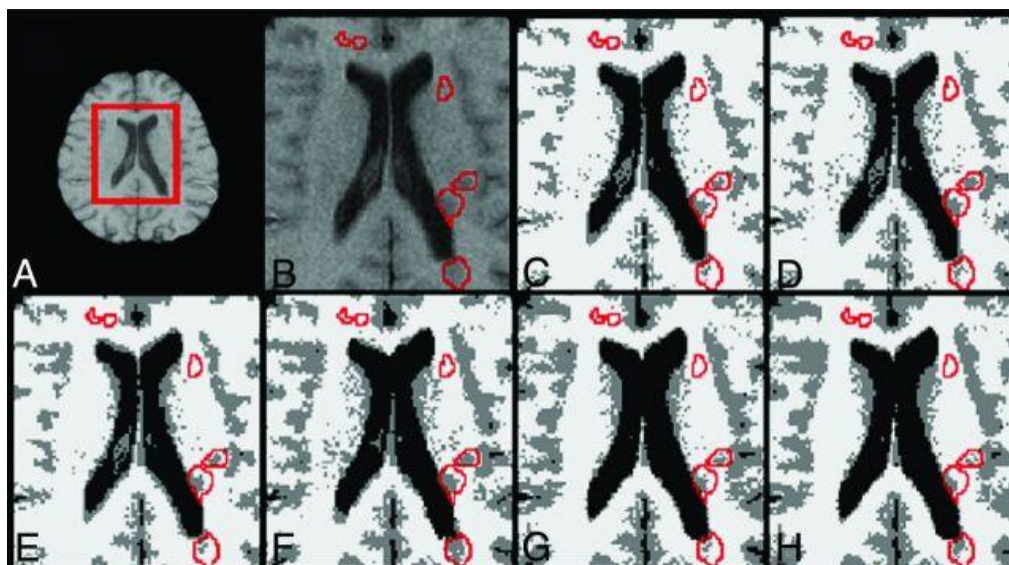


Fig. 4.6: Output di classificazione restituito da ciascun metodo di segmentazione sulla stessa immagine. A, scansione pesata in T1. B, parte ingrandita della scansione con le lesioni evidenziate in rosso. I risultati della segmentazione dei tessuti cerebrali sono anche evidenziati per ANN (C), FCM (D), FANTASM (E), FAST (F), SPM5 (G) e SPM8 (H). C-H, il tessuto GM segmentato è rappresentato in grigio; il tessuto WM, in bianco; e il CSF, in nero [16].

Conclusioni: i risultati di questo studio hanno mostrato una relazione diretta tra le differenze nel volume dei tessuti cerebrali e le variazioni nel carico lesionale e nell'intensità delle lesioni delle WM. SPM8 ha mostrato una minore influenza delle lesioni nella stima del volume, FCM ha sovrastimato più di tutti il volume della GM. Per quanto riguarda l'influenza delle lesioni al di fuori delle regioni prive di lesioni, tutti i metodi sono stati influenzati, soprattutto FCM e FAST. Nonostante il preprocessing, tutti i metodi tendono a sovrastimare il volume di GM. Questo costituisce un problema nelle immagini con un alto carico di lesioni, perché potrebbe nascondere o falsificare parte dell'atrofia del tessuto cerebrale, sia per la GM che per la WM. Questo studio però, come il precedente, presenta delle lacune:

- mancanza di annotazioni da parte di esperti di tessuti, dovuto al fatto che le immagini acquisite erano molte e provenivano da ospedali diversi;
- sensibilità dei metodi di segmentazione ai cambiamenti nella maschera di rimozione del cranio (skull-stripping mask);
- difficoltà nel comparare gli studi precedenti, a causa della diversità dei protocolli di acquisizione [16].

4.3.3 Chard DT et al. (2010)

Nello studio condotto da Declan T. Chard et al., l'obiettivo è quello di sviluppare un algoritmo automatico di riempimento delle lesioni per ridurre il bias nella segmentazione dei tessuti dovuto alla presenza di lesioni da SM, e sviluppare inoltre, un tool di simulazione di lesioni con cui testare l'algoritmo [17].

Dataset: immagini di tre volontari sani [17].

Protocollo: acquisizione di immagini 3D FSPGR [17].

Riconoscere i limiti di un determinato metodo di segmentazione insieme alla sua robustezza, consente di sviluppare soluzioni migliori, tecniche per ridurre al meglio l'effetto delle lesioni sulla stima dei volumi. Con questo scopo, lo studio è stato diviso in due parti: la prima, prevede una simulazione di lesioni della materia bianca e mira a quantificare l'effetto che esse hanno sulle misure di atrofia nella WM e GM; la seconda parte mira a ridurre gli errori causati dalle lesioni. Inizialmente quindi, è stata sviluppata una tecnica di simulazione delle lesioni, e successivamente è stato quantificato il loro effetto sulle misure dei volumi attraverso l'utilizzo di SPM. Nella seconda parte sono stati utilizzati metodi esistenti basati sull'esclusione delle lesioni durante la segmentazione o sulla loro riclassificazione come materia bianca a seguito della segmentazione. È stata inoltre sviluppata ed utilizzata una tecnica chiamata LEAP (Lesion Automated Preprocessing) che riempie le lesioni prima

della segmentazione, con valori normali della materia bianca, per vedere se ciò portasse a miglioramenti [17].

La simulazione delle lesioni è stata applicata su immagini acquisite da tre volontari sani. Come già detto all'inizio del paragrafo, l'effetto delle lesioni sulla segmentazione è stato valutato utilizzando SPM5: in un primo momento è stata valutata l'efficacia della segmentazione, producendo volumi di GM e WM su immagini in cui ancora non erano state aggiunte le lesioni, successivamente sono state aggiunte lesioni artificiali ed è stata ripetuta la segmentazione. Ogni volta che venivano aggiunte le lesioni si calcolavano le frazioni di GM e di WM. Dopo di che, sono stati utilizzati due metodi per ridurre gli errori:

- riempimento delle lesioni con LEAP prima della segmentazione;
- segmentazione senza mascheratura, seguita dalla riclassificazione delle lesioni come materia bianca [17].

Conclusioni: entrambi i metodi di correzione forniscono frazioni di GM e WM che sono vicini ai valori originali. Nelle immagini originali (senza lesioni), il 99.6% dei voxel è stato classificato da SPM come materia bianca, nelle regioni in cui poi si andavano ad inserire le lesioni artificiali. Quando queste regioni sono state riempite, la percentuale è stata del 100%, questo significa che: la sostanza bianca naturale aveva meno probabilità di essere classificata come tale rispetto alla sostanza bianca simulata. Questo studio dimostra che le misure dei volumi di GM e WM ottenute tramite SPM sono influenzate dalle lesioni della sostanza bianca, ma gli errori possono essere corretti dalla tecnica LEAP in quanto si è mostrata essere la più efficiente [17].

Gli autori hanno giustificato la scelta del software SPM con il fatto che esso è uno dei software maggiormente utilizzati nella segmentazione dei volumi cerebrali, ma lo scopo di questo studio non è evidenziare gli errori del software, bensì presentare una tecnica appropriata che permette di correggere gli errori, in modo tale da poter essere utilizzata nel preprocessing prima dell'utilizzo di un qualsiasi software di segmentazione. Nonostante la tecnica LEAP si sia mostrata molto efficiente in questo studio, non è detto che sia così per ogni campione analizzato e per ogni macchinario utilizzato. Bisogna tenere in considerazione, infatti, fattori che possono influenzare la sua efficacia, come ad esempio: tipo di bobina di acquisizione, sequenze di immagini diverse, diverse apparecchiature o parametri diversi [17].

4.3.4 Rummel C et al. (2018)

In pazienti affetti da SM, l'analisi volumetrica delle immagini è considerata come un importante strumento per la "mancanza di evidenza di attività della malattia", in quanto è utilizzata per rilevare la perdita progressiva del tessuto cerebrale. La maggior parte dei software utilizzati in ambito clinico però, permettono solamente un'analisi volumetrica longitudinale dell'intero cervello, trascurando in questo modo l'analisi basata su determinate regioni. Lo scopo dello studio condotto da Christian Rummel et al., è quello di fornire una pipeline di analisi completamente automatica basata sui software gratuiti FSL e FreeSurfer [18].

Dataset: 55 acquisizioni in 5 pazienti affetti da SM-RR sotto il trattamento del farmaco Natalizumab. Questi dati sono stati comparati con un dataset di soggetti sani (HCs) i cui dati sono stati ottenuti da 323 dataset di immagini T1-w di 267 neurologicamente sani, di cui 142 appartenevano a soggetti di sesso maschile e 181 a soggetti di sesso femminile, con un range di età di 7-79 anni (media: 35.9 anni, SD: 18.0 anni). Ulteriori dettagli a cui fare riferimento: 21 soggetti sono stati sottoposti a scansioni due volte, 2 soggetti tre o quattro volte, 5 soggetti cinque volte e 1 soggetto sei volte con un intervallo inferiore a due anni [18].

Come detto, negli studi citati nei paragrafi 4.2.2 e 4.2.3, le lesioni possono influenzare la stima dei volumi cerebrali. In questo studio è stato applicato il riempimento delle lesioni prima dell'analisi morfometrica dei pazienti con SM.

Protocollo: sono state registrate le immagini FLAIR durante la stessa sessione delle immagini T1-w, dalle immagini FLAIR sono state prodotte maschere di lesioni, per ogni visita sono stati calcolati i volumi delle lesioni ed è stato utilizzato il comando 'lesion_filling' di FSL usando come input le maschere precedentemente ottenute. In questo modo, sono state ottenute immagini T1-w in cui le lesioni risultano riempite con intensità della WM. Tale procedimento non è stato applicato nei soggetti sani. FSL e FreeSurfer sono stati utilizzati per elaborare le immagini T1-w, in particolare: i volumi totali di CSF, GM e WM sono stati stimati utilizzando la versione 5.0 di FSL, mentre per quanto riguarda la stima dei volumi delle segmentazioni di GM, WM e CSF è stata utilizzata la versione 5.3.0 di FreeSurfer [18].

Di seguito vengono riportate direttamente le conclusioni tratte a seguito del presente studio, i passaggi seguiti e l'analisi statistica non vengono riportati in quanto non inerenti con lo scopo di questa tesi.

Conclusioni: nel presente studio, è stata dimostrata la fattibilità della pipeline proposta. Va specificato però, che tutto il procedimento seguito andrebbe applicato su campioni più ampi di pazienti con SM, ma anche su un campione di pazienti affetti da altre malattie neurodegenerative. Un

altro aspetto da tenere in considerazione è l'utilizzo di dati provenienti anche da altri software, e non solo da FreeSurfer e FSL [18].

4.3.5 Cabezas M et al. (2014)

Mariano Cabezas et al., nel loro studio, propongono un algoritmo per la segmentazione dei tessuti ed il rilevamento di lesioni da SM. L'algoritmo prevede due step: nel primo step, viene fatta la segmentazione dei tessuti cerebrali in cui le lesioni non sono separate dal tessuto, il secondo step è basato sull'applicazione di una soglia all'immagine FLAIR per il rilevamento delle lesioni. Questo algoritmo prende il nome di: algoritmo di aspettazione-massimizzazione (EM, dall'inglese expectation-maximisation), e, quella proposta da questo studio, ne presenta una versione modificata. Esso inoltre è uno degli algoritmi maggiormente utilizzati nella letteratura per la segmentazione con atlas. Souplet et al., per esempio, usarono questo algoritmo per segmentare le lesioni e per contrastare gli effetti del volume parziale (PV). L'approccio utilizzato è un'estensione dell'algoritmo proposto da Dugas-Phocion et al., ed è basato sulla definizione di due tipi di classi principali: un tipo che comprende GM, WM e CSF (tessuti pure), mentre il secondo tipo di classi prende il nome di classe di volume parziale che comprende proporzioni tra CSF e GM. In questo studio, viene ulteriormente mostrato l'approccio adottato da tale algoritmo e viene presentato in che modo Mariano Cabezas et al. forniscono i loro contributi [19]

Viene utilizzata una mappa di similarità per ponderare l'atlas, poi vengono sfruttate le informazioni di vicinato insieme agli atlas ponderati, ed infine viene introdotta una mappa di probabilità di PV ed una riduzione dei falsi positivi. Tutti i passaggi proposti però, sono applicati dopo la fase di preprocessing [19].

Dataset: immagini provenienti da tre ospedali diversi (H1, H2 e H3), per ogni ospedale sono state acquisite le immagini di 15 pazienti [19].

Protocollo: Per ogni paziente sono state acquisite le immagini T1-w, T2-w, PD-w e FLAIR, esse sono state acquisite con vista assiale e con uno spessore di taglio di 3 mm [19].

Rappresentando il carico lesionale di ogni paziente in tutti e tre gli ospedali, si è notato che: l'ospedale H1 ha mostrato la più bassa media e mediana per paziente, H2 la più alta media e mediana per paziente, H3, invece, presenta valori intermedi tra H1 e H2. È inoltre possibile dire che H2 presenta un'alta variabilità (sempre parlando in termini di carico lesionale), H1 e H3, invece, hanno una variabilità simile. Inoltre, sulle immagini PD-w sono state fatte delle annotazioni delle lesioni che sono state delineate in modo semiautomatico utilizzando il software JIM [19].

La funzione di densità di probabilità dei principali tessuti cerebrali (GM, WM e CSF), viene influenzata da intensità esterne appartenenti a tessuti non-cerebrali, non è ancora noto in che modo essi influenzino i tessuti cerebrali, ma di solito quando i voxel ad essi associati vengono mascherati (rimossi), i risultati della segmentazione migliorano. Nell'approccio adottato in questo studio, per rimuovere questi tessuti, è stato utilizzato un tool di FSL, chiamato BET. Successivamente, viene applicato un algoritmo per eliminare il bias e ridurre il rumore. Dopo aver fatto la registrazione dell'atlante (è stato usato l'ICBM), la mappa di similarità, la classificazione dei tessuti con EM ed infine un'inizializzazione dei parametri ed una loro massimizzazione, si è passati alla segmentazione delle lesioni [19].

In questo studio il rilevamento delle lesioni si basa su immagini FLAIR attraverso l'individuazione di una soglia. Per individuare tale soglia è necessario assumere due cose: come prima cosa si assume che le intensità di GM nell'immagine FLAIR seguano una distribuzione gaussiana, e, come seconda cosa, che le lesioni rappresentino degli outliers di tale distribuzione. Detto ciò, è possibile calcolare la soglia in questo modo (4.1):

$$T^F = \mu_{GM}^F + \gamma \sigma_{GM}^F \quad (4.1)$$

In cui μ_{GM}^F e σ_{GM}^F rappresentano i parametri di distribuzione di GM nell'immagine FLAIR e γ è un parametro empirico per determinare gli outliers [19].

Successivamente, la maschera di GM ottenuta precedentemente, viene utilizzata per stimare i parametri dei tessuti: essa viene applicata all'immagine FLAIR per calcolare un istogramma (Fig.4.7) [19].

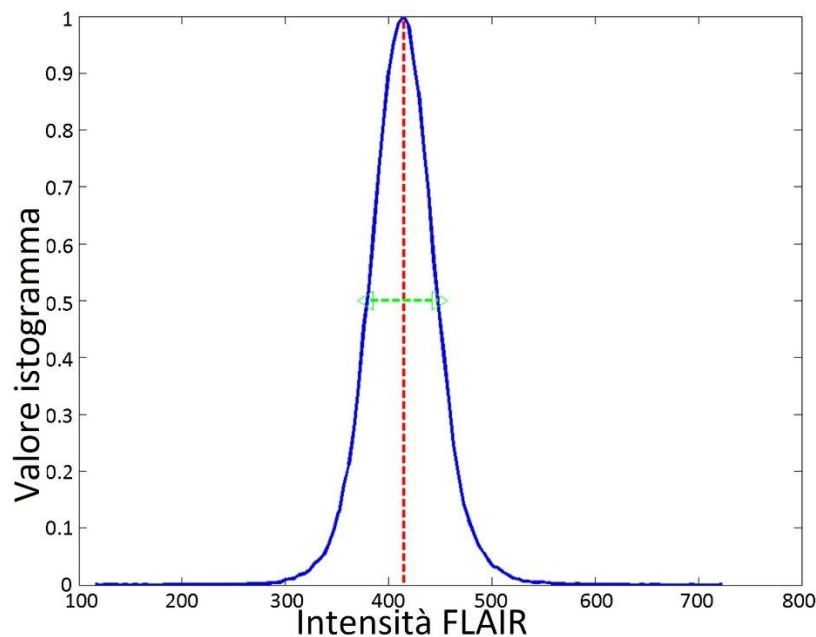


Fig. 4.7: Istogramma FLAIR per GM. La linea rossa rappresenta il picco usato per calcolare la media, mentre la linea verde rappresenta la larghezza a metà altezza (FWHM) usata per calcolare la deviazione standard [19].

Poiché le lesioni e la GM mostrano somiglianze di intensità nelle immagini T2-w e PD-w, esse, di solito, sono parte della maschera GM; quindi, l'istogramma risulta influenzato dalle intensità delle lesioni (questo però influisce solamente sulla stima della deviazione standard). Per questo motivo per calcolarla si usa l'espressione FWHM. Successivamente, viene utilizzata la (4.1) e viene applicata all'immagine FLAIR, ottenendo in questo modo una maschera iniziale di lesioni, che però comprende altri artefatti iperintensi, quindi questa maschera deve essere affinata. In un secondo momento, la maschera viene suddivisa in regioni, e viene definita una serie di regole che sono valide per le lesioni, per differenziare quest'ultime da altre regioni. In questo modo, è stato possibile ridurre i falsi positivi in termini di rilevamento dovuti agli artefatti. Queste regole sono:

- le lesioni sono principalmente classificate come classi basate su WM e GM;
- le lesioni sono circondate da WM;
- le lesioni non dovrebbero essere presenti tra i ventricoli;
- le lesioni dovrebbero avere una dimensione minima.

Tutte le regioni scartate in base a queste regole vengono riclassificate in base alla segmentazione dei tessuti [19].

È possibile fare un confronto tra il lavoro proposto in questo studio ed i due approcci più promettenti dello stato dell'arte: Suoplet et al. e Schmidt et al. Il primo è stato implementato come parte di un

software chiamato SepINRIA, mentre il secondo è stato integrato recentemente nel software SPM (Fig.4.8) [19].

L'approccio LST e quello proposto dallo studio corrente sono risultati i migliori per quanto riguarda il rilevamento delle lesioni, in particolare LST per H1 e l'altro per H2 e H3. L'approccio utilizzato da Souplet et al. invece ha mostrato scarsi risultati, causando un elevato numero di falsi negativi [19].

Conclusioni: i risultati di rilevamento si sono mostrati migliori rispetto alla segmentazione iniziale dei tessuti grazie al passaggio di riduzione dei falsi positivi. L'approccio presentato ha mostrato risultati migliori di rilevamento delle lesioni e risultati simili a LST per quanto riguarda la segmentazione. Questo può essere spiegato dal fatto che siano stati utilizzati atlas ponderati e siano stati ridotti i falsi positivi [19].

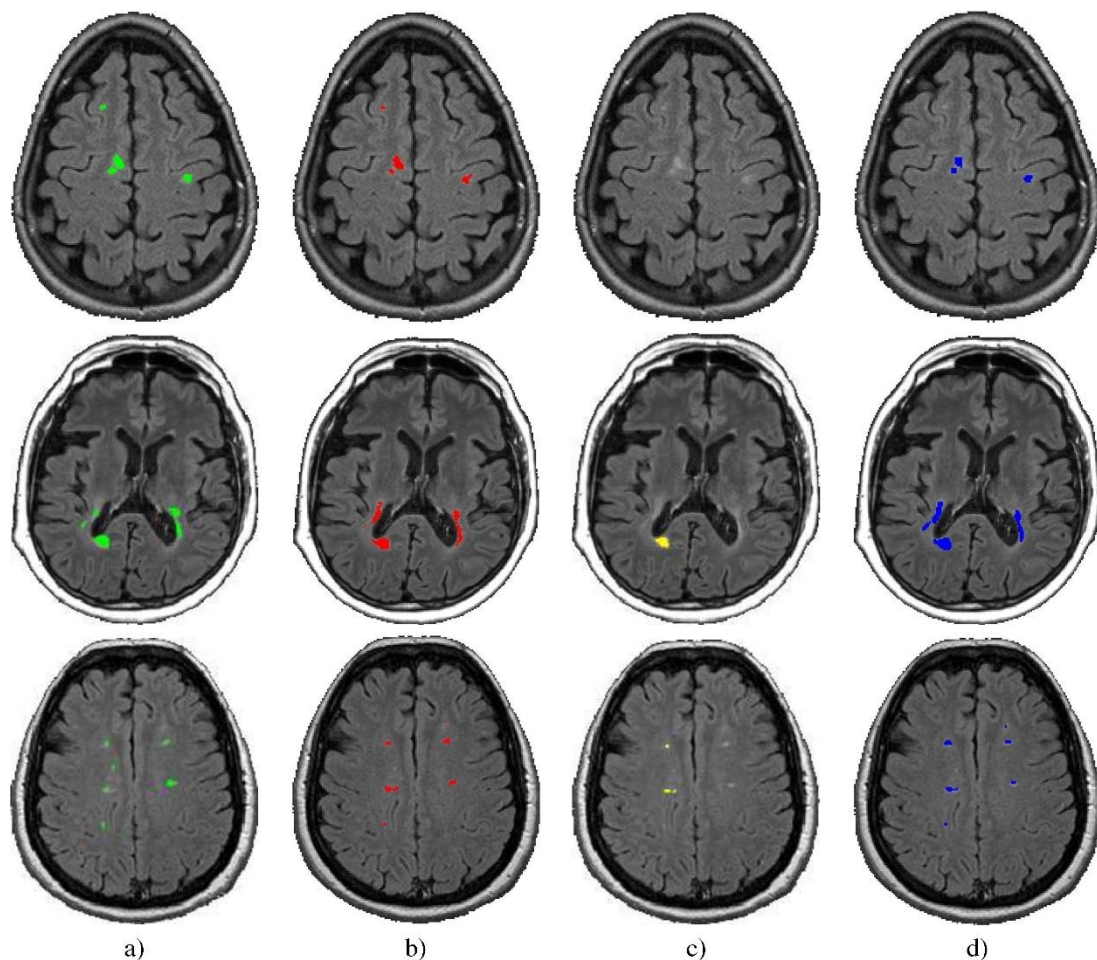


Fig. 4.8: Confronto di segmentazione: (a) GT (verde); (b) lavoro proposto (rosso); (c) Souplet et al. (giallo); e approccio LST (blu). Ogni riga comprende immagini provenienti da un ospedale diverso [19].

4.4 Discussione e conclusioni

Attraverso l'analisi di questi cinque studi riportati è stato possibile capire come un processo di segmentazione delle lesioni sia fondamentale in una malattia come la SM. Attraverso esso, infatti, è possibile valutare e/o quantificare le lesioni, permettendo una più vasta comprensione della malattia e dell'associazione che c'è tra il carico lesionale e l'atrofia cerebrale, in questo modo è possibile anche studiare al meglio la progressione della disabilità nei pazienti, in quanto le lesioni sono strettamente correlate al livello di disabilità. È stato riportato un confronto sui software maggiormente utilizzati per la segmentazione, ed è stato visto in che modo le lesioni possano influenzare i diversi metodi di segmentazione e come ridurre il bias introdotto sulle stime dei volumi cerebrali. Infine, è stato riportato uno studio che proponesse un metodo di rilevamento delle lesioni tramite soglia, che prevedeva una segmentazione iniziale dei tessuti.

L'importanza dell'implementazione di tecniche automatizzate di segmentazione delle lesioni da SM, è sottolineata dal fatto che, la rilevazione manuale di tali lesioni, è un processo soggettivo, soggetto ad errori umani e richiede, inoltre, molto tempo. Nonostante negli ultimi anni si siano fatti progressi in questo settore, non esiste ancora una tecnica di segmentazione così robusta da poter essere considerata come standard. Il motivo di ciò risiede nei numerosi ostacoli e nelle numerose lacune che in un certo senso 'rallentano' l'affermarsi di un metodo predefinito [13].

Con l'analisi dei cinque articoli precedentemente riportati, è stato possibile capire quali siano le principali lacune che accomunano la maggior parte degli studi fatti nel settore. Un primo ostacolo è rappresentato dalla mancanza di dataset abbastanza numerosi da far valutare al meglio l'efficacia di un determinato metodo/software. Come è stato visto nella parte iniziale della tesi, infatti, le forme di SM sono molteplici, e le lesioni possono presentarsi in diverse forme/dimensioni ed in diverse zone; per questo l'utilizzo di un database molto ampio è molto importante; non è detto, infatti, che i risultati di un software siano simili in pazienti aventi differenti forme di malattia e diversa localizzazione delle lesioni. Un altro ostacolo è rappresentato dal fatto che, le diverse acquisizioni siano fatte su macchinari diversi (non tutti gli ospedali hanno macchinari dello stesso produttore): si dovrebbero poter comparare diversi studi basati su acquisizioni ottenute da uno stesso macchinario. Inoltre, la diversità nei protocolli di acquisizione utilizzati, che risiede nelle immagini acquisite (per es. T1-w piuttosto che T2-w), nel campo magnetico utilizzato, nei parametri scelti, impedisce un confronto diretto tra i diversi studi. L'affidabilità dei risultati in uscita da un software/metodo di segmentazione, inoltre, è messa a dura prova dal fatto che la presenza di lesioni della materia bianca, possano influenzare la sua robustezza, in termini di efficacia. In alcuni casi, infatti, si potrebbe avere una stima errata dei volumi cerebrali portando così a considerazioni sbagliate: questo aspetto è stato visto

soprattutto nello studio riportato nel paragrafo 4.3.2. Una possibile soluzione a questo problema è stata illustrata nello studio riportato in 4.3.3, chiamata LEAP: nonostante essa abbia prodotto dei buoni risultati, non è detto che gli stessi vengano riprodotti in egual modo su altri campioni o su immagini acquisite con macchinari diversi.

È possibile quindi dire che, al giorno d'oggi, nonostante la ricerca sia andata avanti nell'utilizzo di questi software e sull'implementazione di nuove metodologie per la segmentazione dei tessuti cerebrali e delle lesioni, non si è ancora affermato un metodo definitivo. Questo, oltre che a tutti i motivi elencati sopra, potrebbe essere dovuto anche al fatto che, negli ultimi anni ci è stata l'esplosione dell'intelligenza artificiale. Ultimamente, infatti, si stanno facendo sempre più studi in cui vengono utilizzate tecniche di intelligenza artificiale, come machine learning e deep learning, sperando che un domani si possa raggiungere un metodo di segmentazione definitivo. Tale aspetto è molto importante per i pazienti con SM: la segmentazione automatica delle lesioni, infatti, non solo aiuta a comprendere meglio il decorso della malattia, ma potrebbe anche evitare l'iniezione del mezzo di contrasto per rendere più visibili le lesioni, aspetto molto importante in quanto esso potrebbe avere effetti spiacevoli nei pazienti.

Capitolo 5

Caratterizzazione tramite SPM12 delle lesioni cerebrali da sclerosi multipla: analisi di un caso clinico

Per questa tesi è stato scelto di utilizzare il software SPM, in particolare la sua versione più recente SPM12, in quanto tra i tre software maggiormente utilizzati per la segmentazione (FreeSurfer, FSL e SPM) esso è l'unico disponibile per il sistema operativo Windows.

5.1 Introduzione a statistical parametric mapping

SPM e la teoria su cui basa, sono state sviluppate da Karl Friston per l'analisi statistica dei dati di neuroimaging funzionale ottenuti dalla tomografia a emissione di positroni (PET). Questo software, che prende il nome di SPM classico, è stato reso disponibile nel 1991 alla comunità dell'imaging funzionale, per permettere la collaborazione tra i vari laboratori, e fornire uno schema di analisi comune. La prima revisione importante del software è stata SPM '94 e sta alla base di tutte le versioni successive. L'approccio utilizzato si basa sulla mappatura parametrica statistica, dalla quale prende il nome il software stesso (gratuito ed open source) {11}.

La mappatura parametrica statistica, di solito, viene usata come strumento per rilevare le risposte cerebrali di determinate regioni; inoltre, rappresenta l'approccio più diffuso per caratterizzare l'anatomia funzionale ed i cambiamenti legati alle malattie. Il suo approccio è basato sui voxel; per poter fornire informazioni su risposte relative a determinate regioni ai fattori sperimentali, utilizza l'inferenza classica. Questo lo fa attraverso la costruzione di processi statistici estesi (in termini di spazio) volti a testare le ipotesi su determinati effetti delle regioni. Grazie alla sua semplicità concettuale, la mappatura parametrica statistica ha riscontrato un enorme successo nel corso degli anni. Questo è dovuto al fatto che si analizza ogni voxel tramite un test statistico standard univariato (che considera una sola variabile), per poi assemblare tutti i parametri statistici ottenuti in un'immagine che prende il nome di SPM. Le varie immagini vengono interpretate poi, come processi statistici estesi. Tali processi si basano sul comportamento probabilistico dei campi gaussiani. Effetti specifici legati a determinate regioni si individuano considerandoli come escursioni improbabili (risultati insoliti) ottenuti nella SPM {12}.

Esiste anche un altro tipo di approccio, chiamato approccio multivariato, che, a differenza di quello univariato proposto da SPM, considera più variabili. Se da un lato l'approccio multivariato è molto utile quando si ha a che fare con migliaia di voxel, dall'altro presenta dei problemi, tra cui:

- non supporta inferenze sugli effetti specifici delle regioni;
- nel contesto di riduzione di dimensione, è meno sensibile agli effetti focali rispetto agli approcci univariati;
- richiede un numero di osservazioni maggiore della dimensione della variabile di risposta.

Alcuni approcci, invece, si basano su analisi non parametriche, i quali però, risultano essere meno potenti rispetto a quelli parametrici (come SPM) {12}.

Il software SPM richiede come input file in formato NeuroImaging Informatics Technology Initiative (NIfTI), il quale racchiude più file in formato Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM).

Un file DICOM è considerato come un insieme di attributi, i quali forniscono informazioni su un singolo paziente (es. ID, Nome, Cognome) e rappresenta uno standard per immagini mediche {13}.

L'iniziativa NIfTI, invece, si preoccupa di collaborare con gli utilizzatori e con gli sviluppatori di strumenti, con l'obiettivo di fornire strumenti informatici affidabili, precisi, adeguatamente documentati, facili da usare e di garantire l'interoperabilità tra varie tipologie e dati {14}.

5.2 Dati

Sono stati utilizzati dati di un soggetto di 23 anni (età alla data della RM) sottoposto a RM senza contrasto, con diagnosi di SM RR. Nello specifico sono state utilizzate le immagini COR T1 FSE, in cui COR sta per coronale, ed indica la direzione di acquisizione delle immagini, T1 sta ad indicare che le immagini sono T1 pesate, e FSE sta per fast spin echo.

5.3 Metodologia

Poiché i dati che si hanno a disposizione sono in formato DICOM, è stato anzitutto necessario convertirli in formato NIfTI.

Dal CD della RM del paziente, sono stati trasferiti tutti i dati contenuti in esso sul PC. Tra le cartelle riportate, c'era una cartella chiamata 'DICOM' in cui erano contenute tutte le immagini acquisite in formato DICOM, essendo il formato standard per immagini diagnostiche. Inoltre, veniva riportato anche un file chiamato 'DICOMDIR', anch'esso in formato DICOM. Per poter visualizzare le immagini è stato necessario aprire il file DICOMDIR, ciò è stato possibile attraverso l'utilizzo del software MicroDicom {15}. Esso conteneva tutte le immagini acquisite con le relative informazioni (tipo di immagine, lunghezza fetta, spessore fetta, ecc..); una volta trovate le immagini T1 pesate (nello specifico COR T1 FSE) per un totale di 21, è stato associato a ciascuna immagine il file DICOM corrispondente presente nella cartella DICOM menzionata all'inizio del paragrafo. Questa associazione è stata effettuata utilizzando un numero di otto cifre che identificava in modo univoco

ciascuna immagine (ad esempio, 007E0B26). Le 21 immagini sono state convertite in formato NIfTI, come già accennato nel paragrafo 5.1, tramite il software dcm2nii {10}: dalla conversione sono risultati un file .nii ed un file .json che, se aperto tramite Blocco Note, ha permesso di visualizzare tutti i metadati (informazioni che descrivono un insieme di dati) relativi all'acquisizione delle immagini COR T1 FSE. Ovviamente queste non sono state le uniche immagini acquisite, ma rappresentano quelle di nostro interesse.

Il formato JSON è un formato per lo scambio di dati, esso risulta facile da generare ed analizzarne la sintassi da parte della macchina, mentre per gli utenti è facile da leggere e da scrivere. È basato su un sottoinsieme del linguaggio di programmazione JavaScript, ed è un formato di testo indipendente dal linguaggio di programmazione che si sta utilizzando; questa caratteristica lo rende interscambiabile ed ideale per lo scambio di dati {16}. Attraverso il file JSON è stato possibile risalire alle seguenti informazioni: tipo di protocollo utilizzato, macchinario, intensità del campo magnetico, descrizione della procedura, posizione del paziente, frequenza di imaging, tipo di frequenza utilizzata, numero dell'acquisizione, spessore della fetta. Informazioni più dettagliate presenti nel file JSON, sono rappresentate di seguito sotto forma di elenco:

- "Modality": "MR", risonanza magnetica;
- "MagneticFieldStrength": 1.5 T, forza del campo magnetico;
- "ImagingFrequency": 63.8643 MHz, frequenza di imaging;
- "Manufacturer": "GE", produttore;
- "ManufacturersModelName": "SIGNA Creator", nome del modello;
- "InstitutionName": "MARIA S. SPLENDORE", nome dell'ospedale;
- "DeviceSerialNumber": "00000000B5103515", numero di serie del dispositivo;
- "StationName": "POGI-RISONMAGN04", nome della stazione;
- "BodyPartExamined": "HEAD", parte del corpo esaminata;
- "PatientPosition": "HFS", posizione paziente;
- "ProcedureStepDescription": "RM DI ENCEFALO E DI TRONCO ENCEFALICO GIUNZIONE CRANIO SPINALE E", descrizione della procedura;
- "SoftwareVersions": "27\LX\MR Software release:SV25.1_R06_1925.a", versione del software utilizzato per l'acquisizione;
- "MRAcquisitionType": "2D", tipo di acquisizione;
- "SeriesDescription": "COR T1 FSE", descrizione della serie;
- "ProtocolName": "ENCEFALO STANDARD RAZ", nome del protocollo;
- "ScanningSequence": "SE", sequenza utilizzata per la scansione;

- "SequenceVariant": "SK", variante della sequenza utilizzata;
- "ScanOptions": "FAST_GEMS\\EDR_GEMS\\TRF_GEMS\\FILTERED_GEMS\\ACC_GEMS\\FSI_GEMS", opzioni usate per la scansione;
- "PulseSequenceName": "fse-x1", nome della sequenza di impulsi utilizzata;
- "ImageType": ["ORIGINAL", "PRIMARY", "OTHER"];
- "SeriesNumber": 14, numero di serie;
- "AcquisitionTime": "17:53:52.000000", ora di acquisizione;
- "AcquisitionNumber": 1, numero di acquisizione;
- "SliceThickness": 3 mm, spessore della fetta;
- "SpacingBetweenSlices": 3.3 mm, distanza tra le fette;
- "SAR": 1.0451 W/Kg, indica il tasso di assorbimento specifico, energia assorbita del corpo quando viene esposto a campo magnetico a RF;
- "NumberOfAverages": 3, numero di medie effettuate;
- "EchoTime": 0.011344 ms, tempo di echo (TE);
- "RepetitionTime": 0.383 ms, tempo di ripetizione (TR);
- "FlipAngle": 160, angolo di rotazione;
- "ShimSetting": [-2, 8, -12]', impostazioni di shim, correzioni magnetiche per ottimizzare l'omogeneità del campo magnetico;
- "PrescanReuseString": "TG/s1, CF/s13, AS/s13", impostazioni di utilizzo dei parametri di prescan;
- "CoilString": "NVarray", tipo di bobina utilizzato;
- "NumberOfExcitations": 3, numero di volte in cui viene effettuata l'acquisizione durante una singola sequenza RM. Usato per aumentare il rapporto segnale/rumore;
- "PercentPhaseFOV": 80, percentuale del campo di vista in fase;
- "PercentSampling": 100, percentuale di campionamento;
- "EchoTrainLength": 4, lunghezza del treno di echo;
- "AcquisitionMatrixPE": 192;
- "ReconMatrixPE": 512;
- "ParallelReductionFactorInPlane": 1.5, fattore di riduzione parallela del piano;
- "PixelBandwidth": 65.1172, larghezza di banda dei pixel, rappresenta la frequenza di campionamento;
- "PhaseEncodingAxis": "i", asse di codifica, i indica l'asse x;

- "ImageOrientationPatientDICOM": [0.99818, -0.05394, 0.02702, 0.01487, -0.21416, 0.97668], orientamento dell'immagine nel sistema di riferimento del paziente;
- "InPlanePhaseEncodingDirectionDICOM": "ROW", direzione di codifica di fase nel piano dell'immagine, ROW indica righe.

È importante notare cosa è riportato nel campo 'ImageType': ["ORIGINAL", "PRIMARY", "OTHER"]. La specifica "ORIGINAL" sta ad indicare che le immagini sono state acquisite direttamente e non sono state soggette ad elaborazioni, "PRIMARY" indica che non sono state derivate da altre immagini, "OTHER", invece, indica che l'immagine non rientra nelle due precedenti ma il significato esatto varia a seconda del contesto.

Visualizzando invece ogni immagine con MicroDicom (Fig.5.1, Fig.5.2) è stato possibile risalire anche alla lunghezza della fetta, che, per le 21 immagini, è compresa tra -82.74 mm e -16.74 mm. Sono presenti inoltre, dei simboli, RT ed ET, che stanno ad indicare rispettivamente che l'immagine è visualizzata secondo un'orientazione destra-sinistra e che essa è stata ritagliata nella parte finale dell'acquisizione per rimuovere eventuali parti indesiderate.

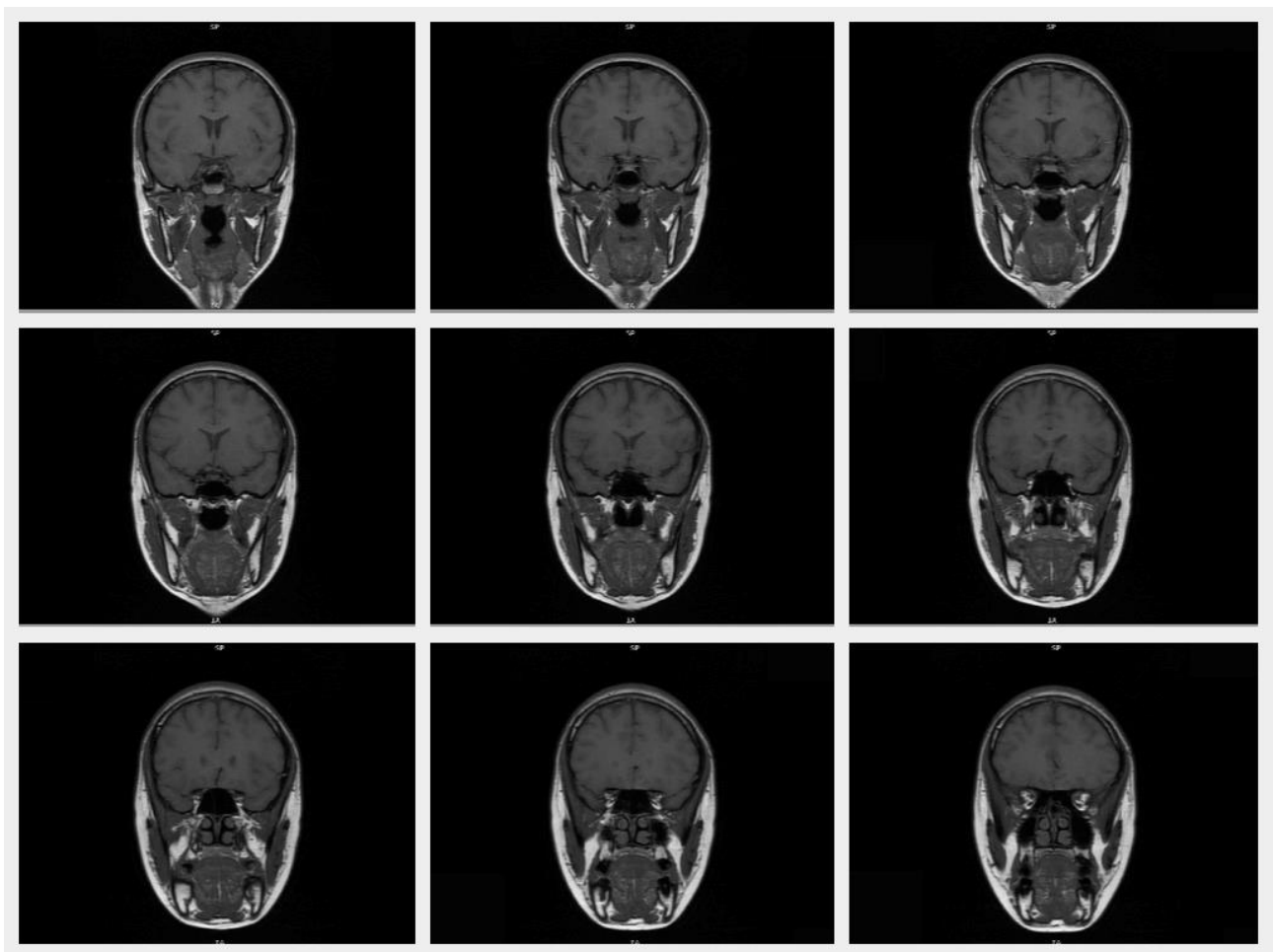


Fig. 5.1: Immagini COR T1 FSE.

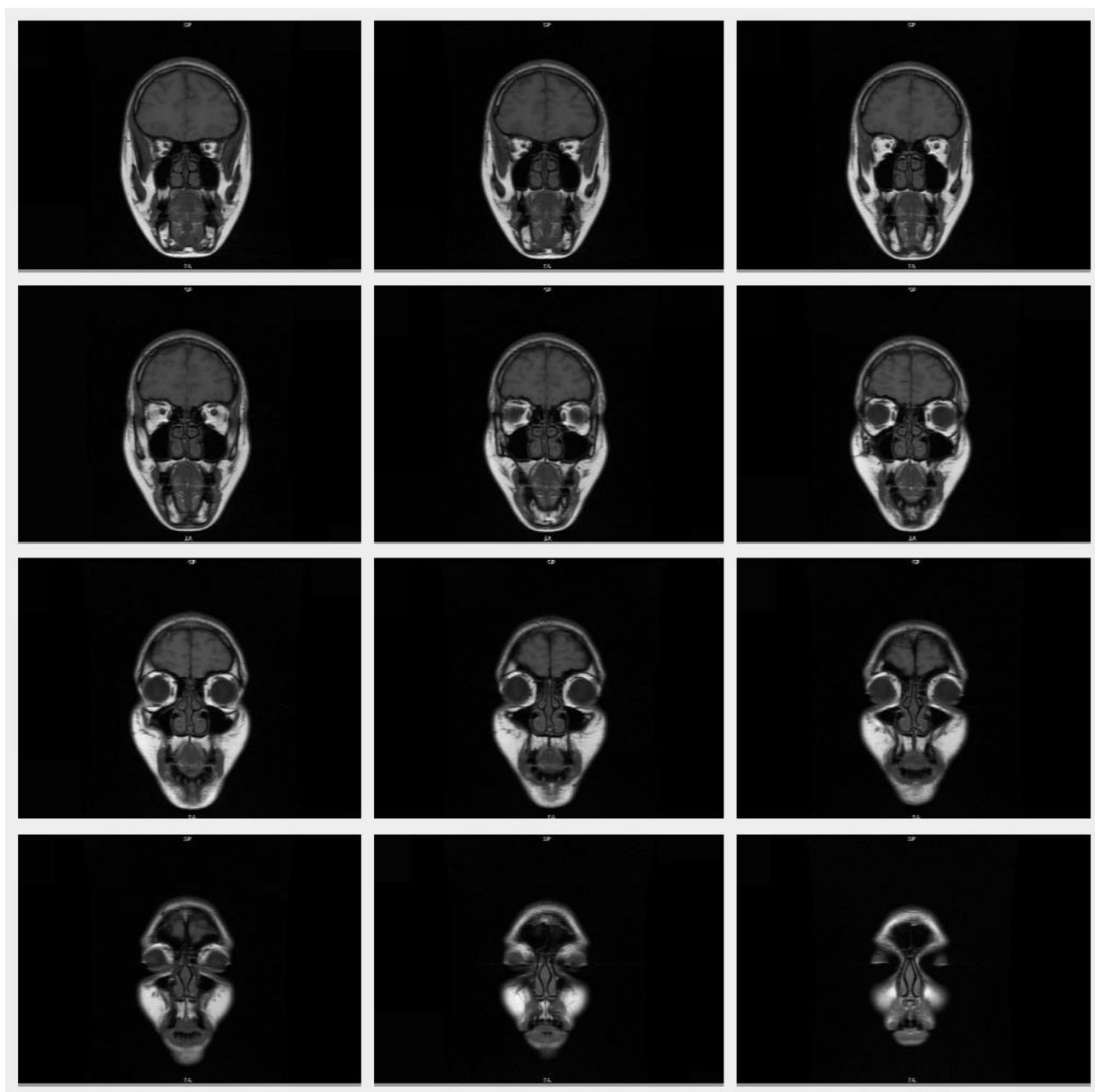


Fig. 5.2: Immagini COR T1 FSE.

Relativamente al protocollo di acquisizione, le acquisizioni sono state fatte con SIGNA Creator del produttore GE, con un'intensità del campo magnetico di 1.5 T. L'esame è stato eseguito sulla testa del paziente in posizione HFS (Head First Supine), acquisizione 2D, con un protocollo adottato che prende il nome di ENCEFALO STANDARD RAZ. Lo spessore di ciascuna fetta è di 3 mm, mentre la distanza tra le fette è di 3.3 mm.

5.3.1 Processamento delle immagini tramite software

In questo sotto-capitolo verrà illustrato il processo che ha portato al conseguimento del primo obiettivo della tesi, ovvero quello di segmentare i tessuti e le lesioni. Come prima cosa, sono state visualizzate le immagini attraverso l'interfaccia del software.

SPM è un software che, per il suo utilizzo, necessita di MATLAB. È stato quindi aperto MATLAB ed è stato digitato 'spm **fmri**' per poter aprire il software (fmri in quanto si sta parlando di risonanza magnetica): si sono aperte tre finestre, tra cui un'interfaccia grafica. SPM richiede file NIfTI decompressi. Poiché quando è stata fatta la conversione si è scelto il formato non compresso (.nii e non .nii.gz), è stato possibile subito procedere alla visualizzazione delle immagini, cliccando 'Display' sull'interfaccia grafica e selezionando il file .nii da visualizzare (Fig.5.3, Fig.5.4, Fig.5.5).

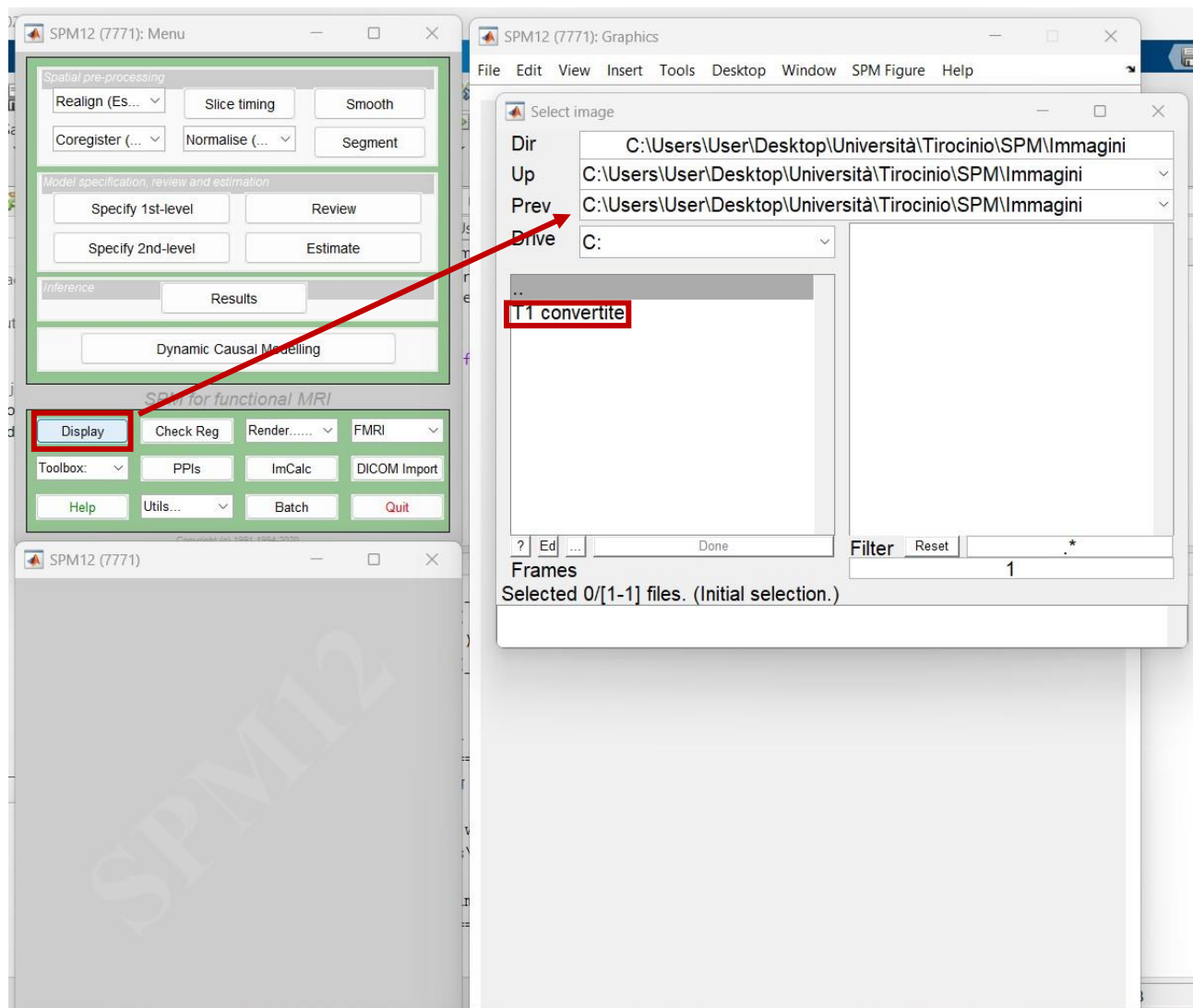


Fig. 5.3: Interfaccia SPM.

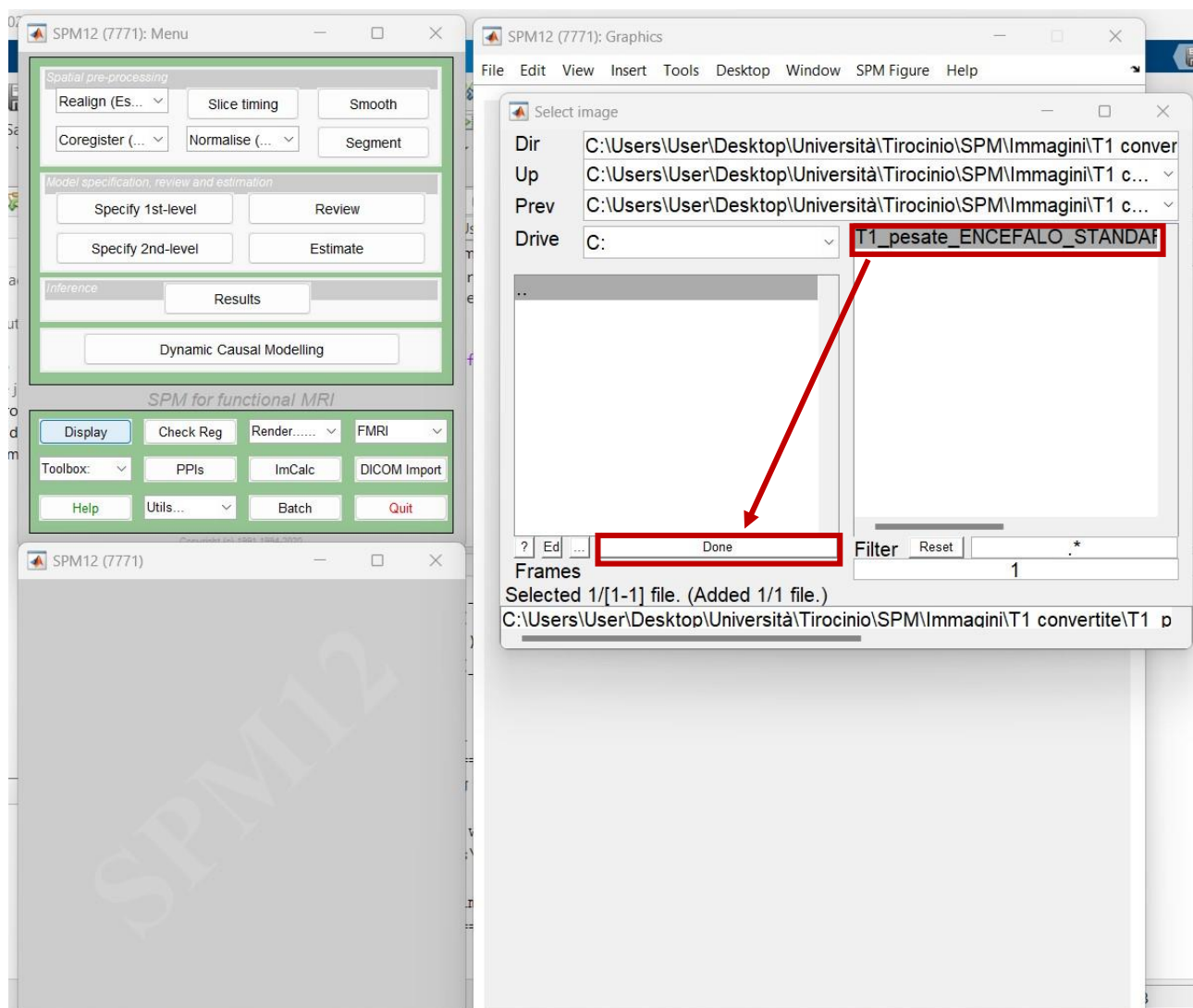


Fig. 5.4: Interfaccia SPM.

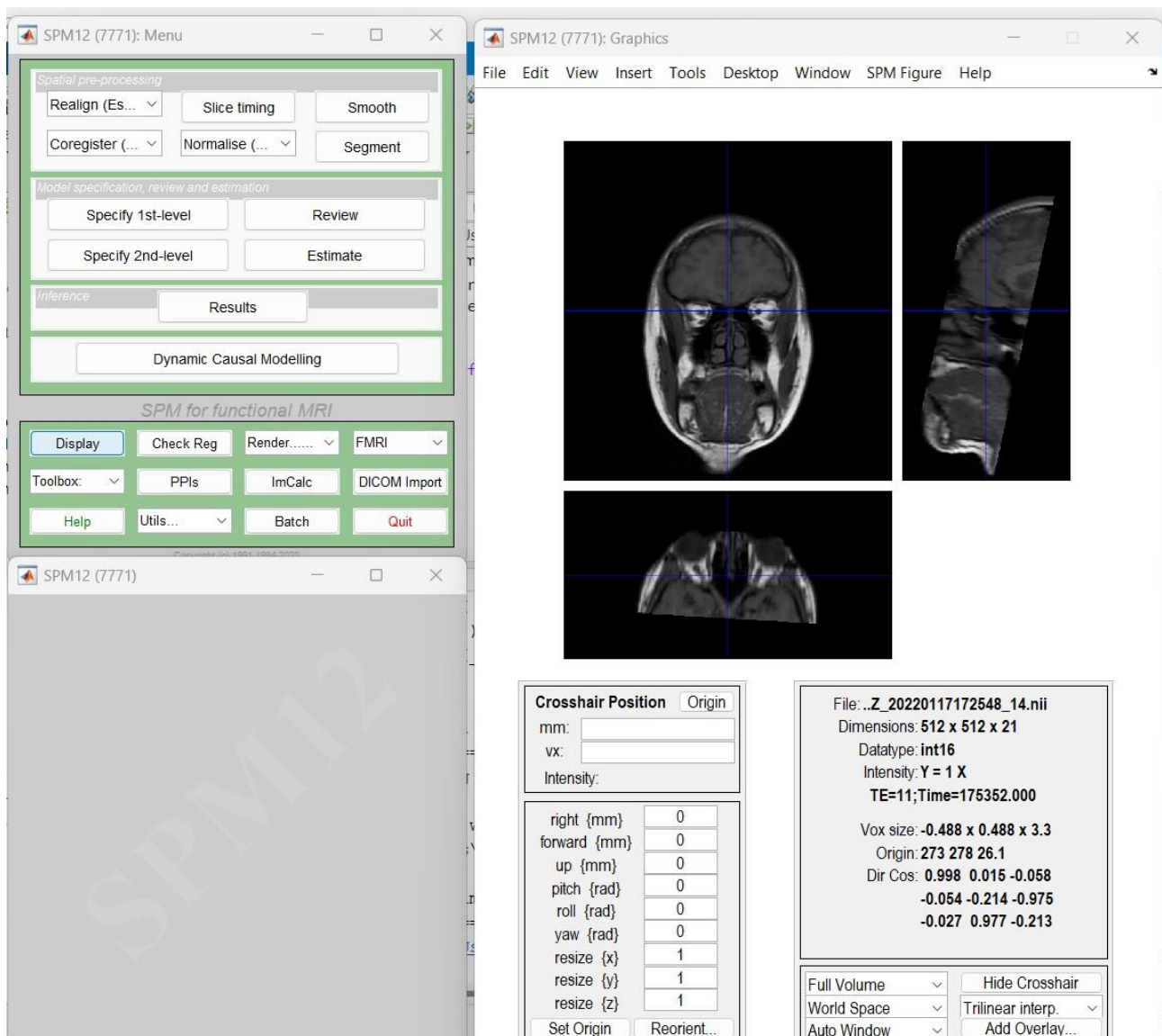


Fig. 5.5: Interfaccia SPM.

5.3.1.1 Segmentazione dei tessuti

Dopo aver visualizzato le immagini, si è proceduto con la segmentazione dei tessuti attraverso i seguenti passaggi:

- cliccare su 'segment' sull'interfaccia grafica;
- fare un doppio clic su 'Volumes' (Fig.5.6) e selezionare il file da segmentare (file .nii), come è stato mostrato precedentemente in Fig.5.4;
- cliccare 'Save Bias Corrected' e selezionare 'Save Bias Corrected' invece di 'Save Nothing' (Fig.5.7);
- cliccare su 'Deformation Fields' e selezionare 'Forward' (Fig.5.8);
- cliccare sulla freccia verde ('Run Batch') per eseguire il programma.

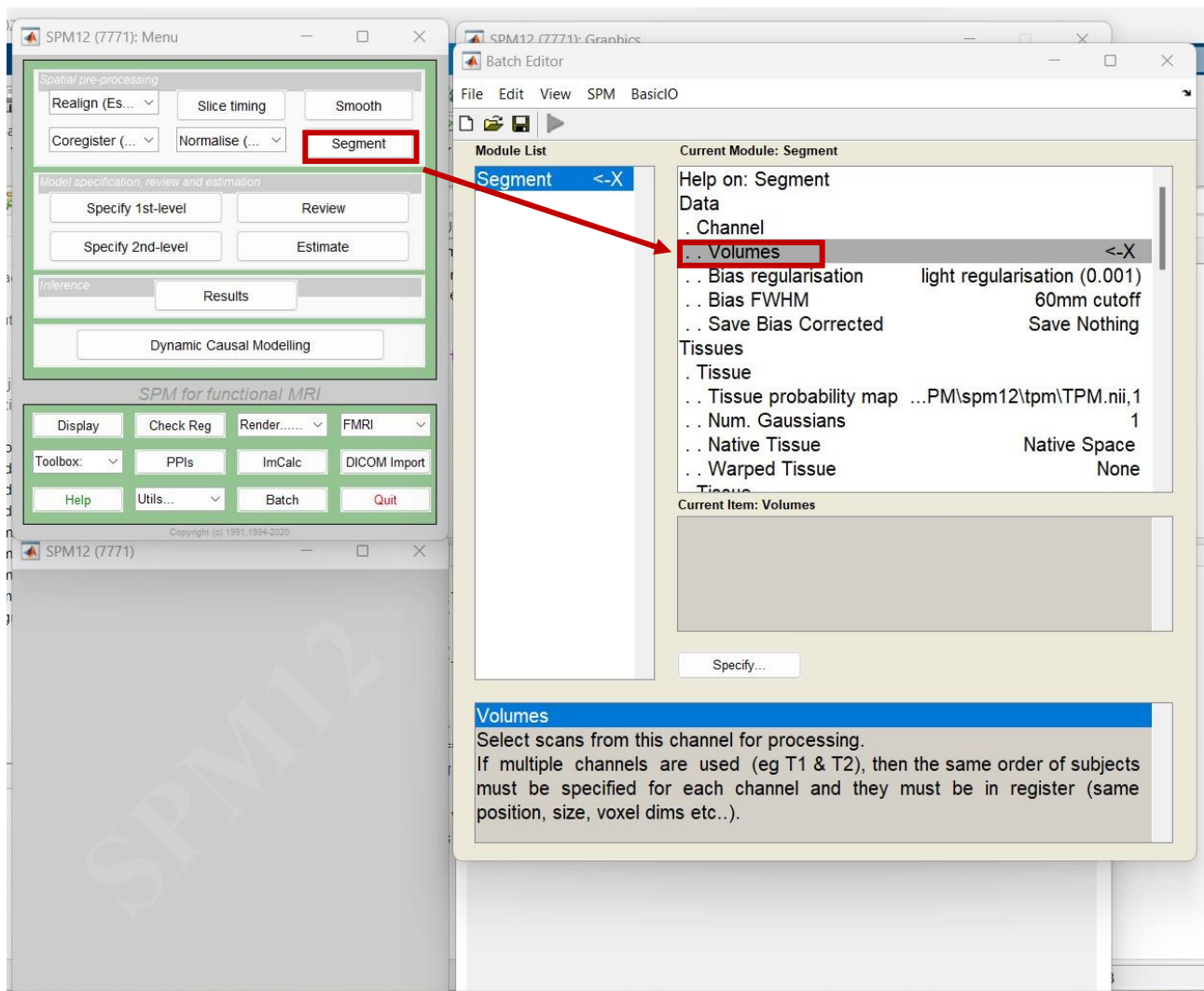


Fig. 5.6: Primo step segmentazione.

Questo modello comprende sia la segmentazione sia la correzione del bias sia la normalizzazione spaziale. Con il termine normalizzazione spaziale, ci si riferisce all'allineamento delle immagini in uno spazio comune (ovvero in un sistema di riferimento comune). Questo può essere utile per confrontare dati di più soggetti. Quando si confrontano dati appartenenti a diversi soggetti, infatti, di solito si usa fare un'ulteriore normalizzazione (sempre attraverso SPM) che permette di allineare le immagini nello spazio MNI, uno spazio comune utilizzato nel neuroimaging; questo facilita molto il confronto tra diversi studi. Quest'ultimo aspetto è molto importante, infatti, nelle conclusioni dello stato dell'arte è stato possibile vedere come il confronto tra diversi soggetti/studi è molto complicato, in quanto i macchinari utilizzati dalle diverse strutture e i relativi protocolli potrebbero essere diversi da studio a studio. Fare una normalizzazione in uno spazio comune come MNI, potrebbe aiutare a mitigare in parte questo aspetto. Per attuare ciò è necessario selezionare l'opzione 'Forward' nel campo 'Deformation Fields' (Fig.5.8).

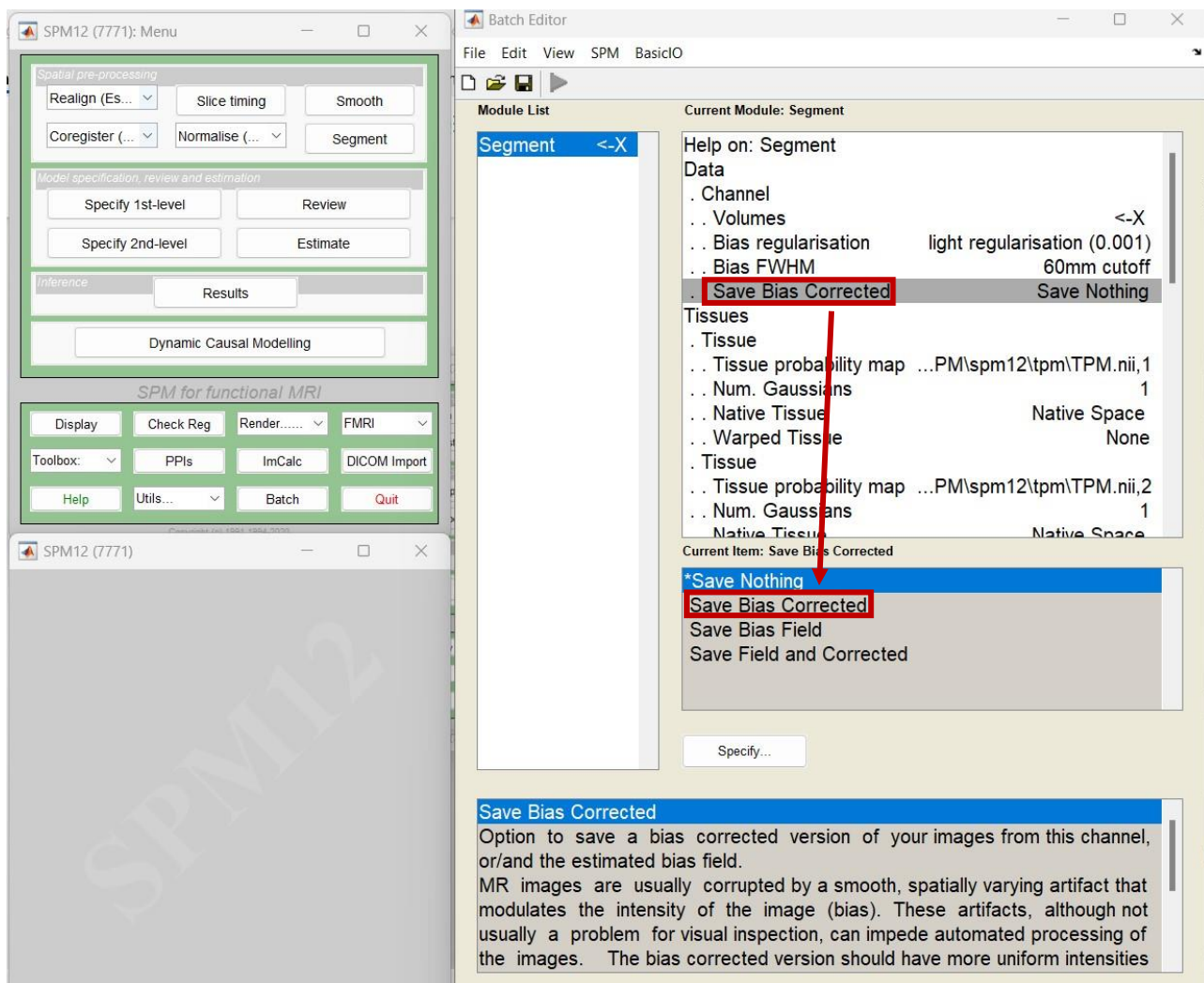


Fig. 5.7: Secondo step segmentazione.

Le immagini di RM sono affette da artefatti che vanno ad influenzare l'intensità dell'immagine (bias). Selezionando l'opzione 'Save Bias Corrected', si dovrebbero avere intensità più uniformi all'interno dei diversi tipi di tessuti.

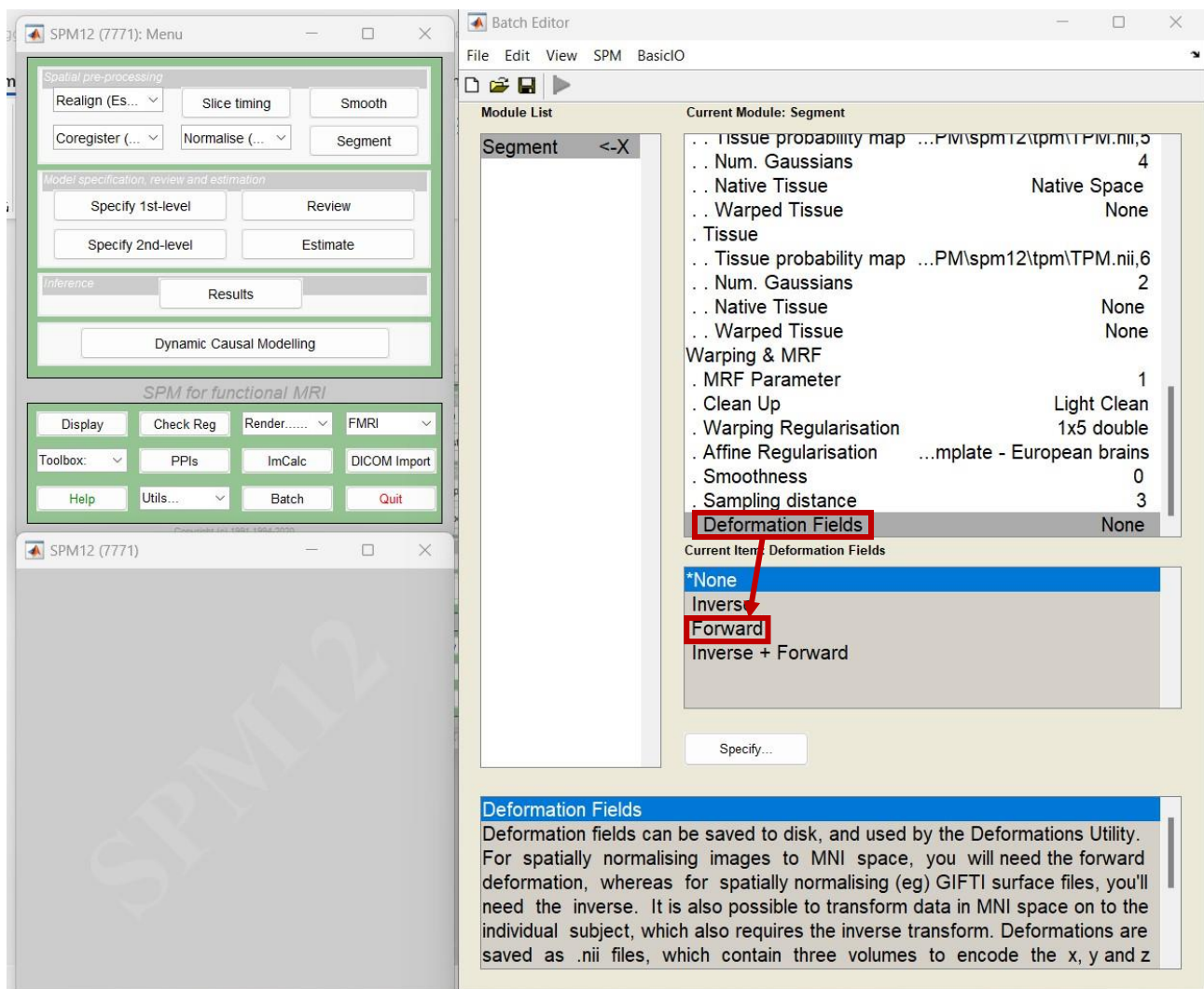


Fig. 5.8: Terzo step segmentazione.

La 'Forward Deformation' è utilizzata per allineare l'immagine segmentata al modello di riferimento MNI, così facendo, si ottiene una corrispondenza spaziale tra le regioni anatomiche del soggetto e quelle del modello. Come già detto precedentemente, questo è utile in caso si ritenga opportuno effettuare un'ulteriore normalizzazione. Poiché in questa tesi si hanno a disposizione dati appartenenti ad un solo soggetto, una successiva normalizzazione non sarà fatta, ma è comunque utile selezionare l'opzione 'Forward', nel caso in cui in un secondo momento si vogliano confrontare questi dati con un altro soggetto/studio.

Una volta fatto ciò, nella cartella in cui era contenuto il file .nii da segmentare, ci saranno altri cinque file .nii preceduti da un prefisso (c1, c2, c3, c4, c5) che sta ad indicare il tipo di tessuto segmentato a cui corrisponde il file, in particolare: c1 indica la sostanza grigia, c2 la sostanza bianca, c3 il liquor, c4 il tessuto osseo, c5 i tessuti molli. È inoltre presente un file preceduto da una m che corrisponde all'immagine strutturale 'bias corrected', ed un file preceduto da una y che corrisponde alla mappa di deformazione. I passaggi precedenti sono stati fatti seguendo le linee guida presenti nel sito {17}.

Come già detto nel paragrafo 3.2 e come confermato dalla neurologa avente in cura il soggetto in esame, le immagini T1 pesate permettono una visualizzazione migliore delle strutture anatomiche del soggetto, mentre le immagini T2 pesate evidenziano meglio le condizioni patologiche. Esiste un toolbox di SPM chiamato LST (Lesion Segmentation Tool) sviluppato appositamente per la segmentazione delle lesioni da SM. Esso è stato già visto nello studio riportato nel capitolo dello stato dell'arte 4.3.1 utilizzato con SPM12. Per questi motivi, è stato deciso di applicarlo al dataset di questa tesi, in particolare alle immagini T2 pesate per evidenziare meglio la condizione patologica. Poiché in letteratura, in particolare negli studi riportati nello stato dell'arte, sono state utilizzate immagini in sezione assiale, anche per questa tesi è stata fatta questa scelta.

5.3.1.2 Segmentazione delle lesioni

LST è un toolbox open source per SPM sviluppato appositamente per la segmentazione delle lesioni da SM. Esso è in grado di segmentare lesioni iperintense in immagini FLAIR pesate in T2. Al momento sono disponibili due algoritmi per la segmentazione delle lesioni: l'algoritmo LPA (Lesion Prediction Algorithm) che richiede solo immagini FLAIR ma è ancora in fase di sviluppo e test, e l'algoritmo LGA (Lesion Growth Algorithm) che richiede immagini T1 pesate e immagini FLAIR {18}.

Le immagini che sono state prese in considerazione sono immagini Ax T2 FLAIR (Fig.5.9), in cui Ax sta per assiale e T2 sta per T2 pesate. Sono state scelte immagini T2 per evidenziare la condizione patologica (come detto precedentemente), e FLAIR perché è la sequenza richiesta dall'LST. Queste immagini sono state convertite in file NIfTI come era stato fatto per le immagini COR T1 FSE, e, per quanto riguarda le informazioni più importanti (protocollo, campo magnetico, macchinario) contenute all'interno del file JSON erano quasi tutte uguali alle informazioni delle immagini COR T1 FSE (essendo sempre lo stesso soggetto e lo stesso macchinario), ad eccezione dello spessore delle fette (5 mm) e della loro distanza (6 mm).

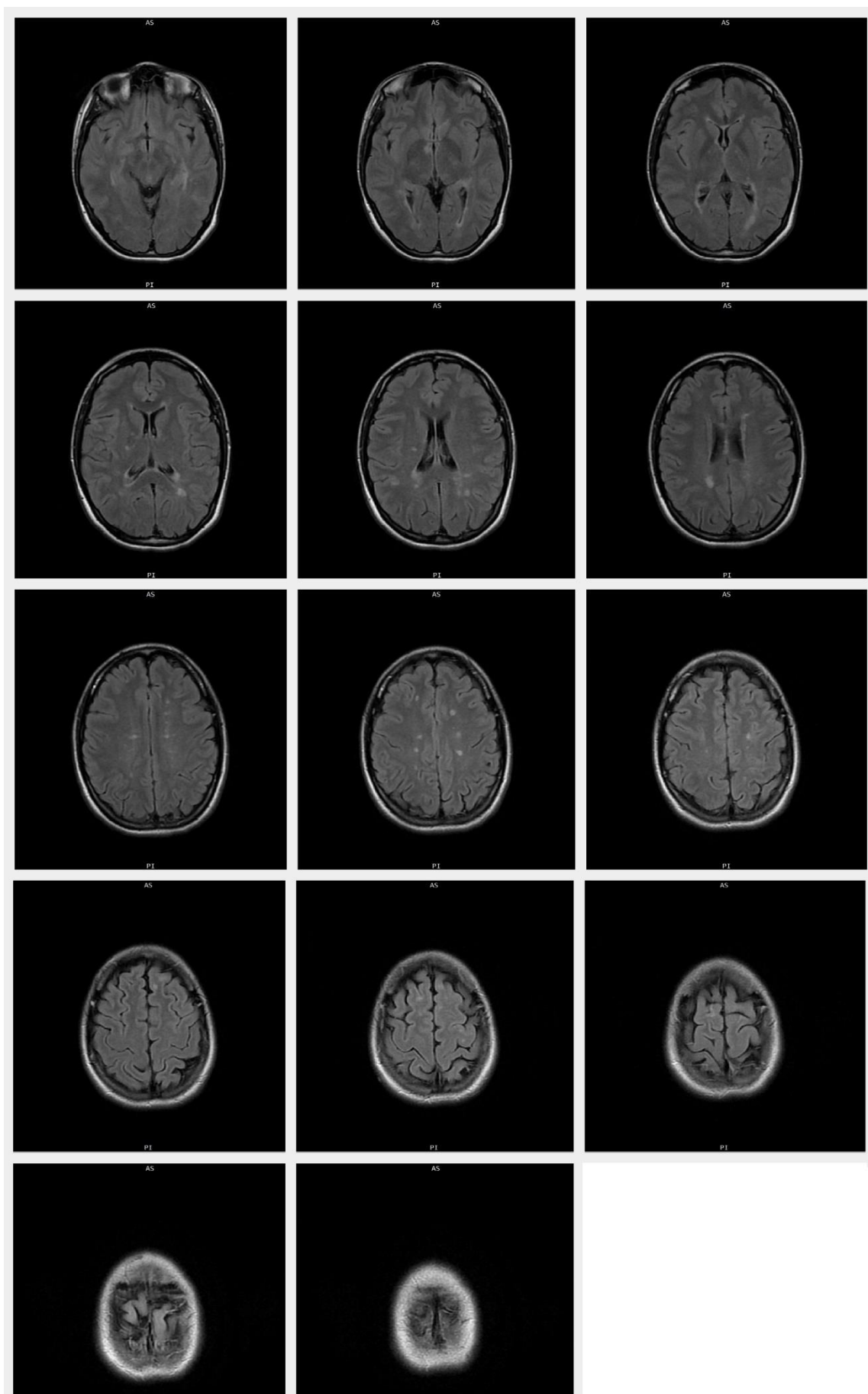


Fig. 5.9: Sottinsieme di immagini Ax T2 FLAIR dello stesso scan.

Poiché l'algoritmo LGA prevede che venga impostata una soglia con la finalità di avere una mappa binaria delle lesioni, e questo può portare non solo ad errori (in quanto bisogna conoscere dettagliatamente il protocollo), ma può consumare molto tempo, per questa tesi è stato scelto l'algoritmo LPA [34] implementato nel toolbox LST versione 3.0.0 [20] per SPM.

Di seguito sono forniti maggiori dettagli su LPA: l'algoritmo si basa su un classificatore binario nella forma di un modello di regressione logistica addestrato sui dati di 53 pazienti con sclerosi multipla con pattern di lesioni gravi. I dati sono stati raccolti presso il Dipartimento di Neurologia, Technische Universität München, Monaco di Baviera, Germania. Per questo modello sono state utilizzate due covariate: una mappa di probabilità di lesioni simile a quella dell'algoritmo di crescita delle lesioni (Schmidt et al., 2012), ed una covariata spaziale che tiene conto delle variazioni specifiche del voxel nella probabilità di lesione. I parametri di adattamento di questo modello vengono utilizzati per segmentare le lesioni nelle nuove immagini fornendo una stima della probabilità di lesione per ciascun voxel [18].

Dopo aver compreso come funziona di preciso l'algoritmo, è stato scaricato il toolbox LST direttamente dal sito [19], è stato decompresso e la cartella chiamata 'LST' è stata spostata nella cartella dei toolbox di SPM12. Per utilizzare l'algoritmo è stato cliccato 'Toolbox' sull'interfaccia grafica di SPM, si è selezionato LST e si è scelto l'algoritmo LPA (Fig.5.10, Fig.5.11, Fig.5.12).

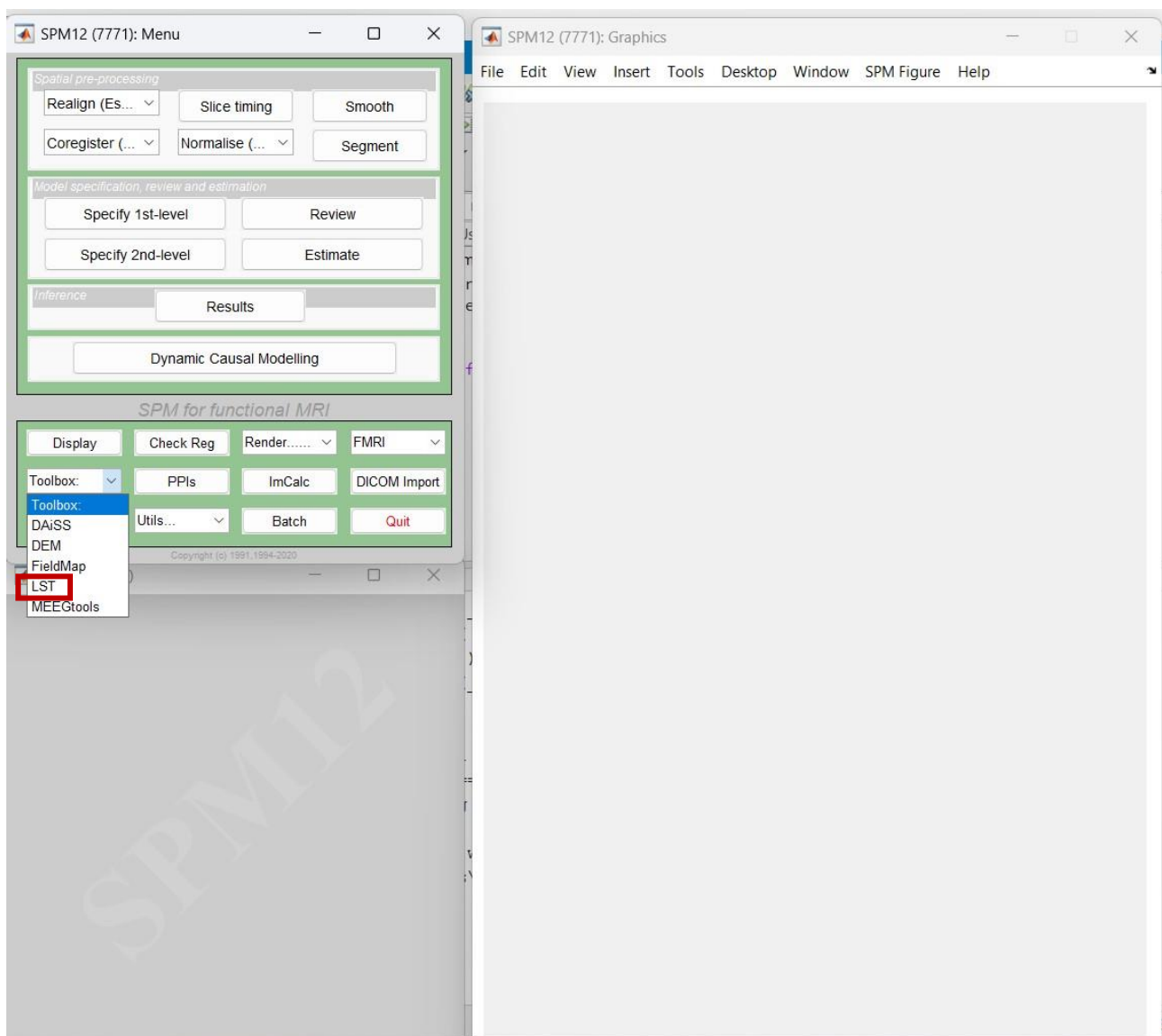


Fig. 5.10: LST primo step.

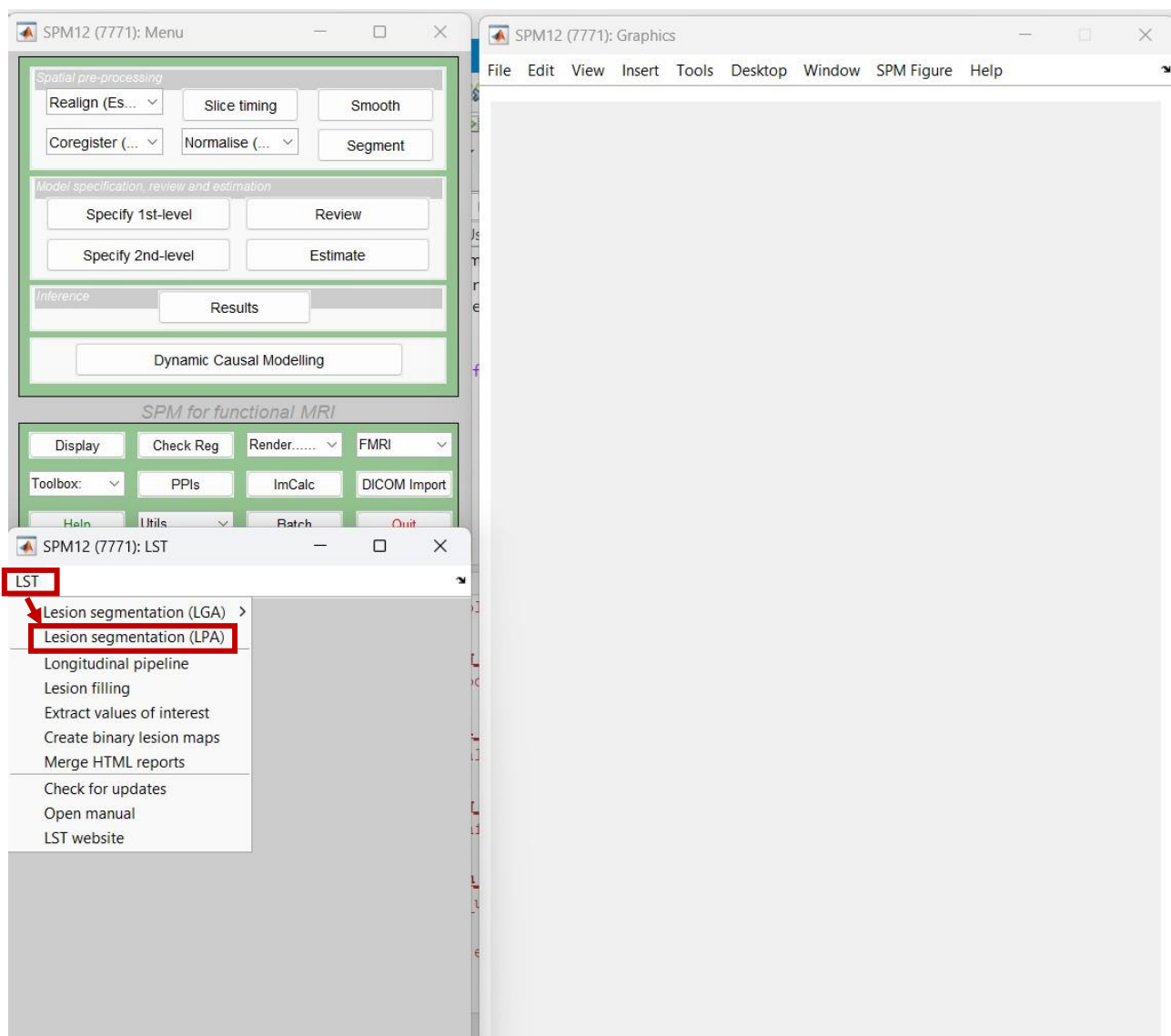


Fig. 5.11: LST secondo step.

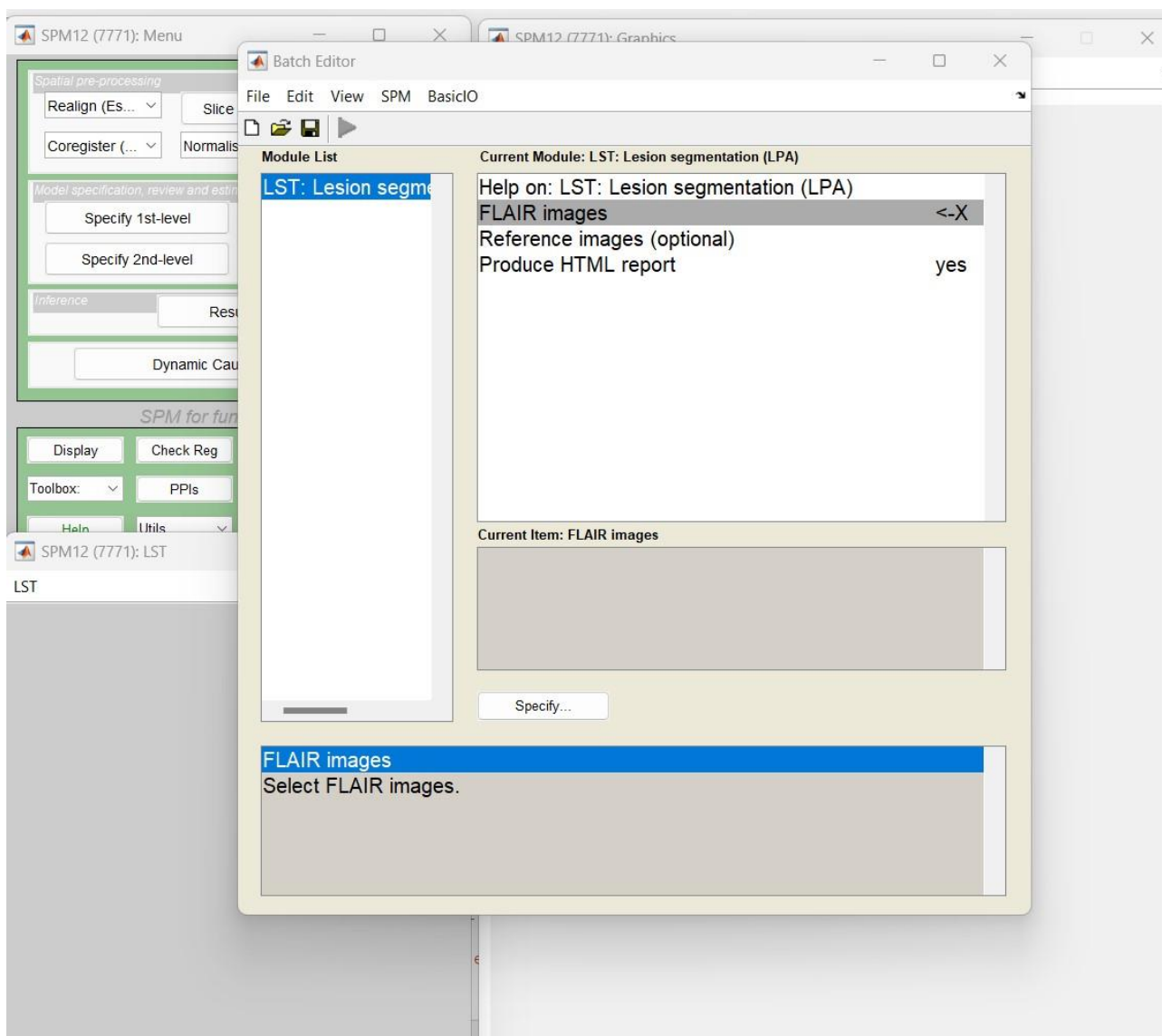


Fig. 5.12: LST terzo step.

In questo step è necessario selezionare le immagini da segmentare (precedentemente convertite in NIFTI) nel campo 'FLAIR images'. Nel campo 'Reference Images' si possono selezionare delle immagini di riferimento, ma non è obbligatorio, mentre nel campo 'Produce HTML report' è consigliabile selezionare 'yes' perché rende più facile il controllo dei risultati.

Come output si avranno: un file preceduto da m (.nii) che rappresenta la versione delle immagini con il bias corretto (se non è stata selezionata nessuna immagine come riferimento), un file .nii che rappresenta la mappa di probabilità delle lesioni, un file .mat utile per successive elaborazioni (per esempio il riempimento di lesioni), ed un file HTML [18].

5.3.2 Valutazione comparativa delle immagini

Al fine di perseguire il secondo obiettivo della tesi, la segmentazione delle lesioni tramite algoritmo LST è stata eseguita anche su una risonanza con contrasto eseguita dopo nove mesi dalla prima, e su una risonanza, sempre con contrasto, eseguita dopo sette mesi dalla seconda al fine di valutare un eventuale cambiamento del carico lesionale in termini di volume e numero delle lesioni. In queste due ultime risonanze il macchinario utilizzato, differente da quello utilizzato nella prima risonanza, è stato il modello ‘Ingenia’ del produttore ‘Philips’. Le sequenze scelte per la segmentazione delle lesioni sono sequenze T2p FLAIR 3D_Brainview_TR 8000 HR, in cui: T2p FLAIR sta ad indicare che sono sequenze FLAIR pesate in T2, 3D_Brainview indica che si è acquisita un’immagine tridimensionale del cervello, TR 8000 indica il tempo di ripetizione (8000 ms), mentre HR sta per ‘alta risoluzione’ (‘high resolution’). Inoltre, la forza del campo magnetico applicato è di 3T, mentre lo spessore delle fette e lo spazio tra di esse sono rispettivamente 1 mm e 0.5 mm.

5.4 Risultati

Una volta che gli obiettivi sono stati raggiunti, è stato essenziale procedere con la visualizzazione dei risultati al fine di trarne conclusioni significative.

5.4.1 Risultati relativi al processamento delle immagini tramite software

Per visualizzare le immagini inerenti ai tessuti segmentati, è stato cliccato il pulsante ‘Display’ e sono state selezionate solamente le immagini c2, in quanto il resto dei tessuti non è utile allo scopo di questa tesi. (Fig.5.13, Fig.5.14, Fig.5.15).

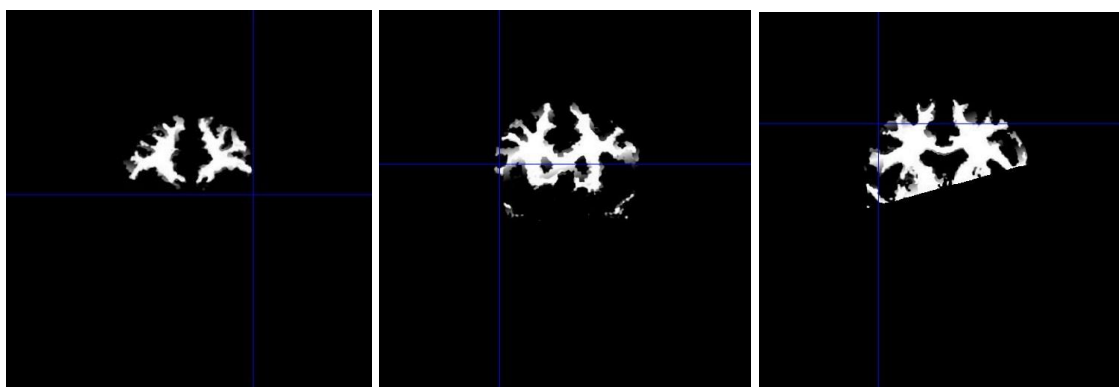


Fig. 5.13: Slice iniziale, centrale e finale sezione assiale.

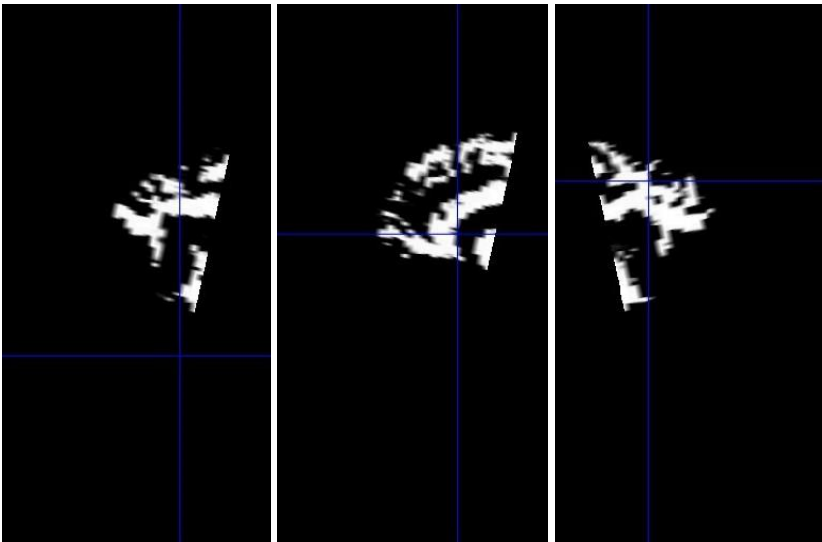


Fig. 5.14: Slice iniziale, centrale e finale sezione sagittale.

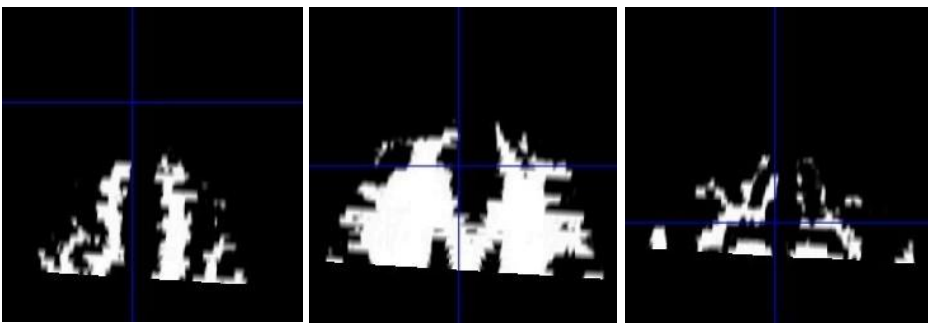


Fig. 5.15: Slice iniziale, centrale e finale sezione coronale.

Nella Fig.5.16, invece, sono riportate le immagini Ax T2 FLAIR della prima risonanza in cui l'algoritmo LPA ha rilevato la presenza di lesioni. Attraverso il file HTML è stato possibile risalire anche al numero di lesioni rilevate (12) ed al volume corrispondente (1.4907 ml).

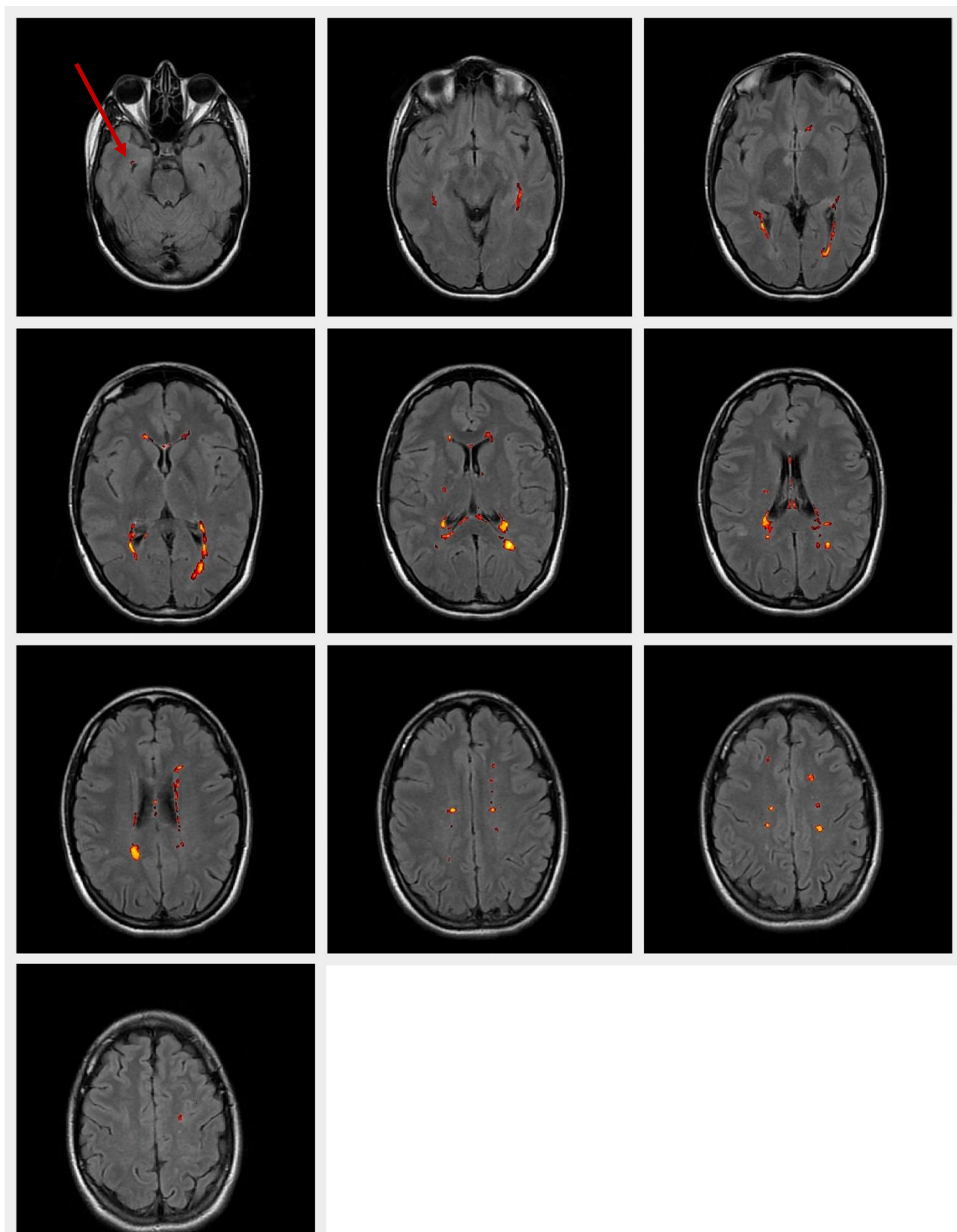


Fig. 5.16: Lesioni rilevate da LPA (in rosso), le più piccole sono indicate dalla freccia rossa.

5.4.2 Risultati relativi alla valutazione comparativa delle immagini

Nella seconda risonanza analizzata, l'algoritmo LPA ha rilevato 32 lesioni ed un volume corrispondente pari a 3.5447 ml. Nella terza risonanza, invece, sono state rilevate 26 lesioni ed un volume di 3.3715 ml. L'aumento del numero delle lesioni a distanza di nove mesi (tra prima e seconda risonanza) è giustificato dalla progressione della malattia in termini di peggioramento. La diminuzione di lesioni rilevate tra la seconda e la terza risonanza analizzata, invece, può portare ad una possibile conclusione: questa diminuzione può essere dovuta al processo di riparo della mielina danneggiata. Infatti, può succedere che, nella prima fase della malattia, il danno si ripari, almeno in parte, in modo autonomo. Tale riparazione può avvenire in diversi modi, tra cui la rimielinizzazione, un processo attraverso il quale si formano nuovi strati di mielina intorno agli assoni danneggiati, ripristinando così la normale conduzione dell'impulso nervoso {21}.

Nelle Fig.5.17 sono riportate delle immagini che rappresentano le lesioni, e la rispettiva localizzazione, rilevate dall'algoritmo, rispettivamente della seconda e terza risonanza.

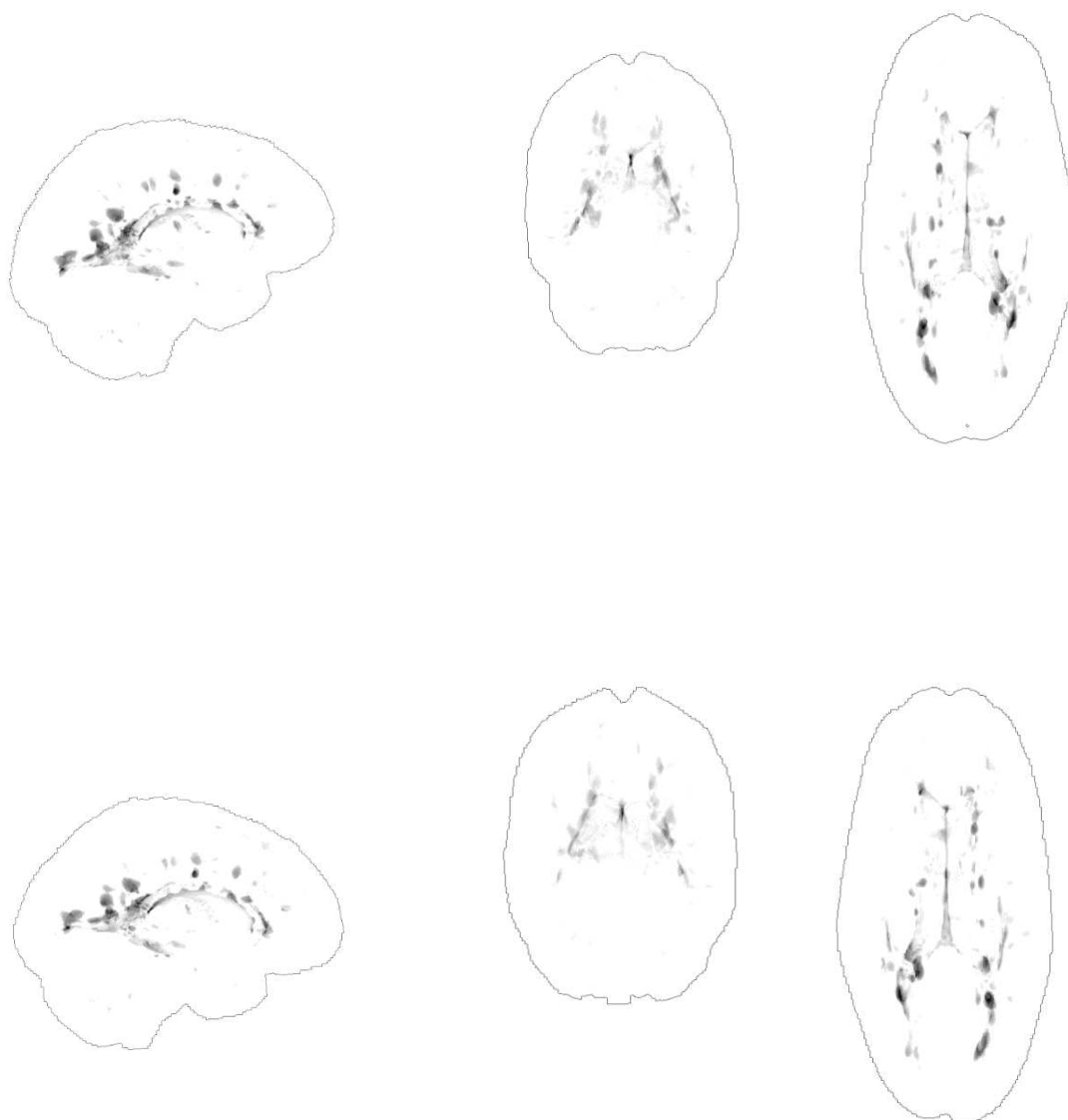


Fig. 5.17: Lesioni seconda (superiore) e terza (inferiore) risonanza: sezione sagittale, coronale ed assiale.

Come è stato già detto in merito al numero ed al volume delle lesioni di queste ultime due risonanze, si è notata una diminuzione delle lesioni, dovuto probabilmente ad una riparazione della mielina. Osservando le immagini sopra riportate, infatti, non si notano molte differenze tra le due risonanze, in quanto esse differiscono per un numero piccolo di lesioni (32 e 26), è possibile notare però una leggera differenza nella morfologia e nella localizzazione di queste tra le due risonanze, soprattutto nella sezione assiale. È importante sottolineare la necessità di disporre di tutte le sezioni per poter visionare meglio le differenze tra le stesse.

5.5 Discussione dei risultati

Lo scopo di questa tesi era duplice: segmentare tessuti e lesioni da SM, e fare una valutazione comparativa tra due scansioni consecutive di RM. Per entrambi gli obiettivi è stato selezionato uno dei software semi-automatici maggiormente utilizzati in letteratura, ossia SPM. Esso è stato scelto anche per la sua compatibilità con Microsoft Windows. Prendendo in esame tre scansioni di RM di uno stesso paziente, si è valutata l'efficacia del software. La prima scansione di RM è stata utilizzata al fine di segmentare tessuti e lesioni, mentre le restanti scansioni consecutive di RM sono state utilizzate per fare una valutazione comparativa tra le stesse. Il software è stato in grado sia di segmentare i tessuti cerebrali sia di segmentare le lesioni in modo efficace attraverso il toolbox LST di SPM. In particolare, è stato utilizzato l'algoritmo LPA di LST, ed è stato possibile notare come, in pochi semplici passaggi, esso è riuscito non solo a identificare le lesioni, ma anche a fornire un report HTML in cui erano riportati i dati di maggior rilevanza: il numero ed il volume delle lesioni. Tramite questi risultati, si è riusciti a confermare la bontà del software in questo tipo di analisi, permettendo di svolgere, in un secondo momento, l'analisi comparativa. Dai risultati di quest'ultima è stato possibile mettere a confronto dati appartenenti a due scansioni consecutive. Si è notata una variazione nel numero e nel volume delle lesioni tra le due RM. Oltre ciò, l'algoritmo ha permesso di ottenere in uscita le immagini con le lesioni rilevate, riuscendo in questo modo anche a valutare la localizzazione delle stesse. Questo rappresenta un fattore rilevante nello studio del decorso della malattia: oltre il numero ed il volume delle lesioni, infatti, è importante anche la loro entità e la loro localizzazione, elementi fondamentali non solo per la diagnosi, ma anche per la scelta della terapia da parte del clinico.

I risultati ottenuti attraverso l'analisi delle immagini di RM, tramite SPM, costituiscono un passo significativo nello studio della SM e del suo decorso, in quanto l'algoritmo LPA ha fornito dati preziosi sull'entità e sulla distribuzione delle lesioni. Tale aspetto conferma la bontà dell'approccio semi-automatico nell'individuare le lesioni distinguendole dal tessuto circostante.

Nonostante l'efficacia dell'algoritmo e la sua chiara utilità in ambito clinico, è doveroso sottolineare alcune criticità o limitazioni dello stesso. In primo luogo, l'algoritmo LPA lavora esclusivamente sulle immagini T2 FLAIR. Poiché il dataset utilizzato appartiene ad un paziente con SM RR, non è possibile confermare al 100 % la bontà dell'algoritmo in caso di dataset appartenenti a pazienti con una forma diversa e/o più grave della malattia. Inoltre, un'ulteriore limitazione è fornita dalla nascita e dal relativo impiego di più promettenti sistemi basati sull'intelligenza artificiale: questo implica il progressivo disuso di software semi-automatici in favore delle nuove tecnologie. Attraverso l'AI,

infatti, sarà possibile utilizzare diverse tipologie di immagini permettendo un miglioramento della segmentazione delle lesioni.

Conclusione

La presente tesi si poneva due obiettivi: (1) segmentare i tessuti cerebrali per poi identificare e segmentare le lesioni da SM, (2) condurre una valutazione comparativa tra due scansioni successive e consecutive di RM. Per fare ciò è stato scelto un software semi-automatico in grado di segmentare i tessuti e di identificare le lesioni, distinguendole dal tessuto circostante. Tale software è stato in grado, inoltre, di fare un report con numero di lesioni ed il corrispettivo volume, grazie ai quali è stato possibile fare un confronto tra le varie RM prese in considerazione.

È fondamentale sottolineare l'importanza dell'analisi eseguita in questa tesi nel contesto della comprensione e della gestione della malattia. L'accurata valutazione e quantificazione delle lesioni attraverso la segmentazione, consente ai clinici di prendere decisioni più accurate sulla scelta della terapia. La SM, infatti, con la sua eziologia incerta e l'assenza di una cura definitiva, rappresenta una sfida significativa per i clinici e per i pazienti. Essa potrebbe essere considerata una malattia 'invisibile', in quanto la maggior parte dei sintomi non sono visibili esternamente da parte di altre persone.

L'analisi condotta è stata presentata con la speranza che possa servire da trampolino di lancio nello sforzo incessante per alleviare il peso della SM nei pazienti.

Bibliografia

- [1] Kenneth S.Saladin. Anatomia umana. Piccin. 2017. Seconda edizione sulla quinta americana.
- [2] Filley CM, Fields RD. White matter and cognition: making the connection. *J Neurophysiol.* 2016 Nov 1;116(5):2093-2104.
- [3] Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, Leonard E. White. Neuroscience. Sinauer Associates, Inc. 2012. Quinta edizione.
- [4] Tafti D, Ehsan M, Xixis KL. Multiple Sclerosis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; September 7, 2022.
- [5] Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, Barkhof F, Ciccarelli O, De Stefano N, Geurts JGG, Paul F, Reich DS, Toosy AT, Traboulsee A, Wattjes MP, Yousry TA, Gass A, Lubetzki C, Weinshenker BG, Rocca MA. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain.* 2019 Jul 1;142(7):1858-1875.
- [6] Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet.* 2017;389(10076):1336-1346.
- [7] Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162-173.
- [8] Hart FM, Bainbridge J. Current and emerging treatment of multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 2016;22(6 Suppl): s159-s170.
- [9] R.S.Khandpur. Biomedical Instrumentation. McGraw-Hill Education. 2004. Seconda Edizione.
- [10] John G.Webster, Amit J.Nimunkar. Medical Instrumentation. John Wiley & Sons Inc. 2020. Quinta edizione.
- [11] Jackson EF, Ginsberg LE, Schomer DF, Leeds NE. A review of MRI pulse sequences and techniques in neuroimaging. *Surg Neurol.* 1997;47(2):185-199.
- [12] Silver NC, Good CD, Barker GJ, MacManus DG, Thompson AJ, Moseley IF, McDonald WI, Miller DH. Sensitivity of contrast enhanced MRI in multiple sclerosis. Effects of gadolinium dose, magnetization transfer contrast and delayed imaging. *Brain.* 1997 Jul;120 (Pt 7):1149-61.
- [13] Danelakis A, Theoharis T, Verganelakis DA. Survey of automated multiple sclerosis lesion segmentation techniques on magnetic resonance imaging. *Comput Med Imaging Graph.* 2018;70:83-100.

- [14] Guo C, Ferreira D, Fink K, Westman E, Granberg T. Repeatability and reproducibility of FreeSurfer, FSL-SIENAX and SPM brain volumetric measurements and the effect of lesion filling in multiple sclerosis. *Eur Radiol*. 2019 Mar;29(3):1355-1364.
- [15] Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev*. 2019;99(3):1381-1431.
- [16] Valverde S, Oliver A, Díez Y, et al. Evaluating the effects of white matter multiple sclerosis lesions on the volume estimation of 6 brain tissue segmentation methods. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36(6):1109-1115.
- [17] Chard DT, Jackson JS, Miller DH, Wheeler-Kingshott CA. Reducing the impact of white matter lesions on automated measures of brain gray and white matter volumes. *J Magn Reson Imaging*. 2010;32(1):223-228.
- [18] Rummel C, Aschwanden F, McKinley R, et al. A Fully Automated Pipeline for Normative Atrophy in Patients with Neurodegenerative Disease. *Front Neurol*. 2018;8:727.
- [19] Cabezas M, Oliver A, Roura E, et al. Automatic multiple sclerosis lesion detection in brain MRI by FLAIR thresholding. *Comput Methods Programs Biomed*. 2014;115(3):147-161.
- [20] Jouzizadeh M, Ghaderi AH, Cheraghmakani H, Baghbanian SM, Khanbabaie R. Resting-State Brain Network Deficits in Multiple Sclerosis Participants: Evidence from Electroencephalography and Graph Theoretical Analysis. *Brain Connect*. 2021;11(5):359-367.
- [21] Toledano-Massiah S, Sayadi A, de Boer R, et al. Accuracy of the Compressed Sensing Accelerated 3D-FLAIR Sequence for the Detection of MS Plaques at 3T. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2018;39(3):454-458.
- [22] Horbruegger M, Loewe K, Kaufmann J, et al. Anatomically constrained tractography facilitates biologically plausible fiber reconstruction of the optic radiation in multiple sclerosis. *Neuroimage Clin*. 2019;22:101740.
- [23] Ouellette R, Treaba CA, Granberg T, et al. 7 T imaging reveals a gradient in spinal cord lesion distribution in multiple sclerosis. *Brain*. 2020;143(10):2973-2987.
- [24] Revenaz A, Ruggeri M, Laganà M, et al. A semi-automated measuring system of brain diffusion and perfusion magnetic resonance imaging abnormalities in patients with multiple sclerosis based on the integration of coregistration and tissue segmentation procedures. *BMC Med Imaging*. 2016;16:4. Published 2016 Jan 14.

- [25] Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J, Pérez-Miralles F, et al. Brain Volume Loss During the First Year of Interferon-Beta Treatment in Multiple Sclerosis: Baseline Inflammation and Regional Brain Volume Dynamics. *J Neuroimaging*. 2016;26(5):532-538.
- [26] Shiee N, Bazin PL, Cuzzocreo JL, et al. Reconstruction of the human cerebral cortex robust to white matter lesions: method and validation. *Hum Brain Mapp*. 2014;35(7):3385-3401.
- [27] Fernando KT, Tozer DJ, Miszkiet KA, et al. Magnetization transfer histograms in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(Pt 12):2911-2925.
- [28] Biberacher V, Schmidt P, Keshavan A, et al. Intra- and interscanner variability of magnetic resonance imaging based volumetry in multiple sclerosis. *Neuroimage*. 2016;142:188-197.
- [29] Golan D, Doniger GM, Srinivasan J, et al. The association between MRI brain volumes and computerized cognitive scores of people with multiple sclerosis. *Brain Cogn*. 2020;145:105614.
- [30] Pridham G, Steenwijk MD, Geurts JJG, Zhang Y. A discrete polar Stockwell transform for enhanced characterization of tissue structure using MRI. *Magn Reson Med*. 2018;80(6):2731-2743.
- [31] Storelli L, Rocca MA, Pagani E, et al. Measurement of Whole-Brain and Gray Matter Atrophy in Multiple Sclerosis: Assessment with MR Imaging. *Radiology*. 2018;288(2):554-564.
- [32] Fischl B. FreeSurfer. *Neuroimage*. 2012;62(2):774-781.
- [33] Kazemi K, Noorizadeh N. Quantitative Comparison of SPM, FSL, and Brainsuite for Brain MR Image Segmentation. *J Biomed Phys Eng*. 2014 Mar 8;4(1):13-26.
- [34] Schmidt, 2017, Capitolo 6.1.

Sitografia

- {1} https://www.aism.it/2014_11_sts_disturbi_cognitivi, visitato in data 11/05/2023.
- {2} https://www.aism.it/cosa_e_la_sclerosi_multipla, visitato in data 11/05/2023.
- {3} https://www.aism.it/sclerosi_multipla_come_agisce_possibili_cause, visitato in data 19/05/2023.
- {4} https://it.freepik.com/vettori-gratuito/illustrazione-del-concetto-di-cellula-nervosa_36946933.htm>Immagine di storyset su Freepik, visitato in data 15/06/2023.
- {5} https://www.treccani.it/enciclopedia/neuroni-e-sinapsi_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/, visitato in data 16/06/2023.
- {6} https://www.treccani.it/enciclopedia/neuroimaging_%28XXI-Secolo%29/, visitato in data 17/06/2023.
- {7} https://www.aism.it/2018_risonanza_magnetica_liquido_contrasto, visitato in data 17/06/2023.
- {8} <https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/>, visitato in data 27/06/2023.
- {9} [http://www.scholarpedia.org/article/Statistical_parametric_mapping_\(SPM\)](http://www.scholarpedia.org/article/Statistical_parametric_mapping_(SPM)), visitato in data 27/06/2023.
- {10} <https://www.nitrc.org/plugins/mwiki/index.php/dcm2nii:MainPage#Download>, visitato in data 28/06/2023.
- {11} <https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>, visitato in data 06/07/2023.
- {12} <https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/intro/>, visitato in data 06/07/2023.
- {13} <https://www.dicomstandard.org/concepts>, visitato in data 06/07/2023.
- {14} <https://nifti.nimh.nih.gov/background>, visitato in data 06/07/2023.
- {15} <https://www.microdicom.com/>, visitato in data 06/07/2023.
- {16} <https://www.json.org/json-it.html>, visitato in data 07/07/2023.
- {17} https://andysbrainbook.readthedocs.io/en/latest/SPM/SPM_Short_Course/SPM_04_Preprocessing/04_SPM_Segmentation.html, visitato in data 10/07/2023.
- {18} https://www.applied-statistics.de/LST_documentation.pdf, visitato in data 11/07/2023.
- {19} <https://www.applied-statistics.de/lst.html>, visitato in data 11/07/2023.
- {20} www.statistical-modelling.de/lst.html, visitato in data 17/07/2023.
- {21} https://www.aism.it/progressione_e_riparazione_del_danno, visitato in data 01/09/2023.

{22} Immagine di brgfx su Freepik, visitato in data 01/10/2023.

Ringraziamenti

Ringrazio di cuore la Prof.ssa Laura Burattini per avermi permesso di realizzare al meglio questa tesi su un tema così delicato, ringrazio la Dott.ssa Selene Tomassini e la Dott.ssa Ilaria Marcantoni per avermi accompagnato durante questo fantastico percorso di ricerca, la loro gentilezza e la loro disponibilità sono stati elementi importanti nella riuscita del lavoro, mi hanno insegnato tanto.

Ai miei genitori, va il mio più sincero ringraziamento. Grazie per avermi sempre supportato durante questo percorso, grazie per i sacrifici che avete fatto. Siete il mio punto di riferimento, ho potuto sempre contare su di voi. Anche se in questi anni la vita ci ha messo un po' a dura prova, voi non vi siete mai abbattuti, non avete mai smesso di supportarmi, devo tutto a voi. Grazie papà, per avermi permesso di fare questo percorso e per aver supportato ogni mia scelta. Mamma, la tua presenza è stata di fondamentale importanza in ogni momento di difficoltà, te ne sono grata per questo. Ringrazio mia sorella, ispirazione per questa tesi. Le auguro di condurre una vita serena e circondata da persone che le vogliano bene, e di realizzare tutti i suoi sogni.

Ringrazio Andrea, che mi ha sostenuto sempre, sin dalla primissima sessione, sin dal primissimo esame. Lo ringrazio per tutte le volte che credevo di non farcela e lui mi ha spinto a dare tutta me stessa. Per tutte le crisi d'ansia che avevo quando studiavo, o poco prima di un esame, per tutti i momenti felici, lui ci è sempre stato, e gliene sarò per sempre grata. Lo ringrazio per aver creduto in me, sin dal primo giorno in cui ci siamo conosciuti, più di quanto ci credessi io.

Grazie, per essere stati tutti parte integrante di questo percorso.