

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA

**OTTIMIZZAZIONE DI SEQUENZE DI RISONANZA
MAGNETICA BASATE SULL'EFFETTO DI TRASFERIMENTO
DI MAGNETIZZAZIONE PER LO STUDIO DELLA
NEUROMELANINA**

Relatore:

**Ch.ma Prof.ssa
Alessandra Bertoldo**

Correlatore:

Ing. Marco Castellaro

Candidato:

Niccolò Berto

8 Luglio 2019

Anno Accademico 2018/2019

Alla mia famiglia

Abstract

Negli ultimi anni la *Neuromelanin-sensitive* MRI sta riscontrando un interesse crescente nell'ambito della ricerca medica. Questo interesse è dovuto al fatto che esistono aree cerebrali caratterizzate da elevate concentrazioni di neuromelanina (NM), in particolare a livello della *Substantia Nigra* (SN). Normalmente, questo pigmento, si accumula con l'avanzare dell'età ma, nei pazienti affetti da patologia di Parkinson, si osserva una marcata diminuzione della sua concentrazione a livello della SN, in dipendenza del progredire della malattia. Pertanto, la possibilità di quantificare il contenuto di NM, pone questa metodica di imaging in una posizione privilegiata per lo studio della patogenesi del Parkinson.

Recenti studi hanno dimostrato come l'utilizzo di impulsi off-resonance, che provocano l'effetto di *Magnetization Transfer* (MT), siano utili per incrementare il contrasto dovuto a tale pigmento, nelle aree citate, rispetto ai tessuti circostanti.

Nel presente lavoro di tesi si è operata la modifica e conseguente ottimizzazione di una sequenza *Turbo Field Echo* standard per adattarla all'imaging di Neuromelanina. Questa operazione è stata effettuata sfruttando gli effetti derivanti da una pre-saturazione MT ottenuta mediante l'applicazione di un treno impulsi off-resonance. Durante questo lavoro sono state proposte diverse versioni della stessa sequenza, per poterne individuare la migliore configurazione in termini di risoluzione. I test si sono svolti su 4 soggetti sani, presso la Fondazione Ospedale San Camillo/IRCCS, dove sono state effettuate le acquisizioni. Il lavoro è poi proseguito per verificare che la sequenza prodotta permettesse una più precisa delineazione delle zone d'interesse, in relazione ad un protocollo preesistente.

Con l'utilizzo delle sequenze MT-TFE proposte, si è riscontrato un incremento consistente in termini di SNR, mantenendo livelli di CNR in linea con quanto ricavato con il vecchio protocollo per la NM, suggerendo, quindi, come il segnale nelle aree della SN sia strettamente correlato ad effetti MT.

Indice

Abstract	v
1 Introduzione	1
2 Neuromelanin-MRI e Magnetization Transfer	3
2.1 Anatomia Substantia Nigra e Locus Coeruleus	4
2.2 Neuromelanina e Parkinson	5
2.2.1 Neuromelanin-MRI	6
2.3 Magnetization Transfer	8
2.3.1 Principi di MT	9
2.3.2 Tecniche di quantificazione MT	11
2.3.3 Strategie implementative	13
2.3.4 Impulsi RF utilizzati in MT	14
2.4 Protocolli d'acquisizione e tecniche d'analisi	17
2.4.1 Analisi del LC mediante sequenze pesate MT	19
3 Materiali e Metodi	25
3.1 Ottimizzazione delle sequenze	26
3.2 Acquisizione dati NM-MRI	28
3.3 Elaborazione delle immagini	30
3.3.1 Preprocessing	30
3.3.2 Analisi delle immagini MRI	32
4 Risultati e Discussione	35
4.1 Risultati Preprocessing	35
4.2 Risultati Analisi	39
5 Conclusioni	51
Bibliografia	53

Capitolo 1

Introduzione

Tra le numerose tecniche di neuroimaging, utilizzate per la diagnosi e la caratterizzazione di malattie neurodegenerative, un ruolo di primo piano è occupato dalla risonanza magnetica strutturale, indicata come strumento ideale per l'analisi delle aree del sistema nervoso centrale colpite da patologia. In particolare, nell'ambito della diagnosi e dello studio della malattia di Parkinson, recentemente è stata introdotta una tecnica di risonanza magnetica denominata *Neuromelanin-MRI* (NM-MRI). Questa tecnica permette di quantificare e monitorare nel tempo la concentrazione di neuromelanina (NM) a livello delle aree cerebrali colpite dalla patologia, ponendosi non solo come strumento importante per una prima diagnosi della malattia ma anche come potenziale metodo per delineare e quantificare l'evoluzione della stessa.

La neuromelanina (NM) è un pigmento normalmente presente in alcuni tessuti e soggetto ad accumulo con l'avanzare dell'età. Specifiche popolazioni neuronali del cervello umano, in particolare a livello dei neuroni dopaminergici della *Substantia Nigra* (SN) e in quelli contenenti noradrenalina del *Locus Coeruleus* (LC) sono particolarmente ricchi di questo pigmento. Dal momento che, nella malattia di Parkinson, si riscontra una marcata diminuzione dei livelli di NM nelle aree sopra citate, si è individuato, in questo pigmento, un importante biomarker in vivo, non solo per la diagnosi ma anche per la valutazione della progressione della malattia.

Lo sviluppo di questa nuova metodica di imaging prevede lo studio di sequenze di risonanza magnetica dedicate, basate sull'utilizzo di metodiche non convenzionali, tra cui la tecnica di *Magnetization Transfer* (MT). L'osservazione che sequenze con preparazione MT esplicita inducessero un aumento nel contrasto tra zone ricche di NM rispetto ai tessuti circostanti,

ha spinto numerosi autori a indicare l'MT come una valida fonte di contrasto nella NM-MRI.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è quello di mettere a punto e ottimizzare una sequenza che permetta di delineare con precisione le aree cerebrali relative alla SN e al LC, sfruttando il contributo legato all'utilizzo di una preparazione MT esplicita. Questo obiettivo si traduce nel tentativo di migliorare la qualità delle immagini acquisite, e, contestualmente, valutarne quantitativamente l'impatto. La valutazione quantitativa è stata effettuata tramite opportuni parametri che permettessero di confrontare le performance che tale metodica presenta rispetto alle convenzionali tecniche utilizzate in NM-MRI.

In tale ottica, quindi, è stata messa a punto una sequenza caratterizzata da una preparazione MT esplicita che, successivamente ad una fase di ottimizzazione, è stata utilizzata per acquisire immagini su soggetti sani. I dati ottenuti sono stati quindi elaborati, mediante tecniche di preprocessing e analisi dell'immagine, per poi essere confrontati con quanto acquisito, nella stessa sede, mediante le sequenze standard in uso presso la struttura ospedaliera ospitante.

Il presente lavoro di tesi è strutturato come segue:

- Capitolo 2: viene fornita una panoramica generale riguardante gli aspetti teorici affrontati nell'elaborato. In particolare, vengono illustrati i principali protocolli d'acquisizione utilizzati in NM-MRI, i principi fisici legati all'effetto MT e alcune strategie adottate per realizzare la pre-saturazione desiderata e gli impulsi a radio frequenza maggiormente utilizzati in questo ambito.
- Capitolo 3: riporta le sequenze che sono state messe a punto e come esse siano state ottimizzate per il fine perseguito. Vengono inoltre descritte le acquisizioni eseguite e le principali metodiche utilizzate per l'analisi delle immagini ottenute.
- Capitolo 4: espone e discute i risultati ottenuti in fase di preprocessing e nella successiva fase di analisi quantitativa, confrontando le sequenze proposte tra loro e con il protocollo attualmente in uso presso la struttura ospedaliera San Camillo/IRCCS.
- Capitolo 5: Conclusioni.

Capitolo 2

Neuromelanin-MRI e Magnetization Transfer

Dopo il morbo di Alzheimer, la malattia di Parkinson (PD, *Parkinson's disease*) costituisce la più diffusa patologia neurodegenerativa e il più comune disturbo del movimento [15]. In generale, la sua completa diagnosi avviene solo quando i sintomi motori sono ormai evidenti e circa il 30% dei neuroni dopaminergici, presenti a livello della SN, sono già morti, sebbene alcuni disturbi precoci associati alla malattia possano farne presagire la comparsa [3].

Per la sua diagnosi e caratterizzazione, in passato, venivano impiegate tecniche quali PET (*Positron Emission Tomography*) e SPECT (*Single Photon Emission Tomography*), le quali permettevano di effettuare valutazioni funzionali di disfunzione nigrostriatale [1], stimando, ad esempio, la perdita di terminali presinaptici dei neuroni dopaminergici che innervano la SNc, mediante l'uso dei traccianti [^{18}F]-DOPA (PET) e [^{18}F]-fluorodeossiglucosio (SPECT) [11]; l'imaging strutturale del cervello ottenuto tramite risonanza magnetica (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*), invece, ricopriva un ruolo marginale. Questa tendenza era motivata dal fatto che le differenze riscontrabili tra soggetti patologici e i gruppi di controllo (HC, *Healthy Controls*) non erano tali da avallare la diagnosi ed inoltre, tale tecnica, non sembrava fornire dei parametri quantitativi che permettessero di quantificare la progressione della malattia [1].

L'introduzione di scanner a 3 e 7 Tesla, complementariamente all'utilizzo di nuove sequenze, ha permesso di raggiungere una migliore risoluzione spaziale e migliorare il contrasto delle immagini; ciò si è tradotto in una maggiore capacità di esaminare le aree cerebrali colpite da PD.

Tra le nuove tecniche introdotte, la *Neuromelanin-MRI* (NM-MRI) permette di valutare e quantificare in vivo la distribuzione di neuromelanina (NM) contribuendo, perciò, alla caratterizzazione della malattia.

2.1 Anatomia Substantia Nigra e Locus Coeruleus

La *Substantia Nigra* (SN) è un'area del sistema nervoso centrale, situata nel mesencefalo, che, nei pazienti affetti da PD, è soggetta ad una progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici che si traduce nei tipici sintomi associati alla malattia: tremori, rigidità degli arti, lentezza dei movimenti, ansia, depressione, disturbi del sonno e deterioramento cognitivo.

Dal punto di vista anatomico la SN si divide in due strutture: la SNr (*pars reticulata*) e la SNc (*pars compacta*) [9]. La SNr costituisce la parte ventrale della SN e contiene neuroni GABA-ergici che si reticolano nel talamo; la SNc costituisce, invece, la parte dorsale della SN e contiene neuroni dopaminergici, i cui assoni formano il fascio nigro-striatale: la via dopaminergica dalla SN allo striato rappresenta la zona maggiormente colpita dalla malattia di Parkinson (Figura 2.1).

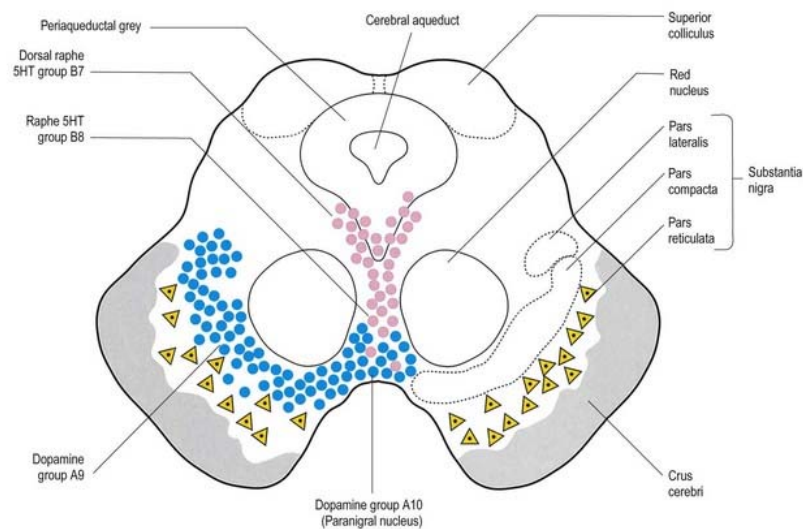


Figura 2.1: Sezione trasversale del mesencefalo che illustra la struttura della SN e la disposizione dei gruppi di cellule dopaminergiche, [26].

Le due strutture sono generalmente difficili da discernere l'una dall'altra, ma possono essere caratterizzate e ulteriormente divise in sottostrutture,

chiamate nigrosomi; il nigrosoma-1 è il più esteso, ed è in quest'area che si riscontra una più netta perdita di neuroni dopaminergici [1], [9].

Il *Locus Coeruleus* (LC), invece, è un piccolo nucleo (≈ 15 mm di lunghezza e 2 mm^2 di spessore) a forma di bastoncino, situato nel tronco encefalico (Figura 2.2), e costituisce il sito principale per la sintesi della noradrenalina nel cervello, neurotrasmettitore contenente neuromelanina [2].

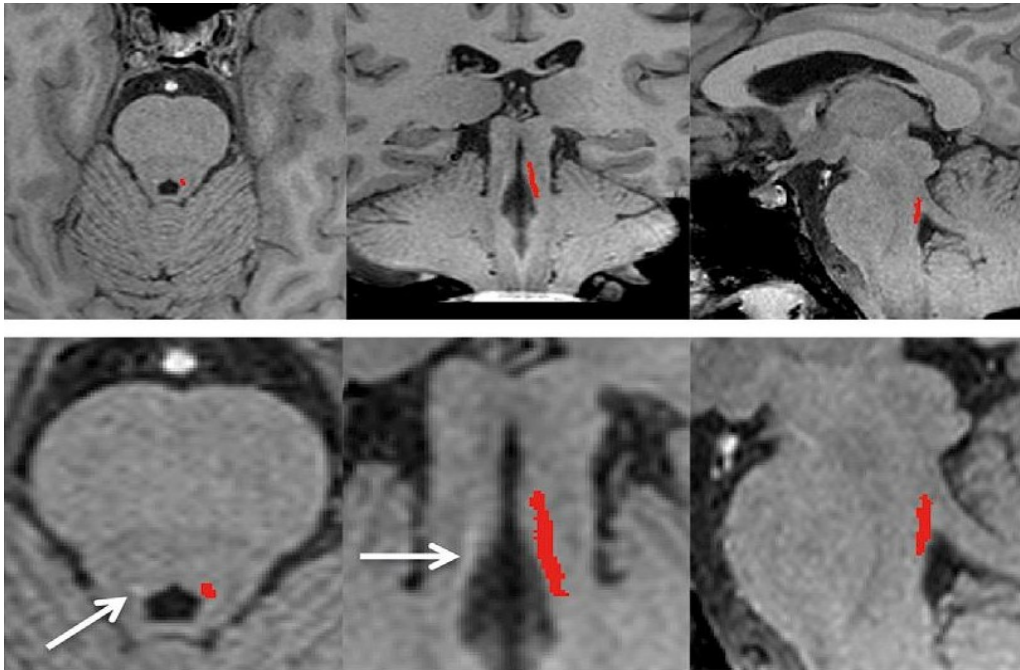


Figura 2.2: Dettaglio della regione corrispondente al LC, [27].

2.2 Neuromelanina e Parkinson

La neuromelanina (NM) è un pigmento normalmente presente in specifiche popolazioni neuronali del cervello umano, in particolare è contenuta a livello dei neuroni dopaminergici della SNc e nei neuroni contenenti noradrenalina del LC. La NM è un pigmento insolubile, proveniente da chinoni derivati dalla dopamina e contenuti in lisosomi autofagici, insieme a lipidi e altre proteine insolubili, costituito da diversi componenti, tra cui ioni metallici: tra di essi, il ferro è il più abbondante ed è dimostrato come la NM ne sia il principale deposito, soprattutto a livello dei neuroni pigmentati della SNc, in quanto agisce da cofattore per la tirosina idrossilasi, un enzima essenziale per la sintesi della dopamina [3],[5].

Il complesso NM-Fe è, inoltre, caratterizzato da elevato paramagnetismo e pertanto facilmente individuabile mediante MRI.

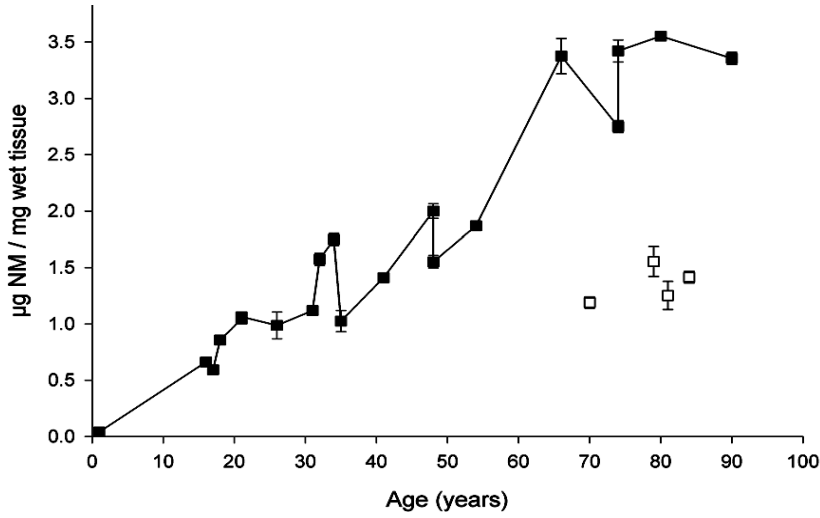


Figura 2.3: Andamento della concentrazione di NM nei tessuti della SN in soggetti sani e pazienti PD, con l'invecchiamento. Nei soggetti sani, a livello di SNc, si può notare un aumento lineare dei livelli di NM nel tempo (quadrati neri), mentre nei soggetti patologici (quadrati bianchi) la concentrazione risulta notevolmente inferiore [3].

Normalmente la NM si accumula con l'avanzare dell'età (Figura 2.3), ma nei pazienti affetti da PD si osserva una diminuzione della sua concentrazione a livello di SNc, in dipendenza del progredire della patologia, accompagnata dalla formazione di corpi di Lewy, degli aggregati proteici anormali che si sviluppano all'interno delle cellule nervose, contribuendo alla demenza associata al morbo di Parkinson; tale dato suggerisce un ruolo chiave della NM nel processo neurodegenerativo [1], [2], [11].

2.2.1 Neuromelanin-MRI

Le tecniche convenzionali, utilizzate in MRI, non consentono un'accurata delineazione delle regioni colpite dal morbo di Parkinson, né permettono di ottenere dati quantitativi che descrivano le variazioni di volume cui i tessuti sono soggetti. La NM-MRI può quindi rappresentare un importante biomarker in vivo, non solo per la diagnosi di PD ma anche per la valutazione della progressione della malattia [1], [3]. Numerosi studi hanno poi dimostrato come la NM, associata con ioni metallici quali il ferro, presenti proprietà paramagnetiche, che comportano effetti di riduzione del rilassamento longitudinale (T_1); inoltre la SNc è caratterizzata dalla presenza di alte concentrazioni di ferro, legato alla NM, motivo che contribuirebbe ad

un'ulteriore diminuzione del T_1 in NM-MRI [1], [3]. Per tale motivo, quindi, fin dalle prime applicazioni di questa tecnica, è emersa la possibilità di discriminare con precisione le aree encefaliche interessate dalla patologia di Parkinson.

L'imaging NM-MRI, è tipicamente basato sull'utilizzo di sequenze T_1 -w TSE (*Turbo Spin Echo*) a 3 Tesla, dal momento che il segnale proveniente dai tessuti circostanti del cervello viene soppresso a causa del prolungamento del suo tempo di rilassamento longitudinale T_1 , e i nuclei contenenti NM possono essere individuati come aree ad alta intensità rispetto al tessuto cerebrale circostante (Figura 2.4) [5].

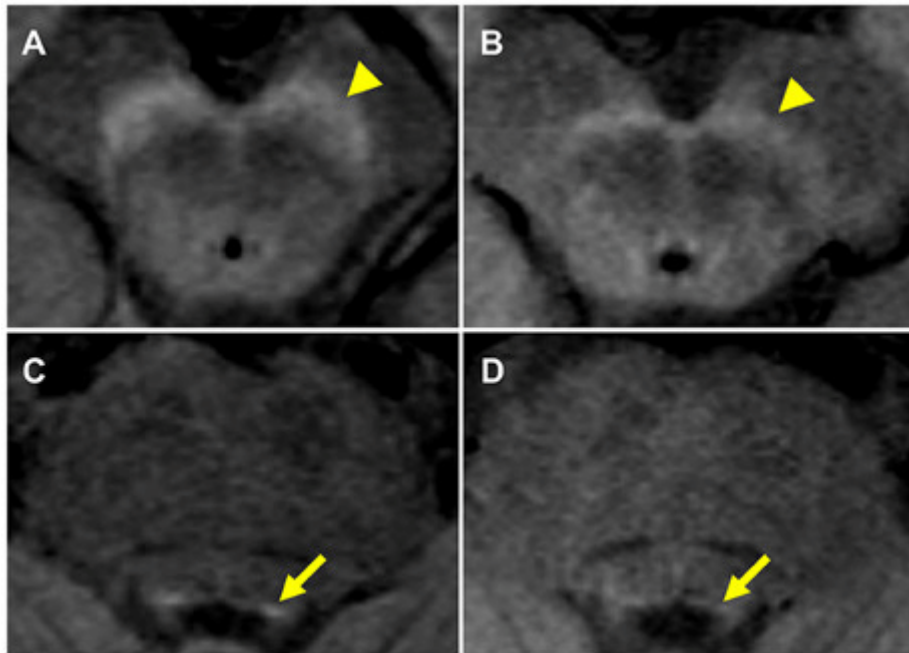


Figura 2.4: Immagini NM-MRI della *substantia nigra* e del *locus coeruleus* in un soggetto sano (A, C) e in un paziente affetto da PD (B, D) [1].

Tali studi hanno evidenziato, infatti, la presenza di una significativa riduzione del segnale correlato alla NM nella SNc e nel LC del paziente Parkinsoniano, che permette di discriminare con precisione i soggetti affetti dalla patologia dai gruppi di controllo.

Si è osservata, infine, nei pazienti con PD precoce, una più marcata attenuazione del segnale nel LC e nella parte laterale della SNc, rispetto a quella riscontrata nelle zone centrale e mediale; inoltre, misure di attenuazione del segnale eseguite a livello del LC, hanno fornito dati caratterizzati da maggior sensibilità e specificità rispetto a quelli ottenuti nella zona laterale della SNc, indice del fatto che, indagini svolte in tale regione, permetterebbero una più efficace discriminazione della patologia nei suoi stadi iniziali, e che

la degenerazione neuronale del LC potrebbe precedere quella della SNc nei pazienti PD [1], [2].

2.3 Magnetization Transfer

Il Gold Standard negli studi NM-MRI è costituito dall'utilizzo di sequenze T_1 -weighted TSE a 3T, in quanto permettono di ottenere un buon contrasto tra le aree cerebrali d'interesse per la patologia e i tessuti circostanti. Tuttavia, l'uso di tali sequenze presenta delle limitazioni, legate principalmente ai lunghi tempi necessari per l'esame diagnostico (superiori ai 12 minuti) a causa del basso Rapporto Segnale Disturbo (SNR, *Signal to Noise Ratio*), ad una marcata sensibilità agli artefatti da movimento e ad un tasso di assorbimento specifico (SAR, *Specific Absorption Rate*) elevato, che necessita di lunghi Tempi di Ripetizione (TR, *Repetition Time*) [2].

La maggior parte degli studi precedenti ha quindi applicato TSE come sequenza 2D con risoluzione anisotropica e spessore della fetta (*slice thickness*) piuttosto grande (2,5-3 mm), al fine di ottenere un SNR sufficiente e mantenere il tempo di scansione entro limiti accettabili [2]. Successivamente si è osservato un miglioramento nel contrasto dell'immagine derivante dall'utilizzo di sequenze 2D T_1 -w TSE caratterizzate da numerosi impulsi RF (*Radio Frequency*) off-resonance, le quali inducevano ad un fenomeno di Trasferimento di Magnetizzazione (MT, *Magnetization Transfer*).

Questi studi hanno infatti dimostrato come, sequenze con una preparazione MT esplicita, permettessero di raggiungere una più elevata sensibilità nel rivelare la NM rispetto a quelle basate su effetti MT indiretti, come le TSE classiche, portando ad associare gli effetti MT all'aumento del contrasto relativo alla NM, sia a livello di SN che di LC [2], [5]. La presenza di ferro, infatti, influenza lo spettro MT; inoltre il ferro è presente a livello della SN sotto forma di ferritina (Fe^{3+}), caratterizzata da scarse proprietà paramagnetiche, mentre il complesso NM-ferro, presente a livello della SNc, è caratterizzato da elevato paramagnetismo: per questo motivo, tramite NM-MRI, è possibile ottenere un segnale di intensità maggiore nella regione SNc rispetto alla SNr. Poiché una diminuzione del T_1 , che si verifica nelle aree cerebrali in cui è presente il complesso NM-ferro, va ad influenzare l'MT enfatizzandolo, vari gruppi di ricerca hanno pensato di utilizzare impulsi off-resonance che vadano a migliorare la combinazione degli effetti MT e T_1 , al fine di aumentare il contrasto nella NM-MRI [3], [5].

2.3.1 Principi di MT

L'interazione e scambio tra protoni di molecole d'acqua e protoni di altre macromolecole dà origine all'effetto MT; poiché i tessuti sono costituiti da vari tipologie di macromolecole, l'intensità dell'interazione stessa sarà diversa e darà origine al contrasto MT [2], [3]. Un impulso MT è un impulso a RF spettralmente selettivo, che riduce il segnale MR proveniente da alcuni tipi di tessuto, lasciando praticamente inalterati gli altri, con un comportamento tessuto-specifico [6].

Questo effetto è stato caratterizzato in vari modi, generalmente i più ricorrenti sono: l'MTR (*MT Ratio*) e il più recente qMT (*quantitative MT*), che comporta l'acquisizione di immagini a RF multiple per la generazione dello spettro MT [5]. Tale spettro verrà poi fittato da un modello che permette la stima di indici quantitativi, per i vari compartimenti. Nei tessuti biologici, infatti, si può supporre che i nuclei di idrogeno (o protoni), sussistano in due diversi stati: legati ad altre macromolecole o meno; è pertanto possibile analizzare gli effetti indotti da un impulso MT, mediante il modello bicompartimentale proposto da Henkelman et al. [8]. Il primo compartimento è indicato con il nome "*free pool*" o "*liquid pool*", comprensivo di molecole con tempi di rilassamento trasversale T_2 lunghi (e.g., >10 ms), mentre, il secondo, viene indicato come "*bound pool*" o "*macromolecular pool*", ed è costituito da quei protoni che sono legati alle macromolecole e che, a causa della loro scarsa mobilità, sono caratterizzati da T_2 corti (e.g., <1 ms) [8].

Dal momento che la *FWHM* (*Full Width at Half Maximum*) dell'impulso è inversamente proporzionale al tempo di rilassamento trasversale ($FWHM \propto 1/T_2$), lo spettro del compartimento macromolecolare risulterà molto più ampio di quanto invece non sia quello relativo al compartimento *free* (Figura 2.5) [6], [10].

Come evidenziato in Figura 2.5, a seguito dell'applicazione di un impulso a RF off-resonance, ovvero trasmesso con uno scostamento di frequenza $\Delta\omega$ rispetto a quella di Larmor, si verificherà la saturazione selettiva della magnetizzazione longitudinale dei protoni appartenenti al compartimento macromolecolare, senza che vi sia un effetto diretto sui protoni del compartimento *free*; tale saturazione, verrà poi trasferita alla magnetizzazione longitudinale dei protoni nel compartimento *free*, secondo un processo chiamato *magnetization exchange*, che comporterà una diminuzione nel segnale MR acquisito [6].

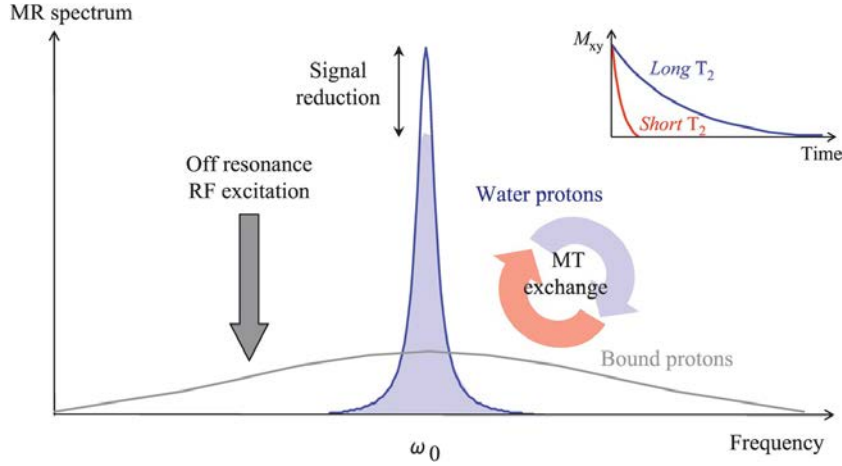


Figura 2.5: Rappresentazione degli spettri relativi ai compartimenti *free* e *bound*, centrati alla stessa frequenza di risonanza ω_0 (frequenza di Larmor $42.7 \text{ MHz} \times \text{Tesla}$, ad es. 128.1 MHz a 3 Tesla) [6].

L'attenuazione ottenuta sfruttando l'effetto MT, tuttavia, non dipende unicamente dalle proprietà intrinseche del tessuto ma è, invece, strettamente correlata al tipo d'impulso MT utilizzato e alla corretta progettazione della sequenza [6].

Sotto le condizioni precedentemente illustrate, l'evoluzione dei compartimenti *free* e *macromolecular*, può essere descritta tramite le equazioni Bloch (2.1), per le due popolazioni di spin interagenti [5], [8]:

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \mathbf{A}(t)\mathbf{M}(t) + \mathbf{B} \quad (2.1)$$

dove $(M_x^f, M_y^f, M_z^f, M_z^m)$, rappresentano le componenti x-,y- e z- del vettore magnetizzazione $\mathbf{M}$ per i compartimenti *free* (f) e *macromolecular* (m), mentre, le matrici $\mathbf{A}$ e $\mathbf{B}$, contengono i coefficienti delle equazioni di Bloch.

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} -R_2^f & -\Delta\omega & 0 & 0 \\ \Delta\omega & -R_2^f & -\omega_1(t) & 0 \\ 0 & \omega_1(t) & -(R_1^f + k_{fm}) & k_{mf} \\ 0 & 0 & k_{fm} & -(R_1^m + k_{mf} + W(t)) \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

$$\mathbf{B} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ R_1^f M_0^f \\ R_1^m M_0^m \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

Prendendo in considerazione le matrici 2.2 e 2.3, i coefficienti in esse presenti rappresentano, rispettivamente:

- $R_{1,2}^{f,m}$ i tassi di rilassamento longitudinali R_1 e trasversali R_2 per ogni compartimento, definiti come $R_{1,2}^{f,m} = \frac{1}{T_{1,2}^{f,m}}$;
- $\Delta\omega$ la frequenza di offset dell'impulso a RF;
- $\omega_1(t)$ la dipendenza dal tempo dell'ampiezza dell'impulso a RF;
- $M_0^{f,m}$ le magnetizzazioni, all'equilibrio, per ognuno dei due compartimenti;
- k_{mf} il tasso di *magnetization exchange* dal compartimento macromolecolare a quello *free*, mentre k_{fm} rappresenta il tasso di scambio nella direzione opposta ($k_{fm} = k_{mf} * M_0^m / M_0^f$);
- $W(t)$ il tasso di saturazione del compartimento macromolecolare, definito come $W(t) = \pi\omega_1^2(t)g(\Delta\omega, T_2^m)$, dove $g(\Delta\omega, T_2^m)$ rappresenta la forma della linea di assorbimento per il pool-macromolecolare [5], [7].

Per frequenze di offset basse, gli impulsi a RF andranno a saturare direttamente (DS, *Direct Saturation*) il compartimento delle molecole d'acqua, inducendo un'attenuazione del segnale misurato; nel modello di Henkelman et al. [8], questa situazione corrisponderà ad avere un valore di $k_{mf} = 0$. In tal senso, quindi, il segnale MR sarà dato dalla combinazione degli effetti indotti da MT e DS [5]. Inoltre, considerando che i contributi derivanti da DS non potranno essere totalmente eliminati, sarà necessaria la messa a punto di un opportuno schema sperimentale che permetta di minimizzarne l'apporto.

2.3.2 Tecniche di quantificazione MT

In generale, le immagini ottenute sfruttando l'effetto MT, possono essere caratterizzate in due modi: tramite il calcolo del MTR oppure mediante la qMT, una tecnica di recente sviluppo che permette di sopperire ad alcune limitazioni della precedente, in particolare per quanto riguarda la possibilità di stimare degli indici quantitativi che descrivano l'effetto stesso.

Una prima caratterizzazione dell'intensità dell'effetto MT può essere comunque ottenuta mediante il calcolo del MTR che, come osservabile in

Figura 2.6, è il risultato dell'apporto di due fattori: M_{dir} , dovuto alla saturazione diretta dei compartimenti, e M_{MT} , causato dall'effetto MT vero e proprio:

$$M_{SAT} = M_{dir} + M_{MT} \quad (2.4)$$

A partire da tale evidenza, è quindi possibile calcolare l'indice adimensionale MTR come segue:

$$MTR = \frac{M_0 - M_{SAT}}{M_0} \quad (2.5)$$

dove M_0 rappresenta la magnetizzazione dei compartimenti all'equilibrio [6], [8]. Tramite un opportuno design sperimentale, è possibile massimizzare l'apporto relativo alla M_{MT} e minimizzare quello dovuto alla M_{dir} , dal momento che l'intensità dell'effetto MT dipende dalla frequenza di offset scelta ($\Delta\omega$), dall'ampiezza, tipologia e durata dell'impulso RF [5].

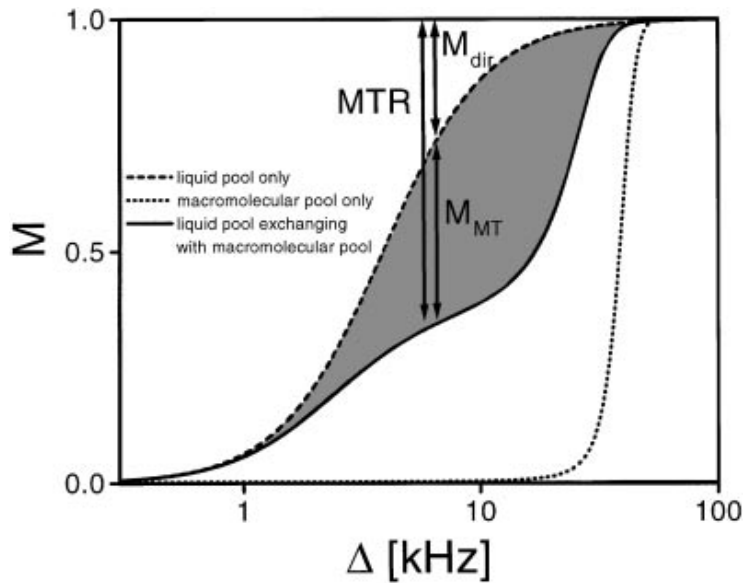


Figura 2.6: Rappresentazione della magnetizzazione longitudinale per i compartimenti *free* e *macromolecular*; l'area scura, presente tra le due curve, di ampiezza M_{MT} , rappresenta la saturazione dovuta all'effetto MT, mentre M_{dir} rappresenta la saturazione diretta [8].

La qMT comporta, invece, l'acquisizione di immagini a RF multiple per la generazione dello Z-spettro, che verrà poi fittato da un opportuno modello, come ad esempio quello proposto da Henkelman e collaboratori [8], che permetterà la stima di indici quantitativi, come, ad esempio, il $PSR = M_0^m/M_0^f$ (*macromolecular to free pool size ratio*), i tassi di trasferimento di

magnetizzazione tra i compartimenti (k_{mf} e k_{fm}) e i tempi di rilassamento trasversali e longitudinali ($T_1^{f,m}$ e $T_2^{f,m}$) [5].

2.3.3 Strategie implementative

In generale, per ottenere effetto MT, è necessario applicare un impulso a RF di pre-saturazione prima dell'eccitazione; tale preparazione può essere eseguita in due modi:

1. tramite l'applicazione continua (CW, *Continuous Wave*) di energia a RF off-resonance (Figura 2.7A);
2. mediante un disegno sperimentale che prevede l'utilizzo di impulsi a RF di durata finita, separati da un certo intervallo temporale (Figura 2.7B).

Dal momento che, solitamente, gli scanner MRI di uso clinico non sono equipaggiati con un secondo generatore di impulsi RF, che permetterebbe di implementare il metodo CW, gli schemi sperimentali impiegati per ottenere effetto MT ricorrono all'utilizzo della tecnica *pulsed* MT [6], [10].

Questo secondo schema sperimentale è realizzato mediante una serie di impulsi RF off-resonance, di ampiezza compresa tra i 5 e i 30 ms (larghezza di banda tra 500 - 1500 Hz), seguiti da un gradiente di spoiling (*spoiler gradient pulse*) che va a sfasare la parte residua della componente trasversale della magnetizzazione [6].

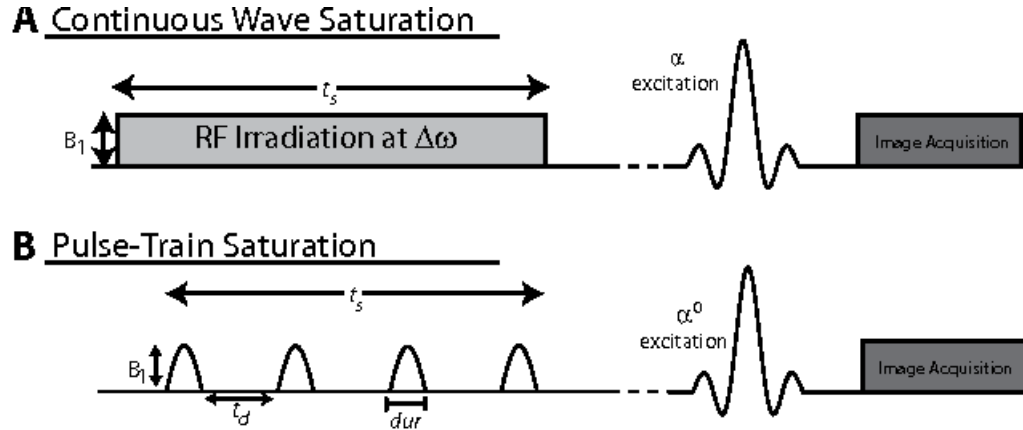


Figura 2.7: Diagrammi delle sequenze di impulsi per i metodi di saturazione a onda continua (CW) e treno di impulsi; B_1 rappresenta l'ampiezza dell'impulso, t_s il tempo di saturazione, t_d la distanza tra due impulsi successivi e dur la durata di ciascun impulso ($1/BW$).

In generale, il metodo che impiega l'utilizzo di un treno d'impulsi per ottenere la pre-saturazione MT, deposita, a livello dei tessuti, una quantità

minore di energia rispetto all'approccio CW. Tenendo in considerazione i limiti SAR, l'ampiezza degli impulsi MT deve essere impostata più alta possibile, dal momento che il grado di soppressione ottenuto sfruttando l'MT aumenta al crescere della potenza RF applicata.

A differenza di quanto illustrato finora, dove viene eseguita un'opportuna messa a punto del design sperimentale per ottenere la pre-saturazione MT, in alcune sequenze utilizzate in MRI, si verifica la comparsa di effetti MT, anche in assenza di un modulo ad esso dedicato. Un esempio di ciò, è costituito dalle sequenze TSE e FSE (*Fast Spin Echo*) utilizzate in NM-MRI, con le quali si osservava un aumento del contrasto legato alla NM, per un effetto MT, provocato dalle acquisizioni *multi-slice* eseguite [2] e dall'elevato numero d'impulsi di rifocalizzazione usati [6].

2.3.4 Impulsi RF utilizzati in MT

Nell'ambito di sequenze basate sull'effetto MT, sono stati utilizzati numerosi tipi di impulsi RF, caratterizzati da una larghezza di banda (BW, *BandWidth*) relativamente ampia, da durata e forma precise, in quanto, soprattutto quest'ultima, permetterà di minimizzare effetti di DS del *liquid pool*, producendo un *flip angle* trascurabile (e quindi eccitando non selettivamente) in corrispondenza della frequenza di Larmor. Inoltre, l'intensità del campo magnetico B_1 e la frequenza di offset dell'impulso RF, influenzano fortemente l'entità della saturazione ottenuta: riducendo la frequenza di offset, in particolare, si otterrà una migliore saturazione del pool macromolecolare [6], [10].

Le forme più comuni d'impulsi a RF, utilizzate in MRI nelle applicazioni di MT, sono la Gaussiana e la SINC, rappresentate in Figura 2.8.

Per quanto riguarda l'impulso Gaussiano, l'intensità del campo magnetico B_1 , espressa rispetto ad un sistema di riferimento ruotante solidalmente con il campo magnetico stesso, è data dalla seguente espressione:

$$B_1(t) = A_G e^{-\frac{t_2}{2\sigma_2}} e^{i\Delta\omega_{rf}t} \quad (2.6)$$

dove, la frequenza angolare di offset $\Delta\omega_{rf} = 2\pi\Delta f_{rf}$, produce l'irradiazione off-resonance desiderata, e i due parametri A_G (fattore di scala misurato in μT) e σ (misurato in ms e proporzionale alla larghezza dell'impulso) permettono la regolazione dell'onda [6].

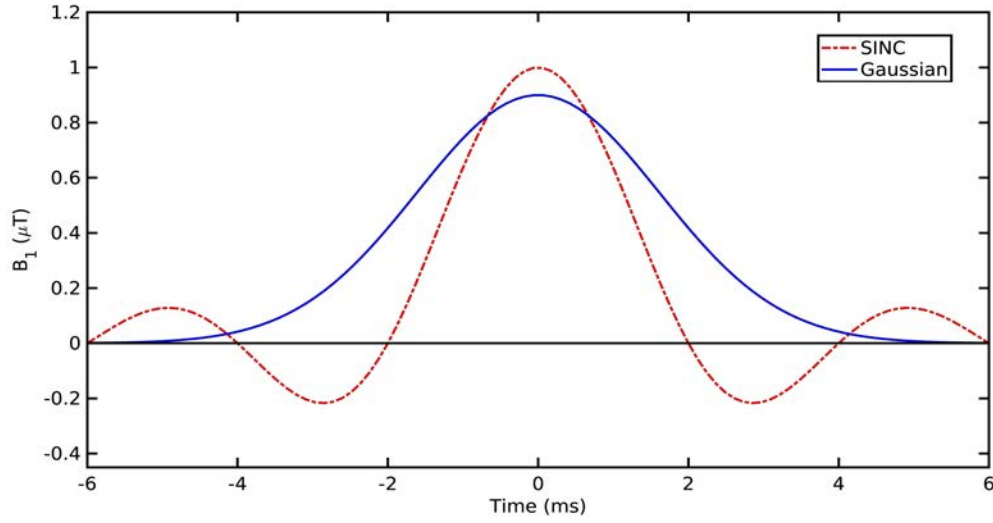


Figura 2.8: Rappresentazione dell'impulso SINC, simmetrico con $N = 3$, e di quello Gaussiano.

L'impulso SINC, invece, è caratterizzato da un lobo centrale di ampiezza massima e dalla presenza di una serie di lobi adiacenti di polarità alternata, la cui ampiezza decresce infinitamente e progressivamente all'aumentare della distanza dal lobo centrale. Tale impulso viene tradizionalmente utilizzato in MRI quando si vogliono ottenere fette (*slice*) caratterizzate da un profilo uniforme, dal momento che la trasformata di Fourier di una funzione SINC, di durata infinita, è un RECT.

Gli impulsi generati nelle applicazioni MRI sono, tuttavia, caratterizzati da durata finita, e presentano un numero di lobi di ampiezza decrescente che affiancano quello centrale. In generale, maggiore sarà il numero di lobi considerati, migliore sarà l'approssimazione al profilo di frequenza ideale, a discapito, tuttavia, della durata dell'impulso stesso che, aumentando, può indurre una serie di effetti indesiderati, parzialmente attenuabile mediante l'uso di una finestra di apodizzazione (*apodizing window*). Tale tecnica, infatti, permette di superare la limitazione legata all'insorgere di fenomeni di *ringing*, dovuti alla discontinuità della derivata prima, in presenza di un impulso SINC simmetrico; finestre di apodizzazione frequentemente usate sono quelle di Hamming e di Hanning [6].

L'espressione analitica, per il campo magnetico B_1 , di un impulso SINC è la seguente:

$$B_1(t) = \begin{cases} A * SINC\left(\frac{\pi t}{t_0}\right) = A * t_0 \frac{\sin\left(\frac{\pi t}{t_0}\right)}{\pi t} & -N_L t_0 \leq t \leq N_R t_0 \\ 0 & \text{altrove} \end{cases} \quad (2.7)$$

dove A rappresenta l'ampiezza del picco massimo per $t = 0$, t_0 costituisce metà della durata del picco centrale, N_L e N_R costituiscono, rispettivamente, il numero di *zero crossing* a sinistra e destra; per $N_L = N_R = N$ l'impulso SINC è simmetrico. Il valore esatto della larghezza di banda può essere calcolato risolvendo le equazioni di Bloch, tuttavia una buona approssimazione si può ottenere ponendo $\Delta f \approx 1/t_0$ [6].

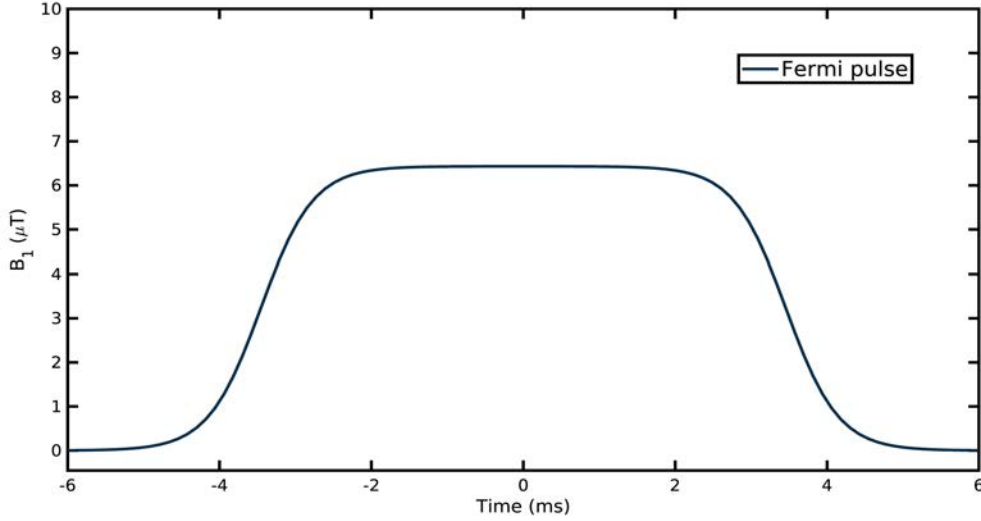


Figura 2.9: Rappresentazione della forma d'onda di Fermi, utilizzata nelle applicazioni MT.

Un'altra diffusa forma d'impulso a RF, utilizzata frequentemente nelle sequenze che sfruttano la MT, è quella di Fermi (Figura 2.9), caratterizzata da un plateau centrale che decade, a destra e sinistra, in maniera esponenziale. Il campo magnetico B_1 , per tale impulso, ha la seguente espressione analitica:

$$B_1(t) = \frac{A_F e^{i\Delta\omega_{rf}t}}{1 + \exp\left(\frac{|t-t_0|}{a}\right)} \quad (2.8)$$

dove A_F rappresenta il livello di ampiezza massima per il campo B_1 , t_0 è una misura della larghezza dell'impulso, mentre a costituisce la durata della transizione [6].

2.4 Protocolli d'acquisizione e tecniche d'analisi

Tramite NM-MRI è possibile quantificare in vivo la distribuzione di NM ed ottenere immagini, sia per quanto riguarda le strutture della SNc che per quelle del LC, caratterizzate da un notevole contrasto, rispetto ai tessuti cerebrali circostanti.

Le prime applicazioni di NM-MRI, eseguite su pazienti affetti da PD, furono condotte, nel 2006, da Sasaki e colleghi, i quali utilizzarono sequenze pesate T_1 TSE su di uno scanner 3 Tesla, evidenziando come, nei soggetti patologici, si riscontrasse una più marcata attenuazione del segnale proveniente dalla SNc e dal LC, rispetto ai gruppi di controllo (Figura 2.10) [2], [15].

Successivamente, venne osservato che alcune sequenze utilizzate inducevano la comparsa accidentale di effetti MT, i quali incrementavano ulteriormente il contrasto tra le aree d'interesse per la patologia e i tessuti limitrofi; questa evidenza ha spinto vari gruppi di ricerca alla messa a punto di sequenze caratterizzate da una preparazione MT specifica per l'applicazione richiesta: è stato infatti dimostrato come effetti MT forniscano, la maggior parte del contrasto per le strutture contenenti NM, mentre, effetti di riduzione del T_1 , contribuiscono solo in minima parte alla sua generazione [5].

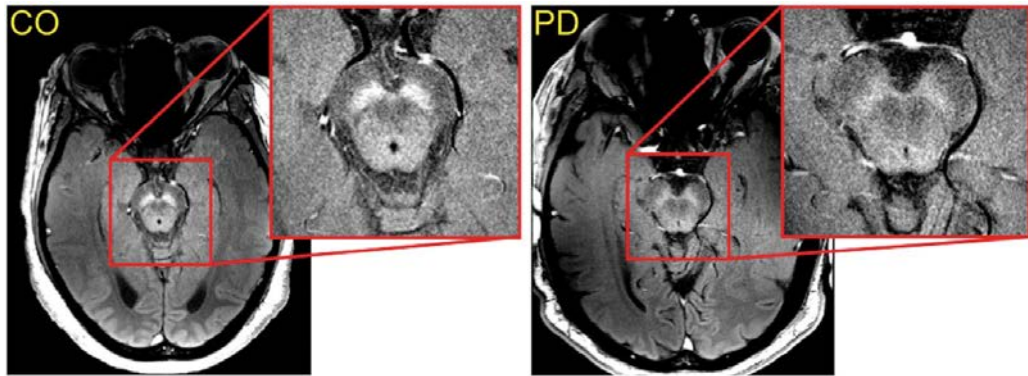


Figura 2.10: Confronto del CNR in un soggetto di controllo (CO, sx) e un paziente parkinsoniano (PD, dx). Le immagini sono state acquisite utilizzando una sequenza T_1 -w TSE con preparazione MT, ed è stato calcolato il CNR prendendo come reference un peduncolo cerebrale. Analizzando in dettaglio le regioni corrispondenti alla SNc, si nota una riduzione del 25% nel CNR nel paziente PD rispetto al controllo, a conferma del fatto che si è verificata una perdita di NM a livello di SNc nel soggetto patologico [3].

Gran parte degli studi precedenti presentavano limitazioni comuni, in primo luogo legate al fatto che l'analisi d'immagini NM-MRI, necessita di una precisa definizione della suddivisione anatomica della SN; tuttavia, sia

per i pazienti PD che per i soggetti di controllo, è difficile definire in modo univoco i confini che demarcano la SNc dalla SNr. Anche nel caso del LC, la sua posizione e dimensione ne rendono difficile una corretta caratterizzazione mediante risonanza a 3 Tesla [3]. Nella maggior parte degli studi NM-MRI si provvede, quindi, al tracciamento manuale della SNc e di una regione di riferimento su una singola sezione assiale dalla scansione di ciascun soggetto; in alcuni casi il segnale, all'interno di tali regioni viene mediato e se ne calcola il CNR (*Contrast to Noise Ratio*):

$$CNR = \frac{I_i - I_{ref}}{I_{ref}} \quad (2.9)$$

dove I_i è l'intensità media del segnale relativa al campione i-esimo e I_{ref} è l'intensità media del segnale nella reference [3], [5].

Le ridotte dimensioni delle aree d'interesse patologico, in particolare per quanto riguarda il LC, richiedevano di effettuare acquisizioni caratterizzate da elevata risoluzione spaziale, bisogno che si scontra con la necessità di mantenere i TA (Tempi d'Acquisizione) entro limiti accettabili e mantenere, allo stesso tempo, un elevato SNR. L'esigenza, infatti, di prolungare i tempi dell'esame diagnostico, incrementano drammaticamente il rischio d'introdurre errori da artefatti da movimento, specialmente nel caso di soggetti parkinsoniani. Le sequenze precedentemente utilizzate, infine, comportavano elevati livelli di assorbimento specifico (SAR) per i pazienti [15].

In Tabella 2.1 sono riportati alcuni esempi di sequenze d'acquisizione utilizzate in NM-MRI, sviluppate in assenza di protocolli per la corretta preparazione di sequenze specifiche per la MT.

Tabella 2.1: Alcuni protocolli d'acquisizione in NM-MRI per sequenze T_1 -w TSE, impiegate nello studio della SN e del LC nella patologia di Parkinson [11], [12], [13].

	Sequenza MRI	FOV (mm^2)	Slice thickness (mm)	T_R/T_E (ms)	TA (min)	Numero di fette	Numero di echi
Castellanos et al.	T_1 -w TSE	220	2.0	600/15	12	11	2
Kashihara et al.	T_1 -w TSE	220	2.5	600/10	7	15	2
Reimão et al.	T_1 -w TSE	220	2.5	633/10	8	20	3

A seguito dell'introduzione di nuove sequenze T_1 -w TSE con l'utilizzo d'impulsi off-resonance che andassero ad amplificare l'interazione tra T_1 e MT, è stato possibile migliorare il SNR e ridurre gli artefatti da movimento.

2.4.1 Analisi del LC mediante sequenze pesate MT

Numerosi gruppi di ricerca, inoltre, hanno notato come la perdita di NM si verificasse in modo più marcato, a livello del LC rispetto a quanto non accadesse nella SN, soprattutto negli stadi iniziali della patologia [2], [16]. Grande interesse, perciò, sta avendo lo studio del LC tramite l'utilizzo d'impulsi di pre-saturazione off-resonance, combinati con una readout di tipo GRE (*Gradient Echo*), dal momento che il segnale rilevato presenta un SAR minore rispetto alla più usata TSE.

In tal senso, quindi, Priovoulos e collaboratori [2] propongono la messa a punto di una sequenza 3D MT-TFL (*turbo FLASH*) per ottenere immagini ad alta risoluzione del LC, caratterizzate da un miglior SNR, ed eseguibili in tempi inferiori, rispetto alle tradizionali TSE. Per quanto concerne la messa a punto delle sequenze, gli autori, prendendo in considerazione il lavoro svolto da Mougin et al. [4], hanno proposto l'utilizzo di una sequenza MT-TFL caratterizzata da un treno di impulsi sinc-gaussiani, off-resonance di 10 ms (larghezza di banda 250 Hz), seguito da una lettura cartesiana [2]; al fine di ottimizzare la sequenza per l'analisi del LC, sono stati valutati, con strumentazione 7 Tesla, due approcci per eseguire la pre-saturazione MT:

1. 8 impulsi di ampiezza $4.50 \mu T$ ($0.37 \mu T$ CWPE, *Continuous Wave Power Equivalent*);
2. 20 impulsi di ampiezza $3.37 \mu T$ ($0.46 \mu T$ CWPE).

L'ampiezza MT, in entrambi i casi, è stata scelta empiricamente come la massima ampiezza tollerabile dai vincoli SAR, per un soggetto di 55 kg senza un'estensione del TR [2], mentre il CWPE [7] è stato definito come la radice quadrata del valore quadratico medio del campo saturo, la cui ampiezza è data dalla seguente formula:

$$\omega_{1CWPE} = \gamma \sqrt{P_{SAT}} = \gamma B_{1CWPE} \quad (2.10)$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, P_{SAT} è il campo di saturazione quadratico medio, calcolato nel tempo TR' ($TR' = TR/\text{numero di fette acquisite} \vee TR$), e ottenibile mediante la seguente espressione:

$$P_{SAT} = p_2 B_{SAT}^2 \frac{\tau_{SAT}}{TR'} \quad (2.11)$$

dove B_{SAT} può essere calcolato a partire dalla conoscenza di θ_{SAT} , *flip-angle* indotto dalla specifica forma d'onda usata per ottenere effetto MT, e p_2 è

il rapporto tra il quadrato dell'ampiezza media dell'impulso di saturazione considerato rispetto a quello di un impulso rettangolare della stessa altezza [7].

Gli autori hanno quindi scelto di procedere con la sequenza costituita da 20 impulsi, dal momento che forniva risultati più performanti, facendo variare la frequenza di offset (4.03 ppm, 6.72 ppm e 11.76 ppm) fino ad ottenere risultati ottimali per il valore di 6.72 ppm. In Tabella 2.2, sono riportate le sequenze utilizzate negli scanner a 3 e 7 Tesla.

Tabella 2.2: Parametri delle sequenze NM-MRI eseguite; la sequenza di saturazione consiste in 20 impulsi off-resonance, ad una frequenza di offset di 6.72 ppm e larghezza di banda 250 Hz; per tutte le sequenze, tranne MP2RAGE, il FOV (*Field of View*) è stato posizionato circa perpendicolarmente al ponte e ha coperto l'area tra il collicolo inferiore e il bordo inferiore del ponte [2].

	Sequenza MRI	Flip angle (μT) of MT saturation	TE (ms)	TR (ms)	Flip angle ($^\circ$)	Voxel size (mm ³)	Numero di fette	TA (min)
7T	MT-TFL 2avg	0.46	4.08	823	8	0.4 x 0.4 x 0.5	60	9:16
	MT-TFL 1avg	0.46	4.08	823	8	0.4 x 0.4 x 0.5	60	4:38
	TFL (no sat)	-	4.08	823	8	0.4 x 0.4 x 0.5	60	3:02
	ME-GRE	-	2.75/7.43/14.86/23.39	37	11	0.4 x 0.4 x 0.5	60	9:32
	MP2RAGE	-	2.47	5000	5/3	0.7 x 0.7 x 0.7	240	9:42
3T	MP2RAGE	-	2.47	5000	5/3	0.7 x 0.7 x 0.7	240	9:42
	MT-TFL 4avg	0.82	3.92	508	8	0.4 x 0.4 x 1	30	11:28
	TSE	-	14	600	90	0.4 x 0.4 x 2	14	11:47
	MPRAGE	-	2.21	5000	9	1 x 1 x 1	256	5:05
	ME-GRE	-	2.65/7.37/13.10/21.11	37	11	0.5 x 0.5 x 0.5	80	8:33

Per quanto concerne le acquisizioni eseguite con scanner a 7 Tesla, è stata utilizzata una MT-TFL 2-*average*, con saturazione MT ottenuta mediante un treno di 20 impulsi, di ampiezza $3.37 \mu T$ ($0.46 \mu T$ CWPE), con frequenza di offset di 6.72 ppm. Al fine di esaminare ulteriormente le prestazioni della sequenza messa a punto, gli autori hanno eseguito anche una singola acquisizione MT-TFL con gli stessi parametri; inoltre, per meglio comprendere come l'effetto MT contribuisca a migliorare il contrasto nell'imaging del LC, è stata compiuta un'acquisizione TFL in assenza di preparazione MT. Tramite una ME-GRE (*Multi-Echo-Gradient Echo sequence*) è stato infine possibile esaminare la relazione presente tra concentrazione di ferro nei tessuti e aumento del contrasto a livello di LC.

Anche per quanto riguarda le acquisizioni eseguite con scanner a 3 Tesla, sono state usate sequenze MT-TFL 4-*average*, con saturazione MT ottenuta mediante 20 impulsi di ampiezza $6.75 \mu T$ ($0.82 \mu T$ CWPE) con frequenza di offset di 6.72 ppm e sequenze T₁-weighted TSE. Al fine di avere un'efficace termine di confronto per le immagini ottenute, rispettivamente, mediante

gli scanner a 3 e 7 Tesla, è stata realizzata una sequenza MP2RAGE (*Magnetization Prepared 2 Rapid Acquisition Gradient Echo*), tramite la quale è stato possibile, allo stesso tempo, ricavare le mappe R_1 ed effettuare la coregistrazione delle immagini prodotte dai due diversi scanner [2].

Successivamente, nella fase di *processing*, gli autori hanno provveduto a registrare tra loro le immagini del tronco cerebrale, mediante una trasformazione rigida contenuta nel pacchetto ANTS (*Advanced Normalization Tools*) e a coregistrarle con le immagini T_1 usando la tecnica BBR (*Boundary Based Registration*); infine, hanno eseguito la segmentazione del LC, per le immagini acquisite con sequenze 3T TSE, 3T MT-TFL e 7T MT-TFL, e alla definizione di una reference ROI a livello del PT (*Pontine Tegmentum*) utilizzando le immagini a 7T T_1 -w.

Gli autori hanno poi voluto effettuare un confronto tra le sequenze TSE classiche e le MT-TFL: in tal senso hanno quindi calcolato la LSF (*Line Spread Function*) a livello della SN, dal momento che risulta più facile da localizzare rispetto al LC e presenta le medesime caratteristiche di iperintensità nelle immagini pesate MT, e la ERF (*Edge Response Function*).

Tabella 2.3: Valori del SNR e del CNR, nella regione LC, per le immagini ottenute con varie sequenze [2].

TSE and MT-TFL images	Numero di soggetti	SNR medio (STD)	CNR medio (STD)
3T MT-TFL	5	5.74 (1.12)	1.86 (0.34)
7T MT-TFL single acquisition	6	8.42 (0.71)	1.52 (0.34)
7T MT-TFL 2 average	5	8.59 (0.61)	1.82 (0.26)
3T TSE	6	6.10 (0.30)	1.32 (0.19)

In Tabella 2.3 sono riportati i dati, relativi al confronto delle sequenze MT-TFL e TSE, sia a 3 che a 7 Tesla, grazie ai quali è stato possibile constatare come i tempi per l'esame diagnostico fossero simili e attestare la qualità delle immagini ottenute, mediante il calcolo del SNR e del CNR (Figura 2.11) [2].

Infine, è stato valutato se il contrasto, a livello del LC, ottenuto con sequenze TSE, fosse dovuto ad effetti MT o ad un allungamento di R_1 ($R_1=1/T_1$), probabilmente a causa di un aumento della concentrazione di ferro.

E' stata, pertanto, calcolata voxel per voxel la mappa MTR, mentre, le mappe R_1 , R_2^* e S_0 (segnale a $TE = 0$) sono state ottenute, rispettivamente, da: sequenza MP2RAGE, per quanto riguarda R_1 , sequenza ME-GRE, per quanto concerne le altre. L'effettivo aumento di segnale riscontrato nel LC

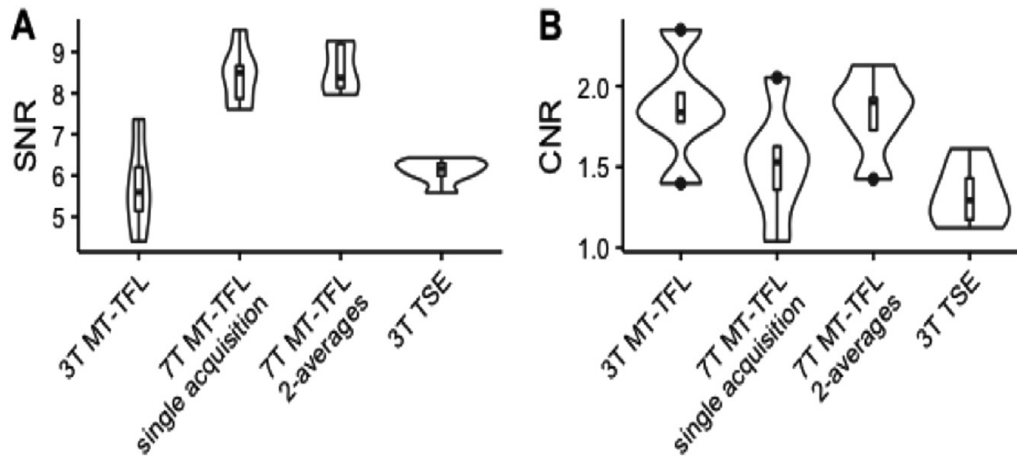


Figura 2.11: Confronto tra SNR e CNR, nel LC, per le sequenze 3T TSE, 3T MT-TFL, 7T MT-TFL singol acquisition e 7T MT-TFL 2-average (A). In (B) CNR tra la regione LC e PT (*Pontine Tegmentum*). Si può notare come le immagini acquisite a 7T siano caratterizzate da un SNR più elevato rispetto a quelle a 3T, mentre i risultati trovati per quanto riguarda il CNR risultano simili [2].

rispetto alla reference (PT), tramite sequenze MT-TFL avalla l'ipotesi che effetti MT possono contribuire a migliorare il contrasto nella NM-MRI.

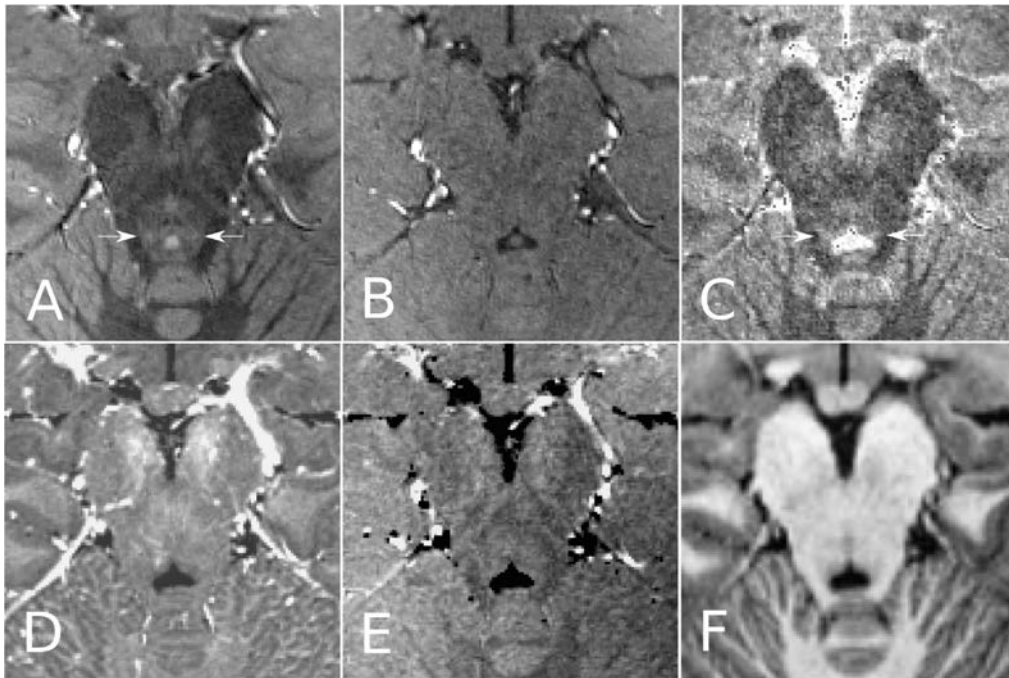


Figura 2.12: Vista multi-contrasto della regione LC. (A) immagine MT-TFL; (B) Immagine TFL senza pre-saturazione; (C) Mappa MTR; (D) Mappa R_2^* ; (E) Mappa S_0 ; (F) Immagine pesata T_1 [2].

Dal confronto delle immagini del LC con le mappe R_1 , R_2^* e S_0 non è emerso un effettivo aumento del contrasto, come invece si era ottenuto passando dalle sequenze TSE a quelle con preparazione MT esplicita; da

notare, infine, come nelle mappe R_2^* , non emerga l'iperintensità del segnale associata al LC, riscontrabile invece nelle immagini MT-TFL e MTR (Figura 2.12).

Da questi studi è emersa la possibilità di ottenere, tramite sequenze MT, immagini del LC caratterizzate da una maggiore risoluzione spaziale, permettendo, inoltre, la riduzione dei tempi d'acquisizione (≈ 12 min) e un miglioramento del SNR, rispetto a quanto era possibile raggiungere con le sequenze TSE standard. Gli autori hanno poi constatato come fosse possibile, a 7T, ottenere una buona localizzazione spaziale del LC, anche con una singola acquisizione, riducendo drasticamente i tempi diagnostici, limitando artefatti da movimento, ma conservando un elevato SNR e CNR.

Emerge, quindi, la necessità di sfruttare sequenze con una preparazione MT esplicita per migliorare il contrasto a livello di LC e SNc, al fine di ottenere una più precisa segmentazione dell'immagine ed avere una più efficace visione del progredire della malattia di Parkinson, oltre a parametri quantitativi che ne permettano una corretta caratterizzazione.

Capitolo 3

Materiali e Metodi

Come illustrato nel capitolo precedente, la tecnica NM-MRI sta riscontrando, negli ultimi anni, un impiego crescente come strumento di ricerca nel campo della malattia di Parkinson. Lo sviluppo di nuove sequenze ha infatti permesso di discriminare con più precisione le aree cerebrali interessate dalla patologia, rispetto ai tessuti limitrofi, stimolando l'interesse verso tale metodica diagnostica, individuata come strumento ottimale per quantificare la perdita di NM nei pazienti PD, soprattutto per quanto concerne le fasi iniziali della patologia [15]. L'evidenza, poi, che sequenze con una preparazione MT dedicata, permettessero di ottenere immagini caratterizzate da un contrasto migliore e un più elevato SNR, mantenendo i tempi d'acquisizione pressoché invariati, ha stimolato l'interesse verso tale tecnica.

In questo capitolo vengono presentate le sequenze che sono state messe a punto, nell'ottica di enfatizzare il contributo conseguente all'effetto MT, un primo dataset derivante da acquisizioni eseguite su soggetti sani e le analisi principali svolte sulle immagini ottenute. In particolare, per quanto concerne la messa a punto e la successiva ottimizzazione delle sequenze, sono stati analizzati i lavori eseguiti da Nikos Priovoulos et al. [2] e da Olivier Mougin et al. [4], sulla base dei quali sono state individuate alcune sequenze d'interesse per un'ottimale enfaticizzazione dell'effetto MT.

Il preprocessing ha invece coinvolto una serie di procedure necessarie al fine di ottenere immagini consistenti, quali *Brain extraction*, normalizzazione e coregistrazione. Per quanto concerne la fase finale di elaborazione delle immagini, si è scelto di eseguire il calcolo di parametri quali SNR e CNR, che permettessero di quantificare e valutare la bontà delle acquisizioni effettuate con il nuovo protocollo proposto per la neuromelanina, consentendo il confronto con le sequenze attualmente in uso.

3.1 Ottimizzazione delle sequenze

Prendendo in esame gli studi eseguiti dai gruppi di ricerca guidati da Nikos Priovoulos (Maastricht) [2] e da Olivier Mougin (Nottingham) [4], si è scelto di proporre una sequenza, con preparazione MT esplicita, caratterizzata da impulsi MT multipli, che riprendesse alcune delle caratteristiche delle sequenze presenti in tali lavori e permettesse di mettere in evidenza il contrasto dovuto alla Neuromelanina.

In particolare, il gruppo di ricerca di O. Mougin [4], proponeva una sequenza costituita da una pre-saturazione, ottenuta ad una specifica frequenza di offset, seguita da una lettura 3D di tipo TFE ($TR/TE=12.5/6$ ms, $SSi=10$ s, $FOV=192 \times 180 \times 50$ mm³, risoluzione: $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ mm³, $\alpha=8^\circ$, TFE factor=410) caratterizzata da una serie di echi a gradiente singolo acquisiti rapidamente, campionando radialmente il K -space (Figura 3.1).

Nello specifico, la sequenza di pre-saturazione consisteva in un treno di $N=20$ impulsi sinc-gaussiani, off-resonance con BW di 200 Hz e durata 30 ms, applicati ad intervalli di $T=60$ ms. Gli autori hanno quindi effettuato diverse prove, su di un singolo soggetto sano, con l'obiettivo di determinare le ottimali frequenze e ampiezze degli impulsi off-resonance, che permettessero di non superare i vincoli SAR.

Al termine della fase di pre-saturazione, prima della lettura TFE, è stato applicato un gradiente di spoiler di ampiezza $G_{spoiler}=33$ mT/m e durata 14.6 ms, per rimuovere eventuali residui di magnetizzazione trasversale.

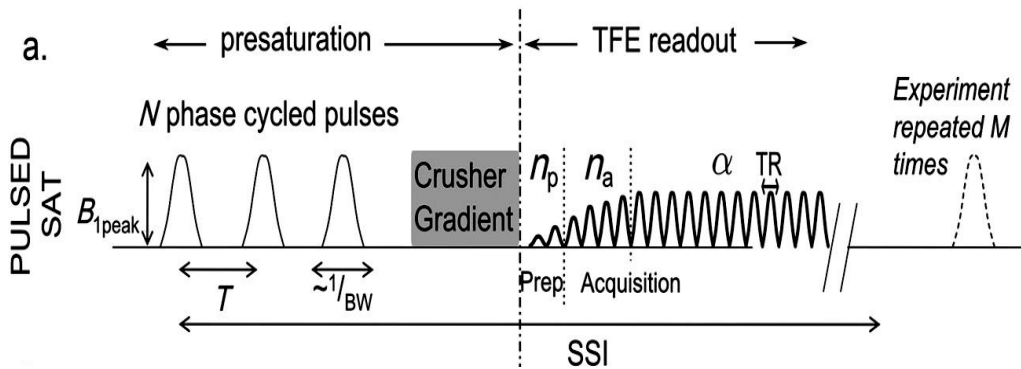


Figura 3.1: Rappresentazione schematica della sequenza proposta da Mougin et al. [4]. La sequenza MT-TFE è costituita da due parti: la prima in cui viene realizzata la pre-saturazione vera e propria, mediante un treno di N impulsi RF off-resonance, di ampiezza B_{1peak} , larghezza di banda BW e frequenza di offset $\Delta\omega$, la seconda caratterizzata dalla lettura TFE.

Nel presente lavoro di tesi si è voluto cercare di replicare quanto proposto, su scanner a 7 Tesla, dai gruppi di ricerca precedentemente citati, lavorando su strumentazione Philips a 3 Tesla. Nello specifico, quindi, sono state preparate, mediante un ambiente di programmazione proprietario di Philips, tre sequenze MT-TFE, caratterizzate da diversa risoluzione, in cui la pre-saturazione è stata ottenuta mediante un treno di 20 impulsi, off-resonance, di tipo sinc-gaussian della durata di 20 ms. La frequenza di offset è stata impostata a 858 Hz (valore ricavato applicando la (3.1)), come suggerito dai lavori precedentemente illustrati [2], mentre l'intervallo di tempo per l'applicazione di ciascun impulso è stato impostato a 20 ms.

$$\text{Frequenza (Hz)} = \frac{\text{Frequenza (ppm)} - \text{Frequenza portante (Hz)}}{10^6} \quad (3.1)$$

A partire dal lavoro eseguito da J. Langley e collaboratori [19], si è scelto di realizzare una sequenza caratterizzata da un *Voxel size* di 0.8 x 0.8 x 3 mm, per poi proporre delle sequenze caratterizzate da una risoluzione minore e da tempi d'acquisizione (TA, *Acquisition Time*) costanti. Tale scelta è motivata dal fatto che, *Voxel size* di dimensioni maggiori contribuiscono a migliorare il rapporto segnale disturbo (SNR) ma, di contro, determinano un rischio maggiore per quanto riguarda la possibilità di introdurre nelle immagini artefatti da volume parziale.

Di seguito, in Tabella 3.1, sono riportate le caratteristiche delle tre sequenze realizzate:

Tabella 3.1: Specifiche delle sequenze messe a punto di tipo MT-TFE.

	NM_0.5_0.5_2	NM_0.6_0.6_2.5	NM_0.8_0.8_3
<i>Voxel size</i> (mm ³)	0.5 x 0.5 x 2	0.6 x 0.6 x 2.5	0.8 x 0.8 x 3
FOV (<i>Field of View</i>) (mm)	110 x 110 x 40	110 x 110 x 40	110 x 110 x 39
<i>Number of slices</i>	20	16	13
<i>Slice Orientation</i>	trasversale	trasversale	trasversale
<i>Readout</i>	3D cartesiano TFE	3D cartesiano TFE	3D cartesiano TFE
<i>shot mode</i>	multishot	multishot	multishot
TFE <i>factor</i>	20	20	20
TE (<i>Time Echo</i>) (ms)	4	4	4
TR (<i>Repetition Time</i>) (ms)	7.8	7.6	7.4
Flip angle (α) (°)	8	8	8
<i>Acquisition Matrix</i>	220 x 220	184 x 184	140 x 138
NSA (<i>Number of Signal Averages</i>)	7	11	18
<i>Pulse_shape</i>	sg_100_100_0	sg_100_100_0	sg_100_100_0
<i>Number of elements</i>	20	20	20
<i>Pulse duration</i> (ms)	20	20	20
<i>Pulse intervals</i> (ms)	20	20	20
TA (<i>Time Acquisition</i>)	10:18.9	10:10.7	10:02.4

Gli schemi di pre-saturazione proposti e le sequenze successivamente realizzate, sono stati scelti seguendo le linee guida riportate negli studi più recenti presenti in letteratura e verificando, inoltre, che i limiti di assorbimento specifico (SAR) non fossero superati.

Per lo sviluppo delle sequenze si è ricorso all'utilizzo del software Philips Release 5.4.1 - DDAS, all'interno del quale avviene la programmazione delle sequenze in un ambiente proprietario, chiamato *Pulse Programming Environment* (PPE) all'interno della suite di programmazione MR-Paradise; il linguaggio di programmazione, semi proprietario di Philips con sintassi C++ e compilatore ibrido, è Goal C++.

3.2 Acquisizione dati NM-MRI

Nel presente studio, sono stati reclutati sei soggetti maschi, di età compresa tra i 23 e i 29 anni. Tutti i partecipanti erano sani e, come valutato nei questionari self-report compilati, privi di problemi neurologici o psichiatrici. Tutti i partecipanti hanno, inoltre, fornito il consenso informato per lo studio, mediante lettura e firma di un documento che descrive le procedure e possibili rischi, prima dell'inizio delle scansioni. I soggetti, per tutta la durata dell'acquisizione, all'interno della camera di Risonanza Magnetica, erano posti in posizione supina, con le braccia rilassate distese lungo i fianchi e la testa bloccata mediante apposito poggiatesta regolabile; tale postura doveva essere mantenuta il più possibile invariata per tutta la durata dell'esame diagnostico.

I dati NM-MRI sono stati acquisiti presso la Fondazione Ospedale San Camillo/IRCCS, mediante uno scanner di risonanza magnetica a 3T (Ingénia CX-3T, Philips Medical Systems) con bobina *head coil* a 32 canali. Le acquisizioni sono state eseguite in due sessioni diverse: la prima, che ha coinvolto due soli soggetti per una durata totale dell'esame diagnostico di circa 40 minuti, ha permesso di tarare e ottimizzare alcuni parametri della sequenza proposta, in particolare per quanto attiene al protocollo di pre-saturazione MT, direttamente dal terminale dello scanner, per ottenere una più precisa e pulita delineazione delle aree d'interesse. Nella seconda, invece, sono stati acquisiti i rimanenti volontari con la sequenza MT-TFE ottimizzata, per una durata totale dell'esame di circa 55 minuti.

Infatti, allo scopo di confrontare le performance delle sequenze preparate, in sede d'esame diagnostico, sono state anche effettuate una serie di

acquisizioni con il protocollo *Gradient Echo* FFE, attualmente in uso nella struttura ospedaliera, per lo studio della neuromelanina. Inoltre, al fine di ottenere un metro di paragone per validare i risultati ottenuti, mediante le sequenze proposte, e valutare l'impatto che una preparazione MT esplicita ha a livello di NM-MRI, sono state eseguite delle acquisizioni di tipo T_1 -weighted MPRAGE, le cui specifiche sono riassunte in Tabella 3.2.

Tabella 3.2: Specifiche della sequenza di tipo FFE, utilizzata per l'analisi delle aree cerebrali ad elevata concentrazione di neuromelanina, e della sequenza T_1 -weighted (MPRAGE), eseguite nello studio, su scanner 3 Tesla.

	NM-FFE	T_1 -w
<i>Voxel size</i> (mm ³)	0.8 x 0.8 x 1.5	0.62 x 0.62 x 0.8
FOV (<i>Field of View</i>) (mm)	100 x 61 x 53	190 x 250 x 320
<i>Number of slices</i>	50	300
<i>Slice Orientation</i>	trasversale	sagittale
TFE <i>factor</i>	20	156
TE (<i>Time Echo</i>) (ms)	4.2	4.5
TR (<i>Repetition Time</i>) (ms)	75	9.9
Flip angle (α) (°)	14	8
NSA (<i>Number of Signal Averages</i>)	2	1
TA (<i>Time Acquisition</i>)	8:06	5:00

Per tutte le sequenze utilizzate, si è scelto come riferimento per il corretto posizionamento del FOV, il PT (*Pontine Tegmentum*), area cerebrale situata nel tronco encefalico, preso a livello della slice assiale pesata T_1 (Figura 3.2).

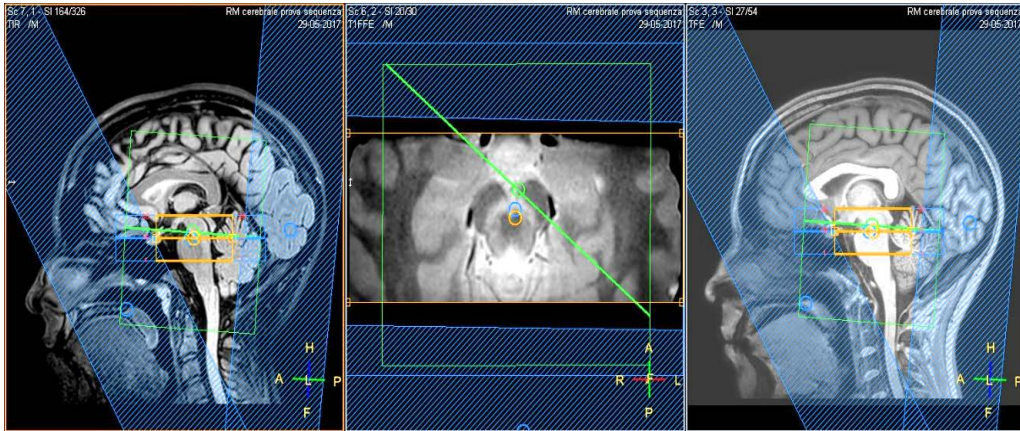


Figura 3.2: Visone sagittale per il corretto posizionamento del FOV e delle bande di saturazione, collocate con angolazione obliqua rispetto alla regione del bulbo oculare, per saturare l'intensità del segnale nelle acquisizioni eseguite.

Le bande di saturazione sono state collocate perpendicolarmente all'encoding di fase, vicino alla linea di demarcazione della base del cranio, in modo da limitare artefatti da volume parziale, derivanti da un FOV ridotto, ed evitare la soppressione accidentale dei segnali legati alle aree d'interesse contenenti neuromelanina.

3.3 Elaborazione delle immagini

Prima di poter procedere con l'analisi delle immagini ottenute, è stato necessario convertire il formato DICOM, utilizzato da molte apparecchiature mediche come standard per la memorizzazione degli esiti degli esami, nel formato NifTi, in quanto, quest'ultimo, consente una più vasta interoperabilità tra suite di calcolo per immagini biomedicali ed utilizza la convenzione neurologica. Per la conversione è stato utilizzato il software dcm2niix [23].

Inoltre, preliminarmente alle operazioni di coregistrazione e normalizzazione delle immagini, si è scelto di effettuare un'operazione di *brain extraction* o *skull stripping*: tale step è necessario nella maggior parte degli studi di risonanza magnetica strutturale, in quanto permette di separare il tessuto cerebrale da tutti quei tessuti che possono costituire fonte di disturbo, come osso, midollo, occhi e grasso. Nello specifico, tale operazione è stata effettuata sulle immagini T_1 pesate di ciascun soggetto (metodo MASS, *Multi Atlas Skull Stripping* [28], [29]), in modo tale che fosse successivamente possibile, mediante normalizzazione, portare i volumi cerebrali acquisiti sullo spazio MNI (*Montreal Neurological Institute, ICBM 2009c Non-linear Symmetric and ICBM152 2006 Non-linear Symmetric*) [20], [21] (Figura 3.3).

3.3.1 Preprocessing

Per ottenere i risultati, in seguito riportati, si è ricorso al software open source ANTs (*Advanced Normalization Tools*) [24], la cui libreria contiene una serie di toolbox utili alla registrazione, normalizzazione e segmentazione di immagini. Per quanto concerne questa prima fase di elaborazione, si è scelto di procedere mediante le operazioni di coregistrazione e normalizzazione; queste due tecniche permettono rispettivamente di:

- stimare una trasformazione spaziale ottimale che permetta di sovrapporre due o più immagini dello stesso soggetto, acquisite in tempi e con modalità differenti, al fine di consentirne un confronto;

- normalizzare volumi acquisiti da soggetti diversi su di uno stesso template comune, detto spazio stereotassico, permettendo di fornire una semplice descrizione anatomica delle aree cerebrali mediante coordinate spaziali e il confronto tra soggetti diversi.

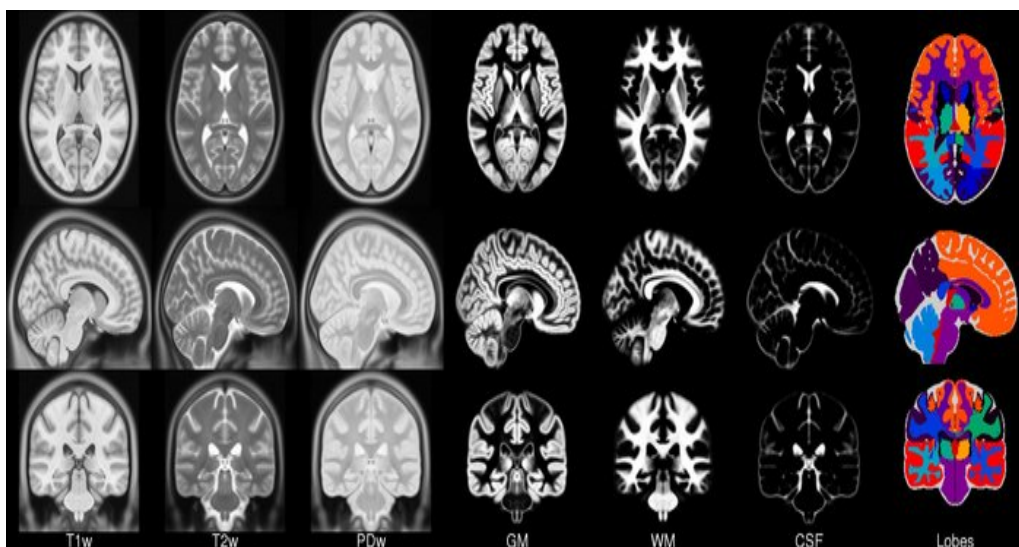


Figura 3.3: Spazio MNI, ICBM 2009c Non-linear Symmetric [20].

L'obiettivo iniziale del preprocessing spaziale è stato, quindi, quello di normalizzare, per ogni singolo soggetto, le immagini pesate T_1 , precedentemente sottoposte alla procedura di *brain extraction* e rappresentanti lo spazio di riferimento, rispetto ai due template scelti, che costituiranno invece la *moving image*, individuati dall'atlante ICBM 2009c *Non-linear Symmetric* e da quello ICBM152 2006 *Non-linear Symmetric* (Figura 3.5), quest'ultimo utilizzato per delineare la reference region utilizzata per il successivo calcolo del CNR e corrispondente al peduncolo cerebellare [19], area del mesencefalo caratterizzata da concentrazioni di NM trascurabili.

Il processo ha coinvolto sia operazioni lineari, quali trasformazione rigida (6 gradi di libertà) e affine (12 gradi di libertà), che tecniche di tipo non lineare come, ad esempio, l'algoritmo SyN, che opera una trasformazione diffeomorfica; l'uscita prodotta sarà, quindi, costituita dall'immagine di partenza coregistrata su quella di riferimento.

E' stata quindi effettuata, successivamente, la coregistrazione delle immagini T_1 -w rispetto a quelle pesate in MT.

Per ogni soggetto, in particolare, sono stati valutati volumi acquisiti a diversa risoluzione (2, 2.5 e 3 mm), realizzando l'operazione in esame mediante una singola trasformazione rigida, generalmente impiegata per registrare immagini di uno stesso soggetto tra loro.

Infine, è stato necessario ricondurre le immagini dallo spazio del template scelto a quello MT, in modo tale da ottenere le maschere utili per le successive fasi di elaborazione: come immagini di riferimento sono state prese quelle pesate in MT, a diverse risoluzioni, ottenute negli step precedenti, in input sono state passate le immagini degli atlanti, per ottenere, quindi, le maschere desiderate. Nello specifico, le normalizzazioni, dallo spazio MNI verso quello MT, precedentemente descritte, sono state eseguite utilizzando i due template proposti, rispettivamente, da Zang et al. [17] e da Wang et al. [18], mentre, per la determinazione della reference, si è utilizzato l'ICBM-DTI-81 *white-matter labels atlas* (Figura 3.5) fornito dalla JHU (*Johns Hopkins University*) [22]. Per tutte le operazioni sopracitate è stata utilizzata una tecnica di interpolazione lineare, ad eccezione di quanto fatto per l'ultima operazione di normalizzazione dallo spazio JHU a quello delle immagini pesate T_1 , dove è stata utilizzata la funzione di interpolazione *Nearest neighbour*, la quale considera l'intensità del voxel nel nuovo volume pari a quella del voxel più vicino, nel volume originale; tale tecnica risulta più adatta a trattare immagini di maschere, dal momento che ne preserva i bordi e il valore.

Quanto appena illustrato è stato, quindi, applicato anche alle immagini acquisite con il protocollo per l'analisi della NM attualmente in uso presso la Fondazione Ospedaliera San Camillo/IRCCS. Nello specifico tale protocollo, di tipo FFE, prevede di ottenere una mappa cumulativa di sottrazione tra echi, mediando il segnale relativo ai primi quattro echi T_1 -w, dove esso è maggiormente intenso, e sottrarre l'ottavo eco T_2 -w, relativo ad un'immagine omogenea a livello delle aree sotto esame. E' stata quindi effettuata, la coregistrazione delle immagini T_1 -w rispetto a quelle ottenute dalla procedura appena descritta, per poi, successivamente, operare la normalizzazione per ricondurre le immagini dallo spazio dei template scelti a quello della NM, per ottenere delle maschere consistenti con quelle precedentemente ricavate per le sequenze MT proposte, al fine di consentire un confronto tra le performance dei due protocolli.

3.3.2 Analisi delle immagini MRI

Le analisi di seguito descritte sono state realizzate mediante il software di calcolo numerico MATLAB R2018b (Mathworks, Natick, MA, USA). Le elaborazioni sono state eseguite a partire dall'immagine pesata in MT. Grazie alle maschere, precedentemente ottenute in fase di normalizzazione

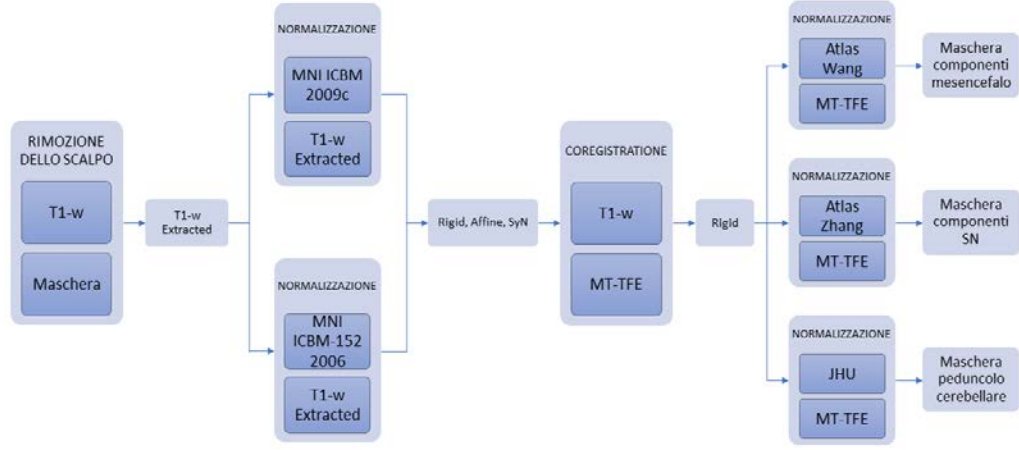


Figura 3.4: Flow chart rappresentante le operazioni eseguite nella fase di preprocessing delle immagini.

con i due template utilizzati [17] e [18], è stato possibile isolare le aree d'interesse per procedere con il calcolo di SNR e CNR, seguendo quanto descritto da Priovoulos e collaboratori [2], per l'analisi del LC:

$$SNR = \frac{I_{ROI}}{STD_{ROI}} \quad (3.2)$$

$$CNR = \frac{(I_{ROI} - I_{Ref})}{STD_{combined}} \quad (3.3)$$

dove I_{ROI} rappresenta l'intensità media del segnale nella ROI considerata, I_{Ref} l'intensità media del segnale nella regione di riferimento, corrispondente al peduncolo cerebellare; STD_{ROI} e $STD_{combined}$ rappresentano, invece, rispettivamente, la *standard deviation* dell'intensità del segnale nella ROI in esame e la *standard deviation* ottenuta considerando, contemporaneamente, la regione d'interesse e la reference. Al fine di includere una quantità sempre maggiore di informazione utile, restringendo l'area soggetta all'analisi, è stato inizializzato un vettore contenente le soglie desiderate da applicare alle immagini.

Nello specifico è stata realizzata una *function* che restituisce in uscita SNR e CNR delle regioni esaminate, ricevendo in ingresso: l'immagine coregistrata dallo spazio T_1 rispetto a quello MT, una struttura contenente le regioni d'interesse, la reference e un vettore con i diversi valori di soglia scelti. A questo livello, si è reso necessario normalizzare le ROI, per ottenere maschere con valori compresi tra 0 e 1.

Successivamente, dopo aver selezionato dall'immagine normalizzata con il template JHU ICBM-DTI-81, le regioni 13 e 14 corrispondenti al peduncolo

cerebellare (Figura 3.5), si è aggiunto un ulteriore step di elaborazione morfologica dell'immagine, realizzato mediante l'operatore di *erosion* (elemento di base disco con diametro pari a 3 mm).

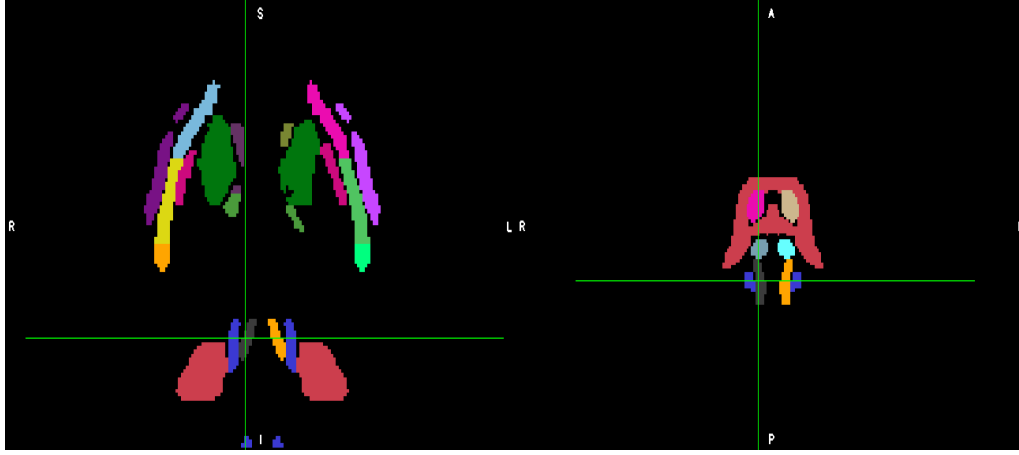


Figura 3.5: Atlante JHU ICBM-DTI-81 *white-matter labels atlas* nelle proiezioni coronale e assiale; in grigio (13) e in giallo (14) sono evidenziate le regioni, prese come reference per le analisi, relative al peduncolo cerebellare [22].

Tale passaggio si è reso necessario, in quanto, come constatato mediante ispezione visiva dei risultati ottenuti nella normalizzazione dallo spazio JHU a quello T_1 , si evidenziava una erronea delineazione dei margini, con conseguente degradazione della reference.

Questa operazione è stata realizzata per mezzo della funzione di MATLAB **imerode** ed ha permesso di eliminare dettagli irrilevanti dall'immagine, realizzando un graduale restringimento dei contorni che costituiscono il background e che sono stati erroneamente inclusi nella regione d'interesse, per ottenere una più precisa e pulita definizione delle aree oggetto di studio.

Una volta completate le procedure appena descritte, si è proceduto con il calcolo, intra-ROI, di SNR e CNR, per tutti i soggetti e per ogni risoluzione con cui sono state acquisite le immagini con la sequenza MT-TFE messa a punto, considerando tutte le regioni d'interesse individuate. Tale operazione è quindi stata eseguita anche rispetto alle immagini ottenute con il protocollo per la NM attualmente in uso presso la struttura ospedaliera, per permettere un confronto con le sequenze caratterizzate da preparazione MT esplicita proposte.

Capitolo 4

Risultati e Discussione

Nel seguente capitolo vengono riportati e discussi i risultati ottenuti, nelle principali fasi di elaborazione dell'immagine, sia per quanto concerne le operazioni preliminari di preprocessing, eseguite mediante il pacchetto ANTs, che per quanto riguarda la successiva fase di analisi quantitativa, eseguita mediante il software di calcolo numerico MATLAB.

4.1 Risultati Preprocessing

Di seguito sono riportati i risultati relativi alle operazioni di *brain extraction*, di normalizzazione e di coregistrazione: le immagini presentate fanno riferimento ad un unico soggetto acquisito con la sequenza messa a punto di tipo MT-TFE con risoluzione 0.6 x 0.6 x 2.5 mm.

Al fine di valutare la bontà delle operazioni eseguite, in questa fase preliminare di elaborazione delle immagini, è stato utilizzato il visualizzatore d'immagini FSLeyes 5.0.10 [25].

In Figura 4.1, viene riportato il risultato dell'operazione di *Brain Extraction* eseguita sull'immagine pesata T_1 del soggetto; tale risultato è stato conseguito adattando una maschera, presa come modello di riferimento, sull'immagine cerebrale MRI per separare il cervello dal cranio. Questa operazione rappresenta uno step preliminare necessario in molte analisi di immagini strutturali ottenute tramite MRI, in quanto permette di isolare la regione cerebrale d'interesse dalle aree che possono costituire fonte di disturbo per le successive fasi di elaborazione dell'immagine.

Nel complesso si può notare come, l'intero volume cerebrale, risulti ben isolato dai tessuti limitrofi.

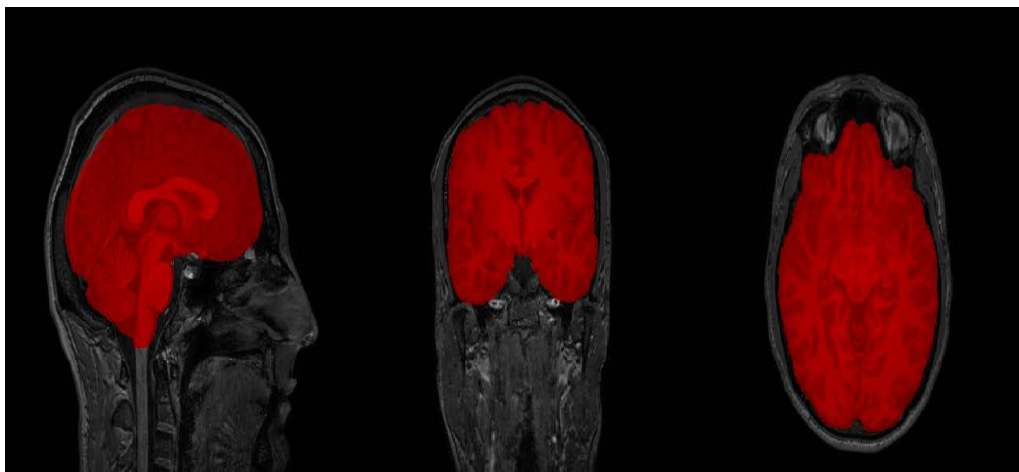


Figura 4.1: Operazione di *Brain Extraction*. Come immagine a livelli di grigio è rappresentata, nei tre piani sagittale, assiale e coronale, l'immagine pesata T_1 presa come riferimento; in rosso emerge la struttura cerebrale privata dello scalpo e di tutti i tessuti che possono costituire fonte di disturbo per le elaborazioni successive.

Le operazioni sopra descritte hanno quindi permesso di realizzare la normalizzazione dallo spazio MNI dei due atlanti utilizzati (ICBM 2009c e ICBM152 2006) a quello delle immagini T_1 -w private dello scalpo (Figura 4.2).

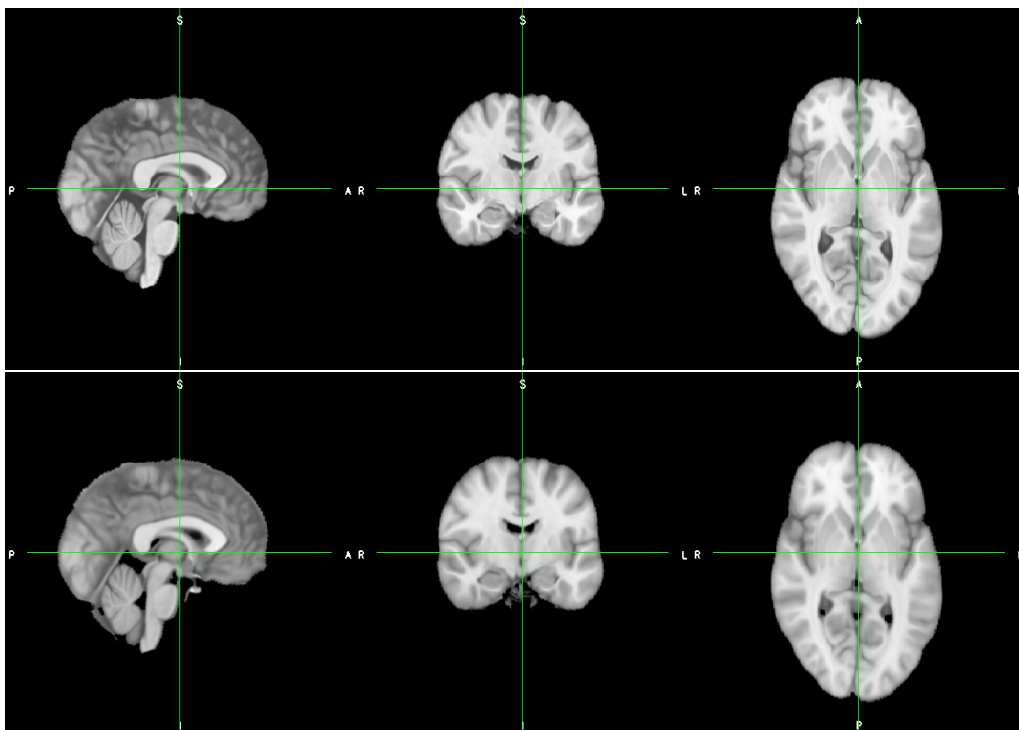


Figura 4.2: Nella porzione superiore sono riportati, nei tre piani sagittale, assiale e coronale, i risultati della normalizzazione MNI ICBM 2009c rispetto alla T_1 ; inferiormente, invece, l'esito della normalizzazione MNI ICBM152 2006 rispetto alla T_1 .

Per quanto riguarda, invece, i risultati ottenuti in fase di coregistrazione, in Figura 4.3 viene rappresentato l'esito dell'allineamento spaziale eseguito. Nello specifico, si nota come tale operazione abbia permesso di riallineare le strutture anatomiche d'interesse, mediante una semplice trasformazione rigida, che ha permesso di ricondurre l'immagine T_1 -w del soggetto nello spazio dell'immagine pesata in MT.

Confrontando le diverse componenti cerebrali si può notare come, al termine dell'operazione eseguita, le aree d'interesse si dimostrino in sovrapposizione.

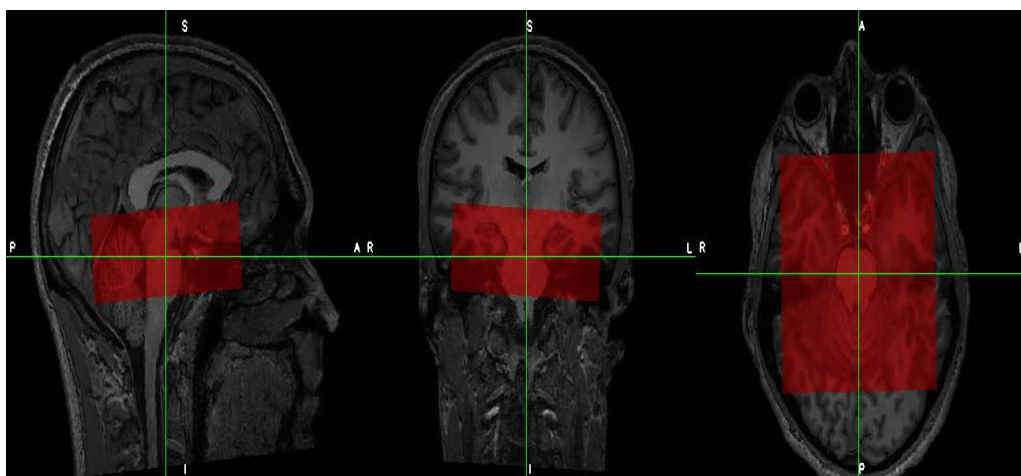


Figura 4.3: Operazione di coregistrazione dell'immagine T_1 -w (immagine a livelli di grigio) rispetto all'immagine ottenuta mediante la sequenza messa a punto di tipo MT-TFE (area rossa), nei tre piani sagittale, assiale e coronale.

Successivamente, al fine di ottenere le maschere desiderate per poter isolare le strutture anatomiche d'interesse del mesencefalo, sono state eseguite le operazioni di normalizzazione dallo spazio MNI verso quello MT, utilizzando i template proposti da Zang et al. [17] e da Wang et al. [18].

In particolare, è stato possibile delineare le diverse aree della SN (mediale, laterale e ventrale) e dei gangli della base (globo pallido, nucleo rosso, SN, corpi mammillari e nucleo subtalamico), al fine di riportarle nello spazio dell'immagine coregistrata, ottenendo, anche in questi casi, una buona sovrapposizione con le strutture cerebrali (Figura 4.4 e Figura 4.5), sebbene sia possa riscontrare una leggera asimmetria tra le strutture corrispondenti della parte destra e sinistra, probabilmente a causa di un non perfetto posizionamento del FOV in fase di acquisizione.

Come ultima operazione, della fase di preprocessing, è stata effettuata la normalizzazione dallo spazio dell'atlante ICBM152 della JHU verso quello MT dell'immagine coregistrata in precedenza (Figura 4.6).

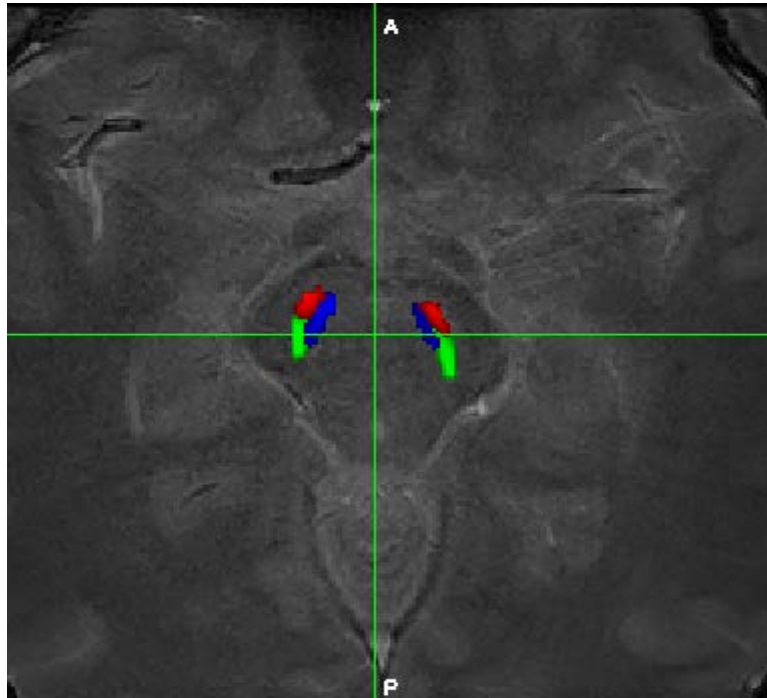


Figura 4.4: Operazione di normalizzazione dallo spazio MNI, utilizzando il template di Zhang et al. [17], verso quello dell'immagine ottenuta coregistrando la T_1 -w rispetto alla MT-TFE. In rosso è rappresentata l'area relativa alla parte ventrale, in verde la parte laterale, mentre, in blu, la parte mediale della SNc.

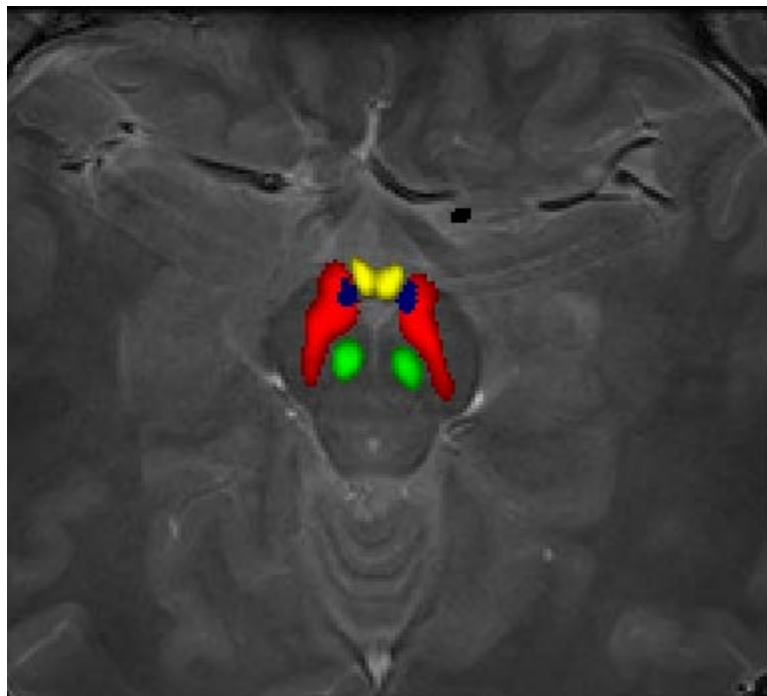


Figura 4.5: Operazione di normalizzazione dallo spazio MNI, utilizzando il template di Wang et al. [18], verso quello dell'immagine ottenuta coregistrando la T_1 -w rispetto alla MT-TFE. In rosso è rappresentata l'area relativa alla SN, in verde la zona corrispondente al nucleo rosso, in giallo i corpi mammillari, in blu il nucleo subtalamico e in nero il globo pallido.

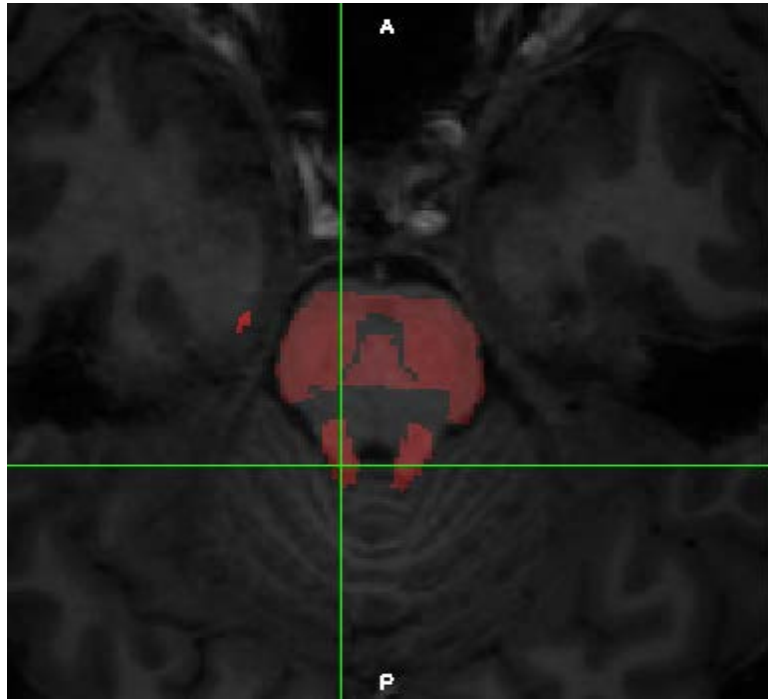


Figura 4.6: Operazione di normalizzazione dallo spazio dell'atlante ICBM152 della JHU, verso quello dell'immagine ottenuta coregistrando la T_1 -w rispetto alla MT-TFE, al fine di ottenere la regione di riferimento d'interesse (ROI 13 e 14).

Tale passaggio si è reso necessario al fine di individuare la reference region, corrispondente al peduncolo cerebellare, utilizzata, successivamente, per l'estrazione del CNR. In particolare, l'analisi di Figura 4.6, evidenzia una erronea delineazione dei margini a livello delle aree del peduncolo cerebellare, che ha indotto, nella successiva fase di elaborazione delle immagini per il calcolo di SNR e CNR, all'applicazione dell'operatore morfologico di erosione, per delineare in maniera più precisa le zone in esame.

4.2 Risultati Analisi

L'analisi visiva, delle immagini ottenute mediante le sequenze MT-TFE proposte, evidenzia la presenza di aree ad elevata iperintensità (Figura 4.7 (a)), in corrispondenza delle zone anatomiche della SNc, rispetto ai tessuti cerebrali circostanti, in accordo con quanto riportato in letteratura.

Con l'obiettivo di confermare quantitativamente quanto appena evidenziato da un punto di vista qualitativo, si è scelto di eseguire, intra-ROI, il calcolo del rapporto segnale disturbo (SNR) e del rapporto contrasto disturbo (CNR), i cui risultati sono di seguito illustrati.

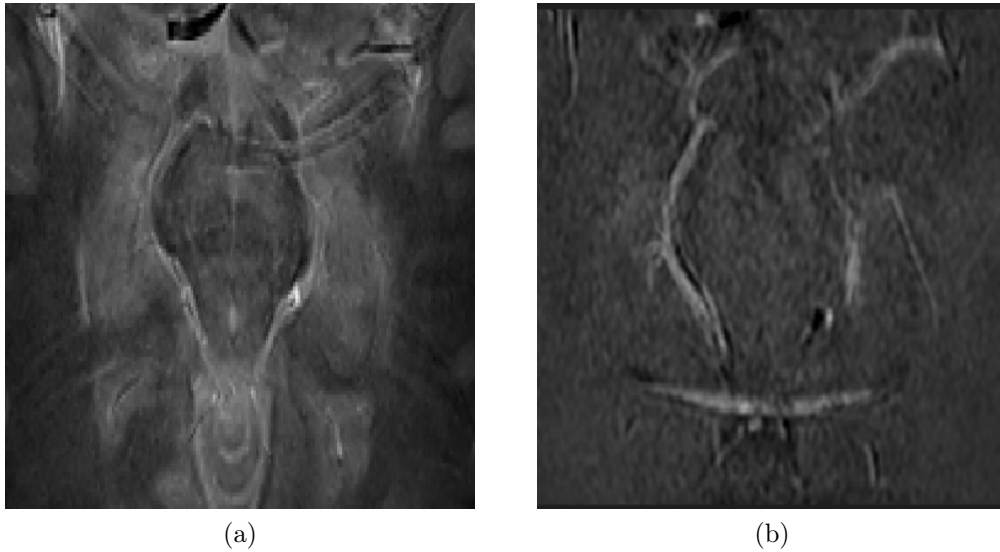


Figura 4.7: (a) Immagine del mesencefalo ottenuta mediante la sequenza MT-TFE messa a punto, con risoluzione $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm. (b) Immagine ricavata tramite il protocollo per la NM in uso presso la struttura ospedaliera San Camillo/IRCCS.

In particolare, dopo aver eseguito un'analisi comparativa dei risultati ottenuti con le tre sequenze proposte a diversa risoluzione, al fine di determinare quale tra esse costituisca la scelta più performante nel delineare le aree d'interesse per la NM, è stato eseguito un confronto con il protocollo FFE in uso presso la struttura ospedaliera S. Camillo/IRCCS.

Confrontando i grafici, relativi al calcolo del SNR, ottenuti partizionando la SN nelle sue componenti laterale, ventrale e mediale, tramite il template proposto da Zhang et al. [17], per le tre sequenze MT-TFE proposte, (Figura 4.8) è possibile constatare come il valore mediano risulti omogeneo per tutte le regioni, e, in particolare, come la sequenza con risoluzione $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm restituisca una risposta migliore in termini di STD (*standard deviation*), consentendo una più precisa riproducibilità dei risultati. Tale dato è motivato dal fatto che, l'utilizzo di sequenze caratterizzate da un *Voxel size* di dimensioni maggiori determinano un rischio superiore di introdurre nelle immagini artefatti da volume parziale.

Ciò, inoltre, è in linea con quanto desumibile analizzando i risultati ottenuti con il medesimo template, relativi al calcolo del CNR (Figura 4.9), dove si osservano valori mediani simili per tutte le risoluzioni ma una minore variabilità per quanto concerne le misure effettuate con la sequenza $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm. Lievi variazioni, sono infine riscontrabili, per tutte le risoluzioni proposte, confrontando tra loro aree corrispondenti degli emisferi sinistro e destro, con valori mediani leggermente superiori in queste ultime.

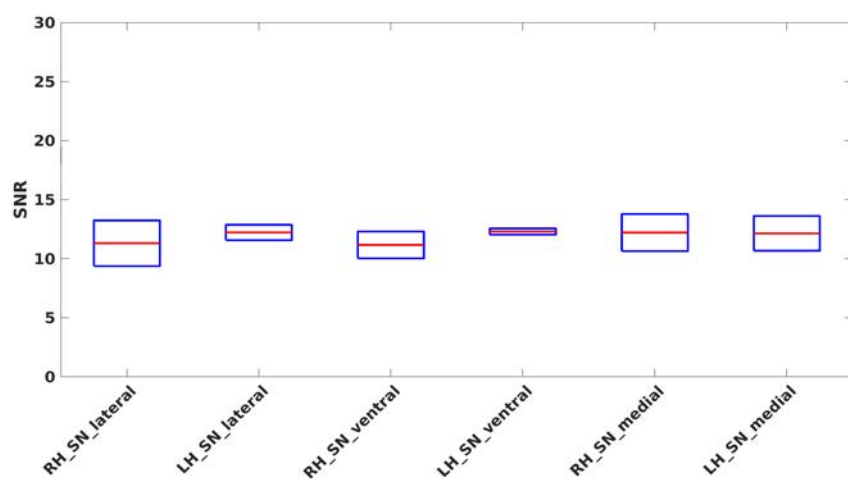
L'analisi dei grafici (Figura 4.10), relativi al calcolo del SNR per le tre sequenze MT-TFE, ottenuti partizionando il mesencefalo nelle sue componenti, tramite il template proposto da Wang et al. [18], conferma quanto precedentemente evidenziato: si riscontrano, infatti, delle disparità tra regioni corrispondenti destre e sinistre, ma, focalizzando l'attenzione sulla SNc, i valori mediani sono congrui con quanto ricavato tramite il template precedente, e, ancora una volta, la sequenza $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm determina una STD minore rispetto a quella $0.8 \times 0.8 \times 3$ mm, suggerendo la possibilità di ottenere una maggiore riproducibilità dei risultati conseguiti.

L'elevato SNR riscontrabile a livello del nucleo subtalamico è, infine, associabile alle maggiori dimensioni che lo caratterizzano, in raffronto alle altre aree esaminate. Anche per quanto concerne il CNR (Figura 4.11), a livello di SNc, si riscontrano valori mediani simili tra le varie risoluzioni, con una minore variabilità per la sequenza $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm.

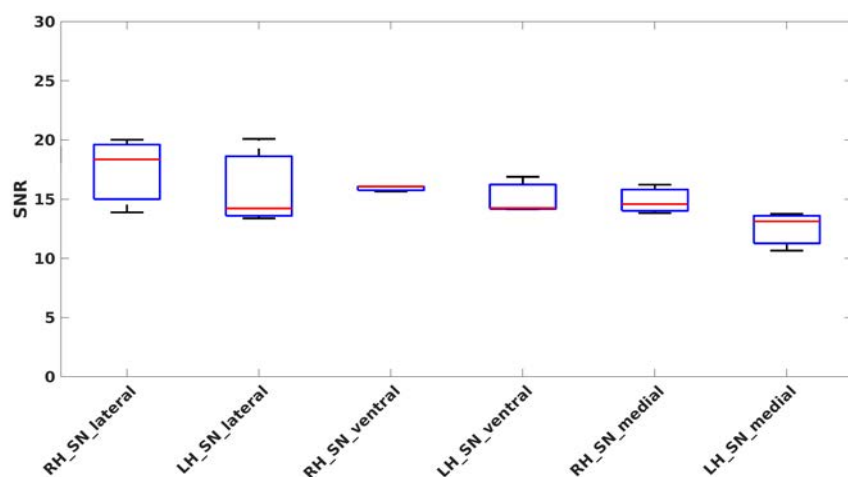
Sulla base delle considerazioni appena fatte, si è quindi scelto di procedere con la sequenza MT-TFE $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm per confrontarla con il protocollo FFE attualmente in uso per l'analisi della NM, dal momento che, nonostante i valori mediani per SNR e CNR risultassero simili a quanto ottenuto con la sequenza caratterizzata da un *Voxel size* maggiore, la minore variabilità delle misure ottenute ha orientato la scelta in questa direzione. In Figura 4.12 sono riportati gli andamenti ottenuti per il SNR, partizionando la SNc mediante il template [17], per la sequenza MT-TFE $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm rispetto a quella FFE.

In particolare, la sequenza proposta, risulta caratterizzata da valori di SNR molto più elevati, rispetto a quanto ottenuto con il vecchio protocollo per la NM, e caratterizzati da minore STD. Per quanto riguarda, invece, l'analisi del CNR (Figura 4.13), i valori mediani per le due sequenze risultano pressoché sovrapponibili, sebbene, anche in questo caso, la sequenza MT-TFE proposta permetta di ridurre la variabilità delle misure. Infine, confrontando le misure di SNR e CNR (rispettivamente, Figura 4.14 e Figura 4.15), ottenute partizionando le immagini con il template [18], si evidenziano, nuovamente, valori di SNR molto superiori, ottenuti tramite la sequenza con preparazione MT, e, in corrispondenza della SNc, valori mediani leggermente più elevati e caratterizzati da minor variabilità per il CNR.

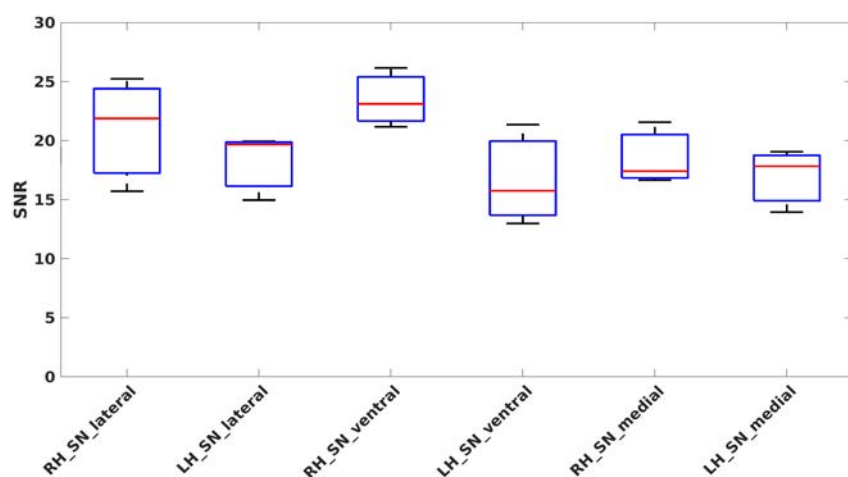
Tali risultati, perciò, confermano dal punto di vista quantitativo come, sequenze caratterizzate da una preparazione MT esplicita, permettano di conseguire risultati migliori, a livello di analisi delle aree anatomiche contenenti NM, rispetto a quanto ottenibile con i protocolli standard.



(a)

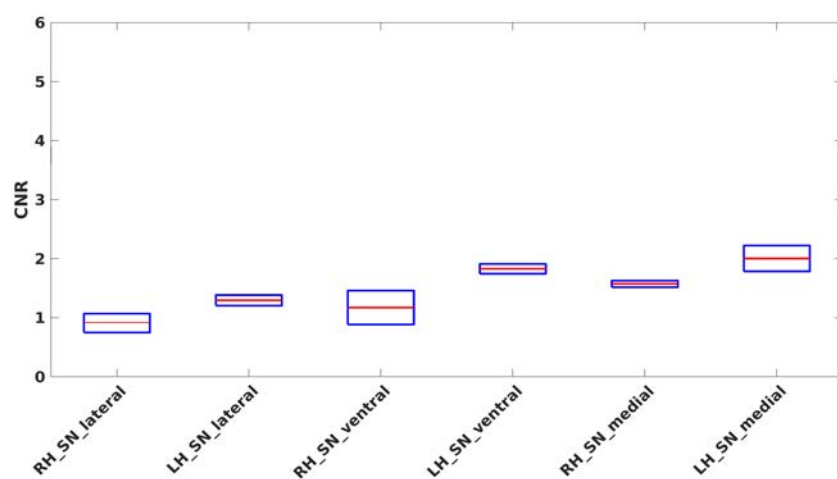


(b)

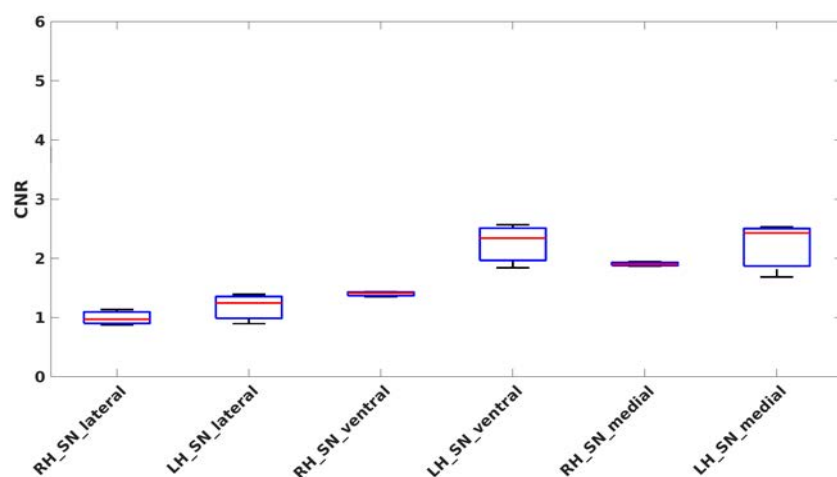


(c)

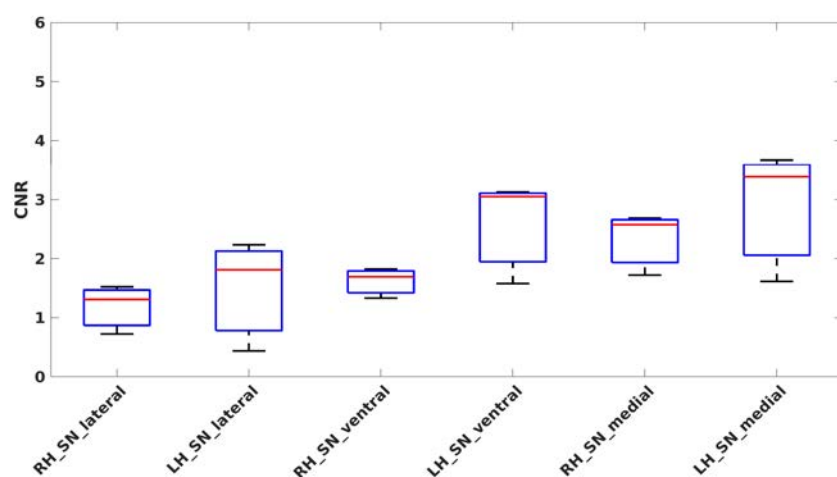
Figura 4.8: SNR delle aree cerebrali ottenute partizionando la SN, nelle sue componenti laterale, ventrale e mediale mediante l'atlante proposto da Zhang e collaboratori [17], per le tre sequenze MT-TFE messe a punto a diversa risoluzione. (a) MT-TFE 0.5 x 0.5 x 2 mm; (b) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (c) MT-TFE 0.8 x 0.8 x 3 mm



(a)

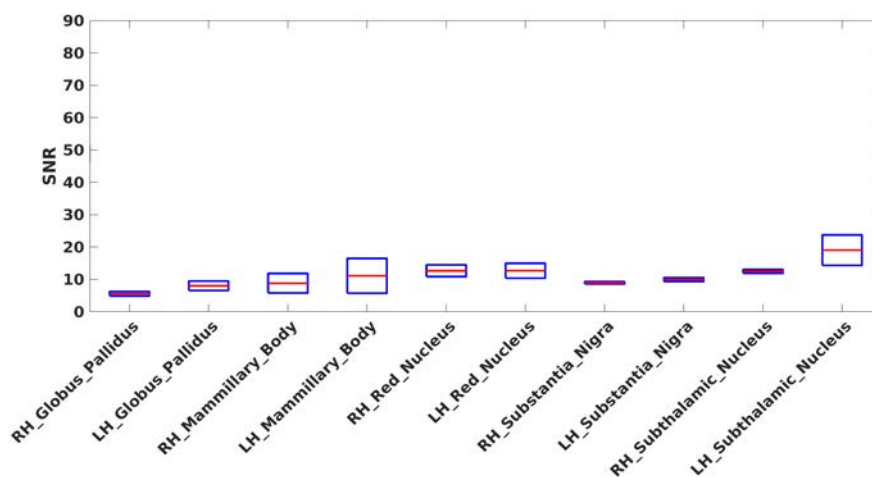


(b)

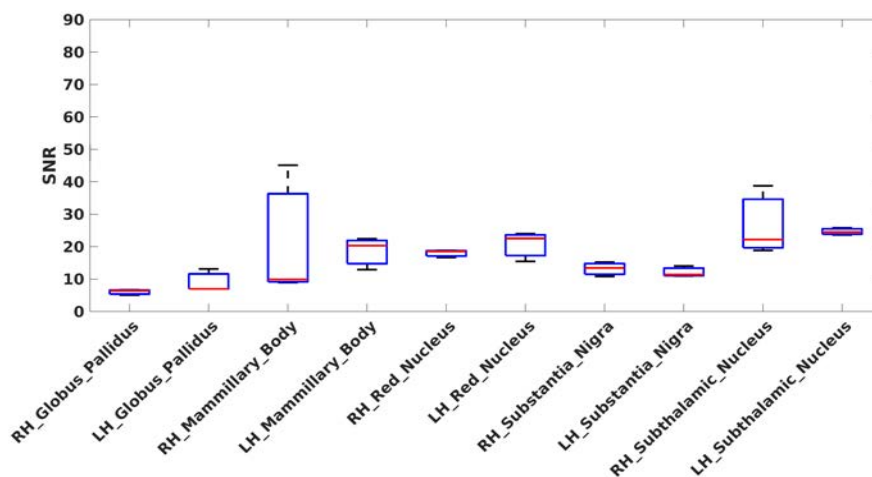


(c)

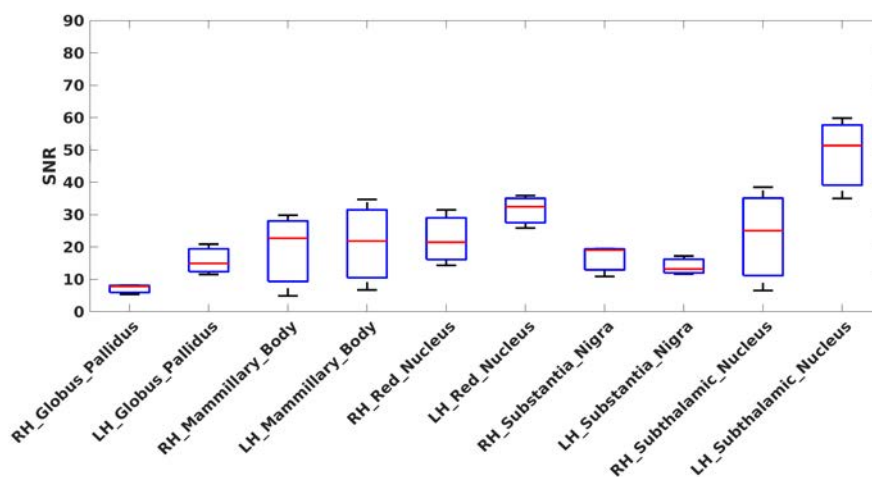
Figura 4.9: CNR delle aree cerebrali ottenute partizionando la SN, nelle sue componenti laterale, ventrale e mediale mediante l'atlante proposto da Zhang e collaboratori [17], per le tre sequenze MT-TFE messe a punto a diversa risoluzione. (a) MT-TFE 0.5 x 0.5 x 2 mm; (b) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (c) MT-TFE 0.8 x 0.8 x 3 mm



(a)

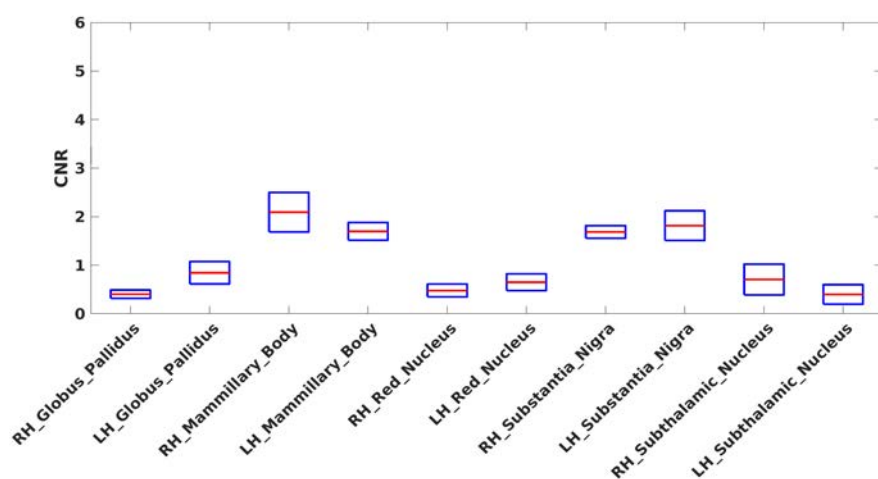


(b)

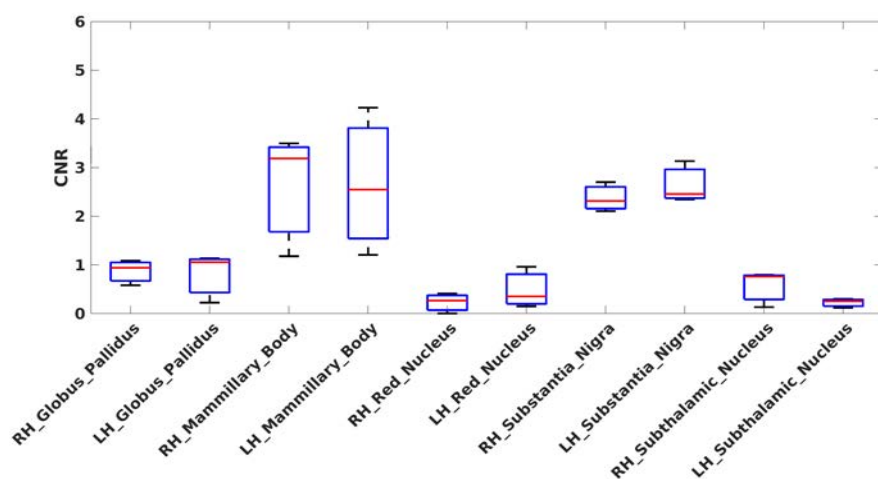


(c)

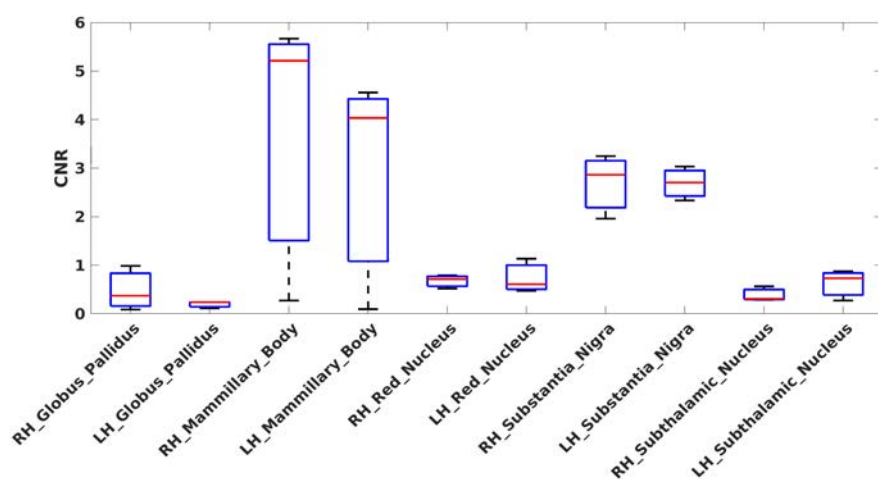
Figura 4.10: SNR delle aree cerebrali ottenute partizionando il mesencefalo, nelle aree relative a Globo Pallido, Corpi Mammillari, Nucleo Rosso, SN e Nucleo Subtalamico, mediante l'atlante proposto da Wang e collaboratori [18], per le tre sequenze MT-TFE messe a punto a diversa risoluzione. (a) MT-TFE 0.5 x 0.5 x 2 mm; (b) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (c) MT-TFE 0.8 x 0.8 x 3 mm



(a)

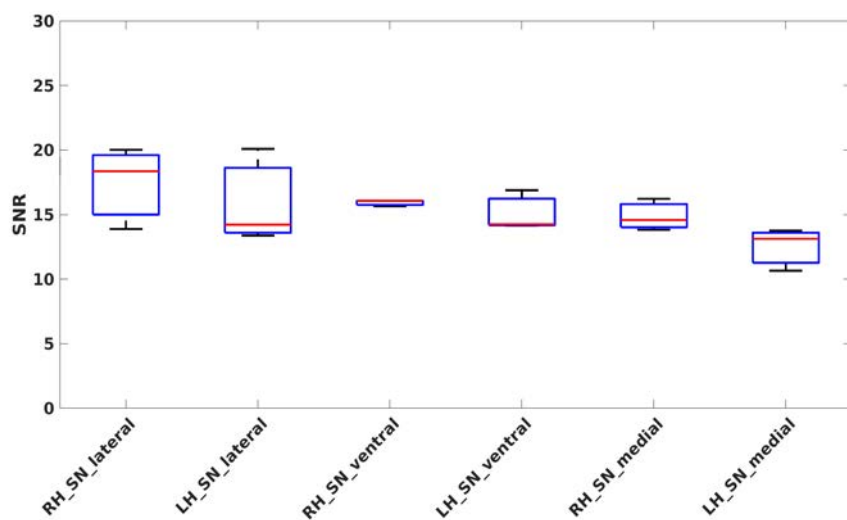


(b)

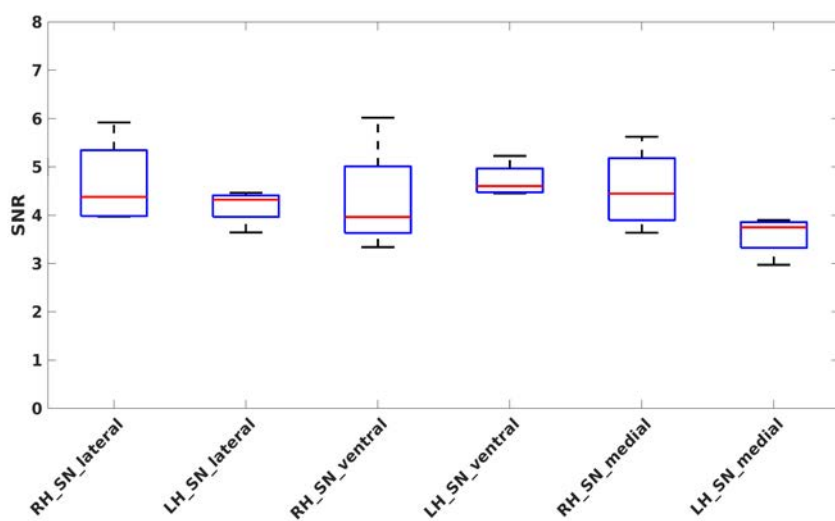


(c)

Figura 4.11: CNR delle aree cerebrali ottenute partizionando il mesencefalo, nelle aree relative a Globo Pallido, Corpi Mammillari, Nucleo Rosso, SN e Nucleo Subtalamico, mediante l'atlante proposto da Wang e collaboratori [18], per le tre sequenze MT-TFE messe a punto a diversa risoluzione. (a) MT-TFE 0.5 x 0.5 x 2 mm; (b) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (c) MT-TFE 0.8 x 0.8 x 3 mm

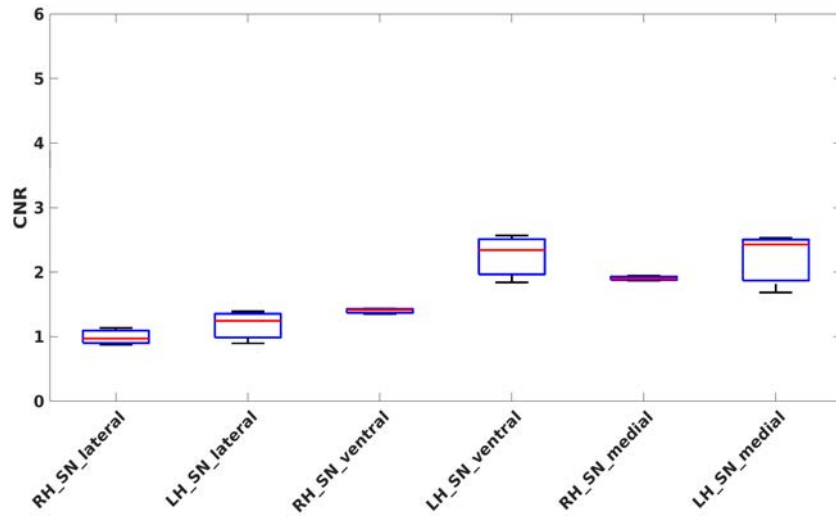


(a)

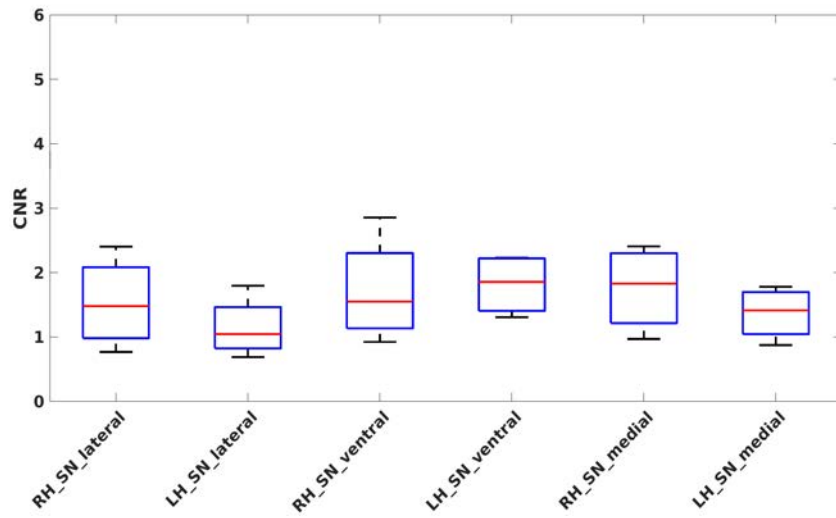


(b)

Figura 4.12: SNR delle aree cerebrali ottenute partizionando la SN, nelle sue componenti laterale, ventrale e mediale mediante l'atlante proposto da Zhang e collaboratori [17], per la sequenza MT-TFE scelta e quella in uso presso la struttura ospedaliera ospitante: (a) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (b) protocollo FFE per la NM

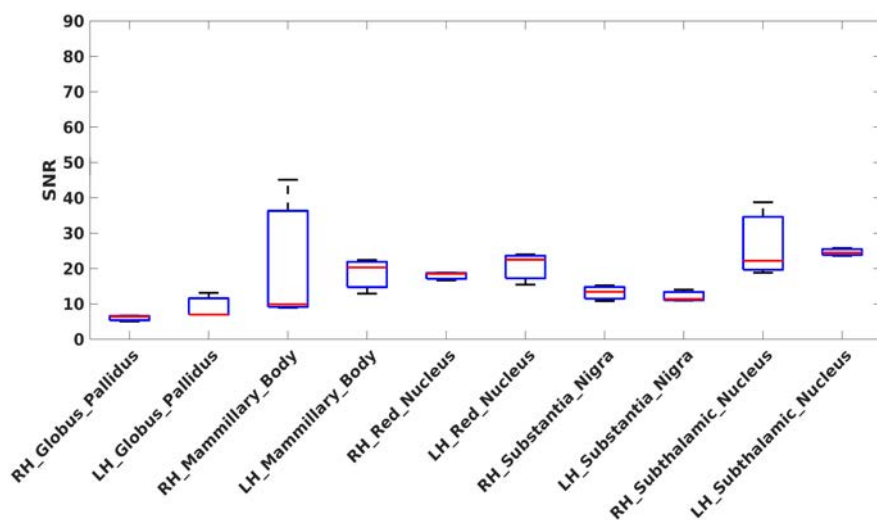


(a)

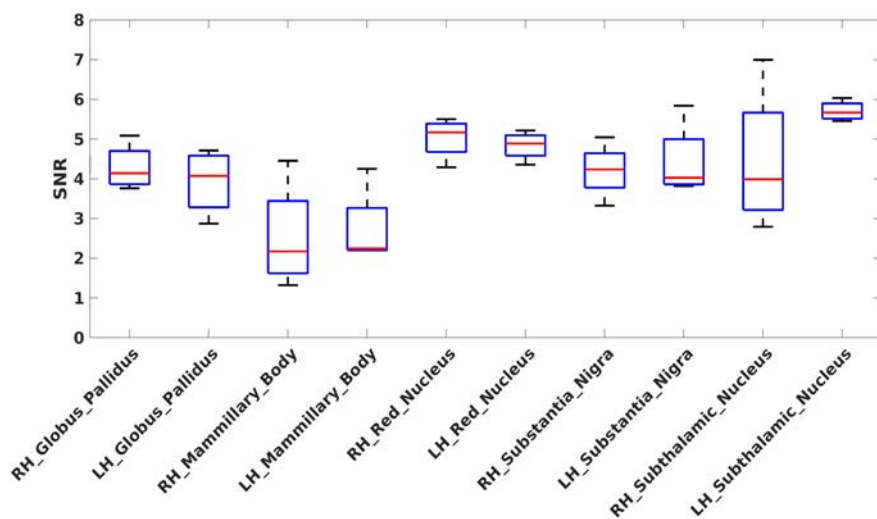


(b)

Figura 4.13: CNR delle aree cerebrali ottenute partizionando la SN, nelle sue componenti laterale, ventrale e mediale mediante l'atlante proposto da Zhang e collaboratori [17], per la sequenza MT-TFE scelta e quella in uso presso la struttura ospedaliera ospitante: (a) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (b) protocollo FFE per la NM

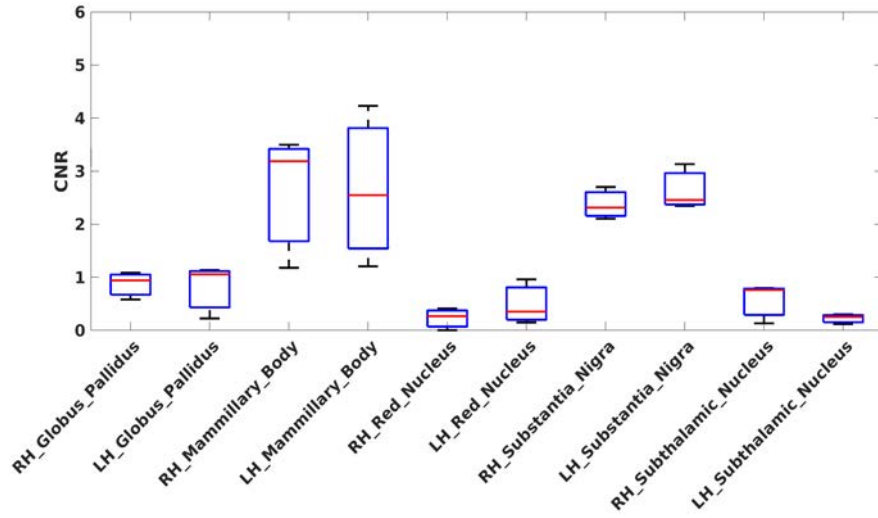


(a)

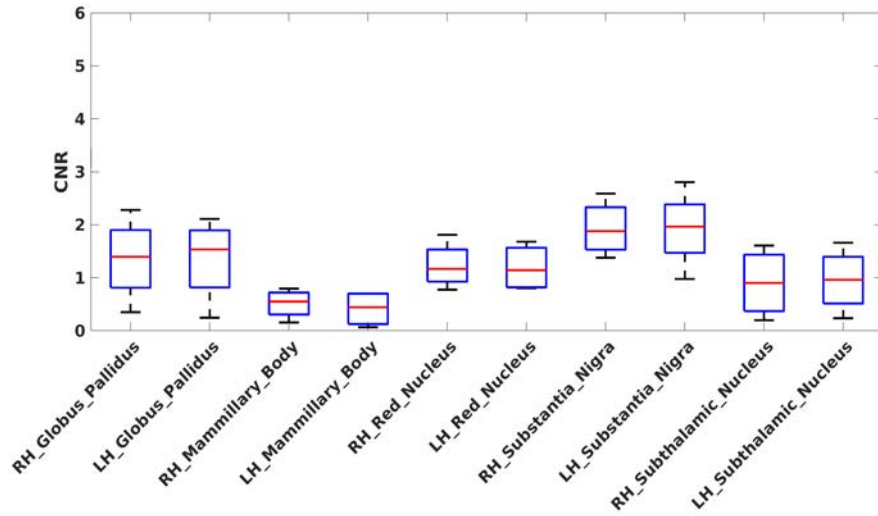


(b)

Figura 4.14: SNR delle aree cerebrali ottenute partizionando il mesencefalo, nelle aree relative a Globo Pallido, Corpi Mammillari, Nucleo Rosso, SN e Nucleo Subtalamico, mediante l'atlante proposto da Wang e collaboratori [18], per la sequenza MT-TFE scelta e quella in uso presso la struttura ospedaliera ospitante: (a) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (b) protocollo FFE per la NM



(a)



(b)

Figura 4.15: CNR delle aree cerebrali ottenute partizionando il mesencefalo, nelle aree relative a Globo Pallido, Corpi Mammillari, Nucleo Rosso, SN e Nucleo Subtalamico, mediante l'atlante proposto da Wang e collaboratori [18], per la sequenza MT-TFE scelta e quella in uso presso la struttura ospedaliera ospitante: (a) MT-TFE 0.6 x 0.6 x 2.5 mm; (b) protocollo FFE per la NM

Capitolo 5

Conclusioni

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di determinare in che modo sequenze con una preparazione MT esplicita, potessero condurre ad un miglioramento del segnale correlato alla NM, inducendo un aumento del contrasto legato a tale pigmento nell'imaging NM-MRI.

Studi precedenti hanno infatti dimostrato come, sequenze caratterizzate da una fase di pre-saturazione MT, ottenuta mediante l'applicazione di impulsi a RF off-resonance, inducessero ad un aumento del contrasto in zone ricche di NM, rispetto a quanto conseguibile con le sequenze convenzionali.

Sulla base di queste considerazioni e dall'analisi dei lavori proposti da Prouvoulos et al. [2] e da Mougin et al. [4], sono state ottimizzate tre sequenze di tipo MT-TFE, caratterizzate da diversa risoluzione, al fine di valutare come effetti di *Magnetization Transfer* potessero contribuire, su strumentazione Philips a 3 Tesla, ad aumentare il contrasto dovuto alla NM.

Dall'ispezione visiva delle immagini ottenute con le sequenze MT-TFE proposte, emerge un effettivo incremento nella possibilità di delineare le regioni contenenti NM della SNC, soprattutto in confronto a quanto viene prodotto con il protocollo FFE attualmente in uso presso la struttura ospedaliera San Camillo/IRCCS. L'analisi quantitativa successivamente eseguita, tramite il calcolo di SNR e CNR, ha, inoltre, permesso di determinare quale delle tre sequenze MT messe a punto, consentisse di ottenere risultati più significativi; la scelta si è quindi orientata sulla sequenza MT-TFE con risoluzione $0.6 \times 0.6 \times 2.5$ mm, in quanto, con essa, è emersa una maggiore possibilità di riprodurre, con precisione, i risultati conseguiti, riducendo, inoltre, il rischio di introdurre artefatti nelle acquisizioni.

L'analisi comparativa delle performance di tale sequenza, con il protocollo FFE per la NM, ha infine stabilito, sia in termini di SNR che di CNR,

prestazioni migliori perseguibili con un'opportuna pre-saturazione MT.

I risultati di questo studio, sebbene vincolati dall'esiguo pool di soggetti esaminati, evidenziano come, sequenze caratterizzate da una preparazione MT esplicita, permettano di ottenere immagini ad elevata risoluzione delle strutture anatomiche associate alla NM, ponendo questa metodica in una posizione privilegiata nello studio della patogenesi del Parkinson.

Il presente lavoro di tesi si pone, quindi, come punto di partenza per lo sviluppo di un protocollo che possa essere utilizzato, in ambito clinico, per la diagnosi e valutazione dell'evoluzione della malattia.

Bibliografia

- [1] Nicola Pavese and Yen F. Tai, *Nigrosome Imaging and Neuromelanin Sensitive MRI in Diagnostic Evaluation of Parkinsonism*, Movement Disorders Clinical Practice, vol. 5, no. 2, pp. 131-140, Feb. 2018.
- [2] Nikos Priovoulos, Heidi I.L. Jacobs, Dimo Ivanov, Kâmil Uludağ, Frans R.J. Verhey and Benedikt A. Poser, *High-resolution in vivo imaging of human locus coeruleus by magnetization transfer MRI at 3T and 7T*, NeuroImage, vol. 168, pp. 427-436, March 2018.
- [3] David Sulzer, Clifford Cassidy, Guillermo Horga, Un Jung Kang, Stanley Fahn, Luigi Casella, Gianni Pezzoli, Jason Langley, Xiaoping P. Hu, Fabio A. Zucca, Ioannis U. Isaias and Luigi Zecca, *Neuromelanin detection by magnetic resonance imaging (MRI) and its promise as a biomarker for Parkinson's disease*, npj Parkinson's Disease, vol. 4, no. 11, pp. 1-11, April 2018.
- [4] Olivier Mougin, Matthew Clemence, Andrew Peters, Alain Pitiot and Penny Gowland, *High-resolution imaging of magnetisation transfer and nuclear Overhauser effect in the human visual cortex at 7 T*, NMR in Biomedicine, vol. 26, no. 11, pp. 1508-1517, Nov. 2013.
- [5] Paula Trujillo, Paul E. Summers, Emanuele Ferrari, Fabio A. Zucca, Michela Sturini, Luca T. Mainardi, Sergio Cerutti, Alex K. Smith, Seth A. Smith, Luigi Zecca and Antonella Costa, *Contrast Mechanisms Associated With Neuromelanin-MRI*, Magnetic Resonance in Medicine, vol. 78, no. 5, pp. 1790-1800, Dec. 2016.
- [6] Matt A. Bernstein, Kevin F. King and Xiaohong Joe Zhou, *Handbook of MRI Pulse Sequences*, Elsevier Academic Press, vol. 32, no. 5, pp. 37-42 and 103-114, 2004.
- [7] A. Ramani, C. Dalton, D.H. Miller, P.S. Tofts and G.J. Barker, *Precise estimate of fundamental in-vivo MT parameters in human brain in*

- clinically feasible times*, Magnetic Resonance Imaging, vol. 20, no. 10, pp. 721-731, Dec. 2002.
- [8] R. M. Henkelman, G. J. Stanisz and S. J. Graham, *Magnetization transfer in MRI: a review*, NMR in Biomedicine, vol. 14, no. 2, pp. 57-64, April 2001.
- [9] Stéphane Lehericy, Eric Bardinet, Cyril Poupon, Marie Vidailhet and Chantal François *7 Tesla Magnetic Resonance Imaging: A Closer Look at Substantia Nigra Anatomy in Parkinson's Disease*, Movement Disorders, vol. 29, no. 13, pp. 1574-1581, Oct. 2014.
- [10] S. J. Graham and R. M. Henkelman, *Understanding Pulsed Magnetization Transfer*, Journal of Magnetic Resonance Imaging, vol. 7, no. 5, pp. 903-912, Jan. 1997.
- [11] Kenichi Kashihara, Takayoshi Shinya and Fumiyo Higaki, *Neuromelanin magnetic resonance imaging of nigral volume loss in patients with Parkinson's disease*, Journal of Clinical Neuroscience, vol. 18, no. 8, pp. 1093-1906, Aug. 2011.
- [12] Gabriel Castellanos, María A. Fernández, Oswaldo Lorenzo-Betancor, Sara Ortega-Cubero, Marc Puigvert, Javier Uranga, Marta Vidorreta, Jaione Irigoyen, Elena Lorenzo, Arrate Munoz-Barrutia, Carlos Ortiz-de-Solorzano, Pau Pastor and María A. Pastor, *Automated Neuromelanin Imaging as a Diagnostic Biomarker for Parkinson's Disease*, Movement Disorders, vol. 30, no. 7, pp. 945-952, March 2015.
- [13] S. Reimão, P. Pita Lobo, D. Neutel, L. Correia Guedes, M. Coelho, M. M. Rosa, J. Ferreira, D. Abreu, N. Gonçalves, C. Morgado, R. G. Nunes, J. Campos and J. J. Ferreira, *Substantia nigra neuromelanin magnetic resonance imaging in de novo Parkinson's disease patients*, european journal of neurology, vol. 22, no. 3, pp. 540-546, Dec. 2014.
- [14] Kimihiro Ogisu, Kohsuke Kudo, Makoto Sasaki, Ken Sakushima, Ichiro Yabe, Hidenao Sasaki, Satoshi Terae, Mitsuhiro Nakanishi and Hiroki Shirato, *3D neuromelanin-sensitive magnetic resonance imaging with semi-automated volume measurement of the substantia nigra pars compacta for diagnosis of Parkinson's disease*, Neuroradiology, vol. 55, no. 6, pp. 719-724, March 2013.

-
- [15] Xiangchuan Chen, Daniel E. Huddleston, Jason Langley, Sinyeob Ahn, Christopher J. Barnum, Stewart A. Factor, Allan I. Levey and Xiaoping Hu, *Simultaneous imaging of locus coeruleus and substantia nigra with a quantitative neuromelanin MRI approach*, Magnetic Resonance Imaging, vol. 32, no. 10, pp. 1301-1306, Dec. 2014.
- [16] Klodiana-Daphne Tona, Matthias J. P. van Osch, Sander Nieuwenhuis and Max C. Keuken, *Quantifying the contrast of the human locus coeruleus in vivo at 7 Tesla MRI*, PLoS One, vol. 14, no. 2, pp. 1-20, Feb. 2019.
- [17] Yu Zhang, Kevin Michel-Herve Larcher, Bratislav Misic and Alain Dagher, *Anatomical and functional organization of the human substantia nigra and its connections*, Elife, vol. 6, pp. 1-23, Aug. 2017.
- [18] Wang, Brian T. and Poirier, Stefan and Guo, Ting and Parrent, Andrew G. and Peters, Terry M. and Khan, R. Ali, *Generation and evaluation of an ultra-high-field atlas with applications in DBS planning*, Medical Imaging, vol. 9784, March 2016.
- [19] Jason Langley, Daniel E. Huddleston, Christine J Liu and Xiaoping Hu, *Reproducibility of locus coeruleus and substantia nigra imaging with neuromelanin sensitive MRI*, Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine, vol. 30, no. 2, pp. 121-125, April 2017.
- [20] V.S. Fonov, A.C. Evans, R.C. McKinstry, C.R. Almli and D.L. Collins, *Unbiased nonlinear average age-appropriate brain templates from birth to adulthood*, NeuroImage, vol. 47, no. 1, pp. S102, July 2009.
- [21] G. Grabner, A. L. Janke, M. M. Budge, D. Smith, J. Pruessner, and D. L. Collins, *Symmetric atlasing and model based segmentation: an application to the hippocampus in older adults*, MICCAI, vol. 9, pp. 58-66, 2006.
- [22] Mori, Susumu and Oishi, Kenichi and Jiang, Hangyi and Jiang, Li and Li, Xin and Akhter, Kazi and Hua, Kegang and Faria, Andreia V and Mahmood, Asif and Woods, Roger and others, *Stereotaxic white matter atlas based on diffusion tensor imaging in an ICBM template*, Neuroimage, vol.40, n. 2, pp. 570-582, 2008.
- [23] <https://github.com/rordenlab/dcm2niix/releases>, 2019.

- [24] <http://stnava.github.io/ANTs/>, 2011.
- [25] <https://git.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fsleyes/fsleyes/>, 2019.
- [26] <https://clinicalgate.com/basal-ganglia-5/>, 2015.
- [27] Matthew J. Betts, Arturo Cardenas-Blanco, Martin Kanowski and Frank Jessen, *In vivo MRI assessment of the human locus coeruleus along its rostrocaudal extent in young and older adults*, Neuroimage, vol.163, pp. 150-159, Dec 2017.
- [28] J. Doshi, G. Erus, Y. Ou, B. Gaonkar and C. Davatzikos, *Multi-atlas skull-stripping*, Academic Radiology, vol. 20, n. 12, pp. 1566–1576, Dec 2013.
- [29] <https://www.med.upenn.edu/sbia/mass.html/>, 2018.