



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea Magistrale in Bioingegneria

**Stima e valutazione
degli indici di diffusione da immagini DTI
per lo studio di pazienti bipolari**

RELATORE

Ch.ma Prof.ssa Alessandra Bertoldo

CORRELATORE

Dott. Ing. Letizia Squarcina

LAUREANDA

Francesca Zappelli

Matr. N. 626068

Anno Accademico 2011/2012

*Dedicato a
mio padre e a Nicola,
con grandissimo affetto
e riconoscenza.*

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Potenzialità dell'analisi MR di diffusione (DTI)	2
1.2	Sindrome Bipolare	2
2	Metodologia	5
2.1	Diffusion Tensor Imaging: fondamentali	5
2.1.1	Diffusione molecolare	7
2.1.2	Il segnale MRI di diffusione	9
2.1.3	Diffusion-Weighted Imaging (DWI)	12
2.1.4	DTI: estrazione del tensore di diffusione	14
2.1.5	Indici di diffusione	15
2.2	Analisi multi-soggetto di dati di diffusione	18
2.2.1	Voxel-Based Morfometry (VBM)	18
2.2.2	Tract-Based Spacial Statistics (TBSS)	19
2.3	Fiber tracking	25
2.3.1	Trattografia deterministica	27
2.3.2	Trattografia probabilistica	27
3	Dati sperimentali	29
3.1	Il dataset	29
3.2	Preprocessing e quantificazione	29
4	Risultati	33
4.1	Analisi statistica TBSS	34
4.1.1	Metodo	34
4.1.2	Risultati dei test statistici	35
4.2	Analisi trattografica	47
4.2.1	Metodo	47
4.2.2	Risultati dell'analisi trattografica	48

5	Discussione	51
5.1	Caratterizzazione delle alterazioni	51
5.2	Analisi topologica delle alterazioni	52
5.3	Validità dell'approccio sperimentale	56
6	Conclusioni	59
	Ringraziamenti	65

Elenco delle figure

2.1	<i>Schema della fibra neuronale e andamento qualitativo della diffusione. Nell'immagine di sinistra si rappresenta schematicamente la struttura del fascio di fibre che costituisce l'assone e la guaina mielinica di rivestimento, nonché le diverse componenti del processo diffusivo: $D \perp$ la componente ortogonale al piano della fibra e $D \parallel$ la componente lungo l'asse della fibra. Tale componenti vengono poi riportate rispettivamente in verde e in rosso nell'immagine di destra, dove viene sottolineato che il processo diffusivo interessa anche l'ambiente al di fuori dell'assone. [12][13]</i>	6
2.2	<i>Rappresentazione 2D esemplificativa della diffusione isotropa. A partire da sinistra: dettaglio di un'immagine DWI dove il comportamento diffusivo non permette di individuare delle direzioni preferenziali sul piano xy, ossia le particelle si muovono in una regione descritta da una cerchio. [15]</i>	8
2.3	<i>Rappresentazione esemplificativa 2D della diffusione anisotropa. Nel caso di fasci di fibre propri della materia bianca il moto delle particelle viene confinato dalle barriere fisiologiche individuando una direzione preferenziale sul piano xy, condizione descritta da un'ellisse. [15]</i>	9
2.4	<i>Rappresentazione schematica della sequenza di acquisizione di Stejskal-Tanner. Nella parte superiore è rappresentato il comportamento gli spin ai vari step della sequenza: l'applicazione prima di un impulso a 90° e successivamente di un impulso a 180° applicato a metà del tempo di echo TE, fanno sì che gli spin vengano proiettati sul piano ortogonale al vettore magnetizzazione residua M, invertiti di segno e al termine dell'applicazione di B_0, generino il segnale di echo. Nella parte centrale si rappresenta come l'azione dell'impulso a 180° permetta di amplificare il segnale grazie all'applicazione di gradienti di campo magnetico di durata δ, intensità G e applicati ad un intervallo Δ, visualizzati nella parte inferiore. [19]</i>	11

2.5	<i>Schema semplificato della sequenza Stejskal-Tanner: effetti sugli spin.</i> [28]	12
2.6	<i>Rette ottenute da acquisizioni per diversi b-value. L'inclinazione di tali rette darà il valore di D.</i> [28]	13
2.7	<i>Confronto fra sfera di diffusione ed ellissoide di diffusione. Gli autovalori $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ del tensore di diffusione permettono di caratterizzare dal punto di vista matematico le condizioni di isotropia e anisotropia: A) nel caso di uguaglianza dei tre autovalori il processo diffusivo non ha direzioni preferenziali ed è rappresentato dalla sfera di diffusione, B) nel caso in cui vi siano delle disuguaglianze fra gli autovalori si individua una direzione preferenziale data dall'autovalore principale λ_1, in C) si rappresenta il caso di anisotropia che si presenta nelle fibre cerebrali dove l'entità del processo diffusivo lungo la direzione della fibra, in direzione λ_1, è ben superiore rispetto al valore degli autovalori secondari.</i> [28]	16
2.8	<i>Valori di FA secondo diversi gradi di anisotropia.</i> [25]	17
2.9	<i>Principali tipologie anatomiche delle fibre cerebrali. Si mostra come alcune regioni della materia bianca (nell'immagine a sinistra il genu del corpo calloso, capsula esterna e braccio posteriore della capsula interna) presentino struttura a piano di un certo spessore, mentre altre regioni (nell'immagine di destra il fascio cingolato inferiore) presentino struttura tubulare.</i> [25]	21
2.10	<i>Dettaglio sulla determinazione della direzione perpendicolare al tratto.</i> [26]	22
2.11	<i>Generazione delle immagini scheletro per i diversi soggetti.</i> [25]	23
2.12	<i>Mappe di distanza (in rosso le zone più prossime allo scheletro).</i> [26]	24
2.13	<i>Rendering 3D dello scheletro di FA medio per lo studio su soggetti affetti da sclerosi multipla: in blu le aree di lesione sogliate al 20% sulla distribuzione di probabilità. In rosso dove FA è correlato negativamente con il volume totale di lesione dei soggetti, a indicare che vi sono alterazioni di FA anche dove le fibre sembrano apparentemente integre.</i> [26]	26
2.14	<i>Confronto fra trattografia deterministica e trattografia probabilistica. La prima genera linee continue corrispondenti ai fasci di fibre, la seconda genera una mappa di probabilità di localizzazione dei fasci.</i> [25]	28
3.1	<i>Immagini esemplificative degli artefatti dovuti a eddy currents: in alto a destra contrazione, in basso a sinistra shift e in basso a destra shear.</i> [35]	30

- 3.2 *Preprocessing dei dati: correzione per eddy currents e artefatti da movimento. In evidenza le zone di iperintensità, in particolare quelle più interne che possono dar luogo ad erronea ricostruzione delle fibre.*[36] 31
- 4.1 *Screenshot di fslview relativi alle posizioni individuate rispettivamente dalle seguenti coordinate anatomiche $(x,y,z)=(73,66,72)$, $(100,66,95)$, $(37,98,80)$. In rosso le aree dove variano simultaneamente tutti gli indici e in verde lo scheletro di FA medio. Le frecce in rosso evidenziano le zone dove variano singolarmente gli indici: in blu il solo indice MD, in giallo solo FA, in azzurro solo RD. L'atlante stereotassico di riferimento è il MNI152 T1 con risoluzione di 1 mm, il medesimo utilizzato nella registrazione non lineare della procedura TBSS.* 39
- 4.2 *Aree di alterazione degli indici fra i gruppi con introduzione delle covariate di età e sesso relative alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(83,115,83)$, vista sagittale. Le ROI sono visualizzate secondo lo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels. In rosso le aree alterate e in verde lo scheletro di FA medio. Legenda:1. Splenium del corpo calloso, 2. Corpo calloso, 3. Genu del corpo calloso.* 42
- 4.3 *Aree di alterazione degli indici fra i gruppi con introduzione delle covariate di età e sesso relative alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(83,115,83)$, vista frontale. Le ROI sono visualizzate secondo lo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels. In rosso le aree alterate e in verde lo scheletro di FA medio. Legenda: 1. fascicolo longitudinale superiore R, 2. corona radiata superiore R, 3. tronco del corpo calloso, 4. corona radiata superiore L, 5. fascicolo longitudinale superiore L, 6. capsula esterna L, 7. braccio posteriore della capsula interna L, 7. parte retrolenticolare della capsula interna L, 8. penducolo cerebrale R, 9. penducolo cerebrale L, 10. braccio posteriore della capsula interna R, 11. capsula esterna R.* 43

- 4.4 *Aree di alterazione degli indici fra i gruppi con introduzione delle covariate di età e sesso relative alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(83,115,83)$, vista trasversale. Le ROI sono visualizzate secondo lo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels. In rosso le aree alterate e in verde lo scheletro di FA medio. Legenda: 1. capsula esterna R, 2. braccio anteriore della capsula interna R, 3. corona radiata anteriore R, 4. genu del corpo calloso, 5. corona radiata anteriore L, 6. braccio anteriore della capsula interna L, 7. capsula esterna L, 8. braccio posteriore della capsula interna L, 9. parte retrolenticolare della capsula interna L, 10. splenio del corpo calloso, 11. radiazione talamica posteriore R, 12. fascicolo longitudinale superiore R, 13. braccio posteriore della capsula interna R. 44*
- 4.5 *Screenshot relativo alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(58,117,84)$. In rosso le aree di correlazione con l'età per tutti gli indici, in blu per il solo indice di Mean Diffusivity, il giallo per Fractional Anisotropy e in magenta Radial Diffusivity. 46*
- 4.6 *Viste rispettivamente della ricostruzione con trattografia probabilistica di genu e di corona radiata anteriore sinistrae sogliate al 2.5% sui massimi relativi. In rosso le rispettive maschere delle ROI di partenza. 49*
- 4.7 *Ricostruzione 3D della trattografia probabilistica delle ROI sotto esame: a sinistra corona radiata anteriore sinistra e a destra il genu del corpo calloso. 49*

Elenco delle tabelle

3.1	Descrizione del dataset.	29
4.1	<i>Impostazione dei valori e delle opzioni per analisi TBSS.</i>	34
4.2	<i>Conteggi voxel attivi al test statistico: aree significativamente diverse fra controlli e bipolari per i diversi indici e per le aree intersezione dei 5 indici. I simboli ↑ e ↓ indicano rispettivamente aumento e calo dell'indice da controlli a bipolari.</i>	36
4.3	<i>Indici di correlazione di Pearson e relativi valori medi di (1-p).</i>	37
4.4	<i>Conteggi di FA, MD, RD e area intersezione degli indici normalizzati secondo l'area dello scheletro di FA medio con relativi valori di p-value medi. I simboli ↑ e ↓ indicano rispettivamente aumento e calo dell'indice da controlli a bipolari.</i>	38
4.5	<i>Analisi statistica con covariate di età e sesso. Conteggi di FA, MD, RD e area intersezione degli indici normalizzati secondo l'area dello scheletro di FA medio e relativi valori di p-value medi. I simboli ↑ e ↓ indicano rispettivamente aumento e calo dell'indice da controlli a bipolari.</i>	40
4.6	<i>Tabella con indice di individuazione delle ROI con relativo nominativo nello standard JHU ICBM-DTI-81 White Matter Labels, conteggi dei pixel relativi allo scheletro di FA medio, conteggi dei pixel di alterazione degli indici e percentuale dell'alterazione delle singole ROI ordinate in modo decrescente.* Conteggi di scheletro di FA medio per una data ROI.</i>	41
4.7	<i>Alterazioni ROI-based dei singoli indici. * Conteggi di scheletro di FA medio per una data ROI.</i>	42
4.8	<i>Conteggi a diversi livelli di significatività delle correlazioni fra età ed alterazioni dei singoli indici. * normalizzazione secondo scheletro di FA medio.</i>	45

4.9	<i>Conteggi dei pixel per ROI dove si ha maggior percentuale di correlazione significativa fra età e alterazione dei singoli indici. * Conteggi di scheletro di FA medio per una data ROI. ** Conteggi dei pixel con risultati positivi al test di correlazione.</i>	46
4.10	<i>Dataset utilizzato per l'analisi trattografica.</i>	47
4.11	<i>Passaggi principali per trattografia probabilistica.</i>	48

Sommario

La tecnologia di risonanza magnetica di diffusione (DTI) è uno strumento importante nel campo dell'imaging della connettività strutturale della materia bianca. Il segnale misurato in DTI è sensibile alle proprietà diffusive dell'acqua che permea i tessuti da cui è possibile estrarre indici che quantificano il fenomeno diffusivo, il quale permette di fornire una misura indiretta dell'architettura cerebrale a livello microscopico. Numerosi studi MRI rilevano che in soggetti affetti da sindrome bipolare si presentano delle alterazioni nella struttura della materia bianca. La tecnologia DTI pertanto può permettere di indagare se e dove si trovino tali alterazioni e in base al comportamento degli indici di diffusione, fornire informazioni circa il tipo di alterazione che interessa la materia bianca. In questa tesi, a partire da un dataset di 35 soggetti sani e di 34 soggetti bipolari, si sono ottenuti gli indici di diffusione più rappresentativi studiati in letteratura e si è operata una selezione degli indici maggiormente informativi per mezzo di studi di correlazione. Dopo aver determinato la combinazione ottima degli indici di diffusione, l'analisi statistica delle mappe parametriche relative a tali indici ha permesso di determinare dove questi presentassero differenze significative al confronto sani contro bipolari. In questo studio, condotto sia a livello dell'intero encefalo sia a livello delle singole regioni cerebrali, è emerso che le alterazioni interessano il processo diffusivo prevalentemente sul piano ortogonale alla direzione di propagazione della fibra. Una revisione dei risultati della letteratura scientifica ha permesso di associare tali alterazioni sia a processi di danneggiamento degli scudi mielinici di rivestimento delle fibre assoniche sia ad anomalie metaboliche e funzionali dell'assone. Individuate nelle regioni di genu e tronco del corpo calloso, corona radiata anteriore e fascicolo fronto-occipitale le aree maggiormente interessate ad alterazioni del processo diffusivo, è stato quindi possibile individuare nei soggetti patologici delle lesioni interemisferiche e intraemisferiche (fronto-occipitali), riconducibili alle alterazioni riscontrate nella sindrome bipolare.

Capitolo 1

Introduzione

Sin dai primi studi sperimentali le tecniche di risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI) si sono presentate ai neuroscienziati come valido strumento per l'analisi strutturale, biochimica e funzionale del cervello umano *in vivo*.

L'anatomia cerebrale si costituisce sostanzialmente in materia grigia (*grey matter*, GM) che si identifica nelle cellule neuronali, nelle cellule della glia e nei neuropili, ossia dendriti e assoni demielinati; e materia bianca (*white matter*, WM), che rappresenta le connessioni (assoni mielinati) di detti corpi cellulari. L'efficienza della conduzione dei segnali elettrici e degli stimoli cerebrali è intrinsecamente legata all'integrità strutturale della materia bianca. La WM in particolare costituisce il 40-50% del cervello umano adulto. A livello macroscopico, consiste in una rete fitamente avvolta di assoni che connettono le differenti regioni cerebrali [1]; a livello biochimico, la materia bianca è principalmente costituita da mielina, una guaina multilamellare di matrice proteica (30%) e lipidica (70%) che avvolge l'assone con lo scopo di preservare l'integrità del segnale neuronale. Sono presenti inoltre piccole regioni non avvolte dalla guaina mielinica, detti nodi di Ranvier, che mediano la corretta conduzione del segnale elettrico e incrementano la velocità di conduzione.

Studi neuropatologici hanno evidenziato come la materia bianca si sviluppi sino alla terza decade di vita, mentre altri lavori hanno vedono terminarne la crescita ai 20 anni [2]. L'analisi di risonanza magnetica *in vivo* ha inoltre permesso di osservare come la materia bianca aumenti il proprio volume nei lobi temporale e frontale sino ai quarant'anni d'età per poi diminuire costantemente [3]. In particolare si è scoperto una riduzione del 28% del volume della WM in funzione dell'età [4]. Una nota curiosa viene evidenziata da un studio sui musicisti di piano, per i quali la pratica aveva indotto plasticità già in giovane età quando i fasci di fibre sono ancora in fase di maturazione [5].

Il progredire delle più avanzate tecniche MRI ha permesso di studiare le alterazioni della WM in molti disturbi neurologici e psichiatrici. Fra queste tecnologie si è imposta la Diffusion Tensor Imaging (DTI), una tecnica *in vivo* non invasiva per

l'imaging cerebrale che ha fornito risultati importanti per lo studio della sindrome bipolare, della schizofrenia e di altri disturbi del comportamento, nonché varie forme di demenza come l'Alzheimer o il Mild Cognitive Impairment. Importanti sono anche le applicazioni della DTI nello studio dei danni indotti dall'abuso di alcol e della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) [6].

1.1 Potenzialità dell'analisi MR di diffusione (DTI)

La Diffusion Tensor Imaging è una tecnica molto promettente che ha rivoluzionato il campo della mappatura e della caratterizzazione funzionale della materia bianca, permettendone la visualizzazione e la caratterizzazione strutturale. La tecnica DTI venne introdotta in letteratura nel 1994 [7] e già al termine degli anni Novanta poteva contare più di 700 pubblicazioni [8]. Il successo di tale tecnologia è strettamente legato al tipo di segnale che si viene a misurare: sfruttando il fatto che le tecnologie MR sono sensibili agli spostamenti dei protoni dell'acqua (la quale costituisce mediamente il 65% dei tessuti corporei) e progettando opportune sequenze di acquisizione diventa possibile rilevare l'entità dei processi diffusivi che avvengono nei tessuti, misura direttamente legata alla struttura microscopica del tessuto stesso. I vantaggi di tale approccio sono evidenti: la DTI permette di visualizzare l'anatomia della materia bianca con buona risoluzione, aspetto che la pone in vantaggio rispetto alla MRI convenzionale dove rimarrebbe indistinguibile; è un approccio non-invasivo e inoltre permette la visualizzazione *in vivo* dei tessuti permettendo così di studiare la funzionalità e la morfologia cerebrale che non si potrebbero indagare in studi post-mortem. Inoltre risulta essere una tecnica *whole-brain*, permettendo quindi un'indagine dell'intero volume encefalico, a differenza di studi con tracciante. L'informazione relativa all'integrità e funzionalità dei tessuti può pertanto essere utilizzata sia per fornire informazioni sull'anatomia cerebrale, anche in funzione di diverse variabili quali età e sesso, sia per essere valido supporto per studi comparativi finalizzati alla determinazione delle alterazioni fra soggetti sani e soggetti patologici considerando anche la possibilità di testare gli effetti di trattamenti farmacologici.

1.2 Sindrome Bipolare

La Sindrome Bipolare (*Bipolar Disorder*, BD), o malattia maniaco-depressiva, è un disturbo che rientra nella famiglia delle patologie psicotiche, le quali costituiscono la maggior parte della totalità dei disturbi mentali, con un'incidenza sulla popolazione dell'1-3%.

Il disturbo bipolare raccoglie diversi quadri clinici aventi come comun denominatore l'alternanza di fasi depressive e maniacali che vanno ad alterare significativa-

mente l'equilibrio timico (alterazione dell'umore). Sintomi comuni sono disturbi dell'affettività, instabilità percettiva, disturbi del comportamento (agitazione, ritardo psicomotorio, afonia), alterazioni cognitive (scarsa attenzione, capacità di giudizio), disturbi del pensiero (megalomania, balbuzie) e altri disturbi che coinvolgono il sonno e l'appetito [9].

L'imaging di risonanza magnetica ha permesso di fornire valide informazioni circa le alterazioni neuroanatomiche in soggetti bipolari: i risultati della MRI strutturale e funzionale suggeriscono che alla base delle alterazioni dell'umore vi siano lesioni dei circuiti frontocorticale, striatale e talamico, che si ripercuoterebbero sui relativi circuiti dei neurotrasmettitori [9]. Tali pathway si situano nella materia bianca profonda e costituiscono il collegamento fra le regioni corticali e i gangli basali, pertanto una loro alterazione può provocare conduzione anomala dei segnali cerebrali. A livello microscopico, si individuano variazioni nella densità dei gangli stessi, a confermare una riduzione in efficienza di tali strutture nervose, e alterazioni neuronali nella corteccia cingolata prefrontale e anteriore, situata nel lobo frontale sopra il corpo calloso. Sino a metà degli anni Novanta, ossia prima dell'avvento della tecnica DTI, la maggior parte della ricerca strutturale veniva condotta a livello della materia grigia. Era quindi necessario chiarire il ruolo dei tratti di fibre che connettevano le regioni corticali e subcorticali, e in particolare le iperintensità della materia bianca rilevate con imaging T2-weighted e presenti in molti studi. Dupont e colleghi descrissero tali fenomeni che si presentavano nella materia bianca profonda come associati ad un numero crescente di ospedalizzazioni [10]. Da allora molti studiosi hanno iniziato ad indagare tali alterazioni della materia bianca individuando come regione critica il lobo frontale [11], sede dello sviluppo del pensiero astratto e dell'attenzione. Si è inoltre osservato che le lesioni si localizzano prevalentemente a livello della materia bianca. Tuttavia queste lesioni non sono patologia-specifiche pertanto non esiste tuttora un marker specifico per la sindrome bipolare. Risulta quindi evidente come l'ambito di ricerca sia ancora aperto e come sia necessaria l'adozione di tecniche di risonanza magnetica di diffusione per la corretta caratterizzazione neurostrutturale e neurofunzionale di tale disturbo.

Capitolo 2

Metodologia

2.1 Diffusion Tensor Imaging: fondamenti

Gli stimoli cerebrali vengono veicolati all'interno dell'encefalo dalla materia bianca, costituita per la maggior parte di una fitta rete di fibre assoniche che collega i diversi corpi neuronali. La morfologia di tali connessioni, già vista nell'Introduzione, può essere indagata con elevata risoluzione (maggiore di quella che si otterrebbe con altre tecnologie MRI) dall'imaging di diffusione. Infatti per le strutture proprie della materia bianca si verifica un aumento dell'intensità del processo diffusivo lungo la direzione della fibra neurale, mentre questo si riduce nelle direzioni perpendicolari alla direzione della fibra stessa [12]. Per una visione esemplificativa del processo diffusivo nella fibra neurale vedi Figura 2.1.

L'entità del fenomeno diffusivo proprio delle fibre neurali viene caratterizzata numericamente nell'imaging di diffusione, determinando per ogni voxel il cosiddetto *ellissoide di diffusione*, descritto matematicamente da un tensore di diffusione. I limiti di questa tecnologia sono legati sostanzialmente al grado di risoluzione raggiungibile, ossia dalle dimensioni dei singoli voxel. Se infatti la dimensione di un voxel è di $2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ i fenomeni diffusivi si realizzano in spostamenti dell'ordine dei micron (il diametro di una fibra è di circa $1\text{-}3 \mu\text{m}$), pertanto l'informazione estratta è relativa ad un orientamento medio delle fibre [16].

A partire dalla conoscenza del tensore di diffusione per ogni voxel è possibile ricavare gli indici di diffusione, introdotti nel dettaglio in 2.1.5, che quantificano maggiormente il tipo di processo diffusivo che interessa le varie regioni cerebrali, fornendo informazioni importanti sulla morfologia e fisiologia neuronale. Dopo l'ottenimento delle mappe dei parametri di diffusione, il passo successivo è il confronto di tali dati fra soggetti diversi (opportunamente normalizzati secondo un atlante stereotassico unificato), al fine di delineare al meglio la microstruttura cerebrale. Questo passaggio si presenta però di cruciale importanza qualora si effettuino con-

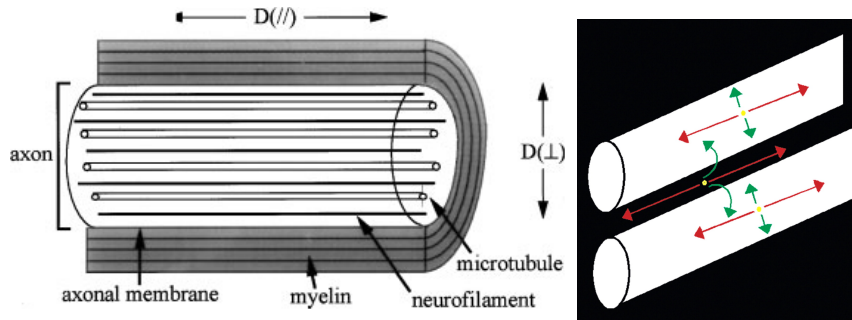


Figura 2.1: *Schema della fibra neuronale e andamento qualitativo della diffusione. Nell'immagine di sinistra si rappresenta schematicamente la struttura del fascio di fibre che costituisce l'assone e la guaina mielinica di rivestimento, nonché le diverse componenti del processo diffusivo: $D \perp$ la componente ortogonale al piano della fibra e $D \parallel$ la componente lungo l'asse della fibra. Tale componenti vengono poi riportate rispettivamente in verde e in rosso nell'immagine di destra, dove viene sottolineato che il processo diffusivo interessa anche l'ambiente al di fuori dell'assone. [12][13]*

fronti fra soggetti sani e soggetti patologici: in questo caso identificare le zone dove si verificano variazioni degli indici di diffusione si traduce nell'individuazione delle zone legate a fenomeni di alterazione dell'integrità e della funzionalità dei tessuti. La rappresentazione 3D della struttura delle fibre cerebrali diventa possibile con tecniche di trattografia: le problematiche che vanno affrontate in questo caso sono legate all'architettura particolarmente complessa del network cerebrale: infatti di fasci di fibre con diverse orientazioni anche all'interno del singolo voxel possono non essere correttamente identificate e rappresentate.

In questo capitolo, dopo una rapida trattazione sulla fisica del moto di diffusione, viene presentata anche la descrizione dei processi diffusivi che si verificano nella materia grigia e nel fluido cerebro spinale (diffusione isotropa) come condizione particolare e semplificata del processo diffusivo, da cui poi si generalizzerà analizzando la diffusione che caratterizza la materia bianca (diffusione anisotropa). L'imaging che permette di identificare il primo fenomeno viene definito Diffusion Weighted Imaging (DWI) mentre per la individuare anche comportamenti anisotropici è necessario ricorrere alla Diffusion Tensor Imaging (DTI). Successivamente, si introduce brevemente l'analisi multi-soggetto e all'approccio Voxel-Based Morphometry (VBM) e si procede presentando la Tract-Based Spatial Statistics, strumento che permette l'analisi voxel-by-voxel, con ottime prestazioni in termini di corretto allineamento fra i singoli soggetti e minimizzazione della perdita di informazione dai dati originali. Il capitolo termina con una breve trattazione sulle diverse tecniche di trattografia.

2.1.1 Diffusione molecolare

La diffusione molecolare è un fenomeno legato al movimento di traslazione termico delle molecole in sospensione in un fluido. La scoperta di tale fenomeno fisico venne associata a Robert Brown, da cui prende il nome di moto browniano nel 1828 [14]. La formulazione matematica applicata alla teoria cinetica venne esposta nel 1905 da Albert Einstein

$$\langle r^2 \rangle = 2 \cdot D \cdot T_D \quad (2.1)$$

dove $\langle r^2 \rangle$ rappresenta la distanza media di diffusione (mm), direttamente proporzionale al tempo di diffusione T_D (s) e al coefficiente di diffusione D (mm²/s), a sua volta definito secondo la relazione di Stokes-Einstein che valuta il caso di una particella sferica immersa in un fluido viscoso

$$D = \mu \cdot k_B \cdot T = \frac{k_B}{6\pi r_P \eta} \cdot T \quad (2.2)$$

dove μ è la mobilità della particella inversamente proporzionale al raggio della particella r_P e alla viscosità del mezzo, k_B la costante di Boltzmann e T la temperatura assoluta. Il valore del coefficiente di diffusione dell'acqua libera alla temperatura di 37°C è pari a $3 \cdot 10^{-9} m^2 s^{-1}$ tuttavia tale valore diminuisce nei tessuti a causa delle barriere fisiologiche presenti, come le membrane cellulari e le fibre stesse, le quali diminuiscono la mobilità delle molecole. Risulta quindi evidente come il coefficiente di diffusione sia legato all'integrità e alla funzionalità stessa dei tessuti, permettendo di individuare possibili alterazioni patologiche.

Diffusione isotropa

Assumendo che le molecole d'acqua possano diffondere senza ostacoli, esse si muoveranno secondo una distribuzione di probabilità associata a massima entropia, ossia di carattere gaussiano, che nel caso monodimensionale (per esempio lungo l'asse x) ha la seguente formulazione

$$P(x, t) = \frac{1}{\langle r^2 \rangle \sqrt{2\pi}} e^{-x^2/2\langle r^2 \rangle} = \frac{1}{\sqrt{4\pi \cdot D \cdot t}} e^{-x^2/4 \cdot D \cdot t} \quad (2.3)$$

dove nel secondo passaggio si è applicata la legge di Einstein per identificare lo spostamento della particella. Estendendo poi al caso tridimensionale, la distribuzione assume la forma

$$P(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{(4\pi \cdot D \cdot t)^3}} e^{-\mathbf{r}^T \cdot \mathbf{r} / 4 \cdot D \cdot t} = \frac{1}{\sqrt{(4\pi \cdot D \cdot t)^3}} e^{-\frac{x^2+y^2+z^2}{4 \cdot D \cdot t}} \quad (2.4)$$

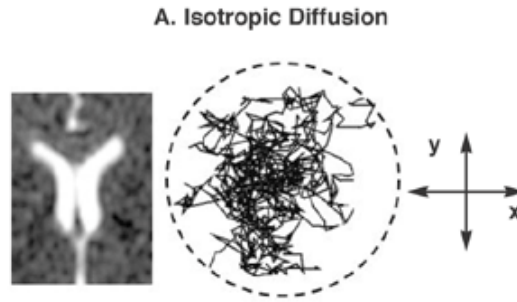


Figura 2.2: *Rappresentazione 2D esemplificativa della diffusione isotropa. A partire da sinistra: dettaglio di un'immagine DWI dove il comportamento diffusivo non permette di individuare delle direzioni preferenziali sul piano xy , ossia le particelle si muovono in una regione descritta da una cerchio.* [15]

La superficie individuata da tale distribuzione viene detta *sfera di diffusione*, in particolare quando si verifica la condizione

$$x^2 + y^2 + z^2 = (\sqrt{2 \cdot D \cdot t})^2 \quad (2.5)$$

il raggio della sfera è pari alla radice del raggio medio di diffusione individuato dalla legge di Einstein. Il moto della particella viene quindi caratterizzato compiutamente da un unico valore del coefficiente di diffusione D , uguale lungo le tre direzioni, ed è quindi impossibile identificare una direzione preferenziale (come mostrato in Figura 2.2). Come già osservato in precedenza, una condizione simile si verifica fisiologicamente nella materia grigia e nel fluido cerebrospinale.

Diffusione anisotropa

Se il moto diffusivo delle molecole si trova ad essere vincolato, la distribuzione delle molecole è determinata dal tipo di vincoli imposti dall'ambiente ed è quindi possibile riconoscere una direzione preferenziale di diffusione (e quindi un valore maggiore di D lungo questa direzione rispetto le altre, vedere Figura 2.3). In tal caso si parla di diffusione anisotropa ed è possibile osservare tale fenomeno prevalentemente lungo le connessioni assoniche che costituiscono la maggior parte della materia bianca. Per caratterizzare il moto diffusivo della particella ora non è più sufficiente la conoscenza di un unico valore di diffusività bensì si richiede il calcolo di un tensore di diffusione che rifletta l'andamento del coefficiente di diffusione nello spazio:

$$\mathbf{D} = \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix}$$

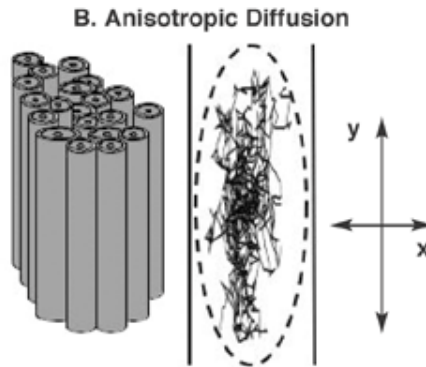


Figura 2.3: *Rappresentazione esemplificativa 2D della diffusione anisotropa. Nel caso di fasci di fibre propri della materia bianca il moto delle particelle viene confinato dalle barriere fisiologiche individuando una direzione preferenziale sul piano xy , condizione descritta da un'ellisse.* [15]

Tale tensore è simmetrico ossia si verifica che $D_{ij} = D_{ji}$ con $i \neq j$, aspetto molto importante che permette di determinare completamente il tensore attraverso la stima di sei parametri distinti anzichè nove. La distribuzione delle particelle diventa della forma

$$P(\mathbf{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{(4\pi \cdot |\mathbf{D}| \cdot t)^3}} e^{-\mathbf{r}^T \cdot \mathbf{D}^{-1} \cdot \mathbf{r} / 4t} \quad (2.6)$$

e identifica nello spazio una superficie che viene detta *ellissoide di diffusione*, avente come asse principale esattamente la direzione con coefficiente di diffusione maggiore.

2.1.2 Il segnale MRI di diffusione

La possibilità di misurare la diffusione era già stata "intuita" sin dai primi sviluppi della tecnologia MRI [16]: infatti già negli anni '50 si osservò come il moto di agitazione termica degli spin riducesse l'ampiezza del segnale spin-echo in presenza di disomogeneità di campo magnetico [17]. Successivamente Torrey [18], adattando le equazioni di Bloch, cercò di sfruttare questo fenomeno non come un potenziale artefatto bensì come l'oggetto di misura dell'esperimento. Nel 1965 Stejskal e Tanner [19] riuscirono a mettere a punto un esperimento (*Pulsed gradient spin echo experiment*, PGSE) che permise di effettuare le prime misure quantitative della diffusione molecolare.

Sequenza di acquisizione Stejskal-Tanner

La tecnologia MRI si basa sulle proprietà degli spin delle molecole d'acqua presenti nei tessuti di allinearsi ad un campo magnetico esterno B_0 , imposto costante e

di elevata intensità¹. Al termine dell'applicazione di tale campo i vettori magnetizzazione dei diversi spin si riportano alla condizione iniziale attraverso fenomeni di rilassamento e si misura il segnale di perdita di magnetizzazione residua (*Free Induction Decay*, FID). La sequenza di Stejskal-Tanner è una particolare sequenza spin-echo che consente di ottenere un segnale MRI legato al coefficiente di diffusione D . Il disegno sperimentale della sequenza spin-echo introdotta da Hahn prevede l'applicazione di due impulsi di radiofrequenza rispettivamente di 90° e 180° . Il primo impulso permette di orientare gli spin precedentemente allineati secondo il campo statico B_0 sul piano ortogonale alla direzione stessa del vettore magnetizzazione. Gli spin in questa condizione iniziano ad oscillare alla frequenza di Larmor e il vettore magnetizzazione si riporta alla condizione precedente l'applicazione dell'impulso a 90° attraverso perdita di magnetizzazione spin-spin secondo un tempo T_2 , detto di rilassamento trasversale. L'applicazione del secondo impulso a 180° permette di invertire il verso degli spin. Dopo un certo tempo detto tempo di echo TE, dell'ordine dei 10-100 ms, si misura il segnale MRI di perdita di magnetizzazione residua, vedere Figura 2.4. Per generare le disomogeneità che permettono di rilevare un segnale MRI sensibile al moto diffusivo delle molecole, si deve supporre l'applicazione di gradienti di intensità di campo (ossia impulsi di breve durata) da applicarsi prima e dopo l'impulso di radio frequenza a 180° (vedere Figura 2.4). L'applicazione di un impulso di gradiente di campo magnetico lungo un asse, ad esempio l'asse x, crea infatti uno sfasamento ϕ_i del momento magnetico μ associato allo spin, che è funzione della posizione x_i dello spin stesso lungo l'asse x. Lo sfasamento si quantifica secondo la formula

$$\phi_i = \int_0^\delta \gamma G x_i dt \quad (2.7)$$

dove G rappresenta l'intensità del gradiente applicato lungo la direzione x e δ la sua durata. Nel caso in cui lo spin sia stazionario lungo l'asse x, l'applicazione di due successivi impulsi di gradiente con stessa direzione ma verso opposto fa sì che lo sfasamento risultante sia nullo. Al contrario, se durante un intervallo di tempo Δt che intercorre tra i due impulsi lo spin ha subito fenomeni di moto diffusivo lungo l'asse x e si è quindi portato dalla posizione x_1 alla posizione x_2 , esso subisce uno sfasamento netto $\Delta\phi$ proporzionale alla distanza percorsa Δx secondo i seguenti passaggi

$$\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2 = \gamma\delta G x_1 - \gamma\delta G x_2 = \gamma\delta G \Delta x \quad (2.8)$$

Gli spin nucleari subiscono quindi una riduzione netta della magnetizzazione totale (vedi Figura 2.5). Se i nuclei non sono soggetti a movimenti diffusivi durante l'ap-

¹L'applicazione di tale campo statico, di elevata intensità (da 0.5 a 9 Tesla, per le tecnologie sperimentali di ricerca), è alla base di tutte le acquisizioni MRI.

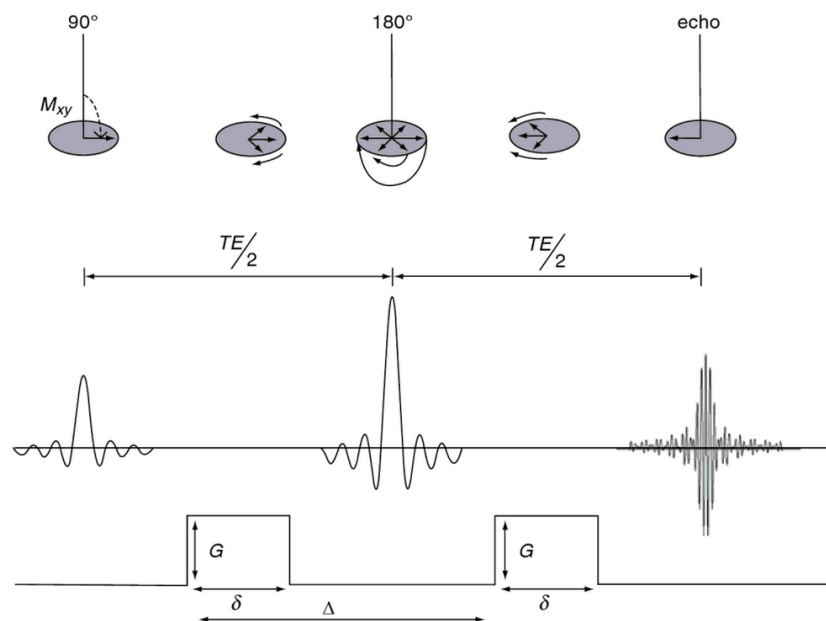


Figura 2.4: Rappresentazione schematica della sequenza di acquisizione di Stejskal-Tanner. Nella parte superiore è rappresentato il comportamento gli spin ai vari step della sequenza: l'applicazione prima di un impulso a 90° e successivamente di un impulso a 180° applicato a metà del tempo di echo TE , fanno sì che gli spin vengano proiettati sul piano ortogonale al vettore magnetizzazione residua M , invertiti di segno e al termine dell'applicazione di B_0 , generino il segnale di echo. Nella parte centrale si rappresenta come l'azione dell'impulso a 180° permetta di amplificare il segnale grazie all'applicazione di gradienti di campo magnetico di durata δ , intensità G e applicati ad un intervallo Δ , visualizzati nella parte inferiore. [19]

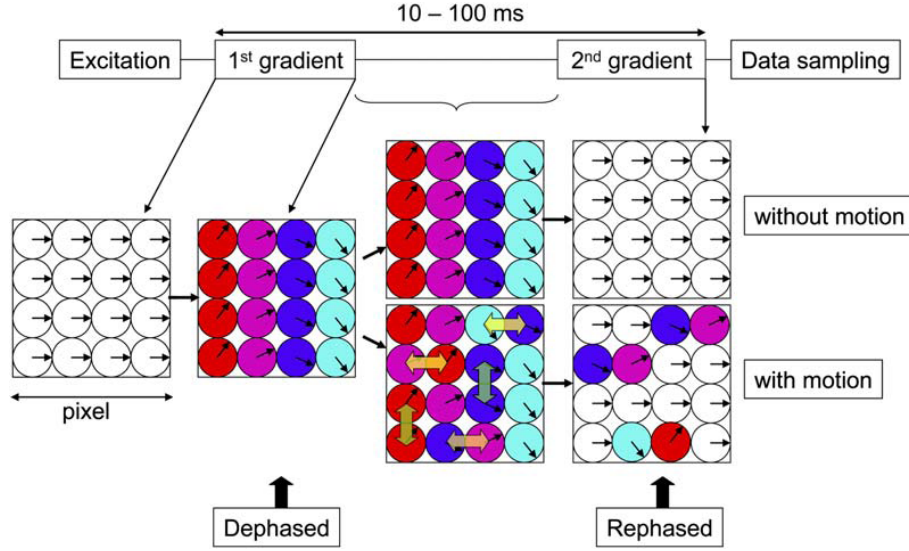


Figura 2.5: Schema semplificato della sequenza Stejskal-Tanner: effetti sugli spin. [28]

plicazione dei due gradienti non vi sarà alcun sfasamento, mentre se avranno variato la loro posizione in seguito a moti diffusivi, si rileverà uno sfasamento non nullo.

2.1.3 Diffusion-Weighted Imaging (DWI)

Nel caso di diffusione isotropa è sufficiente la determinazione di un solo parametro, il coefficiente di diffusione D , per caratterizzare completamente il processo diffusivo. Con la sequenza di acquisizione appena presentata è possibile misurare il segnale MRI, che viene ad essere direttamente legato al segnale non pesato in diffusione S_0 nonché al coefficiente di diffusione D e al b -value, un parametro che riflette le caratteristiche del disegno sperimentale, secondo la seguente relazione

$$S = S_0 e^{-b \cdot D} \quad (2.9)$$

dove il b -value b è direttamente proporzionale all'intensità di gradiente G , alla sua durata δ e al tempo che intercorre fra l'applicazione dei due gradienti successivi Δt

$$b = (\gamma \delta G)^2 t_d = (\gamma \delta G)^2 \left(\Delta t - \frac{\delta}{3} \right) \quad (2.10)$$

Si deve imporre inoltre che l'applicazione dei gradienti di campo magnetico abbia durata di molto inferiore al tempo che intercorre fra l'applicazione di un gradiente e l'altro, in modo da poter ipotizzare con buona approssimazione che non si verifichino fenomeni diffusivi anche durante l'applicazione dei gradienti stessi. Quindi per $\delta \ll \Delta t$ il b -value assume la forma

$$b = (\gamma \delta G)^2 \Delta t \quad (2.11)$$

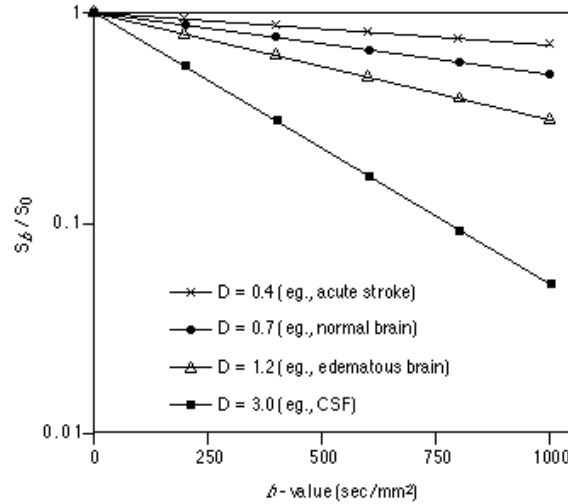


Figura 2.6: Rette ottenute da acquisizioni per diversi b-value. L'inclinazione di tali rette darà il valore di D . [28]

Da tale formula e noto il b-value dal disegno sperimentale, è possibile estrarre l'informazione del coefficiente di diffusione secondo la formula

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -D \cdot b \quad (2.12)$$

considerando tale valore come il coefficiente angolare della retta avente come variabile dipendente il logaritmo dei segnali misurati a diversi valori di b-value e come variabile indipendente i valori dei b-value stessi. In questo modo è sufficiente acquisire due immagini a b-value diversi per poter determinare tale retta e di conseguenza il valore di D , come mostrato in Figura 2.6.

In realtà si è evidenziato in precedenza che il processo diffusivo si realizza a livello microscopico: quindi all'interno dello stesso voxel si troveranno più microstrutture e compartimenti aventi caratteristiche diffuse diverse (e quindi D diversi). Nell'ipotesi che i tempi di diffusione siano sufficientemente piccoli per escludere fenomeni di diffusione fra voxel vicini, si sarebbe richiesto un modello diffusivo multicompartimentale descritto dalla seguente formula:

$$\frac{S}{S_0} = \sum_i p_i e^{-bD_i} \quad (2.13)$$

dove D_i e p_i sono rispettivamente i coefficienti di diffusione e la frazione di molecole che diffondono dall' i -esimo compartimento. Sarebbe quindi necessario procedere con la determinazione dei parametri del modello ma spesso i valori dei coefficienti di diffusione hanno intensità e variabilità ridotta. Si preferisce quindi calcolare il coefficiente di diffusione apparente (*Apparent Diffusion Coefficient*, ADC) così

definito

$$ADC = \sum_i p_i D_i \quad (2.14)$$

Modellizzando quindi il segnale rispetto al coefficiente di diffusione apparente si ottiene

$$\ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = -ADC \cdot b \quad (2.15)$$

che verrà pertanto determinato nel medesimo modo introdotto per D . Determinando per ogni voxel il relativo valore di ADC, si ottengono mappe relative all'entità del processo diffusivo (ma non della sua direzionalità) molto utili nell'indagine di alterazioni legate ad ischemie cerebrali o in campo oncologico.

2.1.4 DTI: estrazione del tensore di diffusione

Nei tessuti laddove il moto diffusivo è di tipo anisotropico non è più sufficiente la determinazione del coefficiente di diffusione apparente. Di conseguenza la formula monoesponenziale 2.9 assume la forma

$$S = S_0 e^{-\sqrt{\mathbf{b}} \cdot \mathbf{D} \cdot \sqrt{\mathbf{b}}^T} \quad (2.16)$$

dove \mathbf{b} diventa un vettore nello spazio tridimensionale (*b-vector*). Ricordando la proprietà di simmetria del tensore di tensione, esplicitando l'equazione essa diventa

$$\ln \left(\frac{\mathbf{S}}{S_0} \right) = - \left[\sqrt{b_x} \ \sqrt{b_y} \ \sqrt{b_z} \right] \begin{bmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{yx} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{zx} & D_{zy} & D_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sqrt{b_x} \\ \sqrt{b_y} \\ \sqrt{b_z} \end{bmatrix} \quad (2.17)$$

$$\ln \left(\frac{\mathbf{S}}{S_0} \right) = - \left(D b_x + D_{yy} b_y + D_{zz} b_z + 2D_{xy} \sqrt{b_x b_y} + 2D_{xz} \sqrt{b_x b_z} + 2D_{yz} \sqrt{b_y b_z} \right) \quad (2.18)$$

E definendo i seguenti vettori

$$\bar{\mathbf{b}} = [b_x \ b_y \ b_z \ \sqrt{b_x b_y} \ \sqrt{b_x b_z} \ \sqrt{b_y b_z}] \text{ e } \bar{\mathbf{D}} = [D_{xx} \ D_{yy} \ D_{zz} \ 2D_{xy} \ 2D_{xz} \ 2D_{yz}]^T$$

la scrittura può essere raccolta nell'equazione

$$\ln \left(\frac{\mathbf{S}}{S_0} \right) = \mathbf{A} = -\bar{\mathbf{D}} \cdot \bar{\mathbf{b}} \quad (2.19)$$

Avendo già osservato come per determinare completamente il tensore di diffusione sia necessario determinare il valore di sei parametri, sarà quindi necessaria l'acquisizione di almeno sei gradienti (S_i con $i = 1, \dots, 6$) lungo diverse direzioni non collineari, che permettano auspicabilmente una campionatura uniforme dello spazio

tridimensionale, oltre all'acquisizione non pesata in diffusione S_0

$$\begin{bmatrix} \ln(S_1/S_0) \\ \ln(S_2/S_0) \\ \ln(S_3/S_0) \\ \ln(S_4/S_0) \\ \ln(S_5/S_0) \\ \ln(S_6/S_0) \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \bar{b}_1 \\ \bar{b}_2 \\ \bar{b}_3 \\ \bar{b}_4 \\ \bar{b}_5 \\ \bar{b}_6 \end{bmatrix} \cdot \bar{D} \quad (2.20)$$

Per determinare ciascuno dei vettori \bar{b}_i è sufficiente specificare un vettore normalizzato corrispondente ad una direzione nello spazio tridimensionale ed il b -value associato. Per ottenere una miglior stima degli elementi del tensore si acquisiscono immagini ad un numero di gradienti ben maggiore di sei: comuni sono misure a 32, 64, 128 direzioni. Il sistema di equazioni 2.20 viene quindi risolto ricorrendo alla stima ai minimi quadrati lineari (*linear least squares*, LLS):

$$\mathbf{D} = -(\bar{\mathbf{b}}^T \bar{\mathbf{b}})^{-1} \bar{\mathbf{b}}^T \mathbf{A} \quad (2.21)$$

Se sono presenti informazioni sull'errore di misura è possibile introdurre dei pesi per la stima dei parametri (*weighted linear least squares*, WLLS). In questo caso la soluzione del sistema è quindi

$$\mathbf{D} = -(\bar{\mathbf{b}}^T \Sigma^{-1} \bar{\mathbf{b}})^{-1} \bar{\mathbf{b}}^T \Sigma^{-1} \mathbf{A} \quad (2.22)$$

dove Σ è la covarianza dell'errore di stima che ha come elementi il reciproco del quadrato dei dati logtrasformati. Esistono ovviamente anche approcci nonlineari che mirano alla determinazione dei parametri direttamente dal fit dei dati non logtrasformati.

Dopo aver stimato i parametri costitutivi, è possibile ricostruire il tensore \mathbf{D} dal quale, attraverso l'operazione di diagonalizzazione, si ricavano gli autovalori ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) e gli autovettori ($\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \mathbf{v}_3$) associati. Gli autovettori sono rappresentativi delle direzioni principali di diffusione mentre gli autovalori quantificano l'intensità del processo diffusivo lungo tali direzioni, come evidenziato in Figura 2.7.

2.1.5 Indici di diffusione

Dopo aver determinato il tensore di diffusione, è possibile sfruttare l'informazione in esso contenuta per mezzo degli autovettori e autovalori. Infatti definendo \mathbf{v}_1 come l'autovettore dove si esplica la diffusività massima, è possibile generare delle mappe

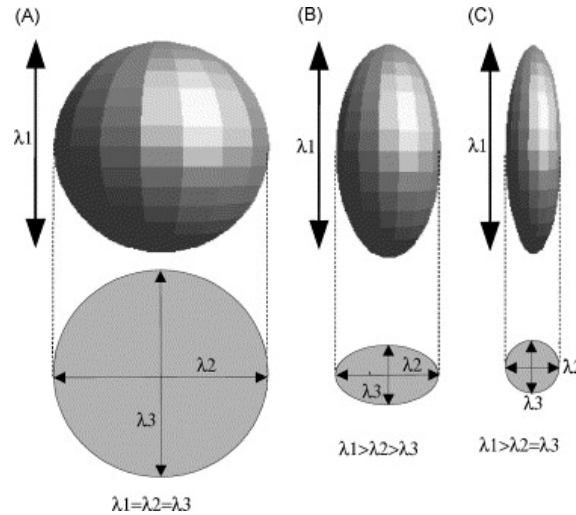


Figura 2.7: Confronto fra sfera di diffusione ed ellissoide di diffusione. Gli autovalori λ_1 , λ_2 , λ_3 del tensore di diffusione permettono di caratterizzare dal punto di vista matematico le condizioni di isotropia e anisotropia: A) nel caso di uguaglianza dei tre autovalori il processo diffusivo non ha direzioni preferenziali ed è rappresentato dalla sfera di diffusione, B) nel caso in cui vi siano delle disuguaglianze fra gli autovalori si individua una direzione preferenziale data dall'autovalore principale λ_1 , in C) si rappresenta il caso di anisotropia che si presenta nelle fibre cerebrali dove l'entità del processo diffusivo lungo la direzione della fibra, in direzione λ_1 , è ben superiore rispetto al valore degli autovalori secondari. [28]

che rappresentino l'orientamento della diffusione in tutta l'immagine². Inoltre combinando opportunamente gli autovalori si possono definire indici di diffusione quali:

- **Diffusività assiale** (*Axial Diffusivity*, AD): coincide con il valore dell'autovalore massimo λ_1 e misura la diffusività lungo la direzione principale di diffusione
- **Diffusività radiale** (*Radial Diffusivity*, RD): data dalla media degli autovalori minori λ_2 e λ_3 , indica la diffusività che si realizza in direzione perpendicolare a \mathbf{v}_1

$$RD = \frac{\lambda_2 + \lambda_3}{2} \quad (2.23)$$

- **Diffusività media** (*Mean Diffusivity*, MD): definita dalla media degli autovalori, rappresenta l'intensità media del tensore di diffusione, ossia il moto molecolare medio in un dato voxel

$$MD = \bar{\lambda} = \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3}{3} \quad (2.24)$$

²L'informazione della direzione dell'autovettore massimo costituisce la base della trattografia streamline deterministica.

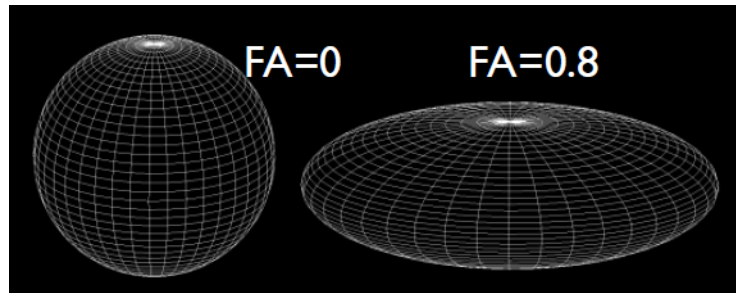


Figura 2.8: Valori di FA secondo diversi gradi di anisotropia.[25]

A questi si aggiungono indici invarianti alla rotazione (quindi non legati al sistema di riferimento adottato), che forniscono una misura oggettiva e intrinseca della struttura e permettono quindi di escludere bias legati alla qualità delle immagini e ad altri artefatti [20][22]:

- **Anisotropia frazionaria** (*Fractional Anisotropy*, FA): è l'indice più utilizzato in DTI e rappresenta una deviazione standard normalizzata delle diffusività lungo i tre assi. Riflette le variazioni dei processi diffusivi nelle diverse direzioni spaziali, legati ai cambiamenti strutturali delle fibre. E' quindi utilizzata come marker per l'integrità della materia bianca.

$$FA = \sqrt{\frac{3 [(\lambda_1 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_2 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_3 - \bar{\lambda})^2]}{2 [\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2]}} \quad (2.25)$$

Assume valori nell'intervallo $[0,1]$ dove a 0 si ha diffusività pressochè costante in ogni direzione, quindi coincide con condizioni di isotropia, mentre al tendere a 1 la differenza fra le varie direzioni aumenta costituendo una misura del grado di anisotropia (vedere a riguardo Figura 2.8). Nel caso della materia bianca si può quindi osservare un aumento della FA che mostra elevata diffusività lungo le fibre e bassa diffusività in direzione perpendicolare ad esse (ostacolata dalla guaina mielinica). Purtroppo i cambi microstrutturali legati a variazioni del grado di anisotropia non sono tuttora chiari, resta il fatto che a valori di FA alterati si associano fenomeni di alterazione dei tessuti: demielinazione, ma anche edema, gliosi e infiammazione [22], [23], [24]. Il fenomeno di demielinazione, in particolare, è un fattore cruciale nel corretto funzionamento dei circuiti neuronali e ha quindi forti implicazioni in molte patologie.

- **Anisotropia relativa** (*Relative Anisotropy*, RA): ulteriore misura di deviazione standard normalizzata, stavolta per la traccia del tensore di diffusione, che rappresenta il rapporto fra la componente anisotropica e isotropica del tensore di diffusione. Assume valori compresi nell'intervallo $[0, \sqrt{2}]$ dove 0 coincide

con il massimo grado di isotropia e $\sqrt{2}$ il massimo grado di anisotropia

$$RA = \sqrt{\frac{[(\lambda_1 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_2 - \bar{\lambda})^2 + (\lambda_3 - \bar{\lambda})^2]}{2[\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3]}} \quad (2.26)$$

- **Rapporto Volumetrico** (*Volume Ratio*, VR): rapporto fra il volume dell'ellissoide di diffusione e il volume della sfera di diffusione con raggio pari a $\bar{\lambda}$. Assume valori compresi nell'intervallo $[0,1]$ ma, a differenza dei vari indici, lo 0 coincide con il massimo grado di anisotropia e l'1 con il massimo grado di isotropia, pertanto alcuni autori sono soliti usare $(1-VR)$

$$VR = \frac{\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3}{\bar{\lambda}^3} \quad (2.27)$$

Ogni indice permette di valutare in diversi modi il grado di anisotropia dei tessuti e può risultare più significativo rispetto ad altri a seconda del tipo di studio che si intende effettuare. In questa tesi si è dunque deciso di sviluppare un confronto estensivo su tali indici valutandone le variazioni reciproche in un contesto di analisi multi-soggetto.

2.2 Analisi multi-soggetto di dati di diffusione

L'estrazione degli indici di diffusione, in particolar modo della Fractional Anisotropy, permette in prima battuta la descrizione del processo diffusivo a livello microscopico e quindi la caratterizzazione della morfologia neuronale. Questi risultati rimangono tuttavia fini a sè stessi se non riportati in un contesto di analisi multi-soggetto. In questo senso alcuni dei primi approcci contemplavano la semplice somma a livello globale dei differenti parametri di diffusione [29] mentre studi più recenti considerano la possibilità di caratterizzare le variazioni nei parametri di diffusione anche a livello dei singoli voxel (voxelwise). Dalla necessità di un'analisi voxelwise, sono stati sviluppati quindi molti approcci basati sull'informazione della morfometria voxel-by-voxel (Voxel-Based Morfometry, VBM [26]).

2.2.1 Voxel-Based Morfometry (VBM)

L'approccio VBM venne introdotto inizialmente per individuare variazioni nella densità della materia grigia nelle immagini MRI strutturali T1-pesate [27].

Con tale tecnica tutte le immagini di diffusione relative ai diversi soggetti vengono allineate rispetto ad uno standard comune e successivamente si effettua l'analisi statistica voxelwise per individuare le regioni di interesse per lo studio in esame (ad

esempio, confronto pazienti sani e patologici). I passaggi fondamentali dell'analisi VBM sono i seguenti [27, 26]:

- (opzionale) generazione di una template studio-specifica attraverso operazioni di media fra le immagini di tutti soggetti, precedentemente allineate secondo un atlante stereotassico (ad esempio MNI152);
- registrazione delle immagini relative ai vari soggetti rispetto alla template scelta (in genere con trasformazione affine);
- segmentazione delle immagini per ottenere i diversi tipi tessutali, solitamente si richiede il solo riconoscimento della sola materia grigia. L'approccio VBM applicato allo studio della materia bianca, condotto in genere su mappe di FA, ha visto dare risultati non sempre consistenti [30], [31]. Questo è legato agli errori che si introducono con allineamenti non corretti e con operazioni di smoothing sulle immagini.
- operazione di smoothing sui dati segmentati, attraverso filtro gaussiano lineare (ampiezza del filtro FWHM da 4 a 16 mm);
- estrazione dell'analisi statistica voxelwise con sogliatura delle immagini statistiche ed eventuale correzione per la multiple comparison.

Tale approccio tuttavia viene esposto in questa sede in forma ridotta poichè presenta limiti evidenti[30] sia in termini di corretto allineamento dei dati dei singoli soggetti secondo uno spazio stereotassico standard, sia per il fatto che esso richiede uno smoothing preliminare dei dati, che corrompe i risultati finali e aumenta il rischio di artefatti partial-volume. Da qui la necessità di una tecnica che non sia particolarmente dipendente da una registrazione non lineare perfetta e che non richieda una fase di preprocessing che alteri l'informazione sui voxels: questo è il caso della Tract-Based Spacial Statistics.

2.2.2 Tract-Based Spacial Statistics (TBSS)

Il punto di forza di tale approccio [26] è legato sostanzialmente alla determinazione di una mappa dello scheletro della Fractional Anisotropy media che rappresenta i centri dei fasci di fibre comuni in tutti i soggetti. I dati di diffusione relativi ad ogni soggetto vengono quindi proiettati in tale mappa in modo tale che ogni voxel dello scheletro porti il valore di diffusione corrispondente al centro locale relativo alla fibra più vicina, risolvendo così i problemi di allineamento. I passaggi fondamentali dell'analisi TBSS sono i seguenti:

- Identificazione di un target per la registrazione e allineamento dei dati relativi ai singoli soggetti a tale target (passaggio per cui non è richiesto un allineamento perfetto);
- Generazione delle immagini di FA media e applicazione di non-maximum-suppression, tecnica di edge detection per ottenere lo scheletro delle immagini secondo analisi dei gradienti d'intensità. Successiva soglia per eliminare aree a bassa FA media o con elevata variabilità inter-soggetto;
- Proiezione delle immagini FA dei soggetti secondo la mappa dello scheletro (per tale operazione è necessario che per ogni voxel si individui la direzione perpendicolare alla direzione di propagazione del tratto);
- Estrazione delle statistiche voxelwise dai dati di FA riferiti allo spazio dello scheletro.

Scelta del target e registrazione nonlineare

L'allineamento nonlineare è sicuramente un passaggio cruciale per la successiva proiezione delle immagini nella mappa dello scheletro. Ovviamente è necessario fissare un compromesso per l'accuratezza: ricorrere a soluzioni con pochi gradi di libertà (per esempio, la trasformazione affine, priva di componenti non lineari) restituirebbe risultati grossolani, mentre per soluzioni ben più sofisticate, che porterebbero ad allineamenti pressochè perfetti, si verificherebbe una distorsione delle immagini originali tale che alcuni tratti potrebbero essere allineati con tratti completamente diversi nell'immagine target ed inoltre tale distorsione potrebbe essere non omologa, andando a variare la topologia della rete (ad esempio, da due tratti generarne uno solo o dividere un unico tratto in due).

Si ricorre quindi ad un approccio non lineare basato su deformazioni free-form e funzioni di interpolazione B-spline. In particolare le deformazioni free-form agiscono sull'immagine individuando la corretta trasformazione, generando una rete di punti controllo. Il ricampionamento dell'immagine secondo tale rete viene quindi realizzato ricorrendo ad interpolazione B-spline e ottimizzato secondo minimizzazione di una funzione di costo. Tale funzione mira sia ad ottimizzare una misura di similarità fra i voxel (ossia la cross-correlazione) per ottenere un allineamento di buon livello, sia ad imporre una regolarizzazione sulla distorsione, in modo tale da evitare gli svantaggi che affliggono approcci VBM.

Esistono diverse possibilità per la scelta delle immagini target sulle quali effettuare l'allineamento: una prima soluzione potrebbe essere il ricorso ad atlanti stereotassici, scelta che risulta essere ottima in termini di costi e tempi computazionali. D'altra

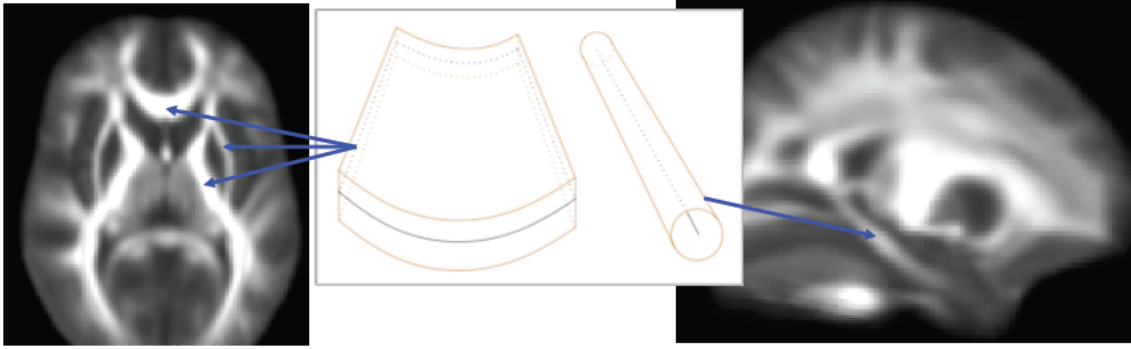


Figura 2.9: *Principali tipologie anatomiche delle fibre cerebrali. Si mostra come alcune regioni della materia bianca (nell'immagine a sinistra il genu del corpo calloso, capsula esterna e braccio posteriore della capsula interna) presentino struttura a piano di un certo spessore, mentre altre regioni (nell'immagine di destra il fascio cingolato inferiore) presentino struttura tubulare.* [25]

parte, per studi altamente specifici (ad esempio pediatrici) dove gli atlanti stereotassici standardizzati risulterebbero inefficaci, si richiede l'estrazione dell'immagine del soggetto "più rappresentativo" del pool in esame. Per ottenere questo si operano allineamenti fra tutti i soggetti e, ottenute le rispettive mappe di distorsione, si calcolano gli spostamenti medi e si identifica il soggetto target come quello avente minima distanza media fra tutti gli altri soggetti. Le immagini relative a tale soggetto devono essere poi riportate con trasformazione affine su standard MNI152 con risoluzione $1 \times 1 \times 1 \text{ m}^3$ per una corretta interpretazione e visualizzazione dei dati. [25]

Generazione di FA media e operazione di skeletonization

Ottenute le immagini di FA allineate, esse vengono mediate per ottenere l'immagine FA media, la quale presenta rumore di fondo legato soprattutto all'operazione di media e al ricampionamento a risoluzioni diverse. La determinazione dello scheletro rivelerà come linee e superfici tutti i tratti di fibra che sono comuni a tutti i soggetti. La Figura 2.9 mostra in particolare come la topologia dei tratti cerebrali si distingua sostanzialmente in sezioni con una certo spessore (come nel caso del corpo calloso) e, meno frequentemente, in tubi (ad es. il fascio cingolato inferiore) che si sviluppano lungo l'asse anatomico longitudinale, per il quali l'elaborazione delle immagini si complica (vedere a riguardo 2.2.2).

Per ottenere lo scheletro è necessario in primo luogo stimare per ogni voxel dell'immagine la superficie perpendicolare alla direzione del tratto e successivamente eseguire l'operazione di *thinning* con non-maximum-suppression lungo tale direzione, identificando così il centro del tratto come coincidente con il massimo valore di FA. Per individuare la superficie perpendicolare alla direzione di tratto è necessario considerare per ogni voxel il valore dei voxel vicini; si presentano così due condizioni,

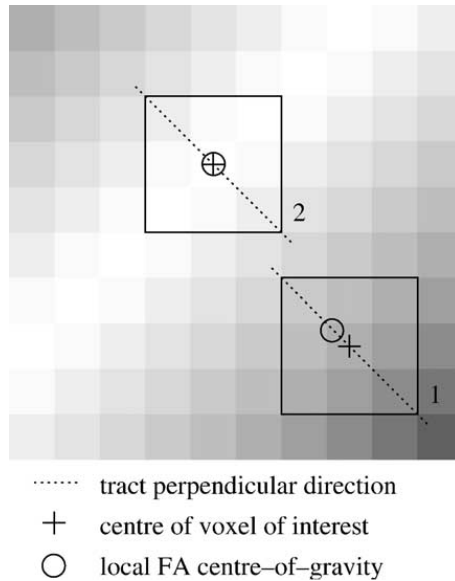


Figura 2.10: *Dettaglio sulla determinazione della direzione perpendicolare al tratto.*[26]

mostrate nel dettaglio in Figura 2.10:

Caso 1 Il voxel in esame non si trova nel centro di una fibra: allora esisteranno dei voxel vicini che presenteranno FA maggiore. Calcolando il centro di gravità per una template di 3x3x3 voxel centrata nel voxel, questo risulterà spostato rispetto al voxel stesso. La direzione perpendicolare al tratto sarà individuata dalle posizioni del voxel e del centro di gravità.

Caso 2 Il voxel sotto esame si trova nel centro di una fibra: questo viene dedotto qualora la distanza dal centro di gravità sia sufficientemente ridotta ($<0.1\text{mm}$). Pertanto l'approccio di stima cambia considerando la derivata seconda dell'immagine sempre con template di 3x3x3 voxel (la direzione è data dalla direzione di massima differenza fra l'intensità del voxel in questione e le medie delle coppie dei voxel opposti).

Dopo aver determinato la direzione perpendicolare al tratto per ogni voxel, si può procedere con la generazione dello scheletro, individuando i differenti centri di tratto. Per fare questo si confrontano per ogni voxel i due voxel più vicini secondo la direzione perpendicolare al tratto: se questo presenta valore di FA maggiore viene marcato come voxel scheletro. Un ultimo passo consiste in una sogliatura delle immagini così ottenute per escludere dalle elaborazioni successive voxels legati ad allineamenti non corretti fra i soggetti nonché associati ad altri tessuti, come la materia grigia e il fluido cerebro spinale.

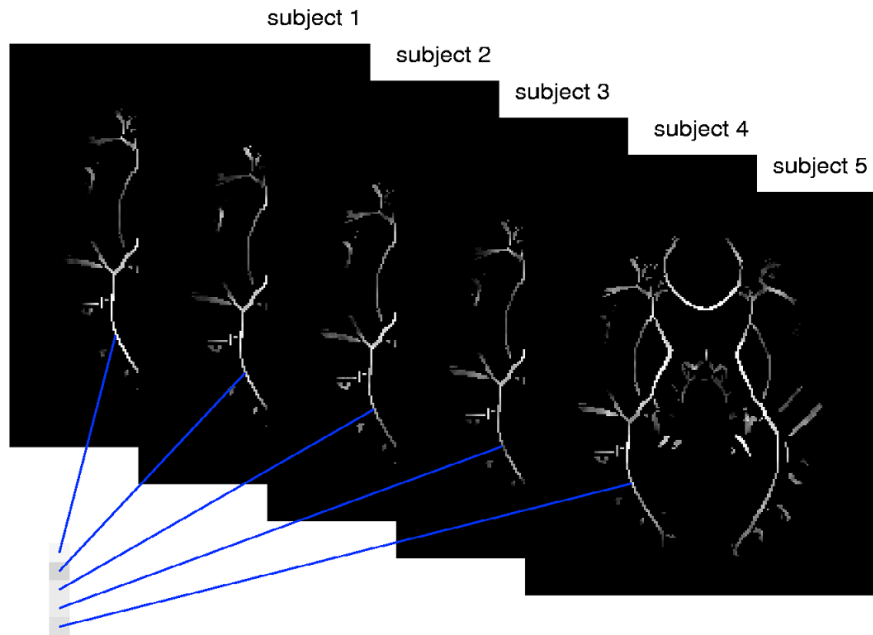


Figura 2.11: *Generazione delle immagini scheletro per i diversi soggetti.*[25]

Proiezione delle immagini FA sulla mappa dello scheletro

Ottenuta la mappa dello scheletro di FA medio, è possibile proiettare tutte le immagini FA allineate secondo tale mappa (vedere Figura 2.11).

Per ogni voxel dell'immagine scheletro si individua il valore di FA massimo nell'immagine del soggetto lungo la direzione perpendicolare al tratto precedentemente individuata. Per effettuare questo è necessario generare delle "mappe di distanza" (vedere Figura 2.12) nelle quali ad ogni voxel viene associato un valore legato alla distanza dal punto di scheletro più vicino e la scelta di tali valori viene ricavata in seguito ad un'operazione di pesatura dei valori di FA attraverso una funzione gaussiana, che permette di abbassare il contributo dei voxel più lontani dal tratto. In questo modo si riducono errori di non perfetto matching introdotti dall'operazione di registrazione delle immagini e l'analisi rimane sensibile alle sole variazioni di FA. Inoltre essendo l'allineamento condotto sulla direzione perpendicolare al tratto, dove FA varia maggiormente, esso permette un risultato ben più sensibile alle variazioni di FA stesso rispetto ad un'analisi lungo la direzione principale di propagazione della fibra.

Esistono poi regioni critiche dove la determinazione della direzione perpendicolare al tratto non è facilmente individuabile: questo è il caso della topologia tubulare propria del fascio cingolato inferiore. In questo caso si ricorre ad una maschera standard dedicata e, per i voxel dell'immagine appartenenti a tale maschera, la ricerca del FA massimo non si effettua su una "direzione" perpendicolare bensì su uno "spazio" circolare.

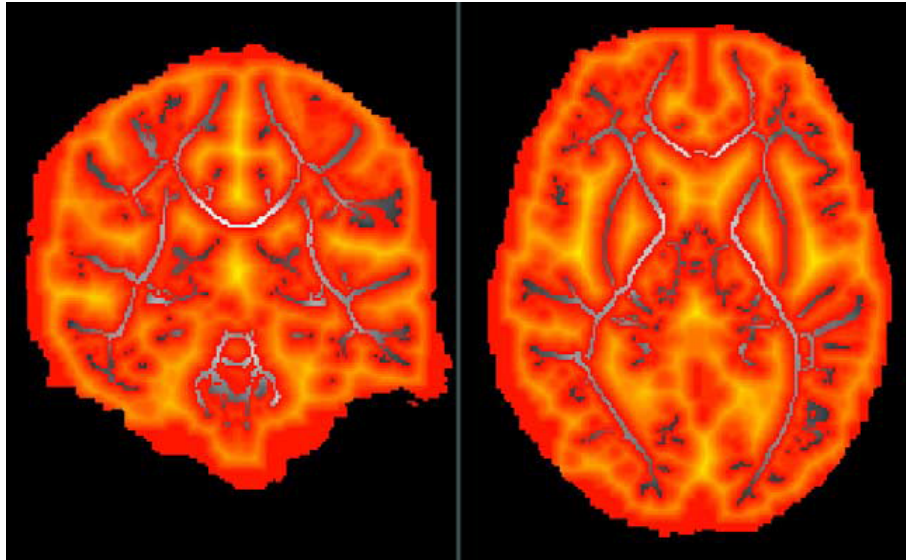


Figura 2.12: Mappe di distanza (in rosso le zone più prossime allo scheletro). [26]

In ultima battuta va considerato che ottenendo immagini a valori "puri" di FA, ossia privi di correzione per artefatti partial-volume, esse avranno significatività quanto più si verificheranno le condizioni in cui i tratti avranno dimensioni maggiori del singolo voxel (ossia appunto dove non si verifica artefatto da partial volume).

Analisi statistica sulle immagini

Al termine dell'operazione di proiezione dei dati FA sulla mappa dello scheletro di FA medio si ottiene un'immagine 4D contenente tutte le acquisizioni per ciascun soggetto (la quarta dimensione è appunto l'ID del soggetto). A questo punto è possibile effettuare l'analisi statistica sui dati.

L'approccio più semplice consiste nell'analizzare ogni voxel dello scheletro indipendentemente, applicando l'approccio General Linear Model (GLM) su tutti i soggetti. In questo modo si realizzano ad esempio test statistici a due gruppi (il test Student disaccoppiato) per valutare le differenze significative di FA fra soggetti sani e soggetti patologici. Per questo approccio tuttavia è necessario che la distribuzione nulla dei valori di FA abbia andamento gaussiano, condizione che in genere viene verificata [26]. Inoltre viene ad essere necessaria una correzione per la multiple comparison, applicando ad esempio la correzione basata sulla disuguaglianza di Bonferroni (*Family Wise Error*, anche se talvolta può risultare troppo conservativa).

In alternativa, soprattutto per considerare modelli più complessi dove oltre agli effetti da testare (ossia le differenze di FA) compaiono anche variabili disturbo (ad es. l'età, il sesso, trattamenti farmacologici) che quindi non permettono di effettuare decisioni su test sufficientemente esatti, si può adottare un approccio permutation-based (metodi di randomizzazione), che valuta una statistica di test (per esempio t

value del voxel, dimensioni o massa del cluster) rispetto alla distribuzione nulla dei massimi valori di tale statistica, la quale in questo caso viene generata per mezzo di permutazioni random multiple di tutti i soggetti ordinate secondo il modello descritto da GLM. Se la statistica si realizza a livello di clustering, è necessario determinare una soglia per l'iniziale generazione dei cluster.

In questa tesi si è condotto l'analisi TBSS per i dati DTI sfruttando il software free FMRIB's Software Library (FSL) sviluppato dal gruppo di Analisi del centro di Oxford per la MRI funzionale del cervello (FMRIB) [33]. In particolare, FSL implementa tale approccio con il programma **randomise** [34] il quale genera immagini del test statistico, nonché dei relativi valori di p-value indicativi della bontà della decisione statistica, anche corretti per la multiple comparison. Per ottenere tali risultati, si modella la matrice di design del modello GLM separatamente per le variabili da testare e le variabili di disturbo secondo la matrice di contrasto. Si effettua quindi il fit dei dati sulle sole variabili di disturbo e si ottengono i residui relativi, i quali vengono permutati per generare un segnale di disturbo stimato da aggiungersi al modello completo del fit dei dati. Il processo si ripete per costruire la distribuzione della statistica da testare. Per l'analisi cluster-based, il programma si avvale anche dell'utilizzo di un metodo per la ricerca della soglia per la generazione dei cluster, il *Threshold-Free Cluster Enhancement* [32]. Ovviamente la soluzione del test statistico sarà asintoticamente esatta, ossia la decisione diventerà via via più precisa, all'aumentare dei gradi di libertà (numero di campioni, ossia i voxel), mentre perderà in accuratezza con il ridursi del numero di gradi di libertà e l'aumentare del numero di variabili di disturbo. In Figura 2.13 è possibile osservare un risultato TBSS applicato allo studio della sclerosi multipla.

2.3 Fiber tracking

I dati di diffusione sono uno strumento prezioso per indagare la morfologia e quindi la funzionalità dei tessuti. Lo studio dell'integrità della materia bianca si traduce nell'analisi della connettività strutturale, ossia nella determinazione dei possibili pathway (ossia le connessioni assoniche) che connettono le diverse regioni cerebrali, senza che questa implichi l'adozione di tecniche invasive.³Inoltre la necessità di indagare la connettività strutturale della materia bianca è evidente: il danneggiamento delle connessioni assoniche risulta essere substrato per molti disturbi di carattere neurologico e psicologico.

³Nell'analisi statistica multi-soggetto si è introdotto il concetto di *centro locale* di tratto, ma questo veniva inserito in un contesto 2D, ossia riferito alla singola slice. Qui la visualizzazione del tratto si estende a tutto il volume cerebrale, coinvolgendo tutte le slice acquisite.

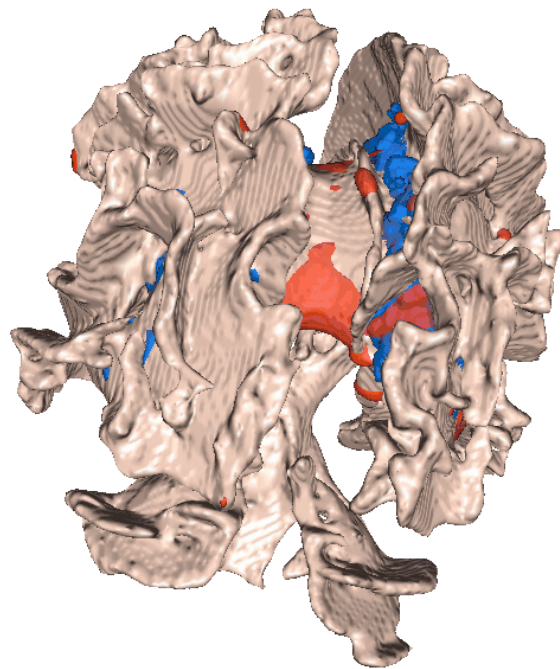


Figura 2.13: *Rendering 3D dello scheletro di FA medio per lo studio su soggetti affetti da sclerosi multipla: in blu le aree di lesione sogliate al 20% sulla distribuzione di probabilità. In rosso dove FA è correlato negativamente con il volume totale di lesione dei soggetti, a indicare che vi sono alterazioni di FA anche dove le fibre sembrano apparentemente integre. [26]*

La visualizzazione dei diversi fasci di fibre è quindi possibile a partire dai dati di diffusione sfruttando le informazioni legate alle direzioni principali di diffusione o all'ellissoide di diffusione (quest'ultimo approccio è da preferirsi perchè più rappresentativo del tensore di diffusione). Infatti come già è stato osservato, la direzionalità del processo diffusivo riflette l'orientamento degli assoni e delle fibre cerebrali, ed è quindi assumibile che le fibre siano orientate parallelamente alla direzione principale di diffusione.

Esistono principalmente due approcci per il fiber tracking: la trattografia deterministica, la quale presenta un forte limite legato alla mancata caratterizzazione della propagazione dell'errore nel modello, e la trattografia probabilistica, il superamento di tali limiti con la caratterizzazione completa dell'errore.

2.3.1 Trattografia deterministica

Negli approcci di trattografia deterministica viene fatta l'assunzione fondamentale della coincidenza della direzione dell'autovettore principale del tensore di diffusione del voxel con il vettore tangente alla fibra cerebrale appartenente al voxel stesso. La fibra viene considerata come una linea continua che ha origine al centro di un voxel, orientata secondo la direzione dell'autovettore principale del tensore di diffusione di quel voxel e che cambia la propria direzione nel passaggio ai voxel successivi secondo la direzione degli autovettori relativi a quei voxel. Esistono poi approcci più complessi considerano non solo la direzione dell'autovettore principale, ma l'intero tensore di diffusione.

I limiti di tali approcci sono tuttavia legati all'arresto del processo di trattografia stesso a causa di valori di anisotropia troppo bassi o ad angoli di curvatura della fibra troppo accentuati. Importantissimo inoltre è il fatto che non si ha informazione sull'errore commesso nella propagazione delle fibre, a meno che non si acquisiscano più dataset per il medesimo soggetto (altamente improbabile dal punto di vista operativo).

2.3.2 Trattografia probabilistica

Per trattografia probabilistica si intende tutta una serie di algoritmi su base stocastica che mirano alla determinazione della propagazione dell'errore. In questo modo la possibilità di orientazioni multiple viene esplicitata in termini probabilistici, e il procedimento di tracking termina solamente ai confini cerebrali.

Gli algoritmi sviluppati sono molti, soprattutto basati su tecniche di inferenza di tipo bayesiano con ricorso a modelli multicompartimentali per il processo di diffusione. Gli output della trattografia probabilistica non saranno quindi linee continue

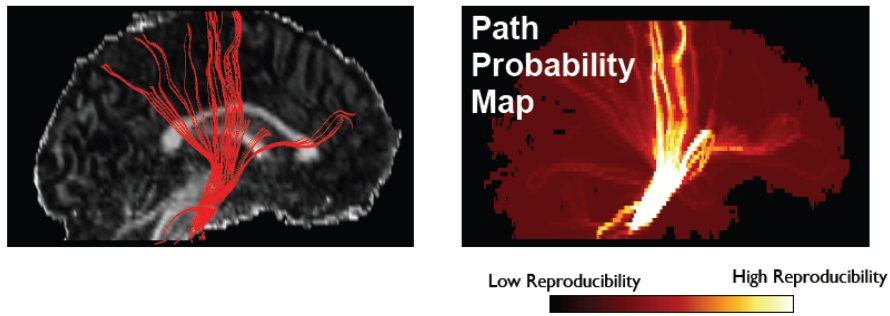


Figura 2.14: Confronto fra trattografia deterministica e trattografia probabilistica. La prima genera linee continue corrispondenti ai fasci di fibre, la seconda genera una mappa di probabilità di localizzazione dei fasci.[25]

rappresentanti i tratti ricostruiti bensì regioni ad elevata probabilità di localizzazione della fibra, come mostrato in Figura 2.14.

Capitolo 3

Dati sperimentali

3.1 Il dataset

Il dataset utilizzato in questa tesi raccoglie dati MRI di diffusione di soggetti sani (controlli) e pazienti bipolari cronici. In Tabella 3.1 vengono riportate le caratteristiche dei diversi pool. Le acquisizioni relative ai singoli soggetti sono state fornite in formato Nifti, congiuntamente alle informazioni sui b-vector e i b-value, fondamentali per la quantificazione delle immagini. I dati DTI sono strutture 4-D: le immagini sono matrici 256x256 pixel acquisite su 50 slices in direzione longitudinale a 12 direzioni di gradiente più un'acquisizione non pesata in diffusione. La risoluzione spaziale è di 1x1x3mm.

3.2 Preprocessing e quantificazione

Le immagini a disposizione necessitano di una fase di preprocessing preliminare alla determinazione delle mappe parametriche di diffusione. Le immagini infatti presentano artefatti legati alla formazione di *eddy currents* [35]. Tale fenomeno è intrinsecamente legato al tipo di acquisizione utilizzata in DTI in quanto si ha la formazione di correnti elettriche indotte da forti gradienti di campo magnetico che s'invertono rapidamente. Quando gli impulsi di gradiente vengono applicati, le variazioni del campo magnetico si risolvono in induzione di corrente nelle varie superfici conduttrici dello scanner MRI. Queste di conseguenza generano gradienti di campo che

	controlli	bipolari
numero	35	34
età (SD)	38.9 (12.8)	49.2 (8.1)
sex (M:F)	19:16	9:25

Tabella 3.1: Descrizione del dataset.

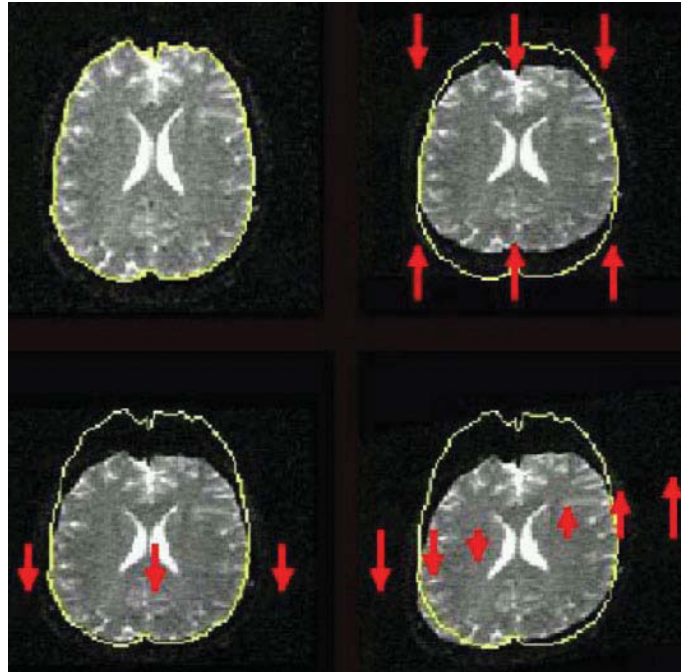


Figura 3.1: Immagini esemplificative degli artefatti dovuti a eddy currents: in alto a destra contrazione, in basso a sinistra shift e in basso a destra shear.[35]

posso persistere anche dopo l'applicazione dei gradienti primari, nonché combinarsi vettorialmente a questi in modo tale che i gradienti effettivi a cui sono sottoposti gli spin non sono effettivamente quelli progettati nel disegno sperimentale. Perciò l'errore nei gradienti locali (non considerati nel software di ricostruzione) produce distorsione geometrica nelle immagini finali. Generalmente si possono osservare tre patterns di distorsione: contrazione o dilatazione, shift completo e shear, i quali comportano la formazione di contorni di iperintensità (erroneamente classificabili come fibre) e ridotta risoluzione dovuta a blurring [36]. In Figura 3.1 è possibile osservare un esempio semplificato dove l'artefatto si sviluppa lungo un'unica direzione longitudinale: la contrazione porta ad un restringimento del volume dell'encefalo, lo shift invece una compressione con minor grado di deformazione, mentre l'artefatto di shear si realizza in una variazione più complessa delle proporzioni d'immagine.

Possibili precauzioni per ridurre gli artefatti dovuti alle eddy currents sono legati all'uso di hardware dedicati quali bobine di gradiente di piccole dimensioni da posizionare vicine al core per generare campi intensi, l'uso di bobine di gradiente "auto-schermate", attualmente lo standard nei sistemi MRI. Altre precauzioni si concentrano sulla generazione di impulsi di gradiente di forma differente che, opportunamente calibrati, andrebbero a compensare tali artefatti (operazione di pre-enfasi). Purtroppo tale soluzione richiede calibrazioni multiple sui diversi assi e spesso di lunga durata [35]. Questi approcci tuttavia permettono di ridurre l'entità dell'artefatto, ma non di eliminarlo: rimane quindi necessaria un'elaborazione delle

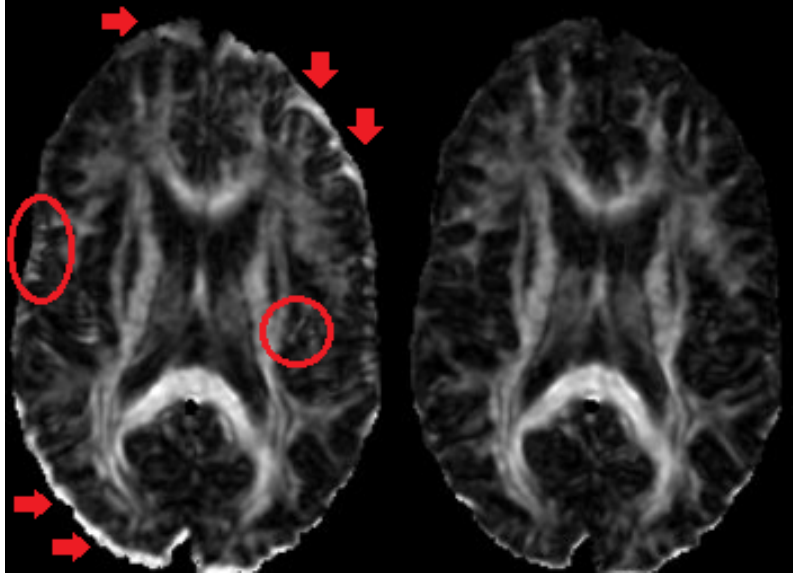


Figura 3.2: *Preprocessing dei dati: correzione per eddy currents e artefatti da movimento. In evidenza le zone di iperintensità, in particolare quelle più interne che posso dar luogo ad erronea ricostruzione delle fibre.*[36]

immagini in fase di post-acquisizione. Si veda a scopo esemplificativo Figura 3.2, dove è possibile osservare come le aree di iperintensità si riducano con la correzione delle immagini.

In questa tesi il preprocessing viene condotto utilizzando il software FSL [33], che mette a disposizione il tool FDT (FMRIB's Diffusion Toolbox) per l'analisi di dati DTI. Per ogni soggetto, ricorrendo al comando *eddy_correct*, è possibile effettuare la correzione di tali artefatti, condotta con coregistrazione per mezzo di trasformazione affine rispetto ad un volume di riferimento, coincidente con l'acquisizione non pesata in diffusione, denominata immagine S_0 . Tale scelta è motivata dal fatto che acquisizione S_0 è rappresentativa dell'anatomia cerebrale del soggetto, in quanto viene acquisita immediatamente prima della generazione dei gradienti di campo magnetico, senza risentire degli artefatti che si avrebbero con l'applicazione dei gradienti di campo magnetico.

Una volta conclusosi il breve preprocessing delle immagini, è possibile passare alla quantificazione effettiva dei dati, ottenendo le mappe parametriche relative agli autovettori e agli autovalori del tensore di diffusione, nonché degli indici di diffusione presentati in precedenza. Sempre ricorrendo al tool FDT di FSL, il comando *dtifit*, ricevendo in ingresso le immagini corrette per il movimento e i valori dei *b_vector* associati, permette di eseguire il fit dei dati sul modello del tensore di diffusione e di ottenere le mappe relative a tutti gli autovalori e autovettori, a FA, MD, MO (Mode of Anisotropy, misura di anisotropia da usarsi congiuntamente con FA). Da questi risultati si sono derivati, ricorrendo al comando *fslmaths*, altri indici di diffusione non direttamente forniti in output da *dtifit*, ossia gli indici di Radial Diffusivity,

Volume Ratio e Relative Anisotropy. La scelta di ottenere un numero così elevato di mappe parametriche per ogni singolo soggetto è motivata dalla necessità di indagare le relazioni reciproche fra gli indici e di determinare, sulla base dell'analisi statistica che segue, quali siano effettivamente gli indici più informativi.

Capitolo 4

Risultati

I ricavati della letteratura scientifica mostrano come la sindrome bipolare sia legata ad uno stadio di degenerazione nella connettività strutturale locale (per una revisione della letteratura si rimanda al Capitolo 5). L'estrazione degli indici di diffusione, come già osservato nel Capitolo 2, permette di rilevare anomalie nella morfologia e funzionalità connettivale come alterazione dei processi di diffusione che avvengono nelle fibre. Con queste premesse il lavoro sperimentale condotto in questa tesi assume duplice scopo: indagare l'esistenza di aree cerebrali dove si registrino differenze negli indici di diffusione fra sani e bipolari, studio condotto sia dal punto di vista sia qualitativo sia dal punto di vista quantitativo, nonché la visualizzazione e caratterizzazione dei fasci di fibre dove si presenti maggior alterazione degli indici.

Nella Sezione 4.1 si riporta l'analisi statistica delle mappe parametriche ottenute dalla quantificazione delle immagini per mezzo di Tract Based Spacial Statistics (TBSS), introdotta nel dettaglio in 2.2.2. Le condizioni di lavoro impostate per ottenere i risultati relativi a tale analisi sono esposte in 4.1.1. Fissate queste condizioni, nella sezione successiva 4.1.2 si presentano i risultati relativi rispettivamente ad un'analisi quantitativa dell'intero volume encefalico o approccio *whole brain*. Da alcune considerazioni emerse sulla composizione del dataset in esame, si sono condotti test statistici che considerassero anche le covariate di età e sesso come possibili fattori di disturbo e si è raggiunto un maggior grado di dettaglio portando l'analisi a livello di singole regioni cerebrali o approccio *ROI-based*. I risultati relativi a tale parte sono presenti in 4.1.2. L'analisi statistica termina quindi con uno studio sulla correlazione fra alterazioni degli indici e covariata età, presente in 4.1.2.

Infine nella sezione 4.2 si riporta la trattografia probabilistica di alcune regioni cerebrali. In particolare l'analisi TBSS permette di far ricadere la scelta su genu del corpo calloso e corona radiata anteriore sinistra. Le modalità di lavoro per ottenere i tratti e i relativi risultati sono presenti in 4.2.1 e in 4.2.2.

Step TBSS	Opzione	
tbss_2_reg	-T	Registrazione su standard FMRIB58_FA
tbss_3_postreg	-S	Normalizzazione su standard MNI152
tbss_4_prestats	th=0.2	Sogliatura per lo scheletro di FA medio
randomise	n=5000	Numero di permutazioni necessarie (default)
randomise	-T2	Metodo di sogliatura TFCE

Tabella 4.1: *Impostazione dei valori e delle opzioni per analisi TBSS.*

4.1 Analisi statistica TBSS

4.1.1 Metodo

Dalla quantificazione delle immagini DTI si ottengono mappe parametriche degli indici di diffusione rappresentative dell'anatomia cerebrale dei singoli soggetti. Per poter conseguire un'indagine comparativa efficace riguardante le possibili alterazioni della materia bianca nei soggetti patologici rispetto ai controlli, si ricorre all'analisi multi-soggetto Tract Based Spacial Statistics (TBSS). Per ottenere le mappe statistiche si ricorre quindi al tool *TBSS v1.2* di FSL. In Tabella 4.1 sono riportate le impostazioni scelte per l'analisi TBSS relativa a questa tesi. La decisione di effettuare la registrazione delle immagini dei diversi soggetti secondo lo standard FMRIB58_FA è legata alla necessità di garantire un buon compromesso fra qualità dell'allineamento e tempi computazionali, potendo effettuare un'unica operazione di registrazione per soggetto anziché tutte le combinazioni possibili fra i soggetti, come si avrebbe nella registrazione avente come target il soggetto "più significativo". Inoltre la scelta di effettuare la registrazione non lineare delle immagini dei soggetti nello spazio stereotassico MNI152 è particolarmente vantaggiosa in termini di visualizzazione ed elaborazione successivi. La sogliatura al valore di FA pari a 0.2 è stato visto garantire buoni risultati dal punto di vista sperimentale [26].

Per quanto riguarda il programma *randomise* si è scelto di fissare il numero di permutazioni a 5000, valore sufficientemente elevato per avere buona precisione sui p-value, ossia sulla bontà stessa della decisione statistica [34], pur non appesantendo i tempi computazionali richiesti da tale passaggio. Si è inoltre scelto di ricorrere all'opzione TFCE di *randomise* per la sogliatura sulle immagini statistiche: tale approccio è più robusto rispetto alle sogliature cluster-based e permette di non dover fissare una soglia arbitraria iniziale per la segmentazione dei cluster. Si è inoltre deciso di utilizzare le mappe dei p-value corretti per la multiple comparison, con correzione del Family Wise Error (per maggiori dettagli vedere Appendice A).

In uscita dal programma *randomise* si ottengono matrici 3-D aventi le dimensioni dettate dallo standard MNI152, ossia 182x218x182, su cui è stata effettuata l'operazione di normalizzazione. In un primo momento, ad ogni processo TBSS relativo ad

un dato indice si sono ottenute le mappe relative al test statistico nei due vers, ossia una mappa delle aree dove l'indice è maggiore nei controlli rispetto ai bipolari e una mappa delle aree dove l'indice è maggiore nei bipolari rispetto ai controlli, nonché le rispettive mappe dei complementari dei p-value, direttamente proporzionali al grado di significatività della decisione statistica.

Per i risultati TBSS relativi ad ogni indice sono state quindi identificate le aree dove l'indice subisce variazioni significative fra i gruppi, espresse sia come numero di voxel risultati positivi al test statistico, sia come valore ottenuto normalizzando il conteggio dei voxel attivi rispetto al numero di voxel identificati come scheletro di FA medio, che si identifica come rappresentativo della struttura della materia bianca nella sua totalità (vedere Tabella 4.2). Tali conteggi si ottengono sia a livello *whole brain* sia a livello singole regioni cerebrali (*Region of Interest*, ROI) grazie alla mappatura fornita dallo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels¹. Per le elaborazioni sulle mappe risultanti dall'analisi TBSS si è utilizzato il programma MATLAB R2009a con l'impiego del toolbox NIFTI_20110921 [37] per poter convertire i file Nifti in strutture manipolabili. Le immagini relative ai p-value corretti per la multiple comparison sono state sogliate in un primo momento al 5% (p-value<0.05).

4.1.2 Risultati dei test statistici

I test statistici, per la cui descrizione in dettaglio si rinvia a Appendice A, sono stati condotti secondo lo schema che segue: t test a due gruppi disaccoppiati per il confronto separato fra controlli e bipolari per tutti gli indici di diffusione precedentemente calcolati e successiva elaborazione dei risultati con estrazione dell'informazione effettiva sul potere discriminante riconducibile ad ogni singolo indice. Selezionati gli indici maggiormente informativi, si sono poi condotti test statistici considerando anche le covariate di età e sesso. Un ultimo test permette di valutare la correlazione fra la variazione degli indici di diffusione e l'avanzare dell'età.

Analisi whole brain

Con le condizioni di lavoro precedentemente introdotte si sono quindi calcolate le aree significativamente alterate per ogni indice e per l'area intersezione, definita come area dove variano contemporaneamente tutti gli indici in analisi (vedi Tabella 4.2). In questo conteggio non sono stati inseriti i valori di alterazione di Axial Diffusivity poichè questo parametro non identifica variazioni significative al confronto sani versus bipolari. Questo è risultato di rilievo nella caratterizzazione del tipo di alterazione legata alla sindrome bipolare, vedere Discussione.

¹Atlante stereotassico che riporta 48 distinte regioni cerebrali della materia bianca.

Controlli versus Bipolari		
$p < 0.05$	Conteggio	Conteggio norm (%)
FA ↓	80622	57.11
MD ↑	81372	57.64
RD ↑	91597	64.88
VR ↑	73957	52.38
RA ↓	69849	49.48
Intersezione	40866	28.95

Tabella 4.2: *Conteggi voxel attivi al test statistico: aree significativamente diverse fra controlli e bipolari per i diversi indici e per le aree intersezione dei 5 indici. I simboli ↑ e ↓ indicano rispettivamente aumento e calo dell'indice da controlli a bipolari.*

I risultati dei test hanno permesso di individuare un'abbassamento dell'indice di FA nei soggetti bipolari, risultato concorde con la letteratura scientifica [6, 26, 38]. Coerentemente anche l'indice di RA subisce una diminuzione nei soggetti patologici, mentre gli indici di MD, VR e RD subiscono un incremento [38, 39]: tale comportamento è atteso poichè questi indici sono rappresentativi del contributo dei processi diffusivi che si svolgono perpendicolarmente alla direzione di propagazione della fibra, e quindi un loro aumento può essere legato ad un'alterazione delle componenti trasverse del processo diffusivo. Risulta evidente che se le componenti trasverse aumentano, ossia aumenta il processo diffusivo sul piano ortogonale a quello di propagazione della fibra, questo implica che si abbia alterazione delle pareti e in generale della funzionalità strutturale della fibra.

Si è posto a questo punto il seguente quesito: avendo a disposizione un numero così elevato di indici, esistono indici più "informativi" di altri? O meglio, esistono indici che presentano comportamento indipendente, posta l'osservazione che se indici diversi individuano le stesse aree e con lo stesso andamento, non si ha perdita di informazione qualora si ricorra all'impiego di uno solo dei due indici? Per risolvere questi quesiti si sono quindi indagate le relazioni reciproche fra i risultati TBSS dei singoli parametri sotto analisi attraverso il calcolo degli indici di correlazione di Pearson per tutte le coppie di parametri di diffusione, eccezion fatta ovviamente per la Axial Diffusivity, ed è stato osservato come alcuni indici siano altamente correlati fra loro, pertanto recanti informazioni molto simili (vedere Tabella 4.3). Si evince infatti che gli indici di VR ed RA sono molto correlati all'indice di Fractional Anisotropy, mentre risultano scarsamente correlati all'indice di Mean Diffusivity, quindi essendo il loro andamento molto simile vengono scartati dal novero degli indici maggiormente discriminanti. Inoltre l'indice di RA è una misura di anisotropia molto simile per definizione alla Fractional Anisotropy, quindi risulterebbe ridondante annoverare entrambe nel medesimo studio. Per quanto riguarda la Radial Diffusivity la situazione è opposta: questa risulta infatti correlarsi con buona percentuale all'indice di MD e

Correlazioni di Pearson (%)					
Indice	FA	MD	RD	VR	RA
FA	—	23.23	66.89	71.46	92.48
MD	86.74	—	78.68	21.03	3.44
RD	96.26	99.84	—	47.23	46.04
VR	99.36	86.64	94.95	—	64.25
RA	99.93	73.53	89.39	99.16	—
(1-p)(%)					

Tabella 4.3: *Indici di correlazione di Pearson e relativi valori medi di (1-p).*

meno all'indice di FA. Quest'ultima considerazione permette quindi di evidenziare che tutti gli indici studiati che presentano elevata correlazione con FA hanno bassa correlazione con MD o viceversa, non evidenziando quindi un comportamento indipendente: i soli indici risultati significativi da questa analisi sono pertanto la Fractional Anisotropy e la Mean Diffusivity. Tuttavia questi indici recano informazioni sul processo diffusivo nella globalità, ossia combinando l'informazione di tutte le componenti spaziali, aspetto che può essere identificativo di più condizioni fisiologiche. Ad esempio, con riferimento alla definizione matematica, ad FA molto elevata può corrispondere sia un elevato grado di anisotropia e quindi valori dell'autovalore principale maggiori rispetto agli autovalori secondari, riconducibile ad un aspetto fisiologicamente più probabile di maggior diffusione lungo la direzione di propagazione della fibra e presumibilmente di integrità della struttura, sia un aumento simultaneo di tutti e tre gli autovalori, condizione ben più complessa dal punto di vista biologico. Analogamente accade per MD dove un aumento dell'indice può non essere indotto dal solo aumento degli autovalori secondari, che andrebbe a individuare un incremento del processo diffusivo solo sul piano ortogonale alla direzione di propagazione della fibra, ma congiuntamente anche un aumento dell'autovalore principale, anche questa situazione da doversi chiarire dal punto di vista clinico. Inoltre un aumento di MD per l'aumento simultaneo degli autovalori non implica necessariamente che si abbia un aumento di FA, anzi sperimentalmente si verifica che ad incrementi di MD si misurino diminuzioni di FA. Diventa perciò necessario accompagnare questi parametri con indici che siano singolarmente legati alle diverse direzioni spaziali del processo diffusivo, pertanto si reintroducono gli indici di Axial Diffusivity per l'informazione sull'entità del processo diffusivo in direzione longitudinale alla fibra e l'indice di Radial Diffusivity per quanto riguarda l'informazione sull'entità del processo diffusivo sul piano ortogonale. La scelta di questi quattro indici trova inoltre riscontri anche in letteratura [40]. Per tali motivazioni si è quindi deciso di proseguire l'analisi statistica per i soli indici di FA, MD, RD e AD i cui risultati dei conteggi sui pixel attivi al test statistico sono riassunti in Tabella 4.4. Tuttavia le aree di alterazione degli indici sono piuttosto diffuse: per poter au-

Livello di significatività $p < 0.05$		
Indice	conteggio norm (%)	p medio (%)
FA ↓	57.11	0.65 ± 0.2
MD ↑	57.64	0.75 ± 0.3
RD ↑	64.88	0.51 ± 0.3
FAMDRD	39.52	—
Livello di significatività $p < 0.01$		
Indice	conteggio norm (%)	p medio (%)
FA ↓	47.34	0.15 ± 0.2
MD ↑	47.14	0.19 ± 0.3
RD ↑	57.18	0.11 ± 0.2
FAMDRD	28.48	—

Tabella 4.4: *Conteggi di FA, MD, RD e area intersezione degli indici normalizzati secondo l'area dello scheletro di FA medio con relativi valori di p-value medi. I simboli ↑ e ↓ indicano rispettivamente aumento e calo dell'indice da controlli a bipolari.*

mentare il grado di selettività del test si è quindi abbassata la soglia sui valori di p ad un valore del 1%, ottenendo i risultati presentati in Tabella 4.4 e negli screenshot di Figura 4.1.

L'indice di RD presenta valore di significatività più elevato rispetto agli altri indici, quindi individua aree con grado di precisione statistica maggiore, risultato concorde se si valuta il confronto delle percentuali a diversi livelli di significatività dove si ha un abbassamento dei conteggi delle aree di RD di solo il 7%, contro il 10% per FA e MD. D'altra parte l'indice che presenta valori di significatività inferiori è l'indice di Mean Diffusivity: si riconferma valida la scelta dell'indice di RD, poichè porta informazione molto legata a quella di MD, ossia l'informazione media dei processi diffusivi, ma con maggior precisione. Gli indici inoltre subiscono alterazioni rispetto allo scheletro di FA medio con percentuali sostanzialmente simili, sebbene non vadano ad individuare le medesime regioni: l'area intersezione dei tre indici si riduce quasi del 50%. Questa considerazione viene inoltre validata dalla visualizzazione dei risultati per mezzo della GUI *fslview*, di cui si riportano in Figura 4.1 alcuni screenshot delle viste di riferimento. Come evidenziato negli screenshot, l'indice che individua aree di alterazione più ampie è RD, soprattutto localizzate nelle regioni inferiori del cervelletto e del lobo occipitale. Esistono poi diverse regioni in cui variano solamente gli indici di RD e FA: una molto ampia è localizzata nell'emisfero sinistro, mentre un'ulteriore regione si situa nel lobo frontale sinistro (vedere Figura 4.1). Per quanto riguarda le regioni dove si individuano variazioni in tutti gli indici, queste si ritrovano nelle regioni più profonde e prevalentemente nella porzione anteriore dell'encefalo, nel lobo frontale.

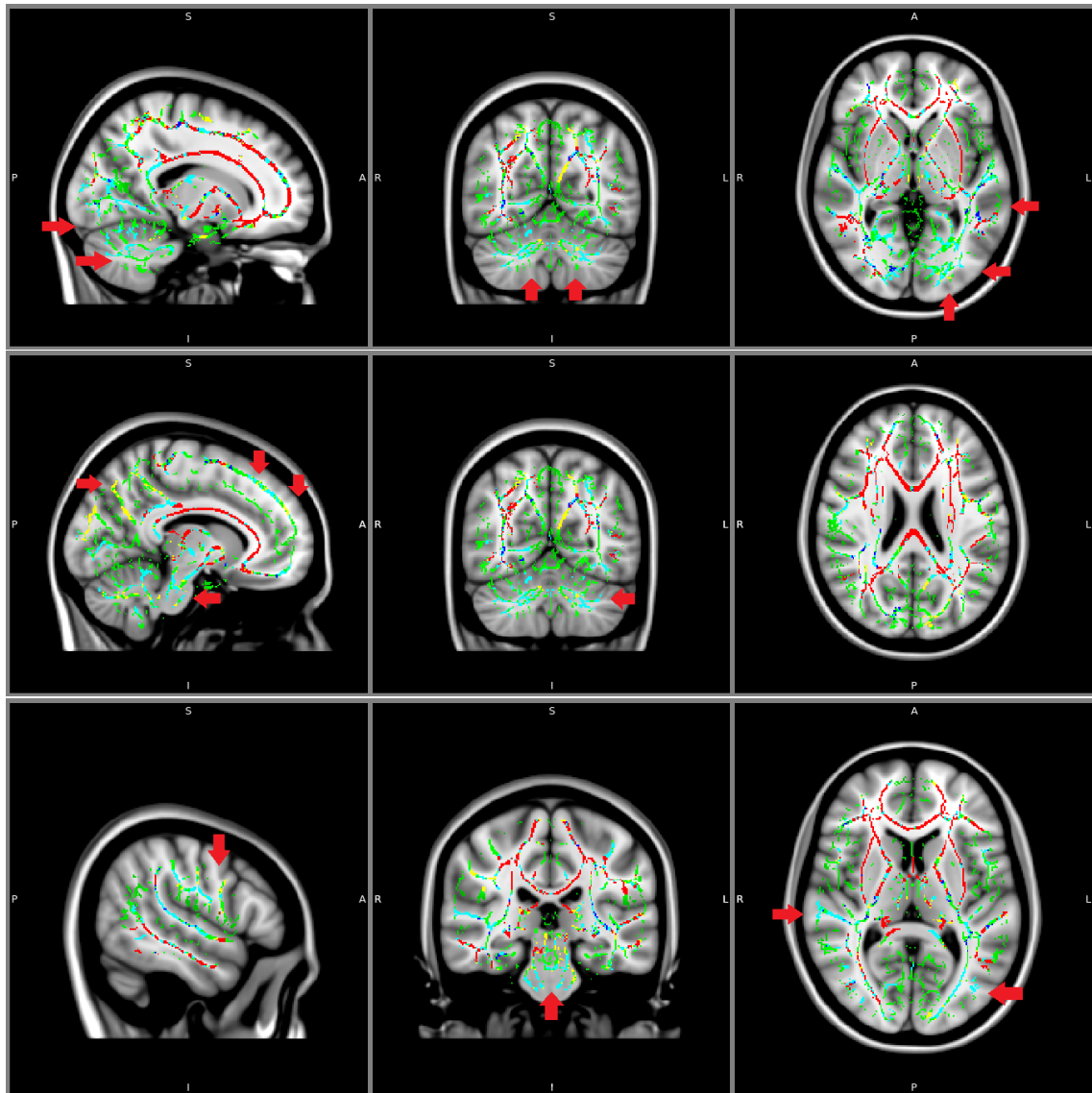


Figura 4.1: Screenshot di *fslview* relativi alle posizioni individuate rispettivamente dalle seguenti coordinate anatomiche $(x,y,z)=(73,66,72)$, $(100,66,95)$, $(37,98,80)$. In rosso le aree dove variano simultaneamente tutti gli indici e in verde lo scheletro di FA medio. Le frecce in rosso evidenziano le zone dove variano singolarmente gli indici: in blu il solo indice MD, in giallo solo FA, in azzurro solo RD. L'atlante stereotassico di riferimento è il MNI152 T1 con risoluzione di 1 mm, il medesimo utilizzato nella registrazione non lineare della procedura TBSS.

Livello di significatività $p < 0.05$		
Indice	conteggio norm (%)	p medio (%)
FA ↓	62.53	0.46 ± 0.5
MD ↑	51.71	0.13 ± 0.89
RD ↑	67.20	0.09 ± 0.93
FAMDRD	39.40	—
Livello di significatività $p < 0.01$		
Indice	conteggio norm (%)	p medio (%)
FA ↓	52.29	0.07 ± 0.2
MD ↑	40.59	0.13 ± 0.2
RD ↑	57.27	0.09 ± 0.2
FAMDRD	29.26	—

Tabella 4.5: *Analisi statistica con covariate di età e sesso. Conteggi di FA, MD, RD e area intersezione degli indici normalizzati secondo l'area dello scheletro di FA medio e relativi valori di p-value medi. I simboli ↑ e ↓ indicano rispettivamente aumento e calo dell'indice da controlli a bipolari.*

Azione delle covariate e analisi ROI-based

Come già osservato in precedenza in Tabella 3.1, il dataset fornito risulta essere eterogeneo sia in composizione maschi/femmine, soprattutto nel gruppo dei bipolari dove tale rapporto è di 9:25, sia per quanto riguarda il fattore età media dei soggetti dei due gruppi, con una differenza fra le due medie di 10.3 anni, con l'età media dei soggetti sani di 38.9 anni mentre quella dei pazienti bipolari pari a 49.2. Si è quindi deciso di condurre nuovi test statistici dove valutare l'influenza dei fattori di età e sesso nelle alterazioni degli indici, includendole come covariate dei test statistici. I risultati sono presenti in Tabella 4.5 e si osserva come anche qui le percentuali non varino in modo significativo, anche se l'inclusione degli effetti di disturbo nell'analisi statistica permette di individuare maggiori aree di alterazione degli indici, aumentando le percentuali dei conteggi.

Dall'osservazione dei risultati per mezzo della GUI fslview è possibile constatare in prima battuta come le alterazioni degli indici si concentrino in determinate regioni cerebrali (*Region of Interest*, ROI), in particolare: il corpo calloso (genu, corpo e in parte splenium), corona radiata anteriore, superiore e in parte posteriore (soprattutto sinistra), fascicolo longitudinale superiore e fascicolo fronto-occipitale superiore, come mostrato in Figura 4.2, Figura 4.3 e Figura 4.4.

Effettuati poi i conteggi dei pixel di alterazione sullo scheletro di FA medio a livello delle singole ROI, è possibile confermare le considerazioni precedenti nonché quantificare le percentuali d'alterazione per ogni ROI, come riassunto in Tabella 4.6. Come osservato precedentemente, l'area intersezione degli indici è ben ridotta rispetto alle variazioni dei singoli indici. In Tabella 4.7 è possibile valutare in quali regioni i singoli indici presentino variazioni maggiori e in quale percentuale. Si può

Label	Denominazione	Totale*	Alterate	(%)
6	fornice	177	166	93.8
4	tronco del corpo calloso	3155	2858	90.6
3	genu del corpo calloso	1843	1590	86.3
24	corona radiata anteriore L	1703	1395	81.9
23	corona radiata anteriore R	1672	1316	78.7
44	fascicolo fronto-occipitale superiore L	88	65	73.9
43	fascicolo fronto-occipitale superiore R	85	62	72.9
26	corona radiata superiore L	1314	926	70.5
34	capsula esterna L	1473	1000	67.9
18	braccio anteriore della capsula interna L	764	489	64.0
33	capsula esterna R	1295	805	62.2
25	corona radiata superiore R	1311	777	59.3
17	braccio anteriore della capsula interna R	791	446	56.4
28	corona radiata posteriore L	760	426	56.1
39	fornice/stria terminalis R	259	135	52.1
27	corona radiata posteriore R	828	425	51.3
46	fascicolo uncinato L	49	24	49.0
20	braccio posteriore della capsula interna L	888	433	48.8
35	giro cingolato R	381	171	44.9
40	fornice/ stria terminale L	303	124	40.9
42	fascicolo longitudinale superiore L	1420	577	40.6
5	splenio del corpo calloso	2422	984	40.6
15	penducolo cerebrale R	608	231	38.0
19	braccio posteriore della capsula interna R	925	316	34.2
41	fascicolo longitudinale superiore R	1467	490	33.4
16	penducolo cerebrale L	624	170	27.2
29	radiazione talamica posteriore R	1131	284	25.1
45	fascicolo uncinato R	45	10	22.2
31	striato sagittale R	598	94	15.7
36	giro cingolato L	412	58	14.1
32	striato sagittale L	454	58	12.8
21	parte retrolenticolare della capsula interna R	753	91	12.1
22	parte retrolenticolare della capsula interna L	695	68	9.8
30	radiazione talamica posteriore L	1081	75	6.9
37	ippocampo R	255	17	6.6

Tabella 4.6: *Tabella con indice di individuazione delle ROI con relativo nominativo nello standard JHU ICBM-DTI-81 White Matter Labels, conteggi dei pixel relativi allo scheletro di FA medio, conteggi dei pixel di alterazione degli indici e percentuale dell'alterazione delle singole ROI ordinate in modo decrescente.* Conteggi di scheletro di FA medio per una data ROI.*

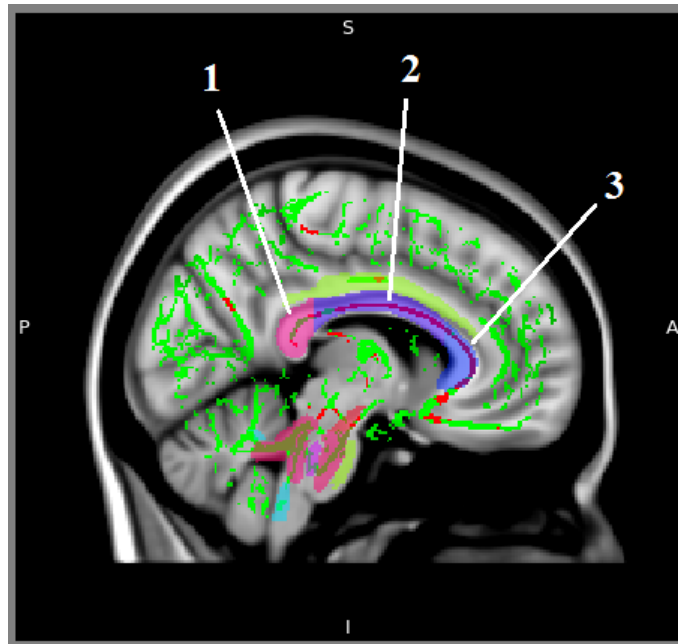


Figura 4.2: Aree di alterazione degli indici fra i gruppi con introduzione delle covariate di età e sesso relative alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(83,115,83)$, vista sagittale. Le ROI sono visualizzate secondo lo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels. In rosso le aree alterate e in verde lo scheletro di FA medio. Legenda:1. Splenium del corpo calloso, 2. Corpo calloso, 3. Genu del corpo calloso.

Regione	totale*	alterazione	(%)
Fractional Anisotropy (in diminuzione)			
fascicolo fronto-occipitale superiore L	88	87	98.9
giro cingolato R	381	375	98.4
giro cingolato L	412	405	98.3
tronco del corpo calloso	3155	3089	98.0
genu del corpo calloso	1843	1775	96.3
Radial Diffusivity (in aumento)			
fornice	177	177	100
tronco del corpo calloso	3155	3094	98.1
genu del corpo calloso	1843	1794	97.3
giro cingolato R	381	365	95.8
corona radiata anteriore L	1703	1595	95.6
Mean Diffusivity (in aumento)			
fornice	177	174	98.3
tronco del corpo calloso	3155	2893	91.7
genu del corpo calloso	1843	1629	88.4
corona radiata anteriore R	1672	1452	86.8
corona radiata anteriore L	1703	1463	86.0

Tabella 4.7: Alterazioni ROI-based dei singoli indici. * Conteggi di scheletro di FA medio per una data ROI.

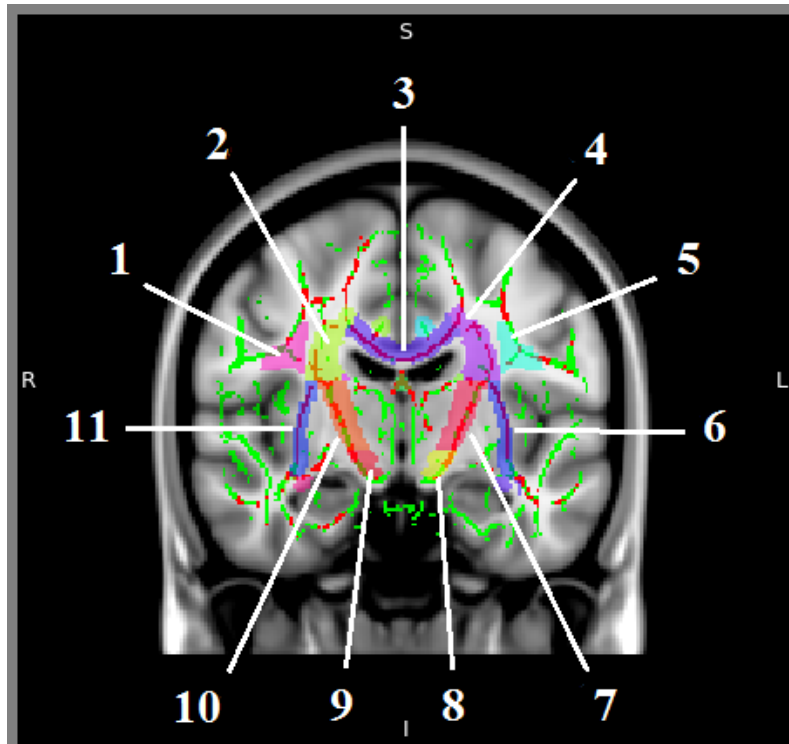


Figura 4.3: Aree di alterazione degli indici fra i gruppi con introduzione delle covariate di età e sesso relative alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(83,115,83)$, vista frontale. Le ROI sono visualizzate secondo lo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels. In rosso le aree alterate e in verde lo scheletro di FA medio. Legenda: 1. fascicolo longitudinale superiore R, 2. corona radiata superiore R, 3. tronco del corpo calloso, 4. corona radiata superiore L, 5. fascicolo longitudinale superiore L, 6. capsula esterna L, 7. braccio posteriore della capsula interna L, 7. parte retrolenticolare della capsula interna L, 8. penducolo cerebrale R, 9. penducolo cerebrale L, 10. braccio posteriore della capsula interna R, 11. capsula esterna R.

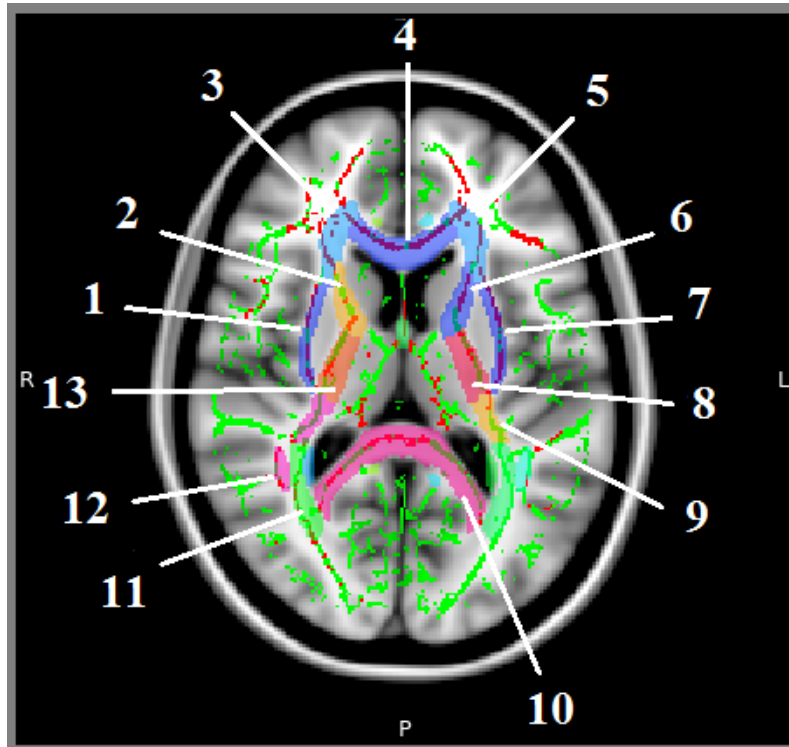


Figura 4.4: Aree di alterazione degli indici fra i gruppi con introduzione delle covariate di età e sesso relative alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(83,115,83)$, vista trasversale. Le ROI sono visualizzate secondo lo standard JHU ICBM-DTI-81 White-Matter Labels. In rosso le aree alterate e in verde lo scheletro di FA medio. Legenda: 1. capsula esterna R, 2. braccio anteriore della capsula interna R, 3. corona radiata anteriore R, 4. genu del corpo calloso, 5. corona radiata anteriore L, 6. braccio anteriore della capsula interna L, 7. capsula esterna L, 8. braccio posteriore della capsula interna L, 9. parte retrolenticolare della capsula interna L, 10. splenio del corpo calloso, 11. radiazione talamica posteriore R, 12. fascicolo longitudinale superiore R, 13. braccio posteriore della capsula interna R.

Correlazione età-alterazioni indici nei soggetti bipolari		
	p<0.05	p<0.01
Indice	Conteggi* (%)	Conteggi* (%)
FA	-30.41	-8.78
MD	33.21	10.47
RD	40.78	25.74
FAMDRD	17.31	2.67

Tabella 4.8: *Conteggi a diversi livelli di significatività delle correlazioni fra età ed alterazioni dei singoli indici. * normalizzazione secondo scheletro di FA medio.*

quindi ritrovare il corpo e il genu del corpo calloso fra le ROI maggiormente alterate nei tre indici e osservare come gli indici di RD e MD individuino sostanzialmente le medesime regioni, sebbene RD con percentuali di alterazione più elevate.

Correlazione età e alterazione degli indici

Come già osservato nell'Introduzione, con l'avanzare dell'età si verifica un lento ma progressivo decadimento della connettività strutturale: andamento atteso è che FA decresca (correlazione negativa), mentre RD e MD aumentino (correlazione positiva)[41]. Si è inoltre osservato come nei due pool di soggetti vi sia un ampio range d'età: da 20 a 61 anni per i controlli e da 33 a 63 anni per i pazienti bipolari. Si è quindi deciso di progettare un ulteriore test, condotto con le medesime condizioni di lavoro precedenti, ossia con livello di significatività $p > 0.05$ e correzione per la multiple comparison, per valutare le correlazioni degli indici in funzione della variabile età all'interno dei due gruppi. Lo scopo infatti è quello di individuare aree più soggette alla variazione delle proprietà diffusive con l'avanzare dell'età. Il gruppo dei controlli non dà risultati significativi per quanto riguarda questo test, mentre i risultati per il gruppo dei bipolari sono riportati in Tabella 4.8. I risultati ottenuti sono coerenti con quanto appena esposto, in quanto i soggetti bipolari presentano numero di soggetti con età superiore a 50 anni pari a 18, mentre i controlli solamente in numero di 9. Fermo restando che tali risultati andrebbero validati su un dataset più omogeneo per quanto riguarda l'età, dove la differenza dell'età media fra i due gruppi sia maggiore e i valori di standard deviation sull'età medie inferiore, abbassando nuovamente il livello di significatività a $p < 0.01$, è possibile osservare comunque come le zone maggiormente soggette all'alterazione degli indici in funzione dell'età siano ben localizzate nelle regioni più profonde dell'encefalo in particolare corpo calloso, capsula esterna sinistra e destra, nonché nel braccio posteriore della capsula interna destra (vedere Figura 4.5).

Regione	totale*	correlazione**	(%)
Fractional Anisotropy			
negativa			
braccio posteriore della capsula interna R	925	604	65.3
braccio posteriore della capsula interna L	888	496	55.9
corona radiata superiore L	1314	662	50.4
corona radiata superiore R	1311	635	48.4
capsula esterna L	1473	620	42.1
Radial Diffusivity			
positiva			
capsula esterna L	1473	1026	69.6
capsula esterna R	1295	896	69.2
corona radiata anteriore L	1314	871	64.5
genu del corpo calloso	1843	1184	64.2
braccio posteriore della capsula interna R	925	594	64.2
Mean Diffusivity			
positiva			
capsula esterna L	1473	859	58.3
radiazione talamica posteriore R	1131	655	57.9
capsula esterna R	1295	749	57.8
genu del corpo calloso	1843	886	48.1
corona radiata anteriore R	1703	658	41.5

Tabella 4.9: Conteggi dei pixel per ROI dove si ha maggior percentuale di correlazione significativa fra età e alterazione dei singoli indici. * Conteggi di scheletro di FA medio per una data ROI. ** Conteggi dei pixel con risultati positivi al test di correlazione.

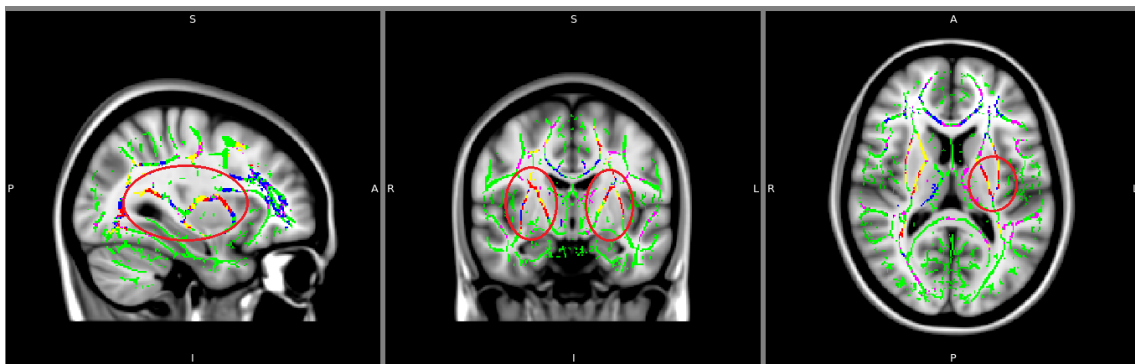


Figura 4.5: Screenshot relativo alla posizione di coordinate anatomiche $(x,y,z)=(58,117,84)$. In rosso le aree di correlazione con l'età per tutti gli indici, in blu per il solo indice di Mean Diffusivity, il giallo per Fractional Anisotropy e in magenta Radial Diffusivity.

	controlli	bipolari
numero	9	9
età (SD)	47.7 (6.9)	47.6 (7.9)
sexo (M:F)	4:5	4:5

Tabella 4.10: *Dataset utilizzato per l'analisi trattografica.*

4.2 Analisi trattografica

La trattografia è valido strumento per la visualizzazione e caratterizzazione dell'architettura della materia bianca. Nel Capitolo 2.3, si evidenziano i vantaggi che la trattografia di tipo probabilistico presenta rispetto la trattografia deterministica. In questo lavoro le ROI candidate all'analisi trattografica sono state selezionate fra le regioni con percentuali maggiori di alterazione nello studio TBSS. La generazione delle mappe di probabilità dei tratti vengono condotte per mezzo del software FSL su un sottoinsieme del dataset originale, opportunamente selezionato per omogeneità in sesso ed età.

4.2.1 Metodo

L'analisi multi-soggetto TBSS ha permesso di localizzare con precisione dove la materia bianca presenti delle alterazioni nel comportamento diffusivo, osservazione che si traduce in un'alterazione delle proprietà strutturali e funzionali delle fibre. Dai conteggi sui pixel risultati positivi ai test di alterazione degli indici (vedi Tabella 4.6) è emerso che le regioni più alterate sono la fornice, il corpo calloso nella sua parte anteriore (genu) e centrale, la corona radiata anteriore sinistra e destra. Queste regioni diventano pertanto ottime candidate per l'analisi trattografica. La fornice e il corpo del corpo calloso vengono esclusi dalla selezione per motivi complementari: la prima è una ROI di piccole dimensioni, dove il conteggio di pixel alterati su pixel totali di materia bianca può facilmente salire, mentre la seconda è una ROI molto ampia e in posizione centrale: la generazione del tratto porterebbe a coprire l'intero volume cerebrale, condizione scarsamente informativa per la caratterizzazione delle lesioni. Pertanto volendo condurre l'analisi trattografica sulle sole ROI che presentassero percentuali significative di alterazione degli indici, la scelta ricade sulle regioni di genu del corpo calloso e corona radiata anteriore sinistra. Il pool scelto per la generazione delle mappe di probabilità è stato opportunamente selezionato per età e sesso e comprende un totale di 18 soggetti (vedere Tabella 4.10). La procedura necessaria per ottenere le mappe di probabilità per mezzo del software FSL si costituisce di più fasi, riassunte in Tabella 4.11. Per la generazione delle mappe di probabilità, la procedura richiede il voxel o il set di voxel da cui far partire la dis-

Step FSL	
bedpostX	Generazione delle distribuzioni dei parametri di diffusione
probtrackX	Determinazione delle distribuzioni di probabilità dei tratti
fnirt	Normalizzazione su standard MNI152
fslmaths	Sogliatura su intensità massima relativa

Tabella 4.11: *Passaggi principali per trattografia probabilistica.*

tribuzione dei tratti: in questa tesi è stato scelto di ricorrere ai voxel risultati alterati negli indici di diffusione per ogni ROI d'interesse, opportunamente riportati negli spazi nativi dei singoli soggetti per essere elaborati dal pacchetto software dedicato di FSL. Ottenuti quindi gli output della trattografia probabilistica, questi vengono riportati nello standard MNI152 per mezzo di registrazione nonlineare con interpolazione nearest neighborhood, la quale richiede tempi computazionali più rapidi al confronto con altri metodi di interpolazione. Le mappe vengono quindi sogliate al 2.5% del massimo valore d'immagine con lo scopo di escludere valori outliers. La scelta di tale valore per la segmentazione delle immagini è legata sia al fatto che tale valore è consigliato in letteratura sia al fatto che fra i risultati che si presentano all'indagine visiva per diverse sogliature, fra cui al 0.5%, 1% e 5%, la soglia al 2.5% permette di essere un buon compromesso fra conservatività e selettività sugli outliers. Con questi risultati si sono estratte le statistiche dei due gruppi per le mappe parametriche dello scheletro di FA relativo ad ogni soggetto appartenente al dataset selezionato e progettato un test di Student per valutare se esistano delle differenze significative fra i due gruppi per le ROI candidate.

4.2.2 Risultati dell'analisi trattografica

Dall'analisi trattografica si ottengono le viste FSL presentate in Figura 4.6 e 4.6. Il test di Student condotto sulle statistiche dei valori dello scheletro di FA dei due gruppi ha permesso di escludere l'ipotesi nulla e quindi permette di asserire che le medie delle distribuzioni dei tratti fra soggetti sani e soggetti bipolari sono statisticamente diverse (con $p < 0.01$) per entrambe le regioni cerebrali in esame. Deve essere considerato come un approccio statistico di questo tipo sia tuttavia di significato limitato in quanto il test si viene a condurre imponendo distribuzione gaussiana sui gruppi e le statistiche si calcolano su immagini cui è stata effettuata una sogliatura basata su metodi empirici. Fermo restando queste considerazioni, il risultato di statistiche significativamente diverse risulta essere risultato coerente con quanto osservato sinora, a riprova del fatto che esistono delle anomalie nei fibre della materia bianca nelle ROI selezionate.

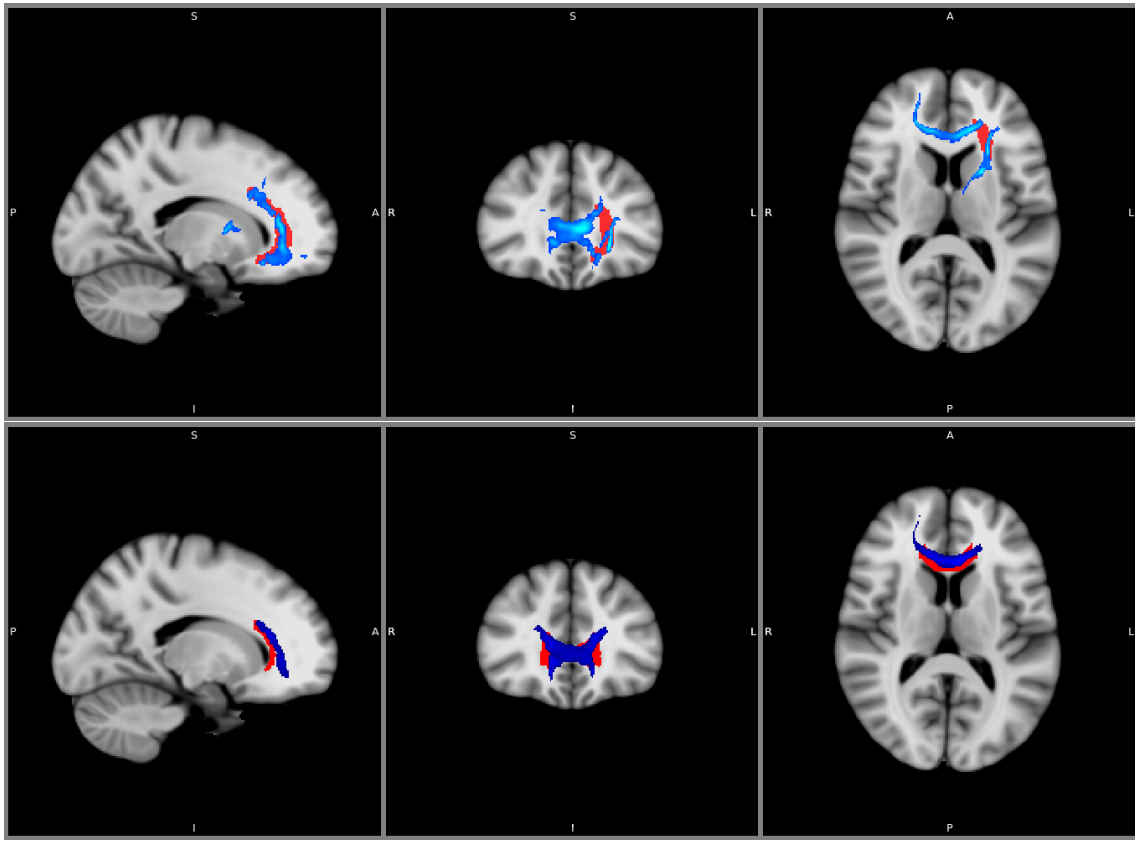


Figura 4.6: *Viste rispettivamente della ricostruzione con trattografia probabilistica di genu e di corona radiata anteriore sinistrae sogliate al 2.5% sui massimi relativi. In rosso le rispettive maschere delle ROI di partenza.*

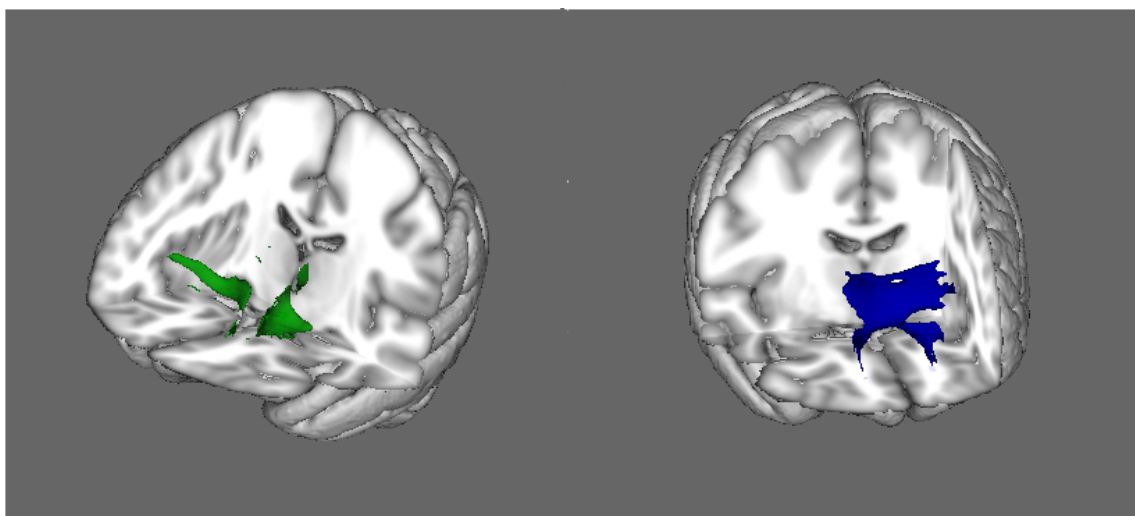


Figura 4.7: *Ricostruzione 3D della trattografia probabilistica delle ROI sotto esame: a sinistra corona radiata anteriore sinistra e a destra il genu del corpo calloso.*

Capitolo 5

Discussione

5.1 Caratterizzazione delle alterazioni

Fissati gli indici di diffusione con i quali proseguire l'analisi statistica, il quadro di alterazione degli indici si presenta chiaro e i risultati riportati sono in linea con la letteratura scientifica: dove esiste variazione significativa fra i due gruppi, l'indice di FA è sempre inferiore nei bipolari, mentre gli indici di RD e MD sempre maggiori.

In questo studio è stato osservato come l'indice di Mean Diffusivity aumenti significativamente nei soggetti bipolari. L'indice di Mean Diffusivity è legato presumibilmente a perdita dell'integrità cellulare oppure a danneggiamento degli scudi di mielina. Tuttavia tale indice sembrerebbe non essere sensibile a perdita di coerenza dei fasci di fibre [52].

Per quanto concerne l'indice di Radial Diffusivity, questo risulta essere in aumento nei soggetti bipolari rispetto ai controlli. L'indice di Radial Diffusivity è una misura di diffusività ostacolata lungo le pareti degli assoni. Dal punto di vista biologico descrive la permeabilità delle membrane degli assoni e quindi viene ad essere una stima indiretta del livello di mielinizzazione. Studi con modelli animali dove si sono manipolati con accuratezza i livelli di mielinizzazione cerebrale hanno mostrato senza ambiguità che la Radial Diffusivity è altamente sensibile a demielinizzazione a livello locale [51].

L'indice di Axial Diffusivity non presenta variazioni significative fra sani e bipolari in questa analisi. Questo risultato è importante in quanto attesta che l'entità del processo diffusivo lungo la direzione della fibra non subisce alterazioni nei soggetti bipolari, quindi le alterazioni del processo diffusivo coinvolgono sostanzialmente le direzioni radiali. Tale indice, che riflette la diffusività libera lungo l'asse dell'assone, ha significato meno chiaro rispetto agli altri indici. Alcuni lavori hanno permesso di asserire che l'indice di AD sia sensibile esclusivamente ai cambi nel flusso degli assoni a causa di traumi in seguito a contusioni e/o passaggio di fasci di fibre [54].

Uno studio sull'espressione genica mostra la sottoregolazione dei geni della mielina nei pazienti affetti da sindrome bipolare. Un altro lavoro ha permesso di supporre che la stima di elevata ereditabilità di RD e la scarsa di AD si traducano in un forte controllo genetico sulle variazioni di RD mentre le differenze intersoggetto in AD siano legati a fattori ambientali [53]. La più alta ereditabilità fra gli indici DTI è stata osservata nella Fractional Anisotropy dove oltre il 50% della variabilità intrasoggetto si esplica in fattori genetici e valori assoluti di FA sono misure molto sensibili dei livelli di mielinizzazione locale, del grado di coerenza delle fibre, della densità neuronale e del diametro medio dell'assone [12].

Un'osservazione interessante è legata al fatto che le aree dove MD varia non siano altro che un sottoinsieme delle aree di alterazione di RD, questo potrebbe suggerire la riduzione ulteriore del numero di indici significativi ai soli indici di diffusione di RD e FA, ma questo rimarrebbe valido per questo particolare studio, dove le alterazioni di AD non sono significative e il significato di MD e RD diventa pressochè simile.

Dalle informazioni dei singoli indici è possibile stabilire che le anomalie strutturali che interessano il gruppo dei soggetti patologici è quindi legata sostanzialmente ad un aumento del processo diffusivo sul piano radiale alla direzione di propagazione della fibra. Come già osservato in precedenza, differenze nei valori di FA nei vari soggetti possono infatti riflettere una moltitudine di patologie della materia bianca, fra cui variazioni nella composizione della mielina, nell'orientazione delle fibre e nella densità di avvolgimento delle fibre della materia bianca stessa [60], alterazioni assoniche in densità, struttura e metabolismo [12]. Tuttavia rimane difficile comprendere se il tipo di anomalia coinvolga principalmente la guaina mielinica o l'intera struttura dell'assone [50], in aggiunta alla possibilità di aumento delle fibre orientate radialmente rispetto alle fibre poste longitudinalmente [50]. Altri studiosi ipotizzano che la dissociazione fra FA e gli altri indici di diffusione potrebbe suggerire l'idea di una ridotta coerenza nei tratti di fibre più che la perdita nell'integrità assonica e della mielina [52]. E' stato inoltre ipotizzato che tali alterazioni riflettano fenomeni di infiammazione locale nei soggetti bipolari [54]. Alterazioni nell'integrità dei rivestimenti assonici sono consistenti con studi post-mortem che mostrano come si presenti una riduzione delle cellule della glia nei soggetti con disturbi comportamentali [45].

5.2 Analisi topologica delle alterazioni

Un ulteriore aspetto da sviluppare congiuntamente al tipo di alterazioni che interessano la materia bianca è dove tali anomalie si localizzano. In questo studio è emerso che le ROI maggiormente alterate sono il genu e il tronco del corpo calloso, la corona radiata anteriore e superiore, la fornice e il fascicolo fronto-occipitale (vedere

Tabella 4.6 di 4.1.2), ossia nelle regioni interemisferica e intra-emisferica del lobo fronto-occipitale. Tali risultati sono coerenti con la letteratura scientifica [47].

La maggior parte degli studi DTI per la sindrome bipolare riporta valori ridotti di FA e incrementati in MD in regioni cerebrali specifiche, in particolare il lobo frontale e prefrontale. I lobi prefrontali sono responsabili delle capacità di organizzazione, del comportamento volontario di valutazione e orientato allo scopo. Anomalie strutturali possono permettere di indagare le basi neurologiche di alcune delle manifestazioni cliniche della sindrome bipolare come la capacità di giudizio alterata e la capacità di prendere decisioni compromessa comuni negli episodi di crisi. Il lobo frontale ha ruolo importante nel controllo delle emozioni e della personalità ed è inoltre coinvolto nel linguaggio, nel giudizio, negli impulsi di controllo e nel comportamento sociale e sessuale [62]. Durante un episodio di mania, i pazienti bipolari manifestano attacchi d'ira e scarso giudizio, parola accelerata, voli di idee privi di coerenza e aumentate le pulsioni sessuali; mentre i pazienti in fase depressiva sono soliti presentare stanchezza cronica, perdita di interesse nelle attività e abbassamento della pulsione sessuale. Pertanto anomalie strutturali, incluse interruzioni della materia bianca del lobo frontale, potrebbero costituire la base neurologica per alcuni di questi sintomi [47].

Il corpo calloso è risultato essere la regione cerebrale maggiormente interessata alla variazione degli indici nei soggetti bipolari. Il corpo calloso è la principale commissura interemisferica e si suddivide in rostro, genu (anteriore), tronco e splenio (posteriore). Il corpo calloso connette la maggior parte delle aree neocorticali, ed è quindi di fondamentale importanza per la neurotrasmissione fra gli emisferi sinistro e destro [47]. Nel normale sviluppo, le dimensioni del corpo calloso aumentano sino a metà della terza decade di vita, e tale aumento riflette principalmente la crescente mielinizzazione delle aree a più alta associazione [52]. La velocità dell'elaborazione interemisferica aumenta con l'età, e si ritiene essere associata con aumento in mielinizzazione e dimensioni del corpo calloso [45]. Inoltre il corpo calloso gioca un ruolo cruciale nelle funzioni cognitive superiori, come le stimolazioni sensomotorie, l'attenzione, eccitazione, linguaggio e memoria [12, 46] e un aumento della mielinizzazione nel corpo calloso si ritiene essere legata ad un incremento delle capacità cognitive durante l'adolescenza [42]. Così una riduzione in mielinizzazione del corpo calloso in pazienti bipolari potrebbe essere dovuta ad un decremento della velocità o dell'entità della comunicazione interemisferica, e causare le anomalie cognitive proprie di questa patologia [42]. E' possibile che la connettività interemisferica alterata da ridotta mielinizzazione callosa sia significativa per i disturbi cognitivi [57] e fisiopatologici del disturbo bipolare [56]. Come già osservato, in questo lavoro si individuano valori di FA inferiori nel corpo calloso dei soggetti bipolari rispetto ai soggetti sani. Contestualmente aumentano i valori di MD e RD, risultato coerente con lavori precedenti

[58, 55, 59]. Altri studi di MRI strutturale hanno inoltre permesso di individuare una riduzione dell'area media del corpo calloso in soggetti bipolari contro i controlli, e un altro studio ha riportato una lunghezza del corpo calloso inferiore nei soggetti bipolari confrontati con soggetti sani. Recentemente è stata rilevata una riduzione marcata del volume totale del corpo calloso nei soggetti bipolari [58], in particolare nelle regioni del genu e nel tronco, coerentemente con i risultati di alterazione degli indici rilevate in questa tesi. Risultati scientifici hanno inoltre suggerito che nella sindrome bipolare vi sia una predisposizione genetica alla formazione di strutture interemisferiche alterate [42].

In questo lavoro l'alterazione degli indici di diffusione interessa anche la corona radiata anteriore. Tale regione appartiene alla famiglia di fibre di proiezione e contiene le fibre degli assoni che collegano la capsula interna con la materia bianca subcorticale. Inoltre la corona radiata è il percorso di fibre che contengono assoni sia ascendenti che discendenti che connettono la corteccia frontale e il tronco encefalico. La corona radiata si associa ai tratti cortico-pontino, cortico-bulbare e spinale e raggiunge i gangli basali attraverso questi percorsi e le alterazioni di tali regioni potrebbero contribuire con le disfunzioni della materia grigia fronto-striatale [49]. Si è postulato che le anomalie nei valori di FA nella corona radiata possano contribuire con le disfunzioni nella materia grigia prefrontale associate con disattenzione, comune nella sindrome bipolare pediatrica e in altre patologie psichiatriche quali sindrome da iperattività e deficit dell'attenzione, e disturbi nella modulazione dell'affettività cruciali nella sindrome bipolare pediatrica [48]. Ulteriore insieme di fibre appartenenti alla famiglia delle fibre di proiezione sono le radiazioni talamiche, anch'esse risultate alterate in questo lavoro, che si trovano nella capsula interna, e il tratto pontino, corticopontino e corticospinale, che passano attraverso la capsula interna. La radiazione talamica superiore si costituisce di fibre talamocorticali che passano attraverso il braccio posteriore della capsula interna, anch'esso avente percentuali di alterazioni significative in questo studio. Queste fibre inviano impulsi sensoriali dal nucleo talamico ventrale al giro post-centrale. Anomalie nella materia bianca della radiazione talamica superiore possono bloccare la trasmissione di questi segnali sensoriali e la loro corretta traduzione nelle risposte motorie attese [42].

In questo lavoro si evidenziano alterazioni degli indici di diffusione nei soggetti bipolari anche in alcune porzioni che interessano le fibre di associazione. Questa famiglia di fibre include il fascicolo uncinato, il fascicolo superiore e inferiore, il fascicolo fronto-occipitale e il cingolo anteriore. Sebbene dall'analisi delle percentuali di alterazione per le diverse ROI vi fossero alterazioni per percentuali sufficientemente elevate (>40%) in molte aree, le percentuali maggiori si sono riportate nel fascicolo fronto-occipitale (~70%), fascicolo uncinato (49%) e giro cingolato (~44%). I fascicoli fronto-occipitali possono essere sottoclassificati in fascicolo fronto-occipitale

superiore e inferiore. Il primo è importante per la consapevolezza dello spazio e l'elaborazione simmetrica e alterazioni in questa zona sono collegate a depressione che interessa l'età adulta e implicate nell'eziologia degli episodi depressivi nei soggetti bipolari [42]. Il secondo collega la corteccia prefrontale con la corteccia visiva e uditiva, così alterazioni in questa regione possono condurre agli episodi di allucinazioni che si riscontrano nei soggetti bipolari. Il fascicolo uncinato si origina da tre convoluzioni temporali anteriori e dall'amigdala per terminare nella corteccia medio orbitale, nel giro retto e nell'area subcallosa. La sua integrità viene studiata nell'intelligenza generica, nell'integrazione della memoria visiva e verbale [44], e funzioni esecutive [43]: danni nei pathway di queste fibre possono condurre a deficit della memoria, facilmente osservabili in pazienti bipolari depressi.

Un ulteriore regione risultata positiva al confronto fra sani e bipolari risulta essere il braccio anteriore della capsula interna. L'alterazione degli indici in tale regione implica connettività strutturale alterata fra i nuclei subcorticali e la corteccia prefrontale [43]. L'attività dello striato e del talamo è modulata dalla corteccia prefrontale, e questo processo sembra essere la chiave per i processi cognitivi di apprezzamento per la ricompensa, elaborazione emozionale e stati d'umore [63]. L'alterazione della connettività fronto-talamica-striatale può quindi contribuire al mantenimento dei deficit funzionali in questi aspetti delle funzioni cognitive, associate non solo con la sindrome bipolare, ma anche con la schizofrenia e altri disturbi dell'affettività [43]. Un interessante studio sull'espressione genica ha permesso di valutare che in soggetti omozigoti per l'allele T del gene della neuroregulina 1 sono stati individuati valori ridotti di FA e densità di materia bianca inferiore nel braccio anteriore della capsula interna se comparati con soggetti omozigoti per l'allele C [61]. Il genotipo TT è stato associato ad un rischio maggiore per psicosi, pertanto sembrerebbe che vi sia una certa predisposizione nei soggetti affetti da sindrome bipolare nel sviluppare anomalie strutturali nella materia bianca.

Il dataset in esame ha permesso in ultima battuta di poter valutare se l'alterazione degli indici fosse legata all'avanzare l'età distintamente nei soggetti sani e nei soggetti patologici. Dai risultati presentati in 4.1.2 è stato possibile constatare come nei soggetti sani, dove si ha un ampio range d'età fra i soggetti, non si registrino correlazioni significative fra alterazioni dei tre indici e il fattore età. Risultati differenti si riportano invece per i soggetti bipolari dove le percentuali di correlazione aumentano consistentemente, sebbene delineando regioni di intersezione ben ridotte ($\sim 2.5\%$ con $p < 0.01$). Le regioni che presentano percentuali di correlazione più elevate per i tre indici sono: la capsula esterna, il braccio posteriore della capsula interna e il genu del corpo calloso. Con questi risultati è possibile supporre che nel progredire della patologia tali aree saranno più soggette a danneggiamento della connettività strutturale.

5.3 Validità dell'approccio sperimentale

I risultati presentati permettono di definire non solo il tipo di alterazioni che si presentano nei soggetti affetti da sindrome bipolare: è infatti possibile caratterizzare, sulla base del tipo di regione interessata, come queste alterazioni possano ricondursi a danneggiamenti nella connettività strutturale correlati con i sintomi comuni di tale patologia.

Tuttavia l'analisi condotta in questa tesi presenta dei fattori limitanti, legati in primis alla composizione del dataset. Come presentato nella sezione 3.1, il dataset è costituito di due pool per un totale di 69 soggetti, ripartiti in numero di 35 soggetti per i controlli e 34 soggetti per i pazienti bipolari. I due gruppi sono confrontabili riunendo un numero quasi identico di soggetti, tuttavia il numero ridotto di soggetti deve essere considerato nella valutazione della forza statistica dello studio in esame. Inoltre i gruppi presentano composizione poco omogenea in età e sesso, con conseguenze sulla consistenza dell'analisi statistica. Infatti con l'avanzare dell'età si verificano fenomeni fisiologici di atrofia cerebrale e alterazione della connettività strutturale, che vanno quindi a confondersi con le alterazioni legate alla patologia bipolare; mentre per quanto riguarda l'eterogeneità maschi:femmine l'encefalo femminile presenta delle diversità rispetto quello maschile, soprattutto in termini dimensionali, che potrebbero alterare l'efficacia del test statistico. Altri aspetti che limitano l'efficacia dell'analisi statistica sono legati alla qualità delle immagini: la risoluzione lungo l'asse longitudinale è di 3 mm da normalizzare su atlante stereotassico a risoluzione di 1 mm, quindi molto viene deciso dalla bontà dell'algoritmo di interpolazione; l'acquisizione con un numero di gradienti di campo magnetico non elevato; un'unica acquisizione non pesata in diffusione quando è preferibile registrare più acquisizioni per ricavarne l'informazione media; la presenza di artefatti anche importanti dovuti alle eddy currents, che non sempre la correzione in pre-processing ha permesso di eliminare completamente. Si deve comunque considerare che le immagini presentano ottima risoluzione sul piano trasversale: sono state acquisite su matrici 256x256 raggiungendo risoluzione inferiore al millimetro.

Se da una parte si ha informazione iniziale discutibile sotto diversi aspetti, dall'altra l'elaborazione dei dati è stata conseguita con un metodo di comprovata validità [26]. Dopo aver effettuato la correzione degli artefatti eddy currents, l'analisi TBSS, come esposto nel dettaglio nel Capitolo 4.1, permette di ottenere immagini confrontabili, normalizzate su atlante stereotassico, e soprattutto di estrarre l'informazione legata alla materia bianca per mezzo di operazione di scheletronizzazione, con il vantaggio di non operare processing sulle immagini che vada ad alterarne il contenuto informativo. I punti di forza dell'analisi statistica condotta con FSL sono stati la scelta della soglia TFCE che permette di ridurre la precarietà del-

l'assunzione di una soglia arbitraria per la segmentazione iniziale dei cluster, e in secondo luogo la possibilità di considerare l'azione delle covariate d'età e sesso nell'analisi statistica. In questo modo si riducono gli svantaggi legati all'eterogeneità del dataset, a favore di un'analisi statistica più attendibile. Si è inoltre sfruttato uno dei limiti del dataset per estrarre informazione utile per l'analisi degli indici di diffusione: osservato infatti che il gruppo dei soggetti bipolari presenta soggetti con un range d'età compreso fra 33 e 63 anni, è stata quindi condotta l'analisi di correlazione fra età e alterazione degli indici.

Per quanto riguarda la validità dei risultati ottenuti, il passaggio da livello di significatività $p < 0.05$ a $p < 0.01$ ha permesso di ridurre ulteriormente i conteggi dei voxel risultati attivi ai test statistici, raggiungendo un livello di precisione statistica superiore. La necessità di poter quantificare l'estensione delle aree di alterazione degli indici ha spinto alla ricerca di una maschera che rappresenti l'intera struttura della materia bianca: ovviamente la scelta ricade sull'immagine dello scheletro di FA medio. Tale scelta è coerente perchè l'analisi statistica TBSS viene condotta sui voxel appartenenti a tale maschera, tuttavia tale approccio presenta delle limiti, legati alla struttura stessa della maschera: essa risulta essere ben inferiore rispetto alla reale estensione della materia bianca (considerato che essa viene ottenuta in seguito ad operazioni di sogliatura sull'immagine, vedere Sezione 4.1). Pertanto i risultati che si raccolgono sono rappresentativi di una certa porzione non nota sulla totalità effettiva di materia bianca.

Una prima parte dei risultati presenti nel Capitolo 4 riporta i valori dei singoli indici di diffusione in esame e si concentra sulla scelta degli indici maggiormente informativi. Questo studio comparativo non trova riscontri in letteratura, dove in genere vengono scelti pochi indici, in numero in genere non eccedente alle tre unità. La decisione di analizzare molti degli indici che la letteratura scientifica offre è dettata dalla volontà di determinare gli indici o la combinazione minima di indici che permetta di condurre analisi statistiche più efficienti, permettendo una caratterizzazione delle alterazioni del processo diffusivo il più precisa possibile. Come già motivato in 4, le modalità di indagine si sono fissate sull'analisi di correlazione fra gli indici con lo scopo di valutare se esistano indici che presentano medesimi andamenti. Da questa analisi gli indici risultati come maggiormente discriminanti sono la Fractional Anisotropy e l'indice di Mean Diffusivity. Tuttavia con l'adozione dei soli indici di FA e MD l'informazione sul processo diffusivo rimane a livello globale: per caratterizzare al meglio il processo diffusivo si rende necessario l'inserimento degli indici di Axial Diffusivity e Radial Diffusivity, rappresentativi dell'entità della diffusione nelle diverse direzioni. La validità della scelta di questi quattro indici trova inoltre riscontro anche in letteratura [40].

La parte dedicata alla trattografia presenta molti aspetti che potrebbero essere

potenziati. In questo lavoro la scelta di un approccio probabilistico è senz'altro da preferirsi rispetto alla trattografia deterministica, tuttavia la scelta di ricorrere a sogliatura a valore arbitrario, sebbene confrontato direttamente sui soggetti in esame e comparato ad altri valori adottati in letteratura, ha sicuramente delle conseguenze sulle elaborazioni finali. La scelta inoltre di valutare la possibilità di differenze significative per mezzo di un semplice t-test potrebbe costituire un approccio troppo debole. Tuttavia l'esito di tale test permette di confermare i risultati ottenuti con l'analisi multisoggetto individuando delle differenze nella distribuzione delle fibre fra sani e bipolari.

Capitolo 6

Conclusioni

La tecnologia Diffusion Tensor Imaging ha permesso di ottenere importanti risultati nel campo della mappatura della connettività strutturale della materia bianca. La possibilità di estrarre indici di diffusione permette di caratterizzare i processi diffusivi che interessano i fasci di fibre neuronali, e quindi di avere una caratterizzazione indiretta della microstruttura della materia bianca. Gli studi sull'integrità strutturale della materia bianca sono fondamentali nell'analisi delle patologie psichiatriche: nei disturbi quali la schizofrenia, l'autismo e la sindrome bipolare si sono infatti rilevati alterazioni nei network della materia riconducibili a sintomi comuni in tali disturbi.

In questa tesi è stata quindi condotta un'analisi che permettesse la caratterizzazione del processo diffusivo nella materia bianca per mezzo dell'estrazione degli indici di diffusione da immagini DTI per un dataset comprendente soggetti sani e bipolari. Attraverso l'elaborazione delle mappe parametriche è stato possibile standardizzare le immagini dei diversi soggetti su un atlante stereotassico unificato e di estrarre lo scheletro della materia bianca. L'analisi statistica condotta su tali immagini ha determinato l'entità delle alterazioni degli indici di diffusione fra il gruppo dei controlli e dei soggetti patologici, e di localizzarne le aree a livello whole brain. Questi risultati hanno quindi consentito di individuare delle lesioni interemisferiche e intra-emisferiche nel lobo fronto-occipitale. Infine una revisione della letteratura scientifica ha permesso di ricondurre queste lesioni ad alcune delle manifestazioni tipiche della sindrome bipolare, quali allucinazioni e alterazioni eutimiche.

Il punto di forza dell'analisi condotta in tale tesi è dato dalla selezione della combinazione ottima degli indici di diffusione. In base alle performance dei diversi indici, grazie a uno studio di correlazione, è stato possibile determinare quali indici fossero maggiormente informativi e permettere una migliore caratterizzazione del processo diffusivo e quindi del tipo di alterazione biologica che interessa la materia bianca.

Allo stato attuale rimane molta incertezza sul tipo di alterazione biologica che

si correla con l'alterazione degli indici, nonché sul legame che si instaura fra questo tipo di lesioni e i sintomi propri delle diverse patologie. Recentemente è stato introdotto un nuovo indice che permette di valutare la coerenza delle fibre [64]: tale indice potrebbe essere confrontato con gli altri indici di diffusione e permettere una caratterizzazione ancor più precisa dell'alterazione biologica delle fibre neuronali.

Una possibile prosecuzione del lavoro condotto in questa tesi sarebbe data dalla caratterizzazione delle alterazioni che interessano i soggetti bipolari dal punto di vista di evoluzione della patologia, avendo a disposizione dati DTI dei pazienti bipolari acquisiti a distanza di determinati archi temporali. In questo modo potrebbero valutare eventuali variazioni nella morfologia della materia bianca nonché quantificare l'azione dei trattamenti farmacologici.

Per quanto riguarda l'analisi trattografica, qui presentata in modo introduttivo, un interessante approfondimento potrebbe essere dato dalla determinazione dei pathway che collegano le diverse ROI risultate positive ai test di alterazione degli indici. Questo studio potrebbe essere importante per valutare quanto i circuiti neuronali siano compressi.

La tecnica di Diffusion Tensor Imaging permette di asserire sulla sola connettività di tipo strutturale, ossia sulla morfologia dell'architettura della materia bianca. Esistono tecnologie innovative, quali Dynamic Causal Modeling (DCM) e Granger Causality Maps (GCM), che permettono di raggiungere un grado di informazione superiore fornendo informazioni sulla connettività effettiva, ossia sui gradi di dipendenza e causalità che si instaurano fra le diverse regioni cerebrali. Questi approcci potrebbero integrare i risultati ottenuti con la tecnica DTI e permettere una caratterizzazione ulteriore delle anomalie che coinvolgerebbero la materia bianca nei soggetti affetti da sindrome bipolare.

Appendice A

Analisi statistica con General Linear Model

L'analisi statistica di immagini DTI permette di effettuare confronti che consentono di estrapolare informazione ad un livello superiore, non legato alle mappe parametriche stesse. In questa tesi è infatti possibile progettare test che determinino le differenze significative fra gli indici nei diversi gruppi, ottenendo quindi mappe statistiche dove ad ogni pixel si associa il risultato del test statistico e il relativo livello di significatività raggiunto, lasciando così il significato biologico relativo al valore che l'indice assumeva in quel dato pixel. In FSL si progettano test statistici ricorrendo a metodi di randomizzazione per garantire elevato grado di significatività del test statistico.

L'approccio General Linear Model (GLM) permette di progettare test statistici di diversa natura e complessità, dal t-test ad un singolo gruppo, per misurare differenze fra misure, al t-test a 2 gruppi, analisi di correlazione semplice e altri. Il vantaggio di tale metodologia è dato dal fatto che la tecnica GLM è di tipo lineare, permettendo di non appesantire i tempi computazionali.

In un contesto GLM si richiede di effettuare il fit dei dati (le mappe parametriche relative ai diversi indici, in questa tesi) secondo un modello lineare così definito

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X}\beta + \varepsilon$$

dove in particolare \mathbf{Y} è la matrice delle misure, \mathbf{X} la matrice di design, β il vettore dei parametri del modello da stimarsi e ε il rumore, supposto teoricamente con le seguenti proprietà: $\varepsilon \sim N(0, \sigma^2\mathbf{I})$, addittivo e a campioni scorrelati.

Per ottenere i parametri stimati $\hat{\beta}$ è possibile ricorrere ad uno stimatore lineare quale minimi quadrati LLS

$$\hat{\beta} = (\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T\mathbf{Y} \quad (1)$$

Mentre i residui $\hat{\varepsilon}$ si calcolano

$$\hat{\varepsilon} = \mathbf{Y} - \mathbf{X}\hat{\beta} \quad (2)$$

La matrice di design \mathbf{X} riporta tante righe quante il totale dei campioni del test statistico (il numero di mappe parametriche su cui effettuare il test, coincidente con il numero di soggetti) e tante colonne quante sono le variabili effect e le variabili di disturbo, assunte indipendenti fra di loro. Per variabili effect si intendono le variabili su cui si intende ottenere inferenza col test statistico, in questa sede il valore degli indici nei diversi gruppi, mentre per variabili di disturbo, si intendono variabili che vengono introdotte per affinare il risultato del test, come è stato fatto con l'introduzione della covariata dell'età e del sesso.

Per poter condurre un test statistico è necessario fissare un'ipotesi nulla H_0 la quale verrà accettata o rifiutata al termine del test. In un contesto GLM è necessario quindi introdurre il concetto di vettore *contrasto*: un vettore ad una riga e tante colonne quante le variabili effetto e disturbo presenti nel modello. Tale vettore a elementi interi relativi permette di pesare le diverse variabili e di definire il particolare test da condursi.

Fissato quindi la matrice \mathbf{X} e il vettore contrasto \mathbf{c} (o l'insieme dei vettori contrasto) è possibile eseguire un t-test, in base al modello su esposto considerando una data statistica (fornita in FSL dal metodo di permutazione) e una volta calcolato il valore di t associato e noti i valori dei gradi libertà (dimostra essere pari a $N-p$ dove N è pari al numero dati sul pixel e p il rango di \mathbf{X}) e imposto il livello di significatività α (pari alla probabilità che la distribuzione statistica ecceda una data soglia di confidenza) è possibile accettare o rifiutare l'ipotesi nulla. Assume importanza cruciale il p-value associato alla decisione statistica, pari alla probabilità che la distribuzione statistica superi il t calcolato, in quanto essa viene ad essere misura inversamente proporzionale alla sicurezza della decisione statistica.

Un test statistico si dice esatto se il tasso di falsi positivi (ossia la probabilità che si rifiuti l'ipotesi nulla quando questa è vera, ossia ad esempio si riconoscono aree in cui gli indici sono alterati sebbene questo non si verifichi effettivamente) coincide esattamente con il livello di significatività scelto [34]. In un contesto GLM si raggiunge tuttavia un grado di inferenza approssimato, considerato il fatto che il modello prevede non solo effetti da testare, bensì anche variabili di disturbo e vengono meno le ipotesi di indipendenza fra le variabili stesse. Per poter ridurre questo aspetto si ricorre ad approcci con metodi di randomizzazione che permettono di ridurre la correlazione fra le variabili.

In FSL si ricorre al metodo di randomizzazione di Freeman e Lane [43] per il quale, in base al vettore contrasto, la matrice di design viene suddivisa in effetti da testare e variabili di disturbo. In un primo momento si effettua il fit dei dati sulle sole variabili di disturbo, ottenendo i relativi residui. Questi vengono quindi permutati e ottenuto il segnale di disturbo stimato questo viene aggiunto per ottenere una realizzazione approssimata dei dati sotto l'ipotesi nulla. Tale realizzazione viene

poi reintrodotta nel modello completo e si procede col test statistico. Tale processo viene ripetuto per costruire statistiche sotto l'ipotesi nulla specificata dal contrasto.

Perchè il test possa ritenersi il più possibile "esatto" si dovrebbero considerare tutte le possibili permutazioni (sperimentalmente poco realizzabile: la correlazione semplice con 12 scansioni richiederebbe mezzo miliardo di permutazioni) [34]. Quindi è necessario eseguire un sottoinsieme casuale delle possibili permutazioni, ricorrendo al test di permutazione Monte Carlo, che è in media esatto e rappresentativo dei risultati che si otterrebbero ricorrendo all'esecuzione di tutte le possibili permutazioni.

Infine è possibile controllare l'errore di tipo I, ossia la probabilità del verificarsi di falsi positivi, legato all'ampio numero di test statistici (ossia un test per ogni pixel dell'immagine) con la correzione sul family wise error basata sulla disuguaglianza di Bonferroni.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la prof.ssa Alessandra Bertoldo per avermi dato la possibilità di sviluppare un argomento di mio interesse e la dott.ssa Letizia Squarcina per la disponibilità nel seguire il mio percorso e nel collaborare nelle difficoltà. Ad entrambe devo moltissimi spunti e osservazioni importanti.

Ringrazio inoltre il team di medici del Policlinico G.B. Rossi di Verona: dott.ssa Marcella Bellani, Cinzia Perlini e Gianluca Rambaldelli per il dataset fornito fondamentale per il lavoro di ricerca di questa tesi e per la disponibilità e i preziosi suggerimenti. Un ringraziamento per il vivo interesse riposto in tale lavoro e per gli utili consigli al dott. Paolo Brambilla, Università di Udine.

Ringrazio di cuore i miei genitori perchè con il loro costante sostegno, economico ma soprattutto morale, mi hanno permesso di raggiungere questo importante traguardo. In particolare ringrazio mio padre, mio modello di vita e costante sostenitore. Ringrazio anche Roberta, anche se lei non se l'aspetta.

Un sincero grazie va anche a Nicola per l'effettivo apporto che ha avuto nella risoluzione delle numerose complicazioni iniziali al lavoro di tesi ma soprattutto per la pazienza e per l'amore che ogni giorno mi ha offerto e mi offre.

Bibliografia

- [1] Xekardaki A., Giannakopoulos P., Haller S. (2011). *White Matter Changes in Bipolar Disorder, Alzheimer Disease, and Mild Cognitive Impairment: New Insights from DTI*. Journal of Aging Research, ID286564.
- [2] Giedd J.N. (2004). *Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1021, 77-85.
- [3] Bartzokis G., Beckson M., Lu P.H., Nuechterlein K.H., Edwards N., Mintz J. (2001). *Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study*. Archives of General Psychiatry, 58(5), 461-465.
- [4] Pakkenberg B. and Gundersen, H.J.G. (1997). *Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age*. Journal of Comparative Neurology, 384, 312-320.
- [5] Bengtsson S.L., Nagy Z., Skare S., Forsman L., Forssberg H., Ullén F. (2005). *Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development*. Nature Neuroscience, 8(9), 1148-1150.
- [6] Lim K.O., Helpert J.A. (2002). *Neuropsychiatric applications of DTI - a review*. NMR in Biomedicine, 15, 587-593.
- [7] Basser P.J, Mattiello J., LeBihan D., (1994) *MR Diffusion Tensor Spectroscopy and Imaging*. Biophysical Journal, 66, 259-267.
- [8] Assaf Y., Pasternak O. (2008). *Diffusion Tensor Imaging (DTI)-based White Matter Mapping in Brain Research: A Review*. J. Mol Neurosci, 34, 51-61.
- [9] Dorcas W.X., Lau I.Y., Graham S., Sim K. (2009). *Neurobiological evidence for thalamic, hippocampal and related glutamatergic abnormalities in bipolar disorder: A review and synthesis*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 33, 336-354.
- [10] Dupont R.M., Butters N., Schafer K., Wilson T., Hesselink J., Gillin J.C. (1995). *Diagnostic specificity of focal white matter abnormalities in bipolar and unipolar mood disorder*. Biological Psychiatry, 38, 482-486.

- [11] Lyoo K., Lee H.K., Jung J.H., Noam G.G., Renshaw P.F. (2002). *White matter hyperintensities on magnetic resonance imaging of the brain in children with psychiatric disorders*. *Comprehensive Psychiatry*, 43, 361-368.
- [12] Beaulieu C. (2001). *The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review*. *NMR in Biomedicine*, 15, 435-455.
- [13] Taber K.H., Pierpaoli C., Rose S.E., Rugg-Gunn F.J., Chalk J.B., Jones D.K., Hurley R.A. (2002). *The Future for Diffusion Tensor Imaging in Neuropsychiatry*. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14, 1-5.
- [14] MÄorters P., Peres Y. (2008). *Brownian Motion*, 25-05-2008, disponibile su <http://www.stat.berkeley.edu/~peres/bmbook.pdf>
- [15] Rosenbloom M., Sullivan E.V., Pfefferbaum A. (2003). *Using Magnetic Resonance Imaging and Diffusion Tensor Imaging to Assess Brain Damage in Alcoholics*. *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 27, 146-152.
- [16] Behrens T.E.J. (2004). *MR Diffusion Tractography: Methods and Applications*. Dphil Thesis.
- [17] Hann E.L. (1950). *Spin echoes*. *Phys. Rev.*, 80, 580-594.
- [18] Torrey H.C. (1956). *Bloch equations with diffusion terms*. *Phys. Rev.*, 104, 563-565.
- [19] Stejskal E.O. e Tanner J.E. (1965). *Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of time-dependent field gradient*. *J. Chem. Phys.*, 42, 288-292.
- [20] Chenevert T.L., Welsh R.C. (2004). *Diffusion Tensor MR Imaging*. *Current Protocols in Magnetic Resonance Imaging*, Unit B8.12004.
- [21] Gonzalez R.G., Hirsch J.A., Lev M.H., Schaefer P.W., Schwamm L.H. (2011). *Acute Ischemic stroke*. Springer, 145-151.
- [22] Dong Q., Welsh R.C., Chenevert T.L., Carlos R.C., Maly-Sundgren P., Gomez-Hassan D.M., Mukherji S.K. (2004). *Clinical Applications of Diffusion Tensor Imaging*. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 19, 6-18.
- [23] Agarwal V., Manoj Kumar M., Jitesh K. Singh J.K., Rathore S., Misra R., Gupta R.K. (2008). *Diffusion tensor anisotropy magnetic resonance imaging: a new tool to assess synovial inflammation*. *Oxford Journals, Medicine, Reumatology*, 48(4), 378-382.

- [24] Budde M.D., Janes L., Gold E., Turtzo L.C., Frank J.A. (2011). *The contribution of gliosis to diffusion tensor anisotropy and tractography following traumatic brain injury: validation in the rat using Fourier analysis of stained tissue sections*. Oxford Journals, Medicine, Brain, 134(8), 2248-2260.
- [25] FSL & FreeSurfer Course (2011). *Analysis of Diffusion-Weighted MR Data*, disponibile su: <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fslcourse/>
- [26] Smith S.M., Jenkinson M., Johansen-Berg H., Rueckert D., Nichols T.E., Mackay C.E., Watkins K.E., Ciccarelli O., Cader M.Z., Matthews P.M., and Behrens T.E.J (2006). *Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data*. NeuroImage, 31,1487-1505.
- [27] Ashburner J., Friston K.J. (2000). *Voxel-Based Morphometry—The Methods*. NeuroImage, 11, 805-821.
- [28] Mori S., Zhang J. (2006). *Principles of Diffusion Tensor Imaging and Its Applications to Basic Neuroscience Research*. Neuron, 51, 527-539.
- [29] Behrens T.E.J., M.W. Woolrich M., Jenkinson M., Johansen-Berg H., Nunes R.G., Clare S., Matthews P.M., Brady J.M., Smith S.M. (2003). *Characterization and Propagation of Uncertainty in Diffusion-Weighted MR Imaging*. Magnetic Resonance in Medicine, 50, 1077-1088.
- [30] Bookstein F., (2001). *“Voxel-based morphometry” should not be used with imperfectly registered images*. NeuroImage 14(6), 1454-1462.
- [31] Davatzikos C., (2004). *Why voxel-based morphometric analysis should be used with great caution when characterizing group differences*. NeuroImage 23(1), 17-20.
- [32] Smith S.M., Nichols T.E. (2009). *Threshold-Free Cluster Enhancement: Addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference*. NeuroImage, 44(1), 83-98.
- [33] FMRIB, *FMRIB Software Library - FSL 4.1*, 08-2008, disponibile su: <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/>
- [34] Behrens T.E.J., Smith S.M., Webster M., Nichols T. (2004), *Randomise v2.1*, disponibile su: <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/randomise/index.html>
- [35] Tan X., (2010). *Artifacts Caused by Eddy Current in Diffusion MRI*. 12-03-2012, disponibile su: http://ric.uthscsa.edu/personalpages/lancaster/DI2_Projects_2010/eddy_current_artifacts_DTI.pdf

- [36] Poonawalla A.H., Zhou X.J. (2001). *Correction of Eddy Currents in EPI-based Diffusion Tensor Imaging*. Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med, 9, 736.
- [37] Shen J. (2005). *Tools for NIfTI and ANALYZE image*. 21-09-2011, disponibile su <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/8797>
- [38] Chan W.Y, Yang G.L., Chia M.Y., Woon P.S., Lee J., Keefe R., Sitoh Y.Y., Nowinski W.L., Sim K. (2010). *Cortical and subcortical white matter abnormalities in adults with remitted first-episode mania revealed by Tract-Based Spatial Statistics*. Bipolar Disorders, 12(4), 383-389.
- [39] Benedetti F., Absintab M., Rocca M.A., Radaellia D., Polettia S., Bernasconia A., Dallaspezia S., Pagani E., Falini A., Copetti M., Colombo C., Comi G., Smeraldi E., Filippi M. (2011). *Report Tract-specific white matter structural disruption in patients with bipolar disorder*. Bipolar Disorders, 13, 414-424.
- [40] Haller S., Xekardaki A., Delaloye C., Canuto A., Lövblad K.O., Gold M., Giannakopoulos P. (2011). *Combined analysis of grey matter voxel-based morphometry and white matter tract-based spatial statistics in late-life bipolar disorder*. Journal of Psychiatry and Neuroscience, 36(6), 391-401.
- [41] Moseley M. (2002). *Diffusion tensor imaging and aging - a review*. NMR in Biomedicine, 15, 553-560.
- [42] Heng S., Song A.W., Sim K. (2010). *White matter abnormalities in bipolar disorder: insights from diffusion tensor imaging studies*. J Neural Transm, 117, 639-654.
- [43] Sussmann J.E., Lymer G.K.S., McKirdy J., Moorhead T.W.J., Munoz Maniega S., Job D., Hall J., Bastin M.E., Johnstone E.C., Lawrie S.M., McIntosh A.M. (2009). *White matter abnormalities in bipolar disorder and schizophrenia detected using diffusion tensor magnetic resonance imaging*. Bipolar Disord, 11, 11-18.
- [44] Kier E.L., Staib L.H., Davis L.M., Bronen R.A. (2004). *MR imaging of the temporal stem: anatomic dissection tractography of the uncinat fasciculus, inferior occipitofrontal fasciculus, and Meyers loop of the optic radiation*. Ajnr, 25, 677-691.
- [45] Ongur D., Drevets W.C., Price J.L. (1998). *Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders*. Proc Natl Acad Sci USA, 95, 13290-13295.
- [46] Tkachev D., Mimmack M.L., Ryan M.M. (2003). *Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder*. Lancet, 362, 798-805.

- [47] Yurgelun-Todd D.A., Silveri M.M., Gruber S.A., Rohan M.L., Pimentel P.J. (2007). *White matter abnormalities observed in bipolar disorder: a diffusion tensor imaging study*. *Bipolar Disord*, 9, 504-512.
- [48] Pavuluri M.N., O'connor M.M., Harral E.M., Sweeney J.A. (2008). *An fMRI study of the interface between affective and cognitive neural circuitry in pediatric bipolar disorder*. *Psychiatry Res*, 162, 244-255.
- [49] Pavuluri M.N., Yang S., Kamineni K., Passarotti A.M., Srinivasan G., Harral E.M., Sweeney J.M., Zhou X.E. (2009). *DTI Study of White Matter Fiber Tracts in Pediatric Bipolar Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder*. *Biol Psychiatry*, 65(7), 586-593.
- [50] Song S.K., Sun S.W., Ramsbottom M.J., Chang C., Russell J., Cross A.H. (2002). *Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water*. *Neuroimage*, 17, 1429-1436.
- [51] Song S.K., Sun S.W., Ju W.K., Lin S.J., Cross A.H., Neufeld A.H. (2003). *Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia*. *NeuroImage*, 20, 1714-1722.
- [52] Adler C.M., Holland S.K., Schmithorst V., Wilke M., Weiss K.L., Pan H., Strakowski S.M. (2004). *Abnormal frontal white matter tracts in bipolar disorder: a diffusion tensor imaging study*. *Bipolar Disord*, 6, 197-203.
- [53] Kochunov P., Glahn D.C., Lancaster J.L., Winkler A.M., Smith S., Thompson P.M., Almasy L., Duggirala R., Fox P.T., Blangero J. (2010). *Genetics of microstructure of cerebral white matter using diffusion tensor imaging*. *NeuroImage* 53, 1109-1116.
- [54] Budde M.D, Kim J.H., Liang H.F., Schmidt R.E., Russell J.H., Cross A.H., Song S.K. (2007). *Toward Accurate Diagnosis of White Matter Pathology Using Diffusion Tensor Imaging*. *Magnetic Resonance in Medicine*, 57, 688-695.
- [55] Wang F., Jackowski M., Kalmar J.H. (2008). *Abnormal anterior cingulum integrity in bipolar disorder determined through diffusion tensor imaging*. *Br J Psychiatry*, 193, 126-129.
- [56] Zanetti M.V., Jackowski M.P., Versace A. (2009). *Statedependent microstructural white matter changes in bipolar I depression*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 259, 316-328.

- [57] Mahon K., Wu J., Malhotra A.K. (2009). *A voxel-based diffusion tensor imaging study of white matter in bipolar disorder*. *Neuropsychopharmacol*, 34, 1590-1600.
- [58] Brambilla P., Nicoletti M.A., Sassi R.B. (2003). *Magnetic resonance imaging study of corpus callosum abnormalities in patients with bipolar disorder*. *Biol Psychiatry*, 54, 1294-1297.
- [59] McDonald C., Bullmore E., Sham P. (2005). *Regional volume deviations of brain structure in schizophrenia and psychotic bipolar disorder: computational morphometry study*. *Br J Psychiatry*, 186, 369-377.
- [60] Chan W.Y., Yang G.L., Chia M.Y., Woon P.S., Lee J., Keefe R., Sitoh Y.Y., Nowinski W.L., Sim K. (2010). *Cortical and subcortical white matter abnormalities in adults with remitted first-episode mania revealed by Tract-Based Spatial Statistics*. *Bipolar Disord*, 12: 383-389.
- [61] McIntosh A.M., Muñoz Maniega S., Lymer G.K. (2008). *White matter tractography in bipolar disorder and schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 64, 1088-1092.
- [62] Kawasaki H., Adolphs R., Kaufman O., Damasio H., Damasio A.R., Granner M., Bakken H., Hori T., Howard M.A. (2001). *Single-neuron responses to emotional visual stimuli recorded in human ventral prefrontal cortex*. *Nature Neuroscience*, 4(1) Issue 1, 15-16.
- [63] Caligiuri M.P., Brown G.G., Meloy M.J. (2003) *An fMRI study of affective state and medication on cortical and subcortical brain regions during motor performance in bipolar disorder*. *Psychiatry research*, 123, 171-182.
- [64] Zhou X.J., Leeds N.E. (2005). *Assessing Glioma Cell Infiltration Using A Fiber Coherence Index: A DTI Study*. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 13, 365.
- [65] Freeman D., Lane D. (1983). *A nonstochastic interpretation of reported significance levels*. *J. Bus. Econom. Statist.* 1, 292-298.
- [66] Nichols T., Hayasaka S. (2003). *Controlling the familywise error rate in functional neuroimaging: a comparative review*. *Statistical Methods in Medical Research*, 12, 419-446.