



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
PSICOLOGIA E NEUROSCIENZE  
*Indirizzo in Neuroscienze*

CICLO XXVII

Imaging molecolare in Spettroscopia RM clinica:  
nuovo metodo di ricostruzione  
ad alta risoluzione spaziale

Settore Scientifico Disciplinare MED/36

**Dottorando**

Dott. Stefano Mazzuca

**Tutore**

Prof. Alberto Pupi

**Coordinatore**

Prof. Renato Corradetti

Anni 2012/2014

*A Te, Sofia, che hai dato alla mia vita il suono del tuo nome...  
e a voi, angeli miei, che ai valori della "famiglia" avete attribuito delle qualità del tutto speciali...  
grazie di essere sempre con me.*

# Indice

**Premessa e scopo della Tesi** ..... pag. 3

## **I. Introduzione**

1. L'imaging molecolare: storia, dispositivi e applicazioni .....	pag. 9
I.1.1 L'evoluzione tecnologica .....	12
I.1.2 Concetti base dell'imaging .....	13
I.1.3 Strumentazioni per l'imaging molecolare .....	14
I.1.4 Sonde molecolari per l'imaging .....	17
2. Principali aspetti fisiopatologici del metabolismo cerebrale ....	pag. 21
I.2.1 Aspetti clinici .....	21
I.2.2 Significato e ruolo dei principali metaboliti del cervello .....	22
I.2.3 Applicazioni cliniche e diagnosi differenziali .....	29
3. Principi fisici della Risonanza Magnetica Nucleare .....	pag. 32
I.3.1 Storia della Risonanza Magnetica per Immagini .....	33
I.3.2 MRI dell'atomo di idrogeno .....	34
I.3.3 Momento di spin e momento magnetico .....	35
I.3.4 Formazione e rivelazione del segnale RM .....	37
I.3.5 Codifica spaziale .....	47
I.3.6 Il k-spazio .....	48
I.3.7 Chemical shift .....	49
I.3.8 Modello teorico del segnaleMRS .....	52
I.3.9 Dal segnale all "spettro" RM .....	53
I.3.10 Risoluzione MRI.....	55

4. L'imaging spettroscopico "in vivo" .....	pag. 56
I.4.1 Tecniche di localizzazione "single-voxel" .....	58
PRESS (Point Resolved Spectroscopy) .....	59
STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode) .....	60
I.4.2 Tecniche di localizzazione "multi-voxel" .....	62
I.4.3 L'imaging spettroscopico a bassa risoluzione spaziale .....	67
I.4.4 Tecniche di codifica spaziale: interpretazione nel k-spazio .....	67
I.4.5 Metodo CSI: modello matematico a serie di Fourier .....	69
Limiti del modello CSI .....	73
I.4.6 Il contenuto innovativo: l'introduzione dei "pixel naturali" .....	75
<b>II. Materiali e metodi</b>	
1. Ricostruzione MRS ad alta risoluzione spaziale .....	pag. 78
II.1.1 Metodo SLIM: modello matematico compartimentale .....	79
II.1.2 Metodo GSLIM: modello matematico a serie generalizzate .....	83
2. Il metodo <i>starSLIM</i> .....	pag. 87
II.2.1 La mappa spaziale di disomogeneità del campo magnetico RF .....	87
II.2.2 La novità del metodo <i>starSLIM</i> .....	89
II.2.3 L'algoritmo computazionale .....	91
3. Il software di simulazione dei dati spettroscopici .....	pag. 93
<b>III. Risultati</b>	
1. Test su dati simulati .....	pag. 97
2. Test su dati sperimentali .....	pag. 109
<b>IV. Discussione e conclusioni</b> .....	pag. 111
<b>Bibliografia</b> .....	pag. 115
<b>Ringraziamenti</b> .....	pag. 125

# Premessa e scopo della Tesi

Le nuove frontiere della diagnostica medica riguardano la biochimica clinica *in vivo*, il cui considerevole recente sviluppo è stato caratterizzato dall'introduzione di nuove strumentazioni, sempre più avanzate, e di tecniche di **imaging medico** orientate alla diagnosi, alla cura ed al follow-up di svariate patologie.

Questo approccio innovativo viene oggi considerato indispensabile nello sviluppo dei farmaci [1] essendo intrinsecamente modellabile in fase preclinica ed utilizzabile come *biomarker* e *surrogate endpoint* nei trial clinici. Questo perché l'**imaging**, nella sua attuale accezione, è caratterizzato dall'essere "**molecolare**" ossia rivolto ad indagare non le "forme strutturali" dei target organici (es. l'organo oppure il tumore) ma la loro configurazione "molecolare", conoscenza indispensabile nell'era della "medicina personalizzata". Questa nuova generazione dell'imaging ha complessità chimico/biologico/tecnologiche che difficilmente possono configurarsi fuori da contesti altamente sviluppati e polivalenti.

Tra le più importanti tecnologie utilizzate, o utilizzabili in futuro, nella diagnostica biochimico-clinica, la Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (MRS, *Magnetic Resonance Spectroscopy*) appare particolarmente innovativa e promettente.

La tesi discuterà le basi teoriche ed applicative di questa tecnologia.

La MRS è un'importante applicazione del fenomeno fisico della Risonanza Magnetica Nucleare e rappresenta un potente strumento diagnostico non invasivo, capace di rilevare informazioni biochimiche e metaboliche dei tessuti biologici esaminati, descrivendone la natura atomica e subatomica e la struttura molecolare attraverso l'analisi delle frequenze di risonanza di specifici nuclei atomici in essi contenuti (ad esempio i protoni nel caso della spettroscopia dell'idrogeno). Tale tecnica diagnostica si propone come valido ausilio e supporto delle indagini standard di imaging RM, in cui mappe anatomiche ad alta risoluzione vengono ricostruite a partire da informazioni di tipo strutturale relative alle regioni esaminate.

Gli sviluppi più promettenti dell'Imaging di Risonanza Magnetica (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) riguardano oggi quelle tecniche diagnostiche che ambiscono a fornire informazioni che vadano oltre la semplice rappresentazione morfologica dell'oggetto in esame. Questo accade negli studi di diffusione, perfusione e di attivazione cerebrale, ma anche, e soprattutto, nelle indagini di Imaging Spettroscopico.

L'applicabilità della spettroscopia RM per studi *in vivo* è stata dimostrata per la prima volta negli anni '80. Da allora molte ricerche sono state compiute ed oggi, ormai, tutti gli scanners dedicati all'imaging RM hanno la capacità di eseguire anche indagini MRS.

Grazie alla sua potenziale capacità di rilevare stati patologici in regioni "normali" da un punto di vista strutturale attraverso lo studio delle variazioni di concentrazione di alcuni metaboliti di interesse, la spettroscopia RM potrebbe in futuro avere applicazioni cliniche di eccezionale portata. Se opportunamente ed efficacemente utilizzata, potrebbe assumere un ruolo fondamentale nella diagnosi e nella cura di molte patologie, in particolare di quelle neurologiche (tumori cerebrali, ictus, sclerosi multipla, malattie neurodegenerative, disturbi psichiatrici), facilitando la comprensione dei loro meccanismi d'azione [2] e permettendo di valutare la progressione del danno tissutale, l'eterogeneità delle lesioni e l'efficacia terapeutica.

In particolare l'imaging spettroscopico, tecnica di localizzazione che si distingue dalla spettroscopia "single voxel" e che prevede l'acquisizione simultanea "multivoxel" dei segnali emessi dai metaboliti, possiede il vantaggio rispetto all'imaging RM convenzionale di poter fornire informazioni sia spettroscopiche che spaziali dei tessuti. Potrebbe quindi rivelarsi di grande aiuto nei casi in cui la specificità dell'imaging anatomico si dimostri limitata o insufficiente [3].

La differenziazione dei tessuti è la principale, potenziale applicazione clinica di tale tecnica di indagine biomedica. L'uso combinato delle informazioni spaziali e morfologiche contenute nelle immagini anatomiche RM e dei dati metabolici ottenuti con indagine spettroscopica potrebbe consentire una più facile discriminazione tra tessuti normali e lesionati, e quindi migliorare l'iter diagnostico di molte patologie del sistema nervoso ma anche di organi, quali mammella e prostata. Nonostante l'indiscussa rilevanza dell'informazione di tipo biochimico fornita dall'imaging spettroscopico ed il grande sforzo di ricerca compiuto negli ultimi anni, attualmente la spettroscopia RM risulta integrata in misura molto limitata nella pratica clinica [4].

Le principali *limitazioni* all'applicabilità *in vivo* della spettroscopia riguardano:

- 1) la bassa risoluzione spaziale delle immagini ricostruite e quindi la scarsa qualità e affidabilità della localizzazione spettrale;
- 2) gli artefatti e le distorsioni presenti nei dati registrabili sperimentalmente.

Il successo dell'utilizzo *in vivo* dell'imaging spettroscopico, come strumento diagnostico, dipende in primo luogo dall'accuratezza con la quale vengono stimate le concentrazioni dei composti chimici presenti nella regione anatomica di interesse, e quindi, inevitabilmente, dall'accuratezza con cui l'informazione spettrale viene localizzata spazialmente.

Le tecniche convenzionali di localizzazione utilizzate sulle apparecchiature medicali RM consentono invece la ricostruzione di immagini ("mappe metaboliche") a bassa risoluzione spaziale.

Una definizione spaziale migliore richiederebbe tempi di acquisizione troppo lunghi, dovuti alle modalità di esecuzione delle indagini sperimentali. Queste prevedono infatti che i segnali spettroscopici provenienti da tutto il campo di vista esaminato (FOV, Field of View) vengano localizzati tramite l'utilizzo di gradienti di codifica di fase, applicati lungo le direzioni dello spazio di acquisizione.

Oltre ai limiti dovuti ai lunghi tempi di esecuzione della codifica spaziale esistono, inoltre, grandi difficoltà legate alla lettura ed interpretazione dell'informazione spettrale ricostruita. Gli spettri RM sono spesso caratterizzati da un basso rapporto segnale/rumore (SNR, Signal to Noise Ratio) e da distorsioni, dovuti alla predominanza di rumore e di componenti di disturbo (quali ad esempio il segnale dell'acqua) rispetto alle basse concentrazioni *in vivo* dei metaboliti clinicamente rilevanti.

Attualmente, nell'ambito dell'imaging spettroscopico, il problema di come poter garantire un'accurata localizzazione spaziale dell'informazione spettrale è di centrale e fondamentale importanza: risolverlo significherebbe infatti sviluppare e concretizzare le indubbe e straordinarie potenzialità della spettroscopia RM, ad oggi purtroppo non ancora efficacemente realizzate.

## **Obiettivo della Tesi**

Il lavoro discusso in questa Tesi si inserisce nel contesto più ampio di un progetto di ricerca, il cui obiettivo specifico è di produrre un metodo matematico capace di ricostruire immagini spettroscopiche ad alta risoluzione spaziale che sostituisca le tecniche standard e superi i loro limiti.

Attualmente, il metodo comunemente implementato sulle apparecchiature dedicate alla Risonanza Magnetica clinica, denominato Chemical Shift Imaging (CSI), si basa sulla

Trasformata Discreta di Fourier (DFT, Discrete Fourier Transform) che garantisce una soluzione esatta al problema descritto solo nel caso in cui il numero degli elementi in esame fosse infinito. Tale tecnica si basa su un metodo di ricerca non invasivo, il cui scopo consiste nel produrre immagini espressive di processi metabolici, interni ad organismi viventi, che hanno luogo in relazione a trasformazioni fisiologiche e biochimiche. La principale problematica connessa allo sviluppo di questo metodo di indagine risiede nella insoddisfacente localizzazione spaziale degli spettri relativi ai metaboliti di interesse.

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche di ricostruzione che prevedono l'utilizzo di modelli matematici sempre più avanzati, non basati sul modello a serie di Fourier. L'attenzione di questo progetto si è rivolta in particolare allo studio e alla validazione teorica e pratica dei metodi SLIM (Spectral Localization by Imaging), GSLIM (Generalized SLIM) e BSLIM (SLIM with explicit B0 field inhomogeneity compensation) basati sull'utilizzo di un modello matematico a serie generalizzate e su un nuovo concetto di pixel [5,6,7,8] ma, soprattutto, allo sviluppo di un nuovo metodo innovativo *starSLIM* (STAtic and Radiofrequency-compensated SLIM) [12] che corregga gli artefatti dovuti alle disomogeneità dei campi magnetici con la configurazione e l'implementazione di mappe di correzione.

Partendo dalla definizione del cosiddetto "pixel naturale", il metodo si fonda sull'idea di incorporare, nelle funzioni di base della serie generalizzata, informazioni *a priori* ricavate da un'immagine anatomica ad alta risoluzione. Tali informazioni aggiuntive permetterebbero di compensare la perdita di informazione spettrale, dovuta al sottocampionamento dei dati in fase di acquisizione e responsabile dei forti limiti del modello a serie di Fourier, utilizzato nel metodo CSI.

Il lavoro svolto ha messo in luce un fatto importante: la validità teorica del modello di rappresentazione della funzione spettrale basato sulle serie generalizzate si scontra inevitabilmente con una serie di problematiche inerenti la natura del dato sperimentale, che si sommano alla complessità intrinseca del problema inverso di ricostruzione di immagini spettroscopiche a partire da dati grezzi sottocampionati. Le enormi potenzialità che la spettroscopia RM possiede e che la rendono una tecnica così tanto affascinante, ed i promettenti risultati offerti dal metodo di ricostruzione SLIM, giustificano comunque lo sforzo di arrivare prima possibile a ricostruire mappe metaboliche ad alta risoluzione e costituiscono la principale ispirazione di questo progetto di Tesi.



## **Approccio fisico-matematico al problema dell'imaging spettroscopico**

Da un punto di vista matematico la ricostruzione di immagini spettroscopiche va ad interessare una struttura matematica che risiede nella categoria dei cosiddetti “problemi lineari inversi” determinati su uno spazio di Hilbert, argomento di grande importanza nel campo dell'elaborazione di segnali ed immagini e, più in generale, in quello della Teoria dell'Informazione.

I problemi inversi si sono dimostrati sempre più rilevanti in numerosi domini delle Scienze Applicate, quali ad esempio quello dell'imaging medico [9] . In generale, essi consistono nel dover ottenere la distribuzione nello spazio, ovvero l'immagine dell'entità fisica che si vuole visualizzare (nel caso della spettroscopia la densità spettrale di un oggetto campione) a partire da un set di dati misurati (i cosiddetti *dati grezzi*).

Le tecniche convenzionali di ricostruzione “diretta”, dedicate alla localizzazione spettrale (basate sull'utilizzo della Trasformata di Fourier), esibiscono la loro inadeguatezza ad affrontare il problema, a causa di artefatti di *aliasing* dovuti all'inevitabile troncamento nei dati sperimentali delle frequenze spaziali che, a causa della conseguente riduzione della risoluzione spaziale dell'immagine, conducono ad artefatti da volume parziale sull'immagine ricostruita della distribuzione spettrale.

Una possibile soluzione a questo problema potrebbe essere aumentare il numero di passi di campionamento delle frequenze spaziali nel  $k$ -spazio spettroscopico quattro-dimensionale [10]. Questo approccio comporterebbe l'acquisizione di un maggior numero di segnali: sfortunatamente ciò richiederebbe tempi di acquisizione troppo lunghi non compatibili con la pratica clinica.

Un primo approccio alla riduzione della natura intrinsecamente malposta del problema è stato sviluppato dal metodo SLIM prevedendo l'introduzione di informazioni esterne (dette informazioni *a priori*) all'interno della struttura della matrice di sistema, al fine di vincolare strettamente il possibile set di soluzioni alla natura fisica del problema [11] .

Il metodo tenta di dirimere l'intrinseco mal-condizionamento matematico del problema spettroscopico non solo dando l'inversione del problema ad un algoritmo meno sensibile alle oscillazioni numeriche dei dati sperimentali, ma soprattutto aggiungendo informazioni spaziali “a priori” nella matrice di transizione del kernel computazionale.

Operando una segmentazione completa dell'intero campo di vista spettroscopico e riconoscendo al suo interno un numero finito e relativamente basso di "pixel naturali", l'intero problema si riconduce alla ricostruzione della densità spettrale contenuta all'interno delle strutture anatomiche, i cui margini rappresentano l'informazione spaziale a priori.

Le limitazioni dovute all'obbligata uniformità della densità spettrale all'interno di ciascun pixel naturale sono state rimosse sviluppando un algoritmo, basato sul modello a serie generalizzate, al problema della ricostruzione dell'immagine biomedica.

Tuttavia, questi metodi non tengono conto delle origini degli artefatti rappresentati da:

- dipendenza spaziale della disomogeneità del campo magnetico statico ( $B_0$ );
- distribuzione non omogenea di potenza del campo magnetico a radiofrequenza (RF).

Questo punto mette in evidenza l'innovazione contenuta nel metodo di ricostruzione MRS ai quali è rivolto il presente progetto di ricerca. La componente RF, infatti, influenza l'ampiezza di un funzionale oscillante, la cui frequenza va ad interessare la distribuzione della disomogeneità del campo magnetico statico  $B_0$ . Lo step cruciale ed innovativo nello sviluppo del progetto è stato lo studio e l'analisi delle disomogeneità del campo statico ( $B_0$ ) e di quello a radiofrequenza (RF) in modo da individuare un adeguato numero di informazioni "a priori" da inserire nel kernel computazionale per poter ridurre ed eliminare gli artefatti a loro dovuti.

# I. Introduzione

## Capitolo 1. L'imaging molecolare: storia, dispositivi e applicazioni

Negli ultimi 25 anni la diagnosi di patologie tramite l'utilizzo dell'imaging diagnostico è notevolmente cambiata e sviluppata.

Gli ultimi decenni del XX secolo hanno testimoniato un significativo avanzamento nell'imaging clinico. Dalla scoperta dei raggi X a opera di Wilhelm Conrad Röntgen nel 1895 e per i 75 anni successivi, l'imaging clinico si è basato sui convenzionali tubi a raggi X<sup>1</sup> e sul binomio schermo di rinforzo-pellicola<sup>2</sup>.

Da quando nei primi anni '70 Allen Cormack [13] e Godfrey Hounsfield [14,15] hanno introdotto la Tomografia Computerizzata (CT, Computed Tomography) basata sul modello matematico di Radon [16], ovvero sulla possibilità di ricostruire immagini di un oggetto dalle sue proiezioni, l'imaging clinico è entrato in una fase rivoluzionaria. Questo approccio ha permesso infatti di visualizzare per la prima volta le strutture anatomiche degli organi interni e di evidenziarne le relative patologie, in modo non invasivo e con una precisione senza precedenti.

In modo analogo, l'applicazione di queste metodiche alla Medicina Nucleare<sup>3</sup> e alle nuove applicazioni della Risonanza Magnetica, associata al continuo progresso della tecnica nel campo elettronico e informatico, hanno accelerato e ampliato lo sviluppo dell'imaging, tanto da consentire modalità di scansione multidimensionali non solo morfologiche ma anche dinamiche, funzionali e metaboliche. Anche se la correlazione e la comprensione, dal punto di

---

<sup>1</sup> La generazione dei raggi X avviene per Bremsstrahlung. Gli elettroni prodotti da un filamento per effetto termoionico sono accelerati da differenze di potenziale dell'ordine dei kV verso un bersaglio metallico. La repulsione Coulombiana dei protoni presenti nei nuclei del medesimo determina violente accelerazioni, con emissione di radiazione di frenamento.

<sup>2</sup> Gli schermi hanno la proprietà di emettere fluorescenza nel campo dell'ultravioletto quando colpiti da raggi X. La radiazione luminosa prodotta è utilizzata per impressionare la pellicola disposta a contatto dello schermo stesso.

<sup>3</sup> Branca della medicina che utilizza sostanze radioattive (radiofarmaci) in diagnostica e in terapia per legare e "marcare" con i raggi gamma, generati da tali isotopi radioattivi artificiali, molecole suscettibili di metabolizzazione in vivo e di reazioni in vitro. Questa tracciatura consente lo studio fisiologico e metabolico del tessuto o della funzionalità in esame.

vista semeiotico<sup>4</sup>, delle relazioni tra disturbi fisiologici e lesioni anatomiche è ancora oggetto di studio, si delinea la possibilità di una nuova e più completa comprensione delle varie patologie.

I recenti progressi nella biologia cellulare e molecolare hanno permesso lo studio delle patologie non solo come semplici alterazioni morfologiche-istologiche, ma come risultato di alterazioni cellulari e metaboliche, che si riflettono in alterazioni funzionali.

Nei sistemi viventi, le funzioni metaboliche sono riconducibili a processi che evolvono nel tempo. Comuni esempi di questa dinamica possono essere i processi di trasmissione di informazione all'interno delle cellule o l'energia generata nel ciclo di vita cellulare. D'altro canto, la struttura morfologica rappresenta un'istantanea ad un generico istante di tempo. L'incompletezza dell'informazione associata alle indagini morfologiche discende da patologie che non manifestano alterazioni anatomiche strutturali, oppure determinano alterazioni morfologiche macroscopiche come tardiva conseguenza di cambiamenti metabolici funzionali a livello cellulare e molecolare. Un tipico esempio di queste patologie è il cancro, dove malfunzionamenti cellulari e metabolici determinati da alterazioni genetiche, a loro volta indotte da cause ambientali diverse (come l'esposizione a radiazioni ionizzanti, ad agenti patogeni o sostanze chimiche), inducono ad alterazioni morfologiche solo come ultima fase dello sviluppo della malattia.

Grazie a metodi di indagine metabolico-funzionali integrati con le recenti innovazioni nella biologia cellulare e molecolare, si creano le basi e le condizioni per una diagnosi decisamente più precoce rispetto a quanto potenzialmente offerto da un'indagine strettamente morfologica.

Nel 1930, Otto Warburg [17] ipotizzava come il metabolismo del glucosio (glicolisi aerobica) aumentasse nei tessuti colpiti da cancro in correlazione alla malignità, tanto che a oggi questo aspetto rimane uno dei principali indicatori di proliferazione tumorale. Se questi indicatori biologici sono disponibili in vivo, informazioni utili possono essere ottenute per identificare e caratterizzare la malattia nella fase iniziale e nella sua successiva evoluzione, gettando così le basi per sviluppare terapie mirate ed efficaci.

L'utilizzo di mezzi di contrasto in MRI e CT ha incrementato l'accuratezza delle diagnosi, tuttavia vi è la necessità di ottenere informazioni molecolari e biochimiche. Per questo si rende necessario sviluppare mezzi di contrasto che siano così detti "smart probes" (sonde

---

<sup>4</sup> Disciplina medica che studia i segni e i sintomi che orientano verso la diagnosi.

intelligenti), agenti in grado non solo di incrementare il contrasto in generale, ma anche di localizzarsi in modo specifico in determinati siti o di subire alterazioni in vivo che permettano la loro visualizzazione solo quando si trovino localizzati in tessuti specifici o qualora sia presente una determinata patologia, ottenendo in tal modo un'immagine molecolare.

Uno dei primi utilizzi dell'*imaging molecolare* è rappresentato dall'utilizzo in PET (Tomografia ad Emissione di Positroni) dell'FDG ([<sup>18</sup>F]2-fluoro-2-desossi-D-glucosio). L'FDG entra all'interno della cellula attraverso i trasportatori di glucosio e viene fosforilata a FDG-6-fosfato da parte dell'enzima esochinasi, enzima significativamente sovra-espresso nelle patologie tumorali. L'FDG-6-fosfato, essendo carico negativamente, resta intrappolato all'interno della cellula permettendo dunque di visualizzare le zone che presentino una sovra espressione di tale enzima [19].

L'imaging molecolare rende possibile, attraverso idonei strumenti, la visualizzazione e la quantificazione dei complessi processi fisiopatologici e biochimici presenti in un sistema vivente. Il termine "*imaging molecolare*" è entrato in uso negli anni novanta, benché già l'utilizzo della Medicina Nucleare per rilevare patologie tiroidee può essere considerata un sistema diagnostico di tipo molecolare.

Nel corso degli anni l'importanza dello sviluppo di tale strategia diagnostica è incrementata al punto che attualmente vi sono due società che si occupano dell'imaging molecolare (la Society for Molecular Imaging e l'Academy of Molecular Imaging), ciascuna delle quali possiede una propria rivista rivolta all'imaging molecolare (Molecular Imaging, e Molecular Imaging and Biology). Altre riviste dedicate alla diagnostica per immagine hanno cambiato il loro nome per introdurre l'aspetto molecolare (i.e. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Journal of Molecular Imaging-Advancing Molecular Imaging) [19].

Nel futuro della diagnostica, l'imaging molecolare permetterà il miglioramento della caratterizzazione e della fenotipizzazione delle patologie sulla base di informazioni biologiche e biochimiche da accompagnarsi a quelle di natura anatomica. Con i progressi della biologia molecolare e genomica funzionale, si prevede che nel giro di qualche decennio si potranno identificare le anomalie nelle catene molecolari provocate dalla malattia e, conseguentemente, incorporare l'informazione biologica così ottenuta nella gestione clinica dei pazienti.

Inoltre, l'imaging molecolare può essere utilizzato anche a fini terapeutici. Lo scopo finale dei trattamenti terapeutici, consiste nell'identificazione dell'obiettivo del trattamento e la somministrazione della massima dose terapeutica sullo specifico obiettivo, distinguendo la

zona da trattare dal tessuto sano circostante. Sistemi MRI sono utili per guidare il trattamento ed il follow-up degli effetti di chirurgie cerebrali e al midollo spinale, come anche per seguire il decorso di crioablazioni di tumori epatici e carcinomi mammari [18].

### **I.1.1 L'evoluzione tecnologica**

Negli ultimi anni il campo della ricerca biomedica è stato caratterizzato dallo sviluppo di nuove tecniche di imaging molecolare, la cui peculiarità consiste nella tempestività di indagine delle patologie in esame, in particolare i tumori, poiché permette di effettuare una diagnosi precoce della malattia e di valutare l'efficacia di un trattamento farmacologico o radioterapico in tempi brevi. Inoltre, un'interessante novità consiste nel poter *personalizzare la terapia stessa al singolo paziente*, poiché si arriva a disporre di informazioni molecolari specifiche per ciascun individuo e dunque a selezionare una cura più mirata ed efficace per ogni caso oggetto di studio.

In diagnostica per immagini questo straordinario avanzamento delle conoscenze, ha condotto alla necessità di sviluppare metodiche di imaging in grado di:

- a) visualizzare precocemente gli eventi molecolari e cellulari che determinano l'insorgenza e la progressione di malattie umane nel singolo individuo,
- b) visualizzare l'espressione di bersagli molecolari per terapie individualizzate,
- c) monitorare in tempo reale sia l'evoluzione naturale della malattia che la risposta alla terapia,
- d) accelerare lo sviluppo di farmaci diretti contro bersagli molecolari.

Il raggiungimento di questi obiettivi richiede nella maggior parte dei casi la sperimentazione e validazione delle metodiche di imaging nel modello animale. Ciò ha comportato una straordinaria evoluzione tecnologica nelle strumentazioni di imaging, in quanto, nel passaggio dalla specie umana al modello animale è necessario migliorare significativamente le caratteristiche tecniche degli apparecchi attuali, soprattutto in termini di risoluzione spaziale e temporale, nonché di rapporto segnale/fondo.

Tutti gli avanzamenti tecnologici operati fino ad oggi per lo sviluppo di metodiche di imaging dedicate allo studio di piccoli animali, hanno cercato di rispondere il più possibile ai requisiti di alta risoluzione, tempi brevi di analisi, specificità del segnale, minimizzazione del rumore

di fondo e scarsa invasività. Le varie apparecchiature ad oggi esistenti per lo studio delle patologie nell'uomo fanno riferimento a tecniche di Risonanza Magnetica (MR), di Ultrasonografia (US), di Tomografia Computerizzata (CT), di Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) e di Tomografia Computerizzata ad Emissione di Fotone Singolo (SPECT). Le stesse tecniche vengono utilizzate nella ricerca preclinica mediante strumenti dedicati a piccoli animali. In larga espansione sono anche le tecniche di imaging ottico, che per ora non hanno apparecchiature equivalenti da impiegare nella pratica clinica. Le diverse tecnologie differiscono tra di loro per alcune principali caratteristiche come: risoluzione spaziale e temporale, grado di profondità di penetrazione del segnale attraverso i tessuti, tipo di segnale che genera l'immagine (radiazioni ionizzanti, onde elettromagnetiche, fenomeni di propagazione della luce, ultrasuoni) e disponibilità di sonde marcate biocompatibili e selettive per il proprio bersaglio [22,23].

### **I.1.2 Concetti base dell'imaging**

Oggi l'imaging medico non è più esclusivamente basato sulle radiazioni ionizzanti, ma esistono diverse tecniche, come per esempio l'ecografia e la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), che fanno uso di radiazioni non ionizzanti.

Un sistema di imaging può essere descritto definendo i concetti di risoluzione spaziale, contrasto, rumore e linearità [21].

1. La *risoluzione spaziale*: può essere definita come la distanza minima tra due oggetti che permette al sistema di distinguerli. La risoluzione spaziale è espressa dalla funzione, detta "Point Spread Function" (PSF), con cui viene rappresentato dal sistema un oggetto puntiforme. La risoluzione spaziale viene usualmente misurata in termini della larghezza a mezza altezza, indicata con FWHM (Full Width Half Maximum), della PSF.

2. Il *contrasto*: l'area dell'immagine può essere divisa in elementi discreti detti pixel. Si parla in questo caso di immagini digitali. Limitandoci, per semplicità, al caso della radiografia e della medicina nucleare, se indichiamo con  $N_1$  e  $N_2$  il numero di eventi rivelati in due diversi pixel, (o in due distinte zone dell'immagine), il contrasto è quantitativamente definito dal rapporto:  $C = |(N_1 - N_2)| / (N_1 + N_2)$

Spesso il contrasto è misurato rispetto a un fondo  $N_0$ , presente anche in assenza degli oggetti che si desidera rivelare; in questi casi il contrasto si può ridefinire come:  $C = (N_1 - N_0) / N_0$ .

3. Il *rumore*: in un'immagine il rumore è l'incertezza sul valore di densità misurato. La componente statistica del rumore ha spesso un ruolo importante nel caso di un contatore. Consideriamo il numero  $N$  di eventi, rivelati in una determinata regione dell'immagine, come variabile casuale, la sua densità di probabilità può essere descritta dalla funzione di distribuzione di Poisson. Con questa ipotesi la deviazione standard di  $N$  è  $\sigma_N = \sqrt{N}$  e l'errore relativo su  $N$  è dato da:  $\frac{\Delta N}{N} = \frac{\sqrt{N}}{N} \Rightarrow \frac{\Delta N}{N} = \frac{1}{\sqrt{N}}$

4. La *linearità*: definiamo come campo di vista FoV (Field of View) di un sistema di imaging, l'area dello spazio reale che viene riprodotta. Un sistema si dice lineare se è invariante rispetto alle traslazioni in tutto il FoV. Ciò significa che, se in un sistema lineare due oggetti sono spostati solidalmente, anche nell'immagine il valore della distanza rimane uguale a quello precedente allo spostamento. Conoscendo la distanza reale tra gli oggetti si può stabilire un fattore di scala  $S$  per l'immagine; in un sistema lineare  $S$  è costante rispetto alla posizione in tutto il FoV. La variazione di  $S$  è quindi una misura della perdita di linearità del sistema. In un sistema reale spesso la linearità è locale, cioè  $S$  è costante solo su distanze piccole rispetto al FoV.

### I.1.3 Strumentazioni per l'imaging molecolare

Attualmente la tecnologia più avanzata e che meglio si presta ad effettuare studi quantitativi e dinamici di imaging è rappresentata dalla PET (Tomografia ad Emissione di Positroni). La PET è una tecnica di medicina nucleare in cui si utilizzano diversi isotopi emettitori di positroni tra cui:  $^{15}\text{O}$  (emivita: 2,07 min),  $^{13}\text{N}$  (emivita: 10min),  $^{11}\text{C}$  (emivita: 20,3 min),  $^{18}\text{F}$  (emivita: 1,83 h),  $^{124}\text{I}$  (emivita: 4,2 giorni),  $^{94\text{m}}\text{Tc}$  (emivita: 53 min).

Molti di questi isotopi presentano una breve emivita<sup>5</sup>, così che la reazione chimica che porta alla loro incorporazione in uno scheletro di una molecola scelta come sonda, deve avvenire molto rapidamente, per consentire poi un adeguato impiego del radiofarmaco. Dalla realizzazione dei primi tomografi per piccoli animali si è cercato, nel corso del tempo, di migliorare la risoluzione spaziale, giungendo per i moderni scanner ad un valore che si aggira tra 1 e 2 mm [23]. Attualmente, sono in corso studi rivolti alla realizzazione di sistemi con una risoluzione spaziale inferiore al millimetro, pur conservando un'elevata sensibilità.

---

<sup>5</sup> L'emivita è una misura della stabilità di un isotopo: si definisce come il tempo occorrente perché la metà degli atomi di un campione puro dell'isotopo decadano in un altro elemento.



La SPECT (Tomografia Computerizzata ad Emissione di Fotone Singolo) oggi rappresenta un'utile tecnica di medicina nucleare impiegata per l'imaging di diversi processi biologici; i radionuclidi tipicamente impiegati sono rappresentati soprattutto da:  $^{99m}\text{Tc}$  (emivita: 6 h),  $^{111}\text{In}$  (emivita: 2,8 giorni) e  $^{123}\text{I}$  (emivita: 13,2 h).

Oggi sono disponibili come prodotti commerciali anche microSPECT dedicate allo studio di modelli animali. Negli ultimi anni, allo scopo di ottenere una risoluzione spaziale submillimetrica e quindi potenzialità di impiego estese, si è data grande enfasi allo sviluppo di rivelatori costituiti da un insieme di cristalli singoli e di ridottissime dimensioni, al posto di scintillatori continui [24,25].

L'imaging ottico sta assumendo oggi, sempre maggiore rilievo negli studi di modelli animali. I principi di questa tecnologia sono rappresentati dai fenomeni fisici di interazione della luce con i tessuti, come: assorbimento, eccitazione, emissione, scattering, fluorescenza e luminescenza. Attualmente, le moderne apparecchiature di imaging ottico, si avvalgono soprattutto di sonde fluorescenti o luminescenti. Questi scanner raggiungono una risoluzione spaziale nell'ordine del millimetro ed una sensibilità nell'ordine del nanomolare. I segnali luminosi emessi sono captati da una CCD camera (Charge-Coupled Device camera) che li converte in immagini. Le CCD camere di ultima generazione sono costituite da cristalli con un'alta sensibilità alla luce ed essendo refrigerate riducono i rumori di fondo dovuti al riscaldamento termico durante l'acquisizione del segnale. I tempi di acquisizione delle immagini sono molto veloci ed è possibile eseguire l'analisi di più animali contemporaneamente. Tuttavia, la più grande limitazione dell'imaging ottico è la mancata possibilità di esplorare piani profondi, che riduce la possibilità di impiego clinico. Un approccio ancora più innovativo di imaging ottico è rappresentato dalla FMT (Fluorescent Mediated Tomography). Durante l'applicazione di questa tecnica, l'oggetto di studio viene esposto a continue onde luminose provenienti da diverse sorgenti ed i segnali emessi dai tessuti vengono poi captati da rivelatori, elaborati mediante degli algoritmi matematici e convertiti in un'immagine tridimensionale. Questi macchinari hanno il vantaggio di poter esplorare i tessuti in maggiore profondità rispetto alle altre apparecchiature di imaging ottico (profondità nell'ordine dei centimetri, piuttosto che micron), presentano una risoluzione tra 1 e 2 mm ed il risultato dell'esame è un'immagine tridimensionale acquisita con una sensibilità dello strumento nell'ordine del nanomolare. Recenti applicazioni della FMT riguardano imaging di angiogenesi tumorale in vivo mediante fluorocromi NIR (Near Infrared) [26].

Grazie ai recenti sviluppi nell'ambito dell'ultrasonografia (US) anche le apparecchiature ecografiche sono oggi disponibili come microscanner dedicati allo studio di piccoli animali. Questi macchinari lavorano mediante sonde ad alta frequenza ed hanno una risoluzione spaziale compresa tra i 10 ed i 100  $\mu\text{m}$  [27]. Attualmente, sono commercialmente disponibili apparecchiature di UBM (Ultrasonic BioMicroscopy) che sfruttano frequenze comprese tra i 40 e 200 MHz. Questo strumento è stato impiegato per diverse applicazioni, tra cui studi funzionali del sistema cardiovascolare in embrione di topo e studi relativi alla crescita e differenziazione di tumori in vivo. Sono stati sviluppati anche degli scanner che lavorano a frequenze superiori ai 200 MHz ed essi sono i SAM (Scanning Acoustic Microscopy), che sono stati impiegati per la valutazione delle proprietà meccaniche delle cellule [28]. Negli ultimi anni anche la messa a punto di moderni mezzi di contrasto e tecnologie di ecodoppler, fanno dell'ultrasonografia una tecnica in larga espansione [29].

Un'altra delle tecniche di maggiore rilevanza per l'imaging è la Risonanza Magnetica (MRI, Magnetic Resonance Imaging).

Molte proprietà individuali dei tessuti nell'ambito dell'MRI, come la densità protonica, le velocità di rilassamento, il flusso, lo shift chimico, la diffusione e la perfusione, contribuiscono al contrasto del tessuto molle.

Inizialmente l'MRI era una tecnica particolarmente costosa che richiedeva tempi lunghi di analisi; essa forniva immagini esclusivamente del cervello e non appariva possibile il suo impiego per porzioni del corpo in cui vi fosse un significativo movimento, come ad esempio il cuore. Tuttavia, tramite l'utilizzo di differenti tecniche, si possono ottenere informazioni morfologiche e funzionali. Ora, grazie alle rapide sequenze di immagini e alle innovazioni tecnologiche, immagini MRI altamente risolte del cuore pulsante permettono l'analisi dettagliata della motilità della parete cardiaca e della perfusione in pazienti presentanti ischemia e infarto [18].

Attualmente queste apparecchiature per piccoli animali (microMRI) presentano una buona capacità di penetrazione tessutale e raggiungono risoluzioni spaziali molto alte. Ciò è possibile grazie all'impiego di campi magnetici ad alta intensità, compresa tra i 4,7 e 17 T e mediante l'uso di hardware e software costruiti sempre più su misura per il modello animale. Queste strumentazioni offrono la possibilità di ottenere delle immagini tridimensionali con una risoluzione anche al disotto dei 10  $\mu\text{m}$ . Un'estensione dell'imaging in modelli animali, mediante MR, è rappresentata dalla Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS), in cui si

ottengono spettri di assorbimento di organi sottoposti a campi magnetici. Gli spettri rilevati dipendono dalla composizione chimica e molecolare del tessuto [23,30].

Tra le altre tecniche di radiologia, la tomografia computerizzata a raggi X (CT) non riveste un ruolo prevalente nell'ambito della ricerca preclinica, rispetto al suo impiego nella clinica. Tuttavia l'allestimento di un sistema dedicato allo studio di piccoli animali ha permesso di utilizzare questa tecnica soprattutto per lo studio di tumori molli, ossa e polmone e per lo studio di diversi modelli animali transgenici knock in/out. I sistemi di microCT attualmente disponibili hanno una risoluzione spaziale di 50  $\mu\text{m}$ , una buona capacità di penetrazione nei tessuti e velocità nell'esecuzione degli esami [30].

Un notevole avanzamento nell'ambito dell'imaging molecolare è rappresentato dall'imaging multimodale, che vede fuse insieme diverse metodologie come PET/CT, SPECT/CT, MRI/Imaging ottico. Questo approccio permette l'esecuzione di due diversi esami contemporaneamente su uno stesso distretto anatomico. L'indagine fornisce quindi informazioni morfologiche ed allo stesso tempo una valutazione della funzionalità dell'organo. L'imaging multimodale presenta notevoli vantaggi, non solo perché diminuisce il numero di esami al quale il soggetto è sottoposto, ma anche perché le informazioni ottenute risultano più accurate e precise, rispetto a quelle derivanti da due esami eseguiti separatamente. Attraverso la messa a punto di nuovi software possono essere registrate insieme immagini di PET e SPECT e quelle di CT ed MR. In questi ultimi anni è stata data grande enfasi soprattutto alle modalità PET/CT e SPECT/CT che sono già da tempo a disposizione nella pratica clinica.

Inoltre il grande interesse verso la ricerca preclinica in piccoli animali ha reso disponibile in commercio anche sistemi microPET/CT e microSPECT/CT. Come per le apparecchiature cliniche anche in questo caso esistono due sistemi indipendenti di acquisizione delle immagini con un software integrato di controllo. Sono in fase di studio anche modalità di integrazione tra PET e MR e sistemi PET/Imaging ottico e MR/Imaging ottico [31].

#### **I.1.4 Sonde molecolari per l'imaging**

Il grande progresso scientifico registrato in questi anni nell'ambito dell'imaging molecolare, non è soltanto il frutto degli avanzamenti tecnologici fin ora descritti, ma è anche il frutto dello sviluppo di nuove sonde molecolari e di moderni mezzi di contrasto. Attualmente, sono

state sintetizzate sonde molecolari altamente specifiche per il proprio bersaglio. Potenziali bersagli per l'imaging molecolare sono: specifici geni, RNA messaggero e proteine (recettori di membrana, trasportatori, enzimi intracellulari, recettori per fattori di crescita ed ormoni etc.). L'amplificata espressione di una serie di proteine nel cancro, rappresenta uno dei motivi che hanno consentito di applicare l'imaging molecolare soprattutto in oncologia.

Sonde molecolari e mezzi di contrasto possono essere suddivisi in agenti non specifici, che non hanno un sito di distribuzione preferenziale, agenti selettivi per uno specifico bersaglio ed agenti che generano un segnale amplificato in seguito all'interazione con il proprio recettore.

I mezzi di contrasto per l'imaging di risonanza magnetica rientrano in tutte le tipologie descritte. Chelati di Gadolinio e particelle di ossido di ferro sono esempi di agenti di contrasto aspecifici e possono essere utili per valutare la perfusione tissutale, permeabilità vascolare e flusso sanguigno. Particelle di ossido di ferro di ridottissime dimensioni (Ultrasmall Particles of Iron Oxide, USPIOs) trovano oggi impiego in studi di angiogenesi tumorale in vivo [32].

Mezzi di contrasto specifici sono rappresentati da composti funzionalizzati mediante peptidi, proteine ed altre molecole selettivamente riconosciute da specifici bersagli. Recentemente, sono state messe a punto delle nanoparticelle contenenti Gadolinio per il riconoscimento di depositi di fibrina, inoltre sono state sintetizzate nanoparticelle superparamagnetiche CLIO (Crosslinked Iron Oxide Nanoparticles) unite all'Annessina V per il riconoscimento della fosfatidilserina di membrana delle cellule in apoptosi [33] ed ancora sono state messe a punto, particelle USPIO (Ultra Small Superparamagnetic Particles of Iron Oxide) legate ad anticorpi per il riconoscimento delle E-selectine di cellule endoteliali, per il monitoraggio della vascolarizzazione tumorale, flogosi ed aterosclerosi [34].

Chelati di Gadolinio legati a gruppi fenolici sono esempi di mezzi di contrasto che in seguito ad interazione enzimatica determinano un segnale amplificato. Infatti questi agenti in seguito all'interazione con enzimi come la perossidasi, formano oligomeri con proprietà paramagnetiche amplificate [32].

Anche nell'ambito dell'ultrasonografia, l'impiego di nuovi agenti di contrasto come microbolle o liposomi acusticamente attivi, oppure emulsioni di perfluorato di carbonio, possono aumentare la risoluzione spaziale delle convenzionali apparecchiature. Inoltre la specificità del segnale può essere incrementata funzionalizzando questi agenti di contrasto con peptidi o frammenti di anticorpi per il riconoscimento di un bersaglio. Un esempio è rappresentato da microbolle legate con anticorpi selettivi verso l'endogлина (CD105), una

glicoproteina espressa sulla superficie delle cellule endoteliali [35], oppure microbolle legate all'echistatina, una molecola che riconosce l'integrina Alfa-V Beta-3 [36].

Questi moderni mezzi di contrasto insieme a tecnologie di ecodoppler, trovano largo impiego nello studio della circolazione e perfusione miocardica, vascolarizzazione tumorale e risposta alla terapia [29].

Notevoli progressi sono stati registrati anche per lo sviluppo di nuove sonde per l'imaging ottico. Le sonde attualmente disponibili per questi studi sono soprattutto composti fluorescenti e bioluminescenti. In merito alla fluorescenza, oggi il composto maggiormente impiegato è rappresentato dalla Green Fluorescent Protein (GFP). Di recente questa proteina è stata utilizzata in topi transgenici per il monitoraggio dell'evoluzione tumorale e dell'insorgenza di metastasi [37].

L'imaging ottico si avvale anche dei fenomeni di bioluminescenza e ciò è possibile soprattutto attraverso l'impiego del sistema luciferasi/luciferina per valutare processi come: l'espressione genica, l'attivazione di "pathways" coinvolti nella genesi del cancro, interazioni proteina-proteina e risposta alla terapia. Attualmente sono in corso di sperimentazione nuovissimi fluorocromi, che aiutano a risolvere il problema tipico dell'imaging ottico, cioè la bassa penetrazione tessutale della luce emessa dalle sonde [30]. Infatti molecole che emettono luce nel vicino infrarosso (NIR, Near Infrared) come derivati delle cianine, consentono di raggiungere una maggiore penetrazione energetica attraverso i tessuti e di ridurre anche i problemi di autofluorescenza emessa dai distretti vicini al punto di interesse. Recentemente sono stati sviluppati anche fluorocromi NIR, attivati da specifiche proteasi selettivamente presenti nella sede del bersaglio, così da aumentare la specificità del segnale e diminuire il rumore di fondo.

A questo riguardo sono stati condotti alcuni studi che dimostrano le potenzialità di questa applicazione nel rivelare l'espressione proteica e l'attività enzimatica in alcuni tumori in vivo [38].

In merito all'imaging di PET e SPECT i processi cellulari che possono essere studiati attraverso sonde radiomarcate si riferiscono soprattutto a proliferazione, apoptosi, angiogenesi, cascate metaboliche, farmacoresistenza, meccanismi di trasduzione del segnale ed espressione genica. Attualmente tra le sonde radiomarcate, uno dei composti maggiormente impiegati è rappresentato dal  $^{18}\text{F}$ -FDG. Esso è un analogo del glucosio che è maggiormente captato da cellule con un'elevata attività glicolitica, caratteristica tipica delle

cellule tumorali maligne. Questo radiofarmaco è entrato nella pratica clinica e viene utilizzato nella diagnosi, stadiazione e monitoraggio della risposta terapeutica di una moltitudine di neoplasie [22,39]. Negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi agenti che possono monitorare più specificamente la proliferazione neoplastica. Un esempio di questa classe di composti sono i nucleosidi analoghi della timidina. Alcuni di questi composti sono stati da poco saggiati in studi clinici [22]. La stessa timidina, marcata con  $^{11}\text{C}$  e  $^{18}\text{F}$ , è stata impiegata per caratterizzare tumori umani e come agente indicatore dell'inibizione della timidilato sintetasi, dopo trattamento farmacologico [28]. Sono stati sviluppati anche altri analoghi di nucleosidi marcati con  $^{18}\text{F}$ , come la  $^{18}\text{F}$ -FLT (3'-deossi-3'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorotimidina). La  $^{18}\text{F}$ -FLT è un substrato della timidino chinasi e viene trattenuta all'interno della cellula dopo fosforilazione. Questo tracciante trova grande applicazione nel valutare la risposta alla terapia ed in alcuni casi risulta essere più accurato rispetto al  $^{18}\text{F}$ -FDG [40]. Attualmente per studi metabolici e funzionali in oncologia sono utilizzate anche altre sonde radiomarcate, come la  $^{11}\text{C}$ -metionina, la  $^{11}\text{C}$ -Colina e la  $^{18}\text{F}$ -Colina.

Da qualche anno, sono stati sviluppati anche dei traccianti per l'imaging dei processi di morte cellulare, come l'apoptosi. La maggior parte di questi traccianti si basa sulla molecola di AnnessinaV, che si lega con alta affinità alla fosfatidilserina, un fosfolipide di membrana marker dell'inizio del processo apoptotico. L'annessina V è stata marcata sia con nuclidi gamma emettitori che positroni emettitori. Tra tutti i composti quelli sicuramente più studiati sono stati la  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-AnnessinaV e la  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Hynic-AnnessinaV. I mitocondri giocano un ruolo fondamentale nel processo di apoptosi e possono potenzialmente fungere da bersaglio per l'imaging di questo processo biologico.

# **I. Introduzione**

## **Capitolo 2. Principali aspetti fisiopatologici del metabolismo cerebrale**

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (MRS), che verrà discussa e sviluppata in questo lavoro di Tesi, si caratterizza come un potente metodo non invasivo per lo studio in vivo dei sistemi biologici offrendo utili informazioni biochimiche. Questa metodologia ha aperto una nuova strada nello studio del cervello umano, dando la possibilità di caratterizzare molte malattie e di scoprire le alterazioni metaboliche coinvolte. Gli studi di MRS hanno spesso portato ad una riscoperta dei metaboliti cerebrali, dei quali molte funzioni sono a tutt'oggi poco chiare.

Una delle principali utilità della MRS risiede, attualmente, nella possibilità di operare un grading tumorale nelle lesioni gliali, nel monitoraggio evolutivo della malattia neoplastica e nella diagnosi differenziale tra recidiva e radionecrosi.

In questo capitolo, sulla base della più recente letteratura, viene data un'interpretazione dei dati spettroscopici delle più frequenti patologie cerebrali alla luce di una integrazione di aspetti morfologici e dati neuro-chimici tumorali.

Inoltre, viene data una descrizione dei principali metaboliti cerebrali, riassumendo le conoscenze acquisite fino ad oggi sui loro diversi ruoli.

### **I.2.1 Aspetti clinici**

La diagnosi differenziale delle neoplasie cerebrali dipende dall'abilità e dall'esperienza del neuroradiologo di interpretare, sulla base di aspetti clinici, una serie di informazioni dirette, ma anche indirette, fornite dall'imaging molecolare. Queste informazioni sono rappresentate dalla sede anatomica, dalla presenza di edema e di eventuale effetto massa, dal riscontro di calcificazioni e/o formazioni cistiche, dalla distribuzione del contrasto, dall'età e dalla presentazione clinica del tumore.

Tuttavia la differenziazione tra alterazioni ascessuali, tumori intra ed extra-assiali, discriminazione tra alto e basso grado, spesso resta molto difficile. In contrasto con la TC, la MRI tradizionale e l'angiografia, la Spettroscopia RM è in grado di fornire informazioni strutturali relative all'integrità neuronale, alla proliferazione e degradazione cellulare, al metabolismo energetico, alla trasformazione necrotica dell'encefalo o del tessuto tumorale.

In virtù di tali caratteristiche tale metodica apporta un valido aiuto nella diagnosi differenziale tra lesione intrassiale gliale e non, nella valutazione del grado di anaplasia cellulare dei tumori, dell'estensione anatomica dei gliomi e dell'edema peritumorale, ed anche nel monitoraggio dell'evoluzione della malattia neoplastica, soprattutto dopo trattamento chirurgico o radioterapico.

Nelle patologie della sostanza bianca le immagini RM convenzionali non ci forniscono indicazioni specifiche sulla natura delle aree di gliosi (alta sensibilità ma bassa specificità), per cui risulta difficile l'inquadramento eziopatogenetico di tali alterazioni che possono essere secondarie a processi patologici diversi, di natura infiammatoria, autoimmune, vascolare, metabolica, tossica, ereditaria.

La MRS consente, in alcuni casi, di differenziare forme apparentemente simili nell'indagine RM convenzionale.

## **I.2.2 Significato e ruolo dei principali metaboliti del cervello**

Con la spettroscopia protonica è stato possibile riscoprire molti metaboliti del cervello, dei quali non erano note molte proprietà e caratteristiche. Negli ultimi venti anni si sono accumulati molti dati sui vari metaboliti e sul loro metabolismo. Diamo un excursus delle principali conoscenze acquisite fino ad oggi sui principali metaboliti del cervello. In tabella 1 sono riportati i range di concentrazioni misurate in vivo con la tecnica di spettroscopia protonica.



Metabolita	Range della concentrazione (mmol/Kg <sub>ww</sub> )
NAA	7.9–16.6
Alanina	0.2–1.4
GABA	1.3–1.9
Colina (totale)	0.9–2.5
Creatina (totale)	5.1–10.6
Glutammato	6.0–12.5
Glutamina	3.05–5.8
Mioinositolo	3.8–8.1
Scilloinositolo	0.3–0.6
Lattato	0.4
Taurina	0.9–1.5

**Tabella 1: Range delle concentrazioni dei metaboliti osservabili con le tecniche MR per il cervello umano normale in vivo e da biopsie di tessuti, ottenute con varie tecniche tra le quali la MRS in vivo**

L'esame spettroscopico evidenzia, nella maggior parte dei casi, anomalie metaboliche legate a 5 metaboliti: N-acetilaspargato (NAA), complesso creatina-fosfocreatina (Cr/PCr), Colina (Cho), acido lattico (Lac) e lipidi (Lip). Accanto a questi, si associano altri metaboliti meno noti ma non meno importanti quali ad esempio il mioinositolo (mI), l'alanina (Ala), il GABA e la taurina che, in alcuni casi, possono essere utili nella diagnosi differenziale di alcune lesioni intra-craniche.

L'eterogeneità isto-patologica che è tipica delle lesioni tumorali e che comprende non solo la presenza di necrosi o cisti intra-tumorali ma anche la presenza di foci cellulari caratterizzati da gradi differenti di anaplasia, spiega i differenti profili metabolici spettroscopici di ciascuna neoplasia ed anche le difficoltà diagnostico-interpretative che, a volte, impediscono una diagnosi certa.

### **N-Acetilaspargato (NAA)**

L'NAA è un aminoacido presente nel cervello in concentrazioni piuttosto elevate (secondo solo all'acido glutammico) ed è localizzato principalmente nel sistema nervoso centrale e periferico, anche se è stata verificata la sua presenza anche negli occhi.

Viene considerato un *marker neuronale* e la sua concentrazione varia nelle diverse regioni cerebrali e con l'età.

Ha un ruolo attivo nella sintesi degli acidi grassi durante lo sviluppo cerebrale, e si pensa

possa anche ricoprire un ruolo importante nel controllo della pressione osmotica. E' precursore N-acetilaspartil-glutammato, importante neurotrasmettitore.

Quando il tessuto cerebrale è danneggiato o è sottoposto ad un processo distruttivo, degenerativo o infiltrativo, esso si riduce marcatamente. Le lesioni extra-assiali che non abbiano infiltrato il cervello o che non contengano tessuto neurogliare non mostrano alcuna risonanza di NAA. Attualmente una riduzione del picco di NAA viene interpretata come espressione di perdita o disfunzione neuronale (mitocondriale).

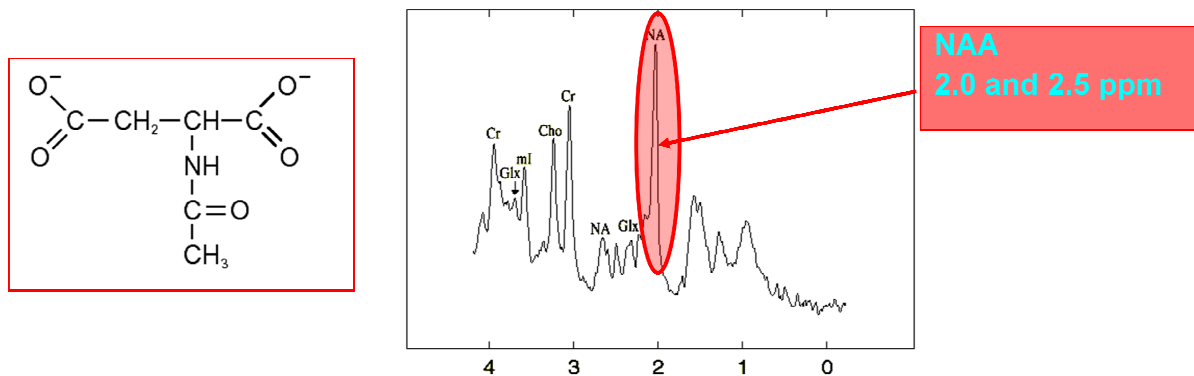
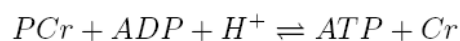


Figura 1: Formula chimica e picco in spettroscopia protonica dell'N-Acetilaspartil-glutammato

## Creatina (Cr)

La creatina e la fosfocreatina (o creatina fosfata, PCr) sono presenti nel cervello, nei muscoli e nel sangue. Questi due composti sono in rapido scambio chimico ed enzimatico, secondo la relazione di equilibrio:



dove con la sigla ADP si indica l'adenosina difosfato e con la sigla ATP l'adenosina trifosfato. L'ATP è la fonte principale di energia per tutti i processi metabolici che avvengono nell'organismo degli animali; la PCr è considerata quindi una riserva di ATP, e variazioni della concentrazione di PCr o di Cr sono considerati un indice di una possibile disfunzione del metabolismo energetico.

La creatina viene considerata un *marker energetico* in quanto coinvolta nel metabolismo dell'adenosina trifosfato (ATP).

Il picco della Cr è considerato più stabile rispetto ai picchi dell'NAA e Cho, per cui viene usato come metabolita di riferimento nella quantificazione in vivo e comunque l'altezza degli altri picchi sullo spettro viene confrontato in termini di rapporto con quello della Cr.

Tuttavia variazioni della concentrazione totale di creatina sono state riscontrate in alcune patologie molto serie: diminuzione dei suoi livelli si hanno nei tumori e nell'infarto, mentre aumenti si riportano nella distrofia miotonica. In particolare, la modificazione del picco della Cr riflette il particolare assetto del metabolismo basale delle cellule neoplastiche il quale, sfruttando prevalentemente la via glicolitica, reprime in parte l'attività enzimatica della creatin-chinasi, riducendo la concentrazione cellulare del complesso Cr/PCr. Vi sono tumori come i meningiomi e le metastasi che sono caratterizzati da una drastica riduzione del segnale della Cr poiché mancano completamente del complesso enzimatico Cr-PCr-chinasi [41].

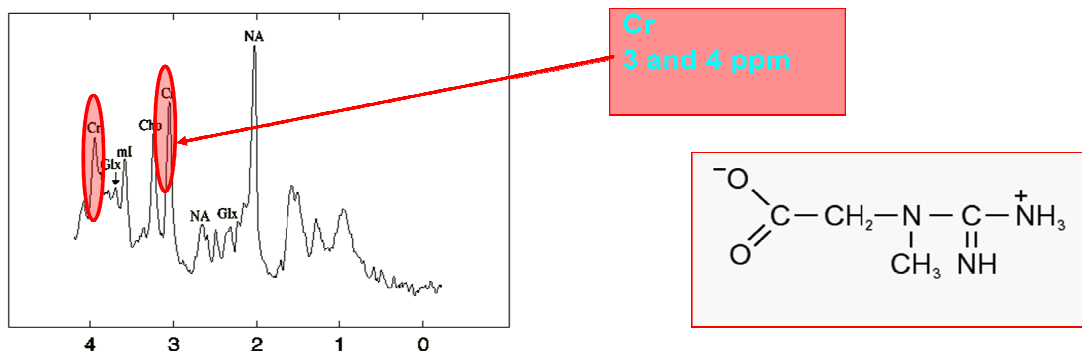


Figura 2: Formula chimica e picchi in spettroscopia protonica della Creatina

## Colina (Cho)

La colina nella spettroscopia protonica mostra un picco prominente a 3.2 ppm che include contributi, oltre che dalla colina libera, anche dalla glicerofosforilcolina (GPC) e dalla Fosforilcolina (PC), quindi più in generale si parla di colina totale, o più semplicemente colina.

Viene trasportata attraverso la barriera emato-encefalica ed è utilizzata nella sintesi dei fosfolipidi di membrana.

Variazioni del suo picco sono generalmente associate ad alterazioni della composizione delle membrane, un aumento del segnale è stato trovato in condizioni patologiche, quali ad esempio il cancro, l'ischemia, nei traumi della testa, nella malattia di Alzheimer e nella sclerosi multipla; una diminuzione è invece associata a malattie del fegato, e nell'infarto.

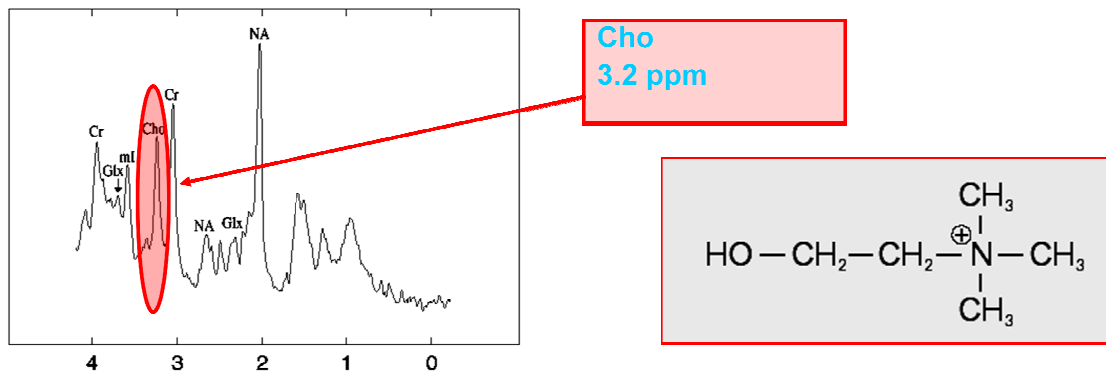


Figura 3: Formula chimica e picco in spettroscopia protonica della Colina

## Lattato (Lac)

Il lattato è il prodotto finale della glicolisi anaerobica, normalmente presente nel cervello a basse concentrazioni e per questo generalmente è difficile una sua osservazione con studi in vivo di MRS.

Il Lattato è generalmente un *marker di insufficiente ossigenazione tissutale*, aumenta anche con l'incremento delle richieste energetiche.

Rapidi aumenti della concentrazione di lattato sono riportati negli studi su stati di ipossia; l'osservazione di questi repentini cambiamenti con la spettroscopia protonica sono di grande interesse clinico nello studio di situazioni in cui il flusso sanguigno risulti compromesso, quali possono essere ad esempio l'infarto, i traumi o i tumori, sebbene la concentrazione di lattato risulti in questi casi altamente variabile.

Aumenti transienti di lattato sono stati riportati in studi sul cervello umano in vivo in situazioni di attivazione funzionale e iperventilazione.

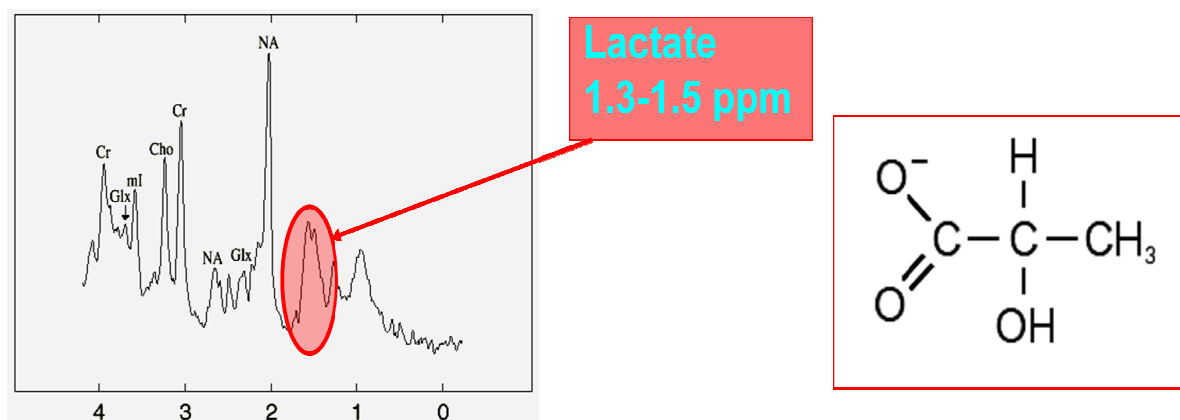


Figura 4: Formula chimica e picco in spettroscopia protonica del Lattato

## MioInositolo (mI)

Dei nove isomeri dell'inositolo, il mioinositolo è quello più presente nei tessuti.

Circa il 70% del picco collocato a 3,5 ppm deriva dal mioinosotolo e il 15% dal mioinositolo fosfato. La funzione del mioinositolo non è chiara ma studi di MRS in vivo sembrano dimostrare che abbia un ruolo come *marker gliale specifico*.

Un incremento di mI viene generalmente osservato nei gliomi e nei deficit di enzimi mitocondriali.

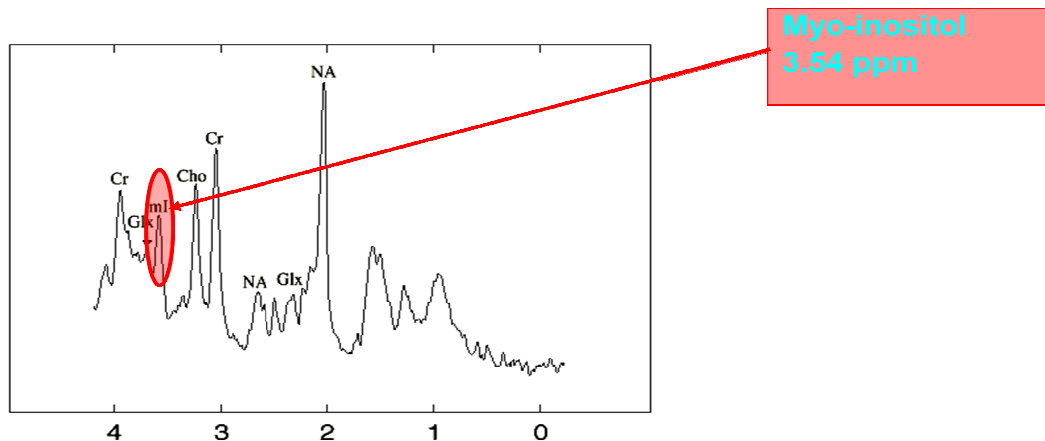


Figura 5: Picco in spettroscopia protonica del MioInositolo

## Glutammato (GLU), Glutamina (GLN)

Il glutammato è un aminoacido con una catena laterale acida, ed è l'aminoacido più abbondante nel cervello umano. La sua concentrazione è di circa 12 mmol/Kgww.

E' nota la sua funzione come *neurotrasmettitore eccitatorio*, anche se sembra avere molte altre funzioni, con ruolo nel metabolismo mitocondriale, nella neuro-trasmissione, come precursore del GABA, come componente del ciclo di Krebs e nella sintesi degli acidi grassi.

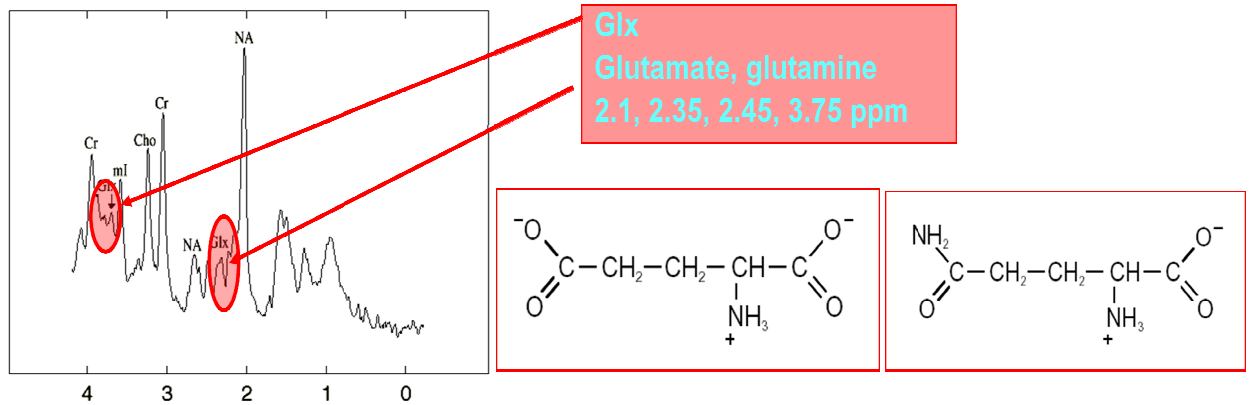
La sua concentrazione aumenta nell'ischemia cerebrale, nell'encefalopatia epatica e nella sindrome di Rett.

La glutamina è un aminoacido ed è un precursore ed una riserva di glutammato.

Nel ciclo glutamina/glutammato, il Glu viene formato, nei neuroni presinaptici, a partire dalla Gln (tramite la glutaminase); il Glu così formato viene rilasciato dai neuroni presinaptici, preso dagli astrociti e convertito nuovamente in Gln dalla glutammina sintetasi.

Un consistente aumento di Gln si ha quando il ciclo glutamina-glutammato è alterato, come

avviene in situazioni di iperammonemia, in questi casi la variazione della sua concentrazione cerebrale è un buon indicatore delle malattie renali. La Gln sembra avere un'importanza cruciale per la funzione cerebrale e nella regolazione delle attività dei neurotrasmettitori.



**Figura 6: Formule chimiche e picchi in spettroscopia protonica del Glutammato e della Glutamina**

### Acido gamma-Aminobutirrico (GABA)

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio, presente nel cervello con concentrazioni di circa 1mmol/Kgww, ed è strettamente legato al metabolismo del glutammato e della glutamina.

Alterazioni della sua concentrazione cerebrale sono state associate a molti disturbi neurologici ed è stato proposto un suo ruolo come regolatore della funzione motoria extrapiramidale; livelli ridotti di GABA vengono riscontrati nelle discinesie tardive, nella malattia di Huntington, nei parkinsonismi, nelle discinesie idiopatiche ed anche in soggetti schizofrenici.

### Lipidi (Lip)

I Lipidi, con picchi di risonanza tra 6 e 1.5 e 1.2 e 0.8 ppm, sono caratteristicamente elevati negli astrocitomi di alto grado, nei meningiomi e nei processi necrotici.

Sono fisiologicamente assenti nell'encefalo sano e studi in vitro hanno mostrato che l'ammontare dei Lip, riscontrato con la spettroscopia RM, si correla bene con il grado di micro e macro-necrosi [48] visto in istologia.

### Alanina (Ala)

L'Alanina, rappresentata da un doppio picco deflesso a 1.5 ppm, viene riscontrata nei meningiomi e sembra svolgere un ruolo importante nella diagnosi differenziale tra meningiomi e neurinomi [49]. Il riscontro di tali metaboliti è tuttavia sporadico, per cui non è

ancora possibile asserire che vi siano markers biochimici specifici di un determinato tipo di neoplasia rilevabili in vivo.

### **I.2.3 Applicazioni cliniche e diagnosi differenziali**

Un dato comune alle *metastasi* ed ai *tumori primitivi cerebrali* è il riscontro di un un incremento della Cho ed un decremento di NAA [49]. Poiché le lesioni non neoplastiche come ad esempio un infarto cerebrale o un ascesso sono caratterizzate da un marcato decremento della Cho, questa può differenziare le lesioni neoplastiche (elevata Cho) da quelle non neoplastiche. Infatti, l'aumento della Cho, che risulta essere statisticamente più elevato nei gliomi altamente maligni rispetto a quelli di basso grado, risulta essere marker istochimico di proliferazione [51] mostrando una correlazione positiva di Cho/Cr con il grading istologico di astrocitomi. Anche la concomitanza di Lac e Lip, essendo espressione di necrosi cellulare, rappresenta una caratteristica del metabolismo dei tumori maligni.

Appare quindi che, nonostante le possibili ed ampie sovrapposizioni di valori tra gradi intermedi, la MRS può differenziare gradi estremi di anaplasia.

Il *glioma di basso grado* è generalmente caratterizzato da un modesto aumento della Cho, una variabile riduzione di NAA e una incostante presenza di Lac. Al contrario, i *gliomi maligni* presentano una elevata quantità di Cho, una accentuata riduzione di NAA (e a volte anche di Cr/PCr) e la presenza combinata sia di Lac che di Lip [54].

Le *metastasi*, d'altro canto, mostrano un variabile incremento di Cho e riduzione di Cr ed NAA; ciò le distingue dalle masse non neoplastiche, per esempio di natura infiammatoria, mentre il loro prominente picco di Lip [48] le differenzia dai glomi ad alto grado. La spiegazione isto-chimica della presenza dei Lip nelle metastasi e la loro assenza nelle masse tumorali cerebrali primitive può essere attribuito da un lato alla crescita veloce e più superficiale delle metastasi rispetto ad una più infiltrante e profonda dei tumori primitivi e, dall'altro, al fatto che le cellule cancerogene di origini differenti con potenziale capacità di metastatizzare sono caratterizzate da Lip mobili nelle loro membrane cellulari, invece assenti nelle membrane delle cellule neoplastiche primitive.

Infatti i lipidi, pur generalmente assenti nei gliomi anaplastici ed in quelli a basso grado, sono invece di frequente riscontro nei glioblastomi a causa delle ampie zone di necrosi, per cui la loro presenza in una massa espansiva intracranica a caratteri infiltranti è considerata elemento

discriminante tra glioblastomi multiformi e gliomi di differente grading.

I *medulloblastomi* (Pnet) mostrano un alto segnale di Cho (con differenze statisticamente significative tra i gliomi di alto grado), un decremento di NAA e Cr e una assenza di Lac e Lip. Questi dati riflettono bene il corso clinico del medulloblastoma come tumore a rapido sviluppo con alta proliferazione [49,53].

Gli studi clinici di MRS eseguiti con l'obiettivo di individuare possibili modificazioni biochimiche capaci di differenziare la natura delle *lesioni cistiche infettive e lesioni cistiche neoplastiche*, primitiva e/o metastatica [46], hanno dimostrato che lo spettro relativo a cisti infiammatorie (es. ascessi cistici) si presenta alquanto vario per la presenza di Lac, Lip, acetato (1.9ppm), succinato (2.4ppm), Ala (1.5ppm) e Valina o Leucina (0.9ppm). Invece i tumori cistici puri, pur mostrando Lip ed acido lattico, non contengono altri amminoacidi. Questi metaboliti, cosiddetti minori, rappresentano presumibilmente il risultato finale di processi di fermentazione operati dal microrganismo patogeno.

Lo spettro protonico dei *tumori extra-assiali, meningiomi e neurinomi*, non presenta alcun picco riferibile a NAA; la presenza di variabili quantità di NAA è attribuita alla contaminazione del voxel con tessuto cerebrale adiacente. Inoltre, la riduzione di Cr dovuta a rallentamento del metabolismo energetico in questi tumori, rende ragione dell'elevato rapporto Cho/ Cr; pertanto la Cr non può essere utilizzata come standard di riferimento. Sebbene l'aumento della Cho sia più rilevante nei meningiomi rispetto ai neurinomi, il fattore discriminante per differenziarli è la presenza di Ala nei meningiomi e quella di mIn nei neurinomi [47,51].

Nella trattazione della patologia tumorale intra-cranica non si può prescindere dalla valutazione dei margini della *neoplasia*, dell'*edema periferico* e della differenziazione tra *recidiva* e *necrosi post-radioterapica*. Con la diagnostica convenzionale, è ormai noto che il margine tumorale radiologicamente definibile nella maggior parte dei casi non corrisponde a quanto riscontrato all'esame istologico. Questo perché può essere presente un'infiltrazione subdola del parenchima cerebrale, più estesa del margine radiologicamente apprezzabile, che la MR non è in grado di rilevare. L'esame di spettroscopia multivoxel, viceversa, offre al chirurgo la possibilità di conoscere con una buona precisione la reale estensione tumorale in virtù del fatto che le caratteristiche spettroscopiche dell'edema cerebrale sono quelle del parenchima normale mentre il parenchima cerebrale infiltrato presenta tutte quelle alterazioni spettroscopiche descritte.



Anche il profilo metabolico della *radionecrosi* è caratterizzato dalla riduzione della concentrazione di tutti i metaboliti normali (Cho, NAA, Cr) fino alla loro completa assenza e dalla presenza di un segnale in un ampio range di frequenza, compreso tra 0.8 e 1.2 ppm, che deriva dalla sovrapposizione dei segnali dei prodotti di disfacimento cellulare (acidi grassi e proteine citosoliche) e dal Lac [50,52].

Il profilo metabolico di *aree neoplastiche evolutive* presenta, invece, un costante aumento di segnale della Cho.

Tuttavia va sottolineato che per la differenziazione della radionecrosi da un tumore in progressione o da una recidiva è sempre indispensabile integrare la spettroscopia alla RM convenzionale ed il follow-up. Le informazioni metaboliche possono ridurre il numero di procedure diagnostiche addizionali, facilitare l'interpretazione delle immagini RM ma non possono, da sole, condurre ad una diagnosi certa.

L'*epilessia* viene definita come una "nutrizione malata" del neurone; infatti si rileva che un'aumentata concentrazione locale di glutammato con o senza una diminuzione della concentrazione di GABA, causato da un rilascio patologico di neurotrasmettitore o da alterazioni del contenuto dell'acqua/osmolarità del tessuto neurologico indichi uno stato patologico. [55]

La *malattia di Parkinson*, sia nella sua forma idiopatica che iatrogena, è risultata variabile nei livelli di NAA, Glx, Cr e Cho, anche se ad oggi ancora non vi è una base statistica sufficientemente ampia per affermare una correlazione diretta tra sintomi e alterazioni metaboliche [56,57].

La diagnosi differenziale tra la *malattia di Alzheimer (AD)* e la demenza vascolare o altre demenze degenerative primarie è di particolare importanza per l'impatto sulla scelta terapeutica e la prognosi. Nell'AD si riscontra una diminuzione caratteristica e consistente di NAA e un aumento di mI nella corteccia mesio-temporale e parieto-occipitale, e in minor misura variazioni di Glx e Cho [58].

Anche le ricerche sulla *schizofrenia* hanno evidenziato una disfunzione neuronale legata a variazioni di metaboliti cerebrali. È stato evidenziato come è possibile osservare una diminuzione significativa del rapporto NAA/Cho nel lobo frontale sinistro [59].

# I. Introduzione

## Capitolo 3. Principi fisici della Risonanza Magnetica Nucleare

Le immagini di risonanza magnetica stanno assumendo crescente importanza tra le metodiche di imaging clinico. Offrono infatti una notevole risoluzione dei tessuti molli senza l'impiego di radiazioni ionizzanti e permettono l'acquisizione di sezioni e volumi con orientamento arbitrario.

La Spettroscopia RM si basa sul fenomeno fisico della Risonanza Magnetica Nucleare e su una proprietà importante degli atomi, nota con il nome di *chemical shift* (spostamento chimico), secondo cui nuclei della stessa specie isotopica "risuonano" a frequenze diverse in intorni chimici differenti.

Ogni nucleo isolato, purché "magneticamente attivo", emette in opportune condizioni fisiche un segnale di risonanza magnetica con lunghezza d'onda specifica; se però il nucleo fa parte di una struttura molecolare complessa emette un segnale con lunghezza d'onda lievemente diversa, a seconda delle caratteristiche del suo ambiente chimico.

Il segnale di risonanza prodotto da un certo sistema molecolare è quindi espressione delle proprietà magnetiche dei nuclei in esso contenuti e del loro caratteristico "modo di risuonare".

Le preziose informazioni nascoste nel segnale registrato durante un'indagine spettroscopica, vengono rivelate dal cosiddetto "spettro RM", la cui osservazione e interpretazione consente di riconoscere e stimare le componenti in frequenza del segnale ed i loro parametri caratteristici.

La spettroscopia RM permette quindi di ricavare informazioni relative a certi nuclei atomici ed alle loro caratteristiche modalità di interazione con l'ambiente chimico in cui abitano, e conseguentemente, in base al fenomeno del *chemical shift*, consente di individuare e quantificare le differenti molecole in cui i nuclei in esame sono contenuti.

### **I.3.1 Storia della Risonanza Magnetica per Immagini**

La storia della Risonanza Magnetica per Immagini (MRI) inizia nel 1946 con la scoperta del principio di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) da parte di Felix Bloch [68] e Eduard Purcell [100].

La Risonanza Magnetica Nucleare fu impiegata per più di venti anni nel campo delle analisi molecolari chimiche e fisiche, finché nel 1971 Raymond Damadian dimostrò che tessuti sani e tumorali possiedono tempi di rilassamento diversi [77], attirando l'attenzione dei ricercatori sulle prospettive di utilizzo della NMR nell'ambito della diagnostica.

Negli stessi anni la radiografia tradizionale stava evolvendo in metodica tomografica: nel 1973 Hounsfield introdusse la Tomografia Assiale Computerizzata mediante raggi X (TAC) [61], trovando la disponibilità delle strutture sanitarie a spendere cifre considerevoli per strumenti di imaging clinico.

Sempre nel 1973, a soli due anni dalla scoperta di Damadian, Paul Lauterbur produsse immagini MR di piccoli campioni in provetta [90], utilizzando per la ricostruzione dell'immagine una tecnica di retroproiezione simile a quella impiegata in TAC.

Nel 1975 Richard Ernst introdusse la codifica in fase e frequenza dei dati MRI, con ricostruzione delle immagini mediante trasformata di Fourier [75,79], completando così i presupposti teorici delle attuali tecniche di imaging in risonanza magnetica.

Innovazioni tecnologiche e nuove metodiche di acquisizione hanno consentito la produzione di immagini a risoluzione e velocità sempre maggiori.

Già nel 1977 fu sviluppata da Peter Mansfield la metodica di Echo Planar Imaging (EPI), che permette l'acquisizione di una sezione in un solo tempo di ripetizione (TR) [93]. La tecnica EPI rese possibile nel 1987 l'imaging in tempo reale del ciclo cardiaco [74].

L'ultima rivoluzione in ambito MRI risale al 1993, anno di nascita della risonanza magnetica funzionale (fMRI) [63,97]. La metodica fMRI permette di indagare l'attività di un organo senza l'impiego di traccianti radioattivi e rappresenta ad oggi la principale tecnica di imaging della funzione cerebrale.

### I.3.2 MRI dell'atomo di idrogeno

Quasi ogni elemento della tavola periodica possiede almeno un isotopo con momento di spin I diverso da zero, ma solo gli isotopi relativamente abbondanti nel corpo umano possono essere impiegati con successo in MRI.

E' definita abbondanza naturale di un isotopo la frazione di nuclei di un elemento aventi un determinato peso atomico (somma del numero di neutroni e di protoni) [112].

Elemento	Simbolo	Abbondanza Naturale
Idrogeno	$^1\text{H}$	99.985
	$^2\text{H}$	0.015
Carbonio	$^{13}\text{C}$	1.11
Azoto	$^{14}\text{N}$	99.63
	$^{15}\text{N}$	0.37
Sodio	$^{23}\text{Na}$	100
Fosforo	$^{31}\text{P}$	100
Potassio	$^{39}\text{K}$	93.1
Calcio	$^{43}\text{Ca}$	0,145

**Tabella 2: Abbondanza naturale degli isotopi di interesse MRI**

Per abbondanza biologica di una specie atomica si intende invece la frazione di un dato elemento nel corpo umano [80].

<b>Elemento</b>	<b>Abbondanza Biologica</b>
Idrogeno (H)	0.63
Sodio (Na)	0.00041
Fosforo (P)	0.0024
Carbonio (C)	0.094
Ossigeno (O)	0.26
Calcio (Ca)	0.0022
Azoto (N)	0.015

**Tabella 3: Abbondanza biologica delle specie atomiche di interesse MRI**

E' evidente come l'idrogeno (H), essenzialmente sotto forma di  $^1\text{H}$ , sia in assoluto l'elemento più rappresentato nel corpo umano. Per questa ragione l'imaging MR è basato sul segnale di NMR generato dai protoni di  $^1\text{H}$ .

Il 63% degli atomi di idrogeno presenti nel corpo umano appartengono a molecole di acqua o lipidi [78]. In particolare, il segnale NMR è prodotto prevalentemente dai protoni dell'acqua [73].

### **I.3.3 Momento di spin e momento magnetico**

Una trattazione esaustiva della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) implica la formalizzazione in termini di fisica quantistica. Una descrizione della NMR in termini classici è comunque possibile seguendo l'approccio di Bloch.

Lo spin è una proprietà fondamentale delle particelle subatomiche. Assume valori multipli di  $\frac{1}{2}$  e può avere segno positivo o negativo. Elettroni, protoni e neutroni posseggono singolarmente uno spin  $\pm \frac{1}{2}$ .

Nell'ambito del modello a "shell" della struttura nucleare, i nucleoni riempiono gli orbitali nucleari secondo il principio di Pauli. L'accoppiamento "spin up-spin down" dà luogo ad una risultante nulla.

Dalla composizione degli spin dei singoli nucleoni risulta il momento angolare totale del nucleo, detto *momento di spin I*.

Il *numero di spin I* determina il numero di livelli energetici in cui può trovarsi il nucleo [78]:

$$2I + 1$$

Nuclei con un numero pari di neutroni e di protoni hanno numero di spin I pari a 0.

Viceversa, nuclei con spin spaiati possiedono un momento di spin non nullo ( $I \neq 0$ ) che li rende osservabili al fenomeno della NMR. Tale proprietà esprime la tendenza dei nuclei a ruotare intorno al proprio asse in un moto detto di "spinning" e a mantenere la direzione di tale movimento anche in presenza di forze esterne.

Nuclei	Protoni Spaiati	Neutroni Spaiati	Spin Risultante	$\gamma/2\pi(\text{MHz/T})$
<sup>1</sup> H	1	0	1/2	42.58
<sup>2</sup> H	1	1	1	6.54
<sup>31</sup> P	1	0	1/2	17.25
<sup>23</sup> Na	1	2	3/2	11.27
<sup>14</sup> N	1	1	1	3.08
<sup>13</sup> C	0	1	1/2	10.71
<sup>19</sup> F	1	0	1/2	40.08

**Tabella 4: Nuclei di interesse in MRI**

Un insieme di nuclei dotati di momento angolare ed appartenenti alla stessa specie chimica (sistema nucleare di spin), se posto in un campo magnetico esterno uniforme, esibisce una proprietà importante, chiamata magnetismo nucleare, e responsabile del fenomeno della risonanza magnetica. Come mostrato in figura 7, in accordo con le equazioni di Maxwell, in cui si postula che cariche elettriche in movimento generano un campo magnetico, tali nuclei

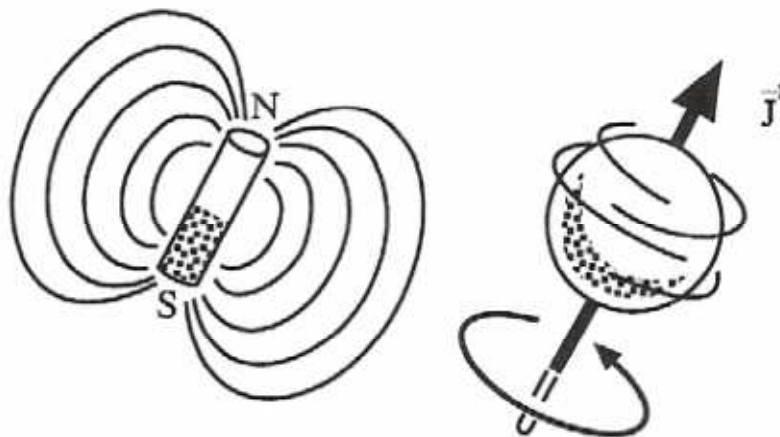
“ballerini” ed elettricamente carichi, ruotando su se stessi producono intorno al proprio asse un microscopico campo magnetico, detto *momento magnetico*  $\mu$ :

$$\mu = \gamma P$$

dove:

-  $P$  è il **vettore momento angolare** associato allo spin di un nucleo e può avere solo valori quantizzati, multipli di  $h/2\pi$  (con  $h$  costante di Planck che vale  $6.626 \times 10^{-34}$  J s) e funziona del numero quantico di spin;

-  $\gamma$  è il cosiddetto *rapporto giromagnetico*, il quale assume un valore caratteristico del tipo di nucleo ed indica la frequenza con cui il nucleo precessa attorno ad un campo magnetico esterno.



**Figura 7: Nuclei dotati di momento magnetico non nullo si comportano come microscopici magneti**

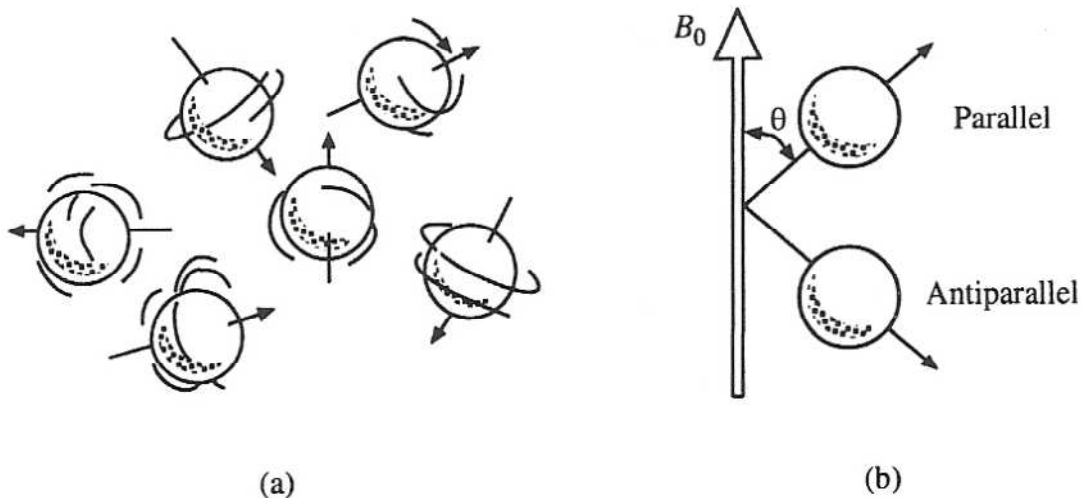
In ambito MRI non interessa tanto il momento magnetico dei singoli nuclei, quanto invece la *magnetizzazione totale* di un elemento di volume, inteso come somma di tutti i momenti magnetici microscopici  $\mu$  presenti nell'oggetto in esame, cioè:

$$M = \sum_i \mu_i$$

### I.3.4 Formazione e rivelazione del segnale RM

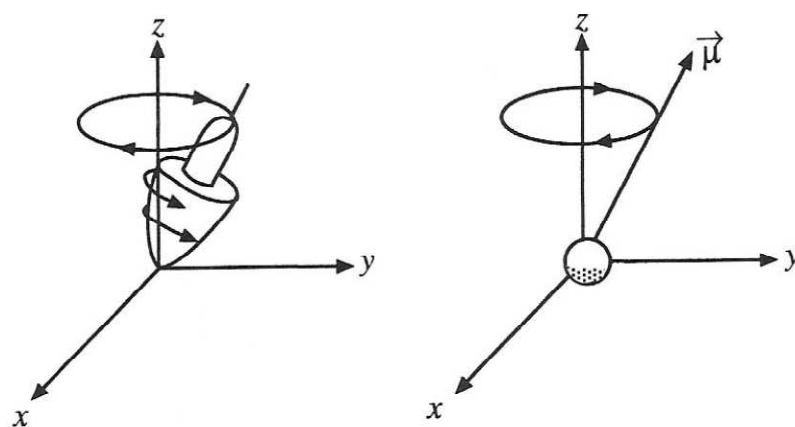
A causa del moto termico caotico, la direzione dei vettori  $\mu$  è completamente casuale in assenza di un campo magnetico esterno, e quindi non si manifesta alcun campo magnetico risultante netto intorno al sistema molecolare ( $M=0$ ). Per attivare una magnetizzazione macroscopica è necessario allineare tutti i momenti magnetici  $\mu_i$ .

Questo si ottiene esponendo il sistema nucleare ad un forte campo magnetico esterno di ampiezza  $B_0$ , applicato lungo la direzione  $z$  dello spazio di osservazione. Ecco che, in presenza di tale campo, i nuclei appartenenti al sistema di spin, comportandosi come fossero piccoli dipoli magnetici, risentono di una forza (frutto dell'interazione tra il campo e quello generato dal loro moto di spinning) che li induce a mutare la loro danza e tende ad allinearli al campo esterno (figura 8).



**Figura 8: Vettori dei momenti magnetici nucleari orientati secondo direzioni casuali (a) e allineati indirezione del campo magnetico esterno (b)**

Mantenendo il loro moto di rotazione e “piroettando” intorno al proprio asse, i nuclei cominciano a descrivere un moto circolare, chiamato *precessione nucleare*, intorno alla direzione del campo esterno applicato, che, per convenzione, coincide con quella dell'asse  $z$  (figura 9).



**Figura 9: La precessione di uno spin nucleare intorno al campo magnetico esterno è simile al rotolamento di una trottola in movimento all' interno di un campo gravitazionale**



A parità di campo magnetico esterno  $B_0$ , l'energia prodotta dalle forze di interazione tra questo ed i momenti magnetici varia al variare della specie nucleare; ciò significa che ciascuna particella subatomica, se isolata, precederà con un proprio specifico ritmo intorno all'asse del campo esterno a cui è sottoposta, con una frequenza caratteristica. Questa è detta *frequenza di Larmor* o frequenza naturale di un sistema di spin isolati, ed è direttamente proporzionale all'intensità del campo esterno applicato, come espresso nella relazione:

$$f_0 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

Ad esempio, in un campo magnetico da 1.5 Tesla la frequenza precessionale dei protoni è circa 64 MHz, in un campo da 3 Tesla è circa 128 MHz e così via.

Danzando intorno all'asse del campo esterno, i campi microscopici  $\mu_i$  del sistema nucleare osservato tendono ad assumere un numero  $(2I + 1)$  di orientazioni rispetto alla direzione di tale asse, dove  $I$  è il numero quantico di spin nucleare. Nel caso dei nuclei degli atomi di idrogeno, carbonio, fosforo e fluoro (come già visto in precedenza) i possibili orientamenti sono due poiché  $I = 1/2$ .

I momenti magnetici nucleari precedono infatti intorno all'asse del sistema con direzioni parallele rispetto ad esso (stato a più bassa energia di interazione tra  $B_0$  e  $\mu_i$ ) o antiparallele (stato a più alta energia), fino a raggiungere uno stato di equilibrio energetico.

La presenza del campo esterno introduce quindi due differenti livelli energetici, nella popolazione degli spin (effetto Zeeman), livelli che corrispondono alle due diverse orientazioni ed hanno energia data rispettivamente da:

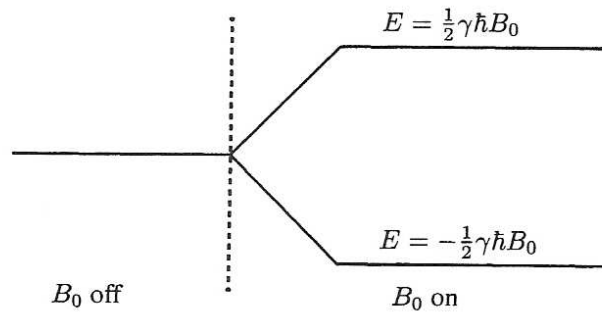
$$E_{\uparrow} = -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0, \quad E_{\downarrow} = \frac{1}{2} \gamma \hbar B_0$$

dove  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  è la costante di Planck  $h$  divisa per  $2\pi$ .

Le equazioni sopra citate indicano che lo stato "parallelo" è quello a più bassa energia di interazione tra  $B_0$  e  $\mu_i$ , mentre lo stato "antiparallelo" è quello a più alta energia. La differenza di energia tra i due stati di spin è data da:

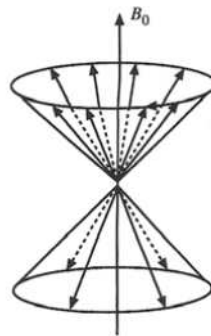
$$\Delta E = E_{\downarrow} - E_{\uparrow} = \gamma \hbar B_0$$

La differenza non nulla nei livelli di energia tra i due stati di spin è conosciuta come fenomeno dello splitting di Zeeman, illustrato in figura 10.



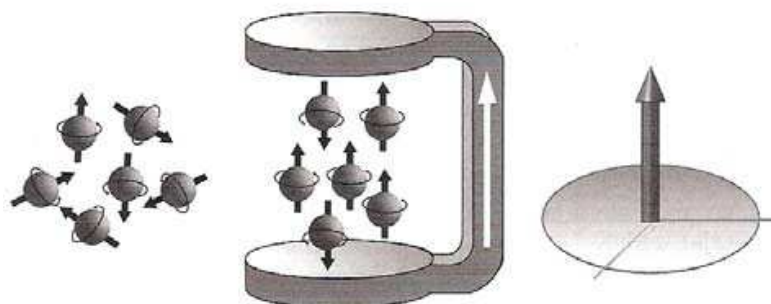
**Figura 10: Fenomeno dello *splitting di Zeeman* nel caso di sistemi di spin a due stati di energia**

Gli spin nucleari si distribuiscono nei due stati secondo la statistica di Boltzmann, da cui si ricava che la popolazione più numerosa è quella che si trova nello stato a più bassa energia, che corrisponde anche a quello a più alta stabilità (figura 11).



**Figura 11: Distribuzione dei momenti magnetici nucleari osservata ad un istante di tempo arbitrario: essi si distribuiscono sui due coni di precessione, orientandosi prevalentemente lungo la direzione del campo**

L'eccesso di spin nello stato energetico più basso, seppur piccolissimo, genera nel sistema un vettore osservabile di magnetizzazione macroscopica netta  $M$ , con ampiezza direttamente proporzionale all'intensità del campo esterno ed al numero di nuclei osservati (figura 12).



**Figura 12: La posizione dell'asse rotazionale degli spin protonici in assenza di campo magnetico è casuale (sinistra); in presenza di un campo magnetico (centro) si manifesta un eccesso di momenti magnetici allineati con la direzione del campo esterno, e quindi un vettore risultante di magnetizzazione (destra)**

A questo punto il sistema di spin si può definire *magnetizzato*; la sua magnetizzazione netta è orientata nella stessa direzione del campo esterno e per questo è detta *magnetizzazione longitudinale* ( $M_L = M_Z$ ). La velocità con cui il sistema nucleare di spin si magnetizza, raggiungendo il proprio equilibrio energetico, è determinata da una costante di tempo T1, nota con il nome di *tempo di rilassamento longitudinale*, caratteristica di ciascun materiale, e dipendente dalla mobilità dei nuclei e delle loro temperature.

Abbiamo visto che l'effetto macroscopico prodotto da un campo magnetico statico esterno  $B_0$  su un insieme di nuclei "ballerini", cioè dotati di spin non nullo, è la generazione di un vettore di magnetizzazione netta  $M$ , diretto lungo la direzione del campo.

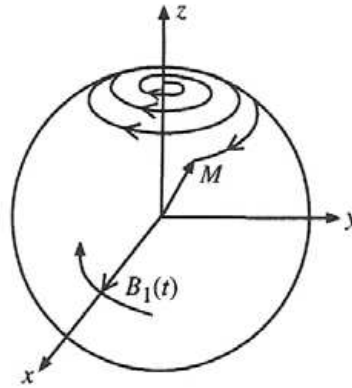
Restringendo la trattazione alla spettroscopia protonica (oggetto di studio del presente progetto) possiamo concludere che i protoni, così come tutti gli altri nuclei subatomici, la cui indole è quella di muoversi ruotando su stessi, danzano perennemente, assumendo nello spazio direzioni disordinate e casuali. In opportune condizioni fisiche gli spin protonici ruotano tutti intorno ad uno stesso riferimento, il campo magnetico esterno, inducendoli ad assumere la posizione di maggior equilibrio e stabilità.

A questo punto il sistema deve essere messo nelle condizioni di poter dare un segnale di sé, di far sentire la sua "voce" risuonando. Il modo più semplice per poter misurare un segnale consiste nell'applicare una perturbazione sul sistema e registrare la sua risposta. Il sistema deve cioè assorbire un'opportuna quantità di energia, che possa poi essere riemessa e misurata.

L'assorbimento dell'energia si realizza "eccitando" il sistema nucleare di spin, già sottoposto al campo statico  $B_0$ , con l'applicazione di una ulteriore forza esterna, un campo variabile nel tempo  $B_1(t)$  e oscillante, nell'intervallo delle radiofrequenze. Tale campo, generato da una pulsazione RF trasmessa da una bobina posta sul piano  $x y$  ortogonale al campo esterno, eccita i momenti magnetici nucleari, influenzando la loro danza "equilibrata" intorno al campo  $B_0$ . Interagendo energicamente con essi, li induce ad allontanarsi dall'asse  $z$ , ad abbandonare il loro stato di equilibrio, e quindi a passare ad uno stato energetico superiore.

La danza di queste particelle subatomiche subisce quindi una nuova variazione per effetto del loro momento angolare che si oppone alla forza di eccitazione (che tenderebbe a mutare la direzione dell'asse di rotazione degli spin in movimento).

Attraverso un lento moto circolare, il vettore di magnetizzazione  $M$  ruota in direzione del piano trasverso (piano  $x y$ , ortogonale alla direzione del campo esterno), precedendo intorno al campo  $B_1$ , con un movimento denominato *precessione forzata* (figura 13).



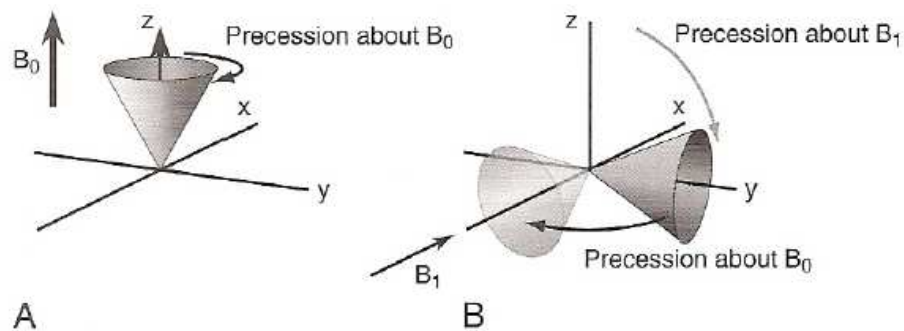
**Figura 13: In un sistema di riferimento fisso il vettore di magnetizzazione netta descrive, in presenza di un campo magnetico rotante RF, un moto a spirale su una superficie sferica**

Si ha quindi una componente del vettore magnetizzazione nel piano  $x y$  del tipo:

$$M_T = M_0 \sin \alpha \exp[j(2 \pi f_{RF} t + \varphi)]$$

che, per induzione, produce un segnale elettrico in una bobina ricevente.

Se l'intensità e la durata della pulsazione di eccitazione sono tali da determinare un angolo di rotazione (flip angle) di  $90^\circ$ , i momenti magnetici del sistema nucleare vengono completamente ribaltati e "abbattuti" sul piano trasverso, con conseguente conversione di tutta la magnetizzazione longitudinale in magnetizzazione trasversale ( $M_T = M_{xy}$ ).



**Figura 14: (A) In condizione di equilibrio termico la magnetizzazione netta è orientata lungo la direzione del campo esterno  $B_0$  e precessa intorno a questo; (B) in presenza di un campo magnetico rotante  $B_1$  (pulsazione RF) il vettore di magnetizzazione viene abbattuto sul piano trasverso e precessa intorno al campo esterno**

In base alle seguenti considerazioni:

1) per indurre in un sistema nucleare di spin magnetizzato una transizione coerente da uno stato energetico ad un altro è necessario fornirgli un'energia pari alla differenza  $\Delta E$  esistente in condizioni di equilibrio tra i suoi stati energetici (i nuclei assorbono o cedono quanti di energia sufficienti a portarli nello stato opposto);

2) in accordo con la teoria quantistica, una radiazione elettromagnetica di frequenza fornisce al sistema fisico cui viene applicata un'energia direttamente proporzionale a tale frequenza (come descritto dalla legge di Planck:  $E_{RF} = hf_{RF}$ ); si deducono le uguaglianze:

$$hf_{RF} = \Delta E = \gamma h B_0$$

da cui si può affermare che la condizione di risonanza di un sistema nucleare di spin è:

$$f_{RF} = f_0$$

La frequenza della pulsazione RF necessaria per eccitare un sistema nucleare di spin, facendogli abbandonare lo stato di equilibrio, deve essere pari alla frequenza naturale di precessione del sistema stesso. In seguito all'eccitazione a radio frequenza i vettori di magnetizzazione dei nuclei esaminati, perdendo la loro posizione di equilibrio vengono abbattuti sul piano della bobina, ortogonale all'asse del campo magnetico esterno, precedendo insieme alla stessa frequenza. Il "ballo" dei nuclei continua nel piano  $x y$ , con lo stesso ritmo e gli stessi movimenti, ma con il vantaggio di poter essere in qualche modo osservato e ammirato. Nel piano si trova infatti una bobina di ricezione che sarà in grado, una volta terminata la pulsazione di eccitazione, di rilevare la corrente indotta dal movimento delle particelle magnetizzate e registrarla nel tempo sottoforma di segnale RM. In accordo con le leggi della termodinamica, dopo esser stato perturbato attraverso una pulsazione RF, il sistema magnetizzato di spin ritorna al suo stato di equilibrio termico, una volta rimossa la forza esterna fonte della perturbazione e trascorso un tempo sufficiente. Quando la pulsazione RF viene rimossa il vettore di magnetizzazione torna alla sua iniziale posizione allineandosi con  $B_0$ , in un processo cosiddetto di *rilassamento*. Durante questo rilassamento l'energia assorbita dal sistema, sottoforma di pulsazione RF, viene emessa sottoforma di un segnale [79].

Finalmente libera, la magnetizzazione  $M$  ruota intorno al campo  $B_0$ , in un ultimo "ballo" di *precessione libera*. Il recupero conseguente della magnetizzazione longitudinale  $M_z$  è detto *rilassamento longitudinale* e il decadimento della magnetizzazione trasversa  $M_{xy}$  è detto

*rilassamento trasversale*. La descrizione classica di come la magnetizzazione trasversa e longitudinale evolvono nel tempo una volta terminata una pulsazione RF è fornita dalle seguenti equazioni, ottenute integrando le equazioni differenziali fenomenologiche di Bloch [10] :

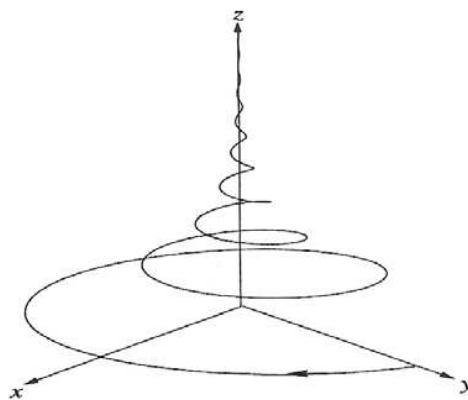
$$\begin{cases} M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{-t/T_2} e^{i2\pi f_0 t} & (I.1) \\ M_z(t) = M_z^0(1 - e^{-t/T_1}) + M_z(0)e^{-t/T_1} & (I.2) \end{cases}$$

Dove:

- $M_z$  e  $M_{xy}$  sono rispettivamente le magnetizzazioni sul piano trasverso e lungo l'asse  $z$  immediatamente dopo la cessazione della pulsazione RF;
- $M_z^0$ , è invece la magnetizzazione longitudinale nello stato di equilibrio termico.

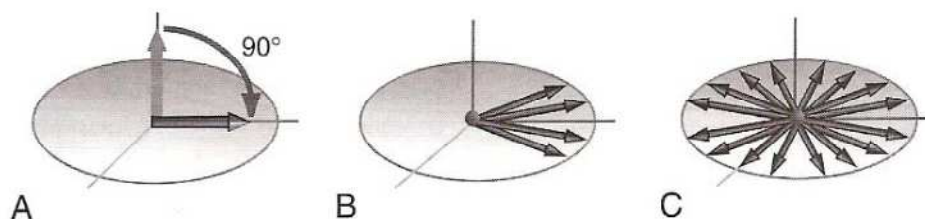
Dall'equazione (I.1) è evidente che l'evoluzione temporale della magnetizzazione trasversa è caratterizzata da un decadimento esponenziale e da un moto di precessione intorno al campo esterno. La durata del periodo di precessione libera dipende dal valore della *costante di decadimento* T2. Nel caso dei tessuti biologici, T2 assume valori nell'ordine di una decina di millisecondi, e questo rende possibile la rilevazione dei segnali RM solo durante questo periodo di tempo.

Inoltre, come si può osservare nell'equazione (I.2), mentre la magnetizzazione M recupera la sua componente longitudinale "spiraleggiando" verso l'asse, non preserva la sua ampiezza, a causa del processo di rilassamento (figura 15). Durante l'eccitazione invece la magnetizzazione spiraleggia allontanandosi dall'asse  $z$  ma mantenendo fissa la sua ampiezza.



**Figura 15: Traiettoria della magnetizzazione durante il processo di rilassamento, secondo un osservatore solidale con il riferimento della bobina**

Inizialmente gli spin precedono tutti in coerenza di fase e quindi le loro magnetizzazioni si sommano, generando il picco massimo di ampiezza del segnale RM (figura 16 A). Successivamente le differenze di campo, dovute ai campi elettromagnetici locali, fanno sì che gli spin comincino a precedere a velocità leggermente diverse e si sfasino (figura 16 C), non contribuendo più tutti insieme, sommandosi, alla generazione del segnale, che apparirà via via sempre meno intenso.



**Figura 16: Abbattimento dei protoni sul piano x,y in seguito a pulsazione RF a 90° e loro precessione in coerenza di fase (A); progressiva perdita di coerenza di fase: gli spin precedono a velocità angolari differenti (B e C)**

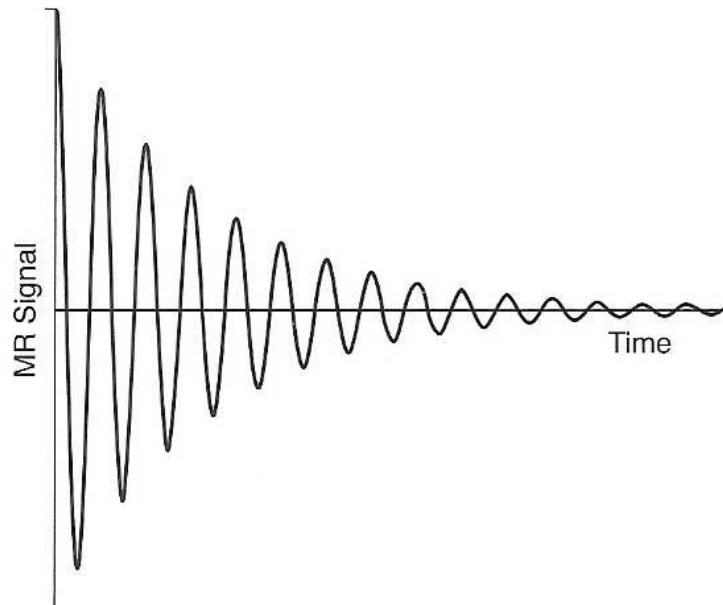
Il segnale elettrico, generato sottoforma di onda elettromagnetica dal moto di precessione della magnetizzazione trasversa sul piano  $x,y$  e rilevato dalla bobina, decade nel tempo ad una velocità determinata da una costante  $T_2$ , caratteristica del tempo di rilassamento del tessuto in esame.

Terminata l'eccitazione a radiofrequenza, il sistema torna infatti spontaneamente, potremmo dire "liberamente", al suo stato di equilibrio. La componente longitudinale della magnetizzazione, quella cioè lungo l'asse  $z$ , tende a recuperare il suo valore iniziale di equilibrio  $M_0$ , e la componente trasversale decade a zero.

Complessivamente, la componente longitudinale della magnetizzazione si ripristina al valore iniziale a causa di scambi energetici fra nucleo e reticolo (costante di tempo  $T_1$ ). La componente trasversale decade invece a causa delle interazioni tra spin (costante di tempo  $T_2$ ).

Il processo di formazione del segnale è detto *induzione di risonanza magnetica* e la perdita di intensità del segnale nel tempo è chiamata decadimento libero di induzione.

Come evidenziato in figura 17, il segnale rilevato nella bobina ricevente tende a zero quasi esponenzialmente e viene comunemente detto FID (Free Induction Decay).



**Figura 17: Il segnale RM è rappresentato nel tempo come un'onda oscillante smorzata esponenzialmente**

L'andamento temporale dell'ampiezza del segnale è descritto dall'equazione:

$$\text{Signal Intensity}(SI) = M(t)e^{-t/T_2}$$

dove  $M(t)$  è la magnetizzazione iniziale e il parametro  $T_2$  determina la rapidità di decadimento del segnale ( $T_2$  è definito “lungo” o “breve” in base al fatto che il segnale decada lentamente o velocemente nel tempo).

Riassumendo: posto un oggetto in un campo magnetico statico esterno ed “eccitato” stimolandolo con un altro campo oscillante possiamo quindi indurre nell'oggetto un magnetismo macroscopico nella forma di una magnetizzazione (trasversa) che ruota intorno al campo esterno.

È questo il fenomeno della Risonanza Magnetica Nucleare: quando si interrompe la sorgente energetica, i nuclei, riallineandosi all'asse del campo magnetico statico, riemettono l'energia assorbita precedentemente, sotto forma di un'onda elettromagnetica di frequenza radio pari a quella di Larmor, una sorta di suono di risonanza, con cui ogni nucleo comunica il ritmo del suo ultimo, rilassato, ballo di ritorno all'equilibrio.

Inizialmente, subito dopo la cessazione della pulsazione RF, le magnetizzazioni microscopiche dei singoli nuclei, precedono insieme, in coerenza di fase sommandosi e generando un segnale molto ampio. Nel tempo però, durante il processo di rilassamento e ritorno alla condizione di equilibrio termico, lievi differenze nei campi magnetici locali fanno



sì che gli spin precedano con velocità leggermente diverse e quindi si sfasino, con una risultante perdita di segnale. La conseguenza dello sparpagliamento delle frequenze precessionali è che il segnale creato decade in modo esponenziale [95] .

A questo punto si deve rilevare questo magnetismo e convertire la magnetizzazione rotante in segnali elettrici. La rilevazione del segnale RM si basa sulla ben nota legge di induzione elettromagnetica di Faraday e sul principio di reciprocità: un flusso magnetico variabile nel tempo attraverso un filo conduttore (bobina di ricezione) induce una forza elettromagnetica (voltage) uguale alla velocità di variazione del flusso. A tale voltage  $V(t)$ , indotto nella bobina, corrisponde il segnale NMR grezzo.

### I.3.5 Codifica spaziale

La codifica spaziale delle immagini MRI è realizzata tramite gradienti lineari di campo magnetico lungo le tre direzioni spaziali: tali gradienti si sommano al campo magnetico statico  $\mathbf{B}_0$ , determinando nei voxel frequenze di precessione leggermente diverse [73].

Il campo magnetico addizionale conseguente alla presenza dei gradienti è esprimibile come:

$$(xG_x + yG_y + zG_z)\hat{z} = (\underline{G} \cdot \underline{r})\hat{z}$$

dove  $x$ ,  $y$  e  $z$  rappresentano le coordinate del voxel nel piano cartesiano,  $\mathbf{r}$  è il vettore posizione,  $\mathbf{G}$  il vettore gradiente e  $\hat{z}$  il versore unitario nella direzione  $z$ ; i gradienti nelle tre direzioni dello spazio sono definiti dalle seguenti relazioni:

$$G_x = \frac{\partial B_z}{\partial x} \quad G_y = \frac{\partial B_z}{\partial y} \quad G_z = \frac{\partial B_z}{\partial z}$$

Il gradiente  $G_z$  è detto di *selezione della fetta* ed è attivo durante la fase di eccitazione: l'impulso a RF ha una banda frequenziale stretta, ed eccita soltanto una sezione del volume in esame [103].

$G_x$  è il gradiente di *codifica di frequenza*: rimane acceso durante l'acquisizione del segnale e fa precedere a frequenze diverse i voxel allineati lungo la direzione  $x$ .

$G_y$  è detto infine gradiente di *codifica di fase*. E' attivo per un breve periodo prima della ricezione del segnale eco e determina lo sfasamento degli spin di una stessa colonna, che è poi mantenuto dopo lo spegnimento del gradiente.

I gradienti  $G_x$  e  $G_z$  vengono compensati, cioè preceduti o seguiti da un gradiente di segno opposto, al fine di evitare la perdita di coerenza di fase nella slice selezionata.

Ogni gradiente ha un proprio andamento temporale, come descritto in precedenza. Il campo risultante lungo  $z$  è quindi espresso dalla seguente relazione:

$$B_z(\underline{r}, t) = B_0 + \underline{G}(t) \cdot \underline{r}$$

I campi magnetici associati ai gradienti di codifica spaziale sono molto inferiori a  $B_0$ .

### I.3.6 Il K-spazio

Il segnale di tensione  $s(t)$  registrato ai capi della bobina ricevente può essere espresso come:

$$s(t) = c \iint_A \rho(x, y, z_0) e^{j \left[ \gamma \int_0^t G_x(t') x dt' + \gamma \int_0^t G_y(t') y dt' \right]} \cdot e^{-\frac{t}{T_2^*}} dx dy$$

Dove:

- $c$  è una costante di proporzionalità;
- $A$  indica la slice selezionata dall'eccitazione RF;
- $\rho(x, y, z_0)$  rappresenta la distribuzione della densità protonica nella sezione  $A$ ;
- $\gamma$  è il rapporto giromagnetico;
- $G_x$  e  $G_y$  sono i gradienti di codifica spaziale nelle direzioni  $x$  e  $y$ .

Gli integrali  $\int_0^t G_x(t') x dt'$  e  $\int_0^t G_y(t') y dt'$  tengono conto dell'effetto cumulativo indotto dall'applicazione di un gradiente sullo sfasamento dei protoni.

Infatti, i prodotti  $G_x \cdot x$  e  $G_y \cdot y$  hanno le dimensioni di un campo magnetico, quindi il prodotto  $\gamma B = \omega$  è una velocità angolare, il cui integrale temporale rappresenta uno sfasamento:

$$\varphi = \int_0^t \omega(t') dt'$$

Trascurando il decadimento esponenziale del segnale RM legato alla costante temporale  $T_2^*$ , e ponendo:

$$k_x(t) = \gamma \int_0^t G_x(t') dt'$$

$$k_y(t) = \gamma \int_0^t G_y(t') dt'$$

È possibile esprimere il segnale  $s(t)$  in funzione delle due nuove variabili  $k_x$  e  $k_y$  :

$$S(k_x, k_y) = c \int_A \rho(x, y, z_0) e^{j(k_x x + k_y y)} dx dy$$

Il parametro  $k$  è detto **numero d'onda** e rappresenta il periodo spaziale di una sinusoide:

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad [\text{m}^{-1}]$$

dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda della sinusoide.

I valori  $S(k_x, k_y)$  costituiscono una matrice detta ***k*-spazio**. Ad ogni punto del  $k$ -spazio corrisponde una sinusoide di:

- direzione ortogonale al vettore posizione del punto considerato;
- periodo spaziale definito dalle coordinate  $k_x$  e  $k_y$ ;
- ampiezza pari a  $S(k_x, k_y)$ .

Acquisire il segnale RM equivale a riempire la matrice del  $k$ -spazio secondo una traiettoria definita dall'andamento temporale dei gradienti di codifica spaziale.

Il segnale RM espresso da  $S(k_x, k_y)$  è la trasformata di Fourier bidimensionale della densità protonica. Ne consegue che antitrasformando il  $k$ -spazio si ottiene un'immagine della distribuzione spaziale della densità protonica.

### I.3.7 Chemical shift

Da quanto detto in precedenza si evince che tutti i nuclei di una stessa specie atomica (per esempio tutti i nuclei dell'idrogeno) se sottoposti ad un medesimo campo magnetico esterno risuonano esattamente alla stessa frequenza. Questo è vero però solo nel caso in cui il sistema nucleare venga considerato isolato.

Fortunatamente i nuclei abitano all'interno degli atomi, e sono quindi circondati dagli elettroni. Le nubi di elettroni intorno ai nuclei sono in grado di schermare leggermente il campo magnetico subito dal nucleo, e questo effetto è diverso da atomo a atomo.

È evidente che se per esempio tutti i nuclei di idrogeno di una molecola risuonassero alla stessa frequenza, la spettroscopia NMR del protone sarebbe praticamente inutile e non potrebbe aiutarci a determinare la struttura dei composti organici. Fortunatamente, il campo magnetico risentito da ciascun nucleo non coincide con quello applicato esternamente poiché questo viene leggermente perturbato dalle nubi elettroniche che circondano il nucleo. La conseguenza di ciò è che la frequenza precessionale di Larmor risulta influenzata e modificata dall'ambiente chimico dello spin [88].

Abbiamo detto che la frequenza di risonanza di un nucleo isolato RMN-attivo è direttamente proporzionale all'intensità del campo magnetico risentito dal nucleo, secondo l'equazione di Larmor. Nel caso in cui però questo stesso nucleo faccia parte di una struttura molecolare più complessa, il suo momento magnetico risentirà oltre che della presenza di  $B_0$  anche di quella dei campi magnetici dell'ambiente chimico circostante.

La precessione delle nubi elettroniche che circondano il nucleo genera un campo che scherma parzialmente il nucleo dal campo magnetico esterno.

L'intensità di campo effettivamente risentita dal nucleo in esame risulta allora essere:

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma)$$

con  $\sigma$  costante di schermo.

La schermatura subita da un nucleo ad opera dei campi elettronici che lo circondano produce un effetto importante, noto con il nome di "effetto di schermatura" (shielding effect) che costituisce la base della Spettroscopia NMR: nuclei della stessa specie chimica, ma inseriti in contesti molecolari diversi, possiedono frequenze di risonanza differenti:

$$f_{eff} = \frac{\gamma}{2\pi} B_{eff}$$

che si discostano dalla frequenza fondamentale di una quantità  $\delta = f_0 - f_{eff}$ , detta *chemical shift* (spostamento chimico).

Le differenze in frequenza, in base all'equazione di Larmor, sono tanto maggiori quanto più intenso è il campo magnetico esterno applicato.

Ad esempio, per i protoni contenuti nella molecola di N-acetylaspartato lo shift di risonanza risulta pari a 127 Hz, se l'indagine spettroscopica viene condotta in presenza di un campo esterno da 1.5 Tesla (T), ed è invece pari a 254 Hz se si utilizza un'apparecchiatura da 3 T.

Gli shift in frequenza sono comunque estremamente piccoli (un tipico spostamento potrebbe essere dell'ordine di 100 Hz, confrontato con una frequenza NMR fondamentale di 100 MHz); per questo motivo il *chemical shift* di un picco nello spettro viene generalmente espresso in parti per milione (*ppm*, parts per million), anziché in Hertz (Hz). La scala *ppm* ha la proprietà infatti di essere indipendente dal campo magnetico di acquisizione, come mostra la seguente formula di conversione da unità Hz ad unità ppm:

$$\delta(ppm) = \frac{f(Hz) - f_{ref}(Hz)}{f_{ref}(Hz)} 10^6$$

dove  $f$  e  $f_{ref}$  rappresentano rispettivamente la frequenza di risonanza del picco di interesse e della componente di riferimento, presa come origine della scala ppm.

La molecola utilizzata come riferimento standard per la spettroscopia protonica è il tetrametilsilano (TMS), il quale produce un singolo picco di assorbimento intenso e sottile (singoletto) ed i cui protoni sono più schermati di quasi tutti i composti organici e quindi risuonano alle frequenze più lontane da quella fondamentale.

Lo spostamento chimico  $\delta$ , a cui è soggetta la frequenza di risonanza di un nucleo non isolato, dipende dall'ambiente chimico locale in cui questo è situato. Rappresenta un importante fattore discriminante di differenti strutture molecolari, e può essere usato per ottenere informazioni circa la natura biochimico-metabolica di un tessuto campione.

Attraverso lo studio delle proprietà magnetiche dei nuclei e sfruttando il principio del *chemical shift* la spettroscopia NMR è in grado di rilevare informazioni dettagliate riguardo la struttura delle molecole, la natura di molti degli atomi presenti in esse, il loro numero ed il loro "intorno molecolare".

Riassumendo: nuclei appartenenti a differenti ambienti chimici emettono segnali di risonanza con differenti frequenze. Questa proprietà importante delle particelle subatomiche, su cui la Spettroscopia RM basa i suoi studi, rende i segnali spettroscopici (MRS) molto utili poiché le differenti strutture molecolari componenti il campione investigato possono essere facilmente identificate e l'analisi di tali segnali può condurre ad importanti informazioni biomediche [88].

Nel caso della spettroscopia dell'idrogeno, i protoni contenuti nelle molecole di acqua libera hanno frequenze di risonanza leggermente diverse da quelle dei protoni contenuti in molecole più complesse (metaboliti), a causa delle diverse strutture molecolari di cui fanno parte. L'ambiente molecolare in cui i nuclei d'idrogeno sono situati influenza quindi significativamente la natura dei segnali RM da loro originati, definendo così le potenzialità e la versatilità di questa tecnica diagnostica.

### I.3.8 Modello teorico del segnale MRS

Il ritorno all'equilibrio del vettore di magnetizzazione di un sistema di spin che ha assorbito l'energia di un impulso RF genera un segnale che può essere rilevato. La rotazione del vettore di magnetizzazione trasversale attorno alla direzione del campo magnetico statico  $B_0$  (asse) induce una corrente nella bobina posizionata attorno all'asse  $x$ .

La corrente è descritta nel tempo da un'onda sinusoidale, che decade naturalmente secondo la costante di tempo  $T_2$  dovuta alla perdita di fase del sistema di spin. Il segnale originato dal "libero" decadimento è chiamato FID (Free Induction Decay).

Un FID acquisito in corrispondenza di un tessuto campione eterogeneo, in cui cioè la specie chimica nucleare esaminata (ad esempio il protone) è inserita in ambienti molecolari differenti, consiste di una combinazione di sinusoidi smorzate esponenzialmente con differenti frequenze, ognuna corrispondente a molecole con differenti *chemical shift*. Da questo ed in base all'equazione (2.1) si ricava che un generico segnale MRS emesso in seguito all'applicazione di una pulsazione di eccitazione può essere rappresentato attraverso il seguente modello teorico:

$$s(t) = \sum_k M_{xy}^k(0) \cdot e^{i2\pi f^k t} \cdot e^{-t/T_2^k}$$

dove:

- $k = 1, \dots, K$  è il numero di oscillazioni che compongono il segnale,
- $M_{xy}^k, f^k, T_2^k$  sono rispettivamente *ampiezza* (intensità di magnetizzazione trasversa), *frequenza* (velocità di precessione) e *fattore di smorzamento* o *decadimento* (tempo di ritorno all'equilibrio della magnetizzazione) della  $k$ -esima componente.

Ogni componente del segnale è caratterizzata dai seguenti parametri:

- frequenza (caratteristica della specie molecolare),
- ampiezza (proporzionale al numero di nuclei che contribuiscono alla componente con una certa frequenza),
- smorzamento (fornisce informazione circa la mobilità e l'ambiente macromolecolare del nucleo).

### **I.3.9 Dal segnale allo “spettro” RM**

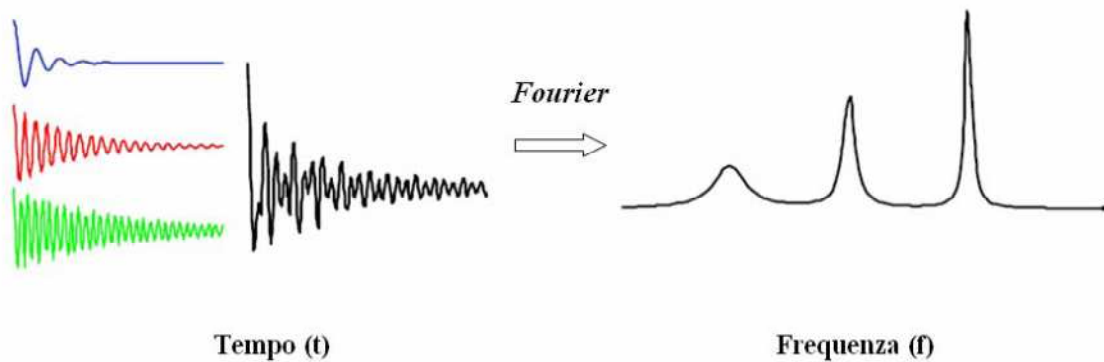
Il segnale elettrico di risonanza (FID) emesso sottoforma di onda elettromagnetica, quasi fosse un “canto”, da un sistema nucleare di spin magnetizzato ed opportunamente eccitato, viene registrato dalla bobina dello scanner di acquisizione, e poi restituito all'osservatore, come segnale temporale.

Come si può evincere dalla discussione sul meccanismo di generazione del segnale RM, tali segnali consistono in oscillazioni smorzate nel tempo, mescolate a rumore, che descrivono il decadimento della magnetizzazione trasversa del sistema nucleare, durante il suo processo di ritorno all'equilibrio.

Le preziose informazioni nascoste nel segnale registrato durante un esame spettroscopico, relative alla numerosità dei nuclei risuonanti (ampiezza del segnale), ed al ritmo (frequenza di precessione) e alla durata (costante di decadimento  $T_2$ ) della loro precessione all'interno del sistema osservato, non possono essere rivelate attraverso un'osservazione diretta dei dati grezzi (raw-data), acquisiti nel dominio temporale.

Poiché ciò che caratterizza un nucleo ed il suo ambiente chimico è la frequenza di oscillazione con cui risuona, è uso comune analizzare i dati nel dominio delle frequenze, anziché in quello del tempo, dopo averli trasformati con un opportuno operatore matematico: la *Trasformata di Fourier* (FT, Fourier Transform), in grado di convertire i dati dal dominio temporale a quello delle frequenze [114].

La trasformata di Fourier è un metodo per analizzare le componenti in frequenza di un segnale temporale: permette di rappresentare le intensità del segnale in funzione della frequenza in un diagramma detto “spettro di ampiezza”.



**Figura 18: Trasformazione di Fourier del segnale dal dominio del tempo (FID) a quello delle frequenze (spettro)**

Il risultato di tale trasformazione è la distribuzione delle intensità dei segnali RM acquisiti, in funzione delle frequenze di risonanza dei nuclei (protoni) da cui sono stati generati.

Tale distribuzione viene visualizzata nel cosiddetto *spettro RM*, diagramma in cui le intensità delle oscillazioni che compongono il segnale vengono descritte, al variare delle situazioni chimiche caratteristiche dei tessuti esaminati, in funzione delle loro frequenze (unità di misura Hz o ppm).

L'osservazione diretta e l'interpretazione dello spettro consentono di riconoscere le componenti del segnale e stimare, attraverso opportune tecniche di elaborazione del segnale, i loro parametri caratteristici: frequenza di risonanza, forma d'onda, larghezza di picco, fase e ampiezza.

I valori di questi parametri di uno spettro RM sono determinati dalle strutture molecolari dei corrispondenti composti che lo hanno generato, dai loro ambienti chimici (condizioni fisiologiche locali e globali) in cui questi si trovano e dalle specifiche condizioni di acquisizione. Ogni parametro può essere oggetto di interesse e svelare aspetti relativi a morfologia, metabolismo e fisiologia dei tessuti esaminati o può costituire un importante biomarker.

Normalmente le specifiche frequenze relative di risonanza (o i loro spostamenti chimici) sono usate per identificare le specie biochimiche da cui tali risonanze hanno avuto origine.

Nell'elaborazione dei dati nel dominio delle frequenze la maggior attenzione è di solito rivolta all'analisi degli integrali dei segnali, poiché tali integrali riflettono i livelli di concentrazione dei metaboliti nei tessuti esaminati. In alcune condizioni patologiche questi



livelli possono variare e le loro variazioni possono servire come markers clinici di tali condizioni.

La larghezza dei picchi delle risonanze è invece espressione dell'effettivo tempo di rilassamento dei sistemi di spin, il cui principale determinante è la mobilità delle componenti molecolari di cui tali sistemi sono parte. Mentre i sistemi di spin di piccoli metaboliti esibiscono valori di T2 relativamente lunghi (in corrispondenza di picchi stretti nello spettro), quelli dei composti macromolecolari di solito hanno valori T2 brevi e questo può causare la presenza nello spettro RM di componenti allargate che si sovrappongono rendendo difficoltosa una sua corretta lettura ed interpretazione (fenomeno di “overlapping” dei picchi).

Tali componenti possono essere filtrate dallo spettro usando tempi di echo più lunghi per l'acquisizione dei dati. Questo semplifica notevolmente la loro analisi quantitativa ma avviene a spese di una perdita di informazione e di una diminuzione del rapporto segnale/rumore [114].

### **I.3.10 Risoluzione MRI**

La generazione di immagini MR è la sola metodica di imaging con risoluzione spaziale indipendente dalla lunghezza d'onda della radiazione impiegata.

Nei sistemi ottici, ecografici e radiografici la diffrazione limita la risoluzione spaziale ad un valore dell'ordine della lunghezza d'onda: il fascio emesso dalla sorgente diverge nel suo cammino verso il rilevatore, per cui non è possibile determinarne con esattezza l'origine.

Nell'imaging MR, invece, la localizzazione spaziale del segnale non è basata sulla focalizzazione della radiazione emessa, ma sulla codifica frequenziale del segnale proveniente dai diversi voxel.

Ciò permette una risoluzione submillimetrica dell'imaging MR, quando invece la lunghezza d'onda della radiazione RF è di alcuni metri.

La risoluzione MR dipende dal grado di copertura del k-spazio ed è inversamente proporzionale alla massima frequenza spaziale acquisita.

Nella pratica clinica, i parametri di acquisizione vengono scelti in base al compromesso tra risoluzione e tempo di acquisizione dell'immagine.

# I. Introduzione

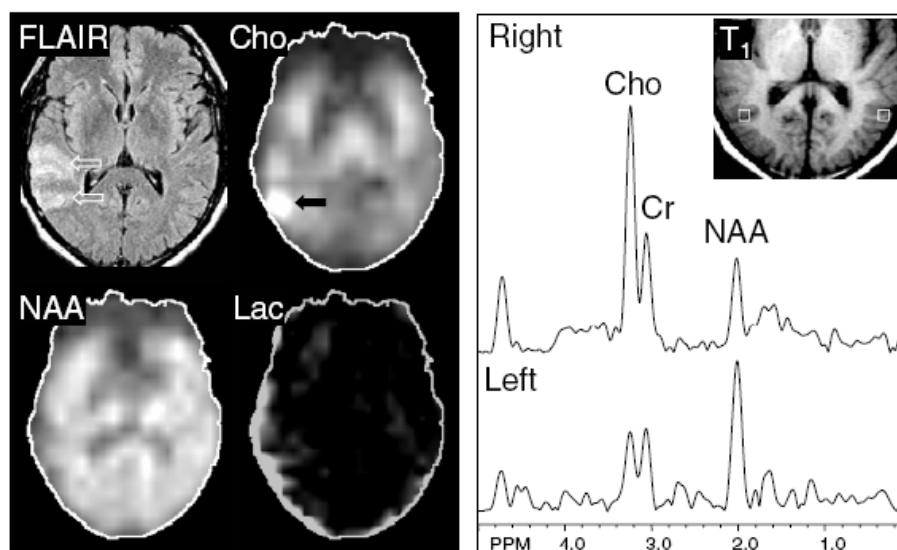
## Capitolo 4. L'imaging spettroscopico "in vivo"

Come descritto nel paragrafo precedente, la Spettroscopia RM del protone, sfruttando il fenomeno fisico di eccitazione e conseguente rilassamento degli spin protonici, è in grado di rilevare informazioni biochimiche e metaboliche dei tessuti esaminati, descrivendone la struttura molecolare.

La possibilità da parte della spettroscopia di rilevare e quantificare *in vivo* certi metaboliti di interesse clinico, e la sua intrinseca natura non invasiva, rendono tale tecnica uno strumento diagnostico ideale in una larga varietà di patologie, in particolare di quelle riguardanti il sistema nervoso centrale [105].

Conoscendo la concentrazione intracellulare di questi metaboliti si valuta la funzionalità di diverse vie metaboliche quali: sistema glutamminergico e GABAergico, metabolismo energetico, osmoregolazione del SNC, oltre alla cellularità neuronale e gliale. Una riduzione delle concentrazioni di NAA (marker specifico dei neuroni) si osserva, ad esempio, nei pazienti con patologie che coinvolgono perdita neuronale e/o assonale (ischemie, tumori cerebrali, epilessia, sclerosi multipla e patologie neurodegenerative).

La spettroscopia RM *in vivo* è una tecnica promettente: monitorando variazioni significative delle concentrazioni metaboliche consentirebbe lo studio dei processi biochimici nei vari organi e quindi un'accurata caratterizzazione chimico-patologica dei tessuti lesionati, nonché la valutazione della progressione del danno tissutale, dell'eterogeneità delle lesioni ed efficacia del trattamento terapeutico. Inoltre, per le sue proprietà intrinseche, l'indagine spettroscopica *in vivo* potrebbe avere la capacità di rilevare stati patologici in corrispondenza di regioni "normali" da un punto di vista strutturale, aprendo così nuovi orizzonti alla medicina diagnostica strumentale.



**Figura 19: Immagine FLAIR RM di una lesione tumorale di I grado della regione temporo-parietale posteriore dx e relative mappe metaboliche. L'aumento marcato della colina solo nella parte posteriore della lesione indica quella come zona a più alta densità gliale, suggerendo la natura edematosa della restante parte della lesione [34]**

In particolare, la Spettroscopia RM *in vivo* rappresenta un progresso rilevante per lo studio diretto delle attività metaboliche del sistema nervoso centrale, oltre che per il suo impiego per una diagnosi preclinica mediante la determinazione quantitativa *in vivo* delle alterazioni metaboliche che sono responsabili del successivo quadro morfologico patologico cui segue la sintomatologia clinica specifica.

Per avere utilità clinica, l'informazione biochimica descritta in uno spettro RM acquisito *in vivo* deve provenire da una specifica e confinata regione di interesse. Sono state sviluppate molte tecniche per ottenere spettri da piccole regioni di un campione (acquisizione *single-voxel*) e, ancor più utili da un punto di vista clinico, tecniche per ottenere uno spettro in corrispondenza di ciascun voxel dell'oggetto esaminato (acquisizione *multi-voxel*).

La gran parte di questi metodi è però caratterizzata da forti vincoli e limitazioni che rendono la spettroscopia *in vivo* una tecnica di imaging a bassa risoluzione, utilizzata attualmente soprattutto nell'ambito di progetti di ricerca, sebbene le sue potenziali caratteristiche "potrebbero" renderla una tecnica diagnostica di grande impatto clinico. Infatti, nonostante siano molti gli studi che oggi riportano in letteratura importanti risultati riguardo l'impiego dell'imaging spettroscopico nella pratica clinica, sappiamo che tali risultati sono in realtà ottenuti interpretando mappe metaboliche a bassa risoluzione, e quindi poco attendibili, soprattutto per quanto riguarda l'analisi quantitativa dei composti biochimici.

Le grandi potenzialità e caratteristiche delle indagini spettroscopiche, realtà concreta nel caso della spettroscopia *ex-vitro*, o ad “alto campo”, diventano purtroppo spesso un “sogno” difficilmente realizzabile nel caso della spettroscopia *in vivo*, o “a basso campo”.

L'utilizzo di campi magnetici di bassa intensità fa sì che gli spettri RM ricostruiti in corrispondenza dei tessuti osservati siano spesso caratterizzati da un basso rapporto segnale/rumore, e fortemente corrotti da artefatti di varia origine e natura, nonché da componenti di disturbo che impediscono il riconoscimento e la corretta quantificazione dei metaboliti di interesse.

Perciò il segnale spettroscopico, a causa della sua complessità, è difficilmente modellizzabile da un punto di vista matematico; ad oggi, non esiste un modello fisico capace di descrivere in modo ottimale tutte le complesse caratteristiche di un segnale acquisito *in vivo*.

A queste problematiche si aggiungono poi i vincoli temporali dovuti al fatto che i tempi di acquisizione del segnale non possono essere eccessivamente lunghi. Tali vincoli, nel caso delle tecniche standard di localizzazione dei segnali spettroscopici, limitano in modo severo la risoluzione spaziale delle immagini ricostruite.

#### **I.4.1 Tecniche di localizzazione “single-voxel”**

Sono disponibili vari metodi di localizzazione spaziale del segnale spettroscopico: la scelta dipende dalla regione anatomica da studiare e specificamente dal livello di dettaglio spaziale richiesto (una migliore definizione spaziale si ottiene invariabilmente a spese del rapporto segnale/rumore degli spettri).

Le tecniche con cui vengono localizzati i segnali registrati con indagini di H-MRS si suddividono in due categorie principali: 1) *tecniche single-voxel*, nelle quali viene acquisito un unico spettro in corrispondenza di una singola regione anatomica di interesse e 2) tecniche multi-voxel, in cui vengono registrati segnali provenienti da regioni multiple di interesse.

Nel caso delle tecniche a volume singolo, le due tipologie di sequenze di acquisizione più utilizzate sono: PRESS (*Point Resolved Spectroscopy*) e STEAM (*Stimulated Echo Acquisition Mode*), dette anche “tecniche fetta selettive” [54]. Il principio su cui entrambe si basano è quello di utilizzare tre pulsazioni selettive di strato, mutualmente ortogonali, e disegnare la sequenza in modo da registrare soltanto il segnale di echo proveniente dal volume spaziale (voxel) in cui si intersecano i tre strati di tessuto selezionati.

## PRESS (Point Resolved Spectroscopy)

La tecnica PRESS ad esempio, usa una sequenza multi-echo 90-180-180. Come mostrato in figura 20, un impulso RF a  $90^\circ$  di selezione della fetta è applicato in congiunzione con un gradiente di campo magnetico  $G_x$ . Questo “eccita” gli spin in un piano  $yz$ .

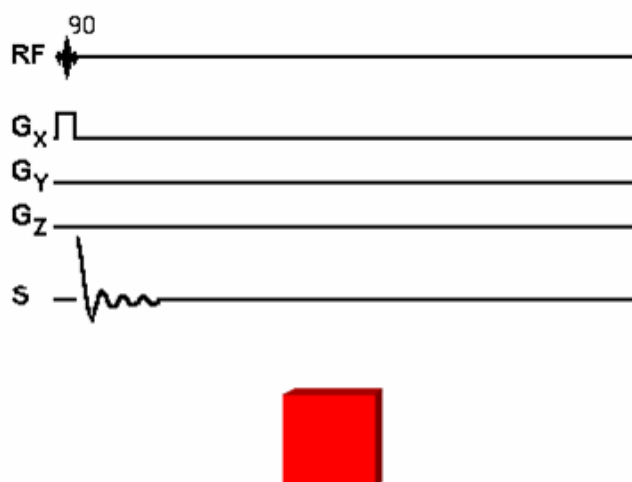


Figura 20: Sequenza PRESS (fase 1); selezione di una fetta sul piano  $yz$  del parenchima esaminato

Un impulso RF a  $180^\circ$  selettivo della fetta è applicato in congiunzione con un gradiente di campo  $G_y$ . Questo ruota gli spin localizzati in un piano  $xz$  (figura 21).

Un secondo impulso RF a  $180^\circ$  di selezione di fetta è applicato in congiunzione con un gradiente di campo magnetico  $G_z$ . Tale impulso a  $180^\circ$  eccita gli spin in un piano  $xy$  (figura 22).

Il secondo echo è registrato come segnale e rappresenta il segnale emesso dagli spin contenuti nella fetta (singolo volume) ottenuta dall'intersezione dei tre piani.

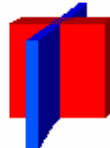
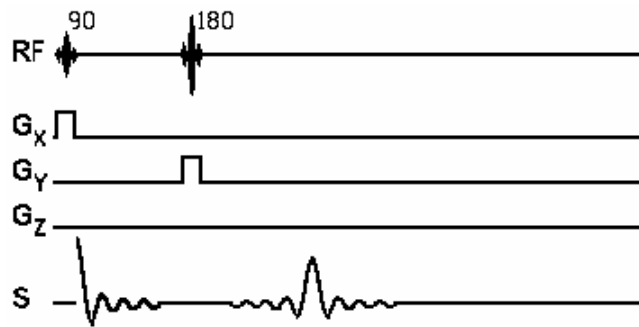


Figura 21: Sequenza PRESS (fase 2); selezione di una fetta sul piano xz del parenchima esaminato

Trasformando l'echo secondo Fourier si ottiene uno spettro NMR degli spin localizzati all'intersezione dei tre piani. Scegliendo accuratamente i gradienti  $G_x$ ,  $G_y$ ,  $G_z$ , è possibile posizionare il voxel di interesse ovunque all'interno dell'oggetto da studiare.

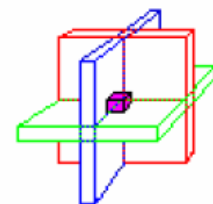
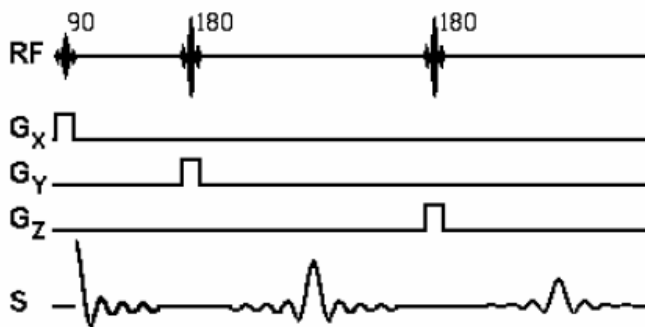
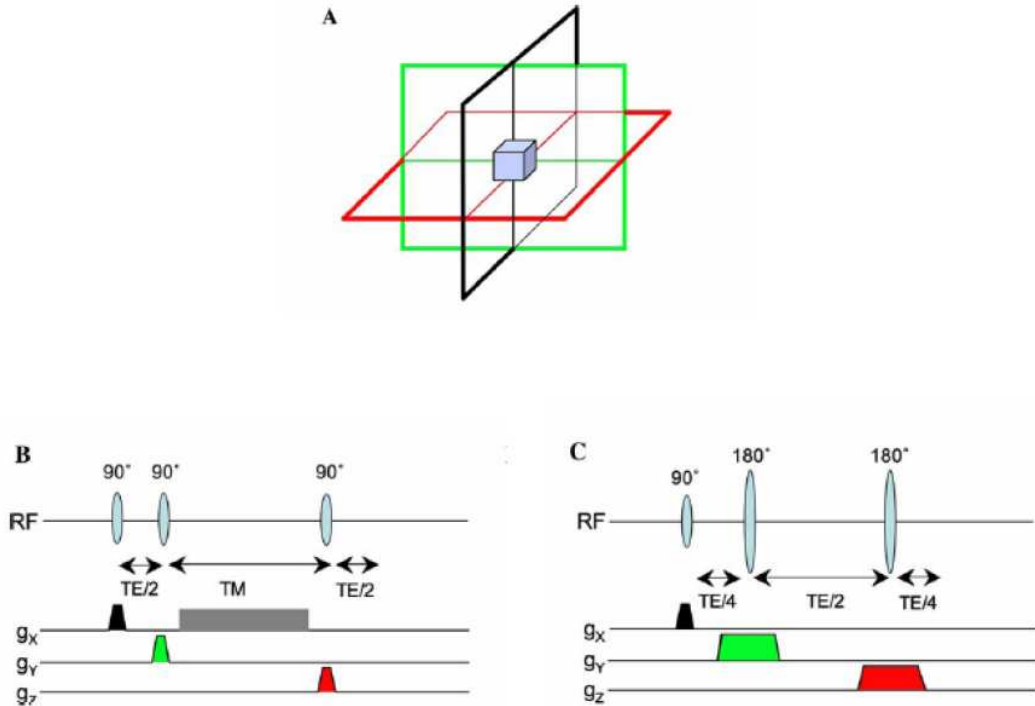


Figura 22: Sequenza PRESS (fase 3); selezione di una fetta sul piano xy del parenchima esaminato. L'intersezione delle tre fette selezionate nelle fasi 1, 2, e 3 corrisponde al voxel in corrispondenza del quale avviene la registrazione del segnale

## STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode)

La tecnica STimulated Echo Acquisition Mode (STEAM) è simile alla PRESS eccetto che per una sequenza di impulsi 90-90-90 usata al posto della sequenza 90-180-180.



**Figura 23: Tecniche di localizzazione single-voxel. (A) La localizzazione spaziale è ottenuta collezionando segnali provenienti dall'intersezione di tre pulsazioni RF selettive dello strato, applicate in direzioni tra loro ortogonali. (B) La sequenza STEAM consiste di tre pulsazioni selettive di strato a  $90^\circ$ . (C) La sequenza PRESS consiste di una pulsazione di eccitazione selettiva di strato a  $90^\circ$  e due pulsazioni di rifasamento a  $180^\circ$  [6]**

La sequenza PRESS fornisce un segnale doppio rispetto a quello che si ottiene con la sequenza STEAM, la quale però presenta il vantaggio di consentire la soppressione del segnale proveniente dalle macromolecole [44].

Nelle tecniche a volume singolo i segnali provenienti da regioni esterne al voxel desiderato, vengono eliminati attraverso l'applicazione di gradienti di defasamento.

Succede però, come nel caso della spettroscopia dei tessuti cerebrali, che le dimensioni del voxel ( $\sim 8 \text{ cm}^3$ ) siano molto più piccole del volume dell'intera regione osservata (il cervello ha un volume pari a circa  $15000 \text{ cm}^3$ ). Questo significa che, se la sequenza riesce ad eccitare il 100% della magnetizzazione dentro il voxel ma anche l'1% di quella fuori dal voxel, il segnale registrato avrà comunque in sé un contributo dall'esterno quasi doppio rispetto a quello proveniente dall'interno del voxel, considerato il bassissimo rapporto voxel/FOV.

Questo significa che affinché la localizzazione sia corretta, è molto importante che la magnetizzazione fuori dal voxel di interesse sia soppressa il più efficacemente possibile, attraverso l'utilizzo di gradienti di abbattimento (*crusher gradients*) sufficientemente larghi [4].

Il volume spaziale definito ha la forma di un parallelepipedo; se la porzione anatomica da investigare risulta omogenea e di dimensioni sufficienti per poter essere catturata in un singolo blocco, è preferibile impiegare tecniche a voxel singolo.

Queste ultime richiedono tuttavia una certa abilità nella preparazione dell'esame. Il posizionamento del voxel di acquisizione risulta molto critico per l'efficacia ed il buon esito dell'indagine. Poiché spesso risulta difficile adattare una porzione anatomica alla forma "innaturale" del blocco selezionato, si può incorrere in errori nel posizionamento del voxel che rendono inaffidabili i dati acquisiti.

Sebbene le tecniche *single-voxel* siano le più usate nella pratica clinica per svariate ragioni (tempi di acquisizione brevi, buona omogeneità di campo, facilità nell'esecuzione dell'esame e interpretazione dei suoi risultati), esse presentano comunque importanti limiti che le rendono incapaci di determinare l'eterogeneità spaziale dei pattern spettrali.

#### **I.4.2 Tecniche di localizzazione "multi-voxel"**

A differenza delle tecniche *single-voxel*, che restringono la registrazione dei segnali a singole regioni (volumi) di interesse all'interno del campione di studio, le tecniche di localizzazione *multi-voxel*, dette anche *Imaging Spettroscopico di Risonanza Magnetica* (MRSI, Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging) collezionano simultaneamente segnali RM provenienti da una matrice mono-, bi- o tri-dimensionale di voxel e con questi ricostruiscono "mappe metaboliche", ovvero immagini della distribuzione spaziale di specifici metaboliti contenuti nel campione in esame.

Il problema, caratteristico delle tecniche *single-voxel*, di come adattare la forma irregolare di un volume anatomico alla forma pseudo-cubica di un voxel può essere risolto selezionando una combinazione di voxel, in luogo di un singolo volume: si parla in questo caso di localizzazione *multi-voxel*.

Le tecniche per imaging spettroscopico sono quelle che permettono di registrare un segnale NMR per ciascun voxel all'interno dell'immagine osservata. Un'indagine *multi-voxel* crea una matrice di segnali (e quindi di spettri) in corrispondenza di molteplici locazioni spaziali. La combinazione dei segnali provenienti da voxel multipli permette il miglioramento del rapporto segnale/rumore.



Questo set di *raw-data* (dati grezzi) viene poi sottoposto ad opportuni metodi matematici, in grado di ricostruire *immagini spettroscopiche*, ovvero mappe della distribuzione nello spazio delle frequenze a cui oscillano i nuclei di una certa specie chimica in differenti contesti molecolari.

L'imaging spettroscopico si basa sul principio della "codifica di fase" lungo una o più dimensioni dello spazio esaminato. La discriminazione spaziale avviene tramite l'applicazione sul parenchima di opportuni gradienti di campo (*imaging gradients*): variando i campi magnetici in funzione della posizione si sfasano in modo differente protoni situati in posizioni differenti e questo permette di discriminarli spazialmente.

Come noto, in un campo magnetico omogeneo in cui non siano stati applicati gradienti di imaging, i protoni con identico *chemical shift* precedono alla stessa frequenza, indipendentemente dalla loro posizione spaziale. Se però imponiamo sul campo magnetico omogeneo principale un campo variabile spazialmente, generiamo lungo un asse predeterminato (una direzione nota) una variazione del campo magnetico totale risentito dai protoni.

Poiché, come già discusso in precedenza, la frequenza precessionale di un protone è proporzionale al campo magnetico a cui esso è esposto, il gradiente di campo produce una variazione sistematica in frequenza lungo il suo asse di applicazione.

Così, i protoni dislocati ad un estremo del gradiente applicato precedono più lentamente, mentre i protoni situati all'estremo opposto precedono più velocemente.

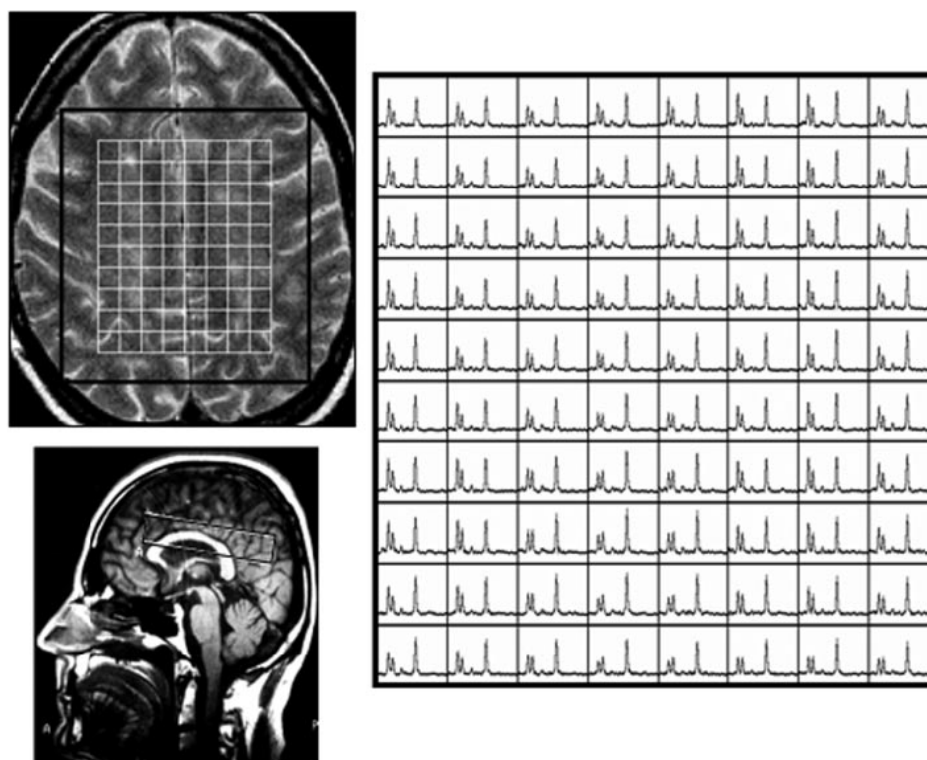
Terminato il "tempo di accensione" dei gradienti, le frequenze precessionali tornano ad essere uniformi ma persistono le loro variazioni di fase. Il segnale acquisito, subito dopo lo spegnimento dei gradienti, conterrà quindi le differenze di fase causate dal gradiente di codifica.

Riassumendo, gli spin protonici posti in differenti locazioni lungo la direzione di applicazione del gradiente, ovvero lungo l'asse di codifica di fase, precedono a differenti frequenze, causando una modulazione del segnale RM. Questo è dovuto al fatto che i segnali emessi da ogni spin assumono o perdono reciprocamente coerenza di fase, causando rispettivamente un'interferenza costruttiva o distruttiva [95].

La tecnica di acquisizione del segnale, tramite applicazione di gradienti di campo, consente di codificare in fase e quindi localizzare spazialmente il segnale proveniente da tutto il campo di

vista (FOV, Field of View) della bobina ricevente. Questo rende possibile la ricostruzione di *immagini spettroscopiche* (ovvero mappe della distribuzione spaziale dei metaboliti all'interno di tutto il FOV).

L'applicazione di  $N_x \times N_y$  codifiche di fase rispettivamente lungo gli assi  $x$  ed  $y$  (con riferimento, per semplicità, al caso di acquisizioni spettroscopiche 2-D, ma che può essere esteso al caso più generale 3-D) equivale in pratica ad imporre sul parenchima una sorta di griglia immaginaria composta da  $N \times N$  celle in corrispondenza di ognuna delle quali si acquisisce un segnale RM (figura 24).

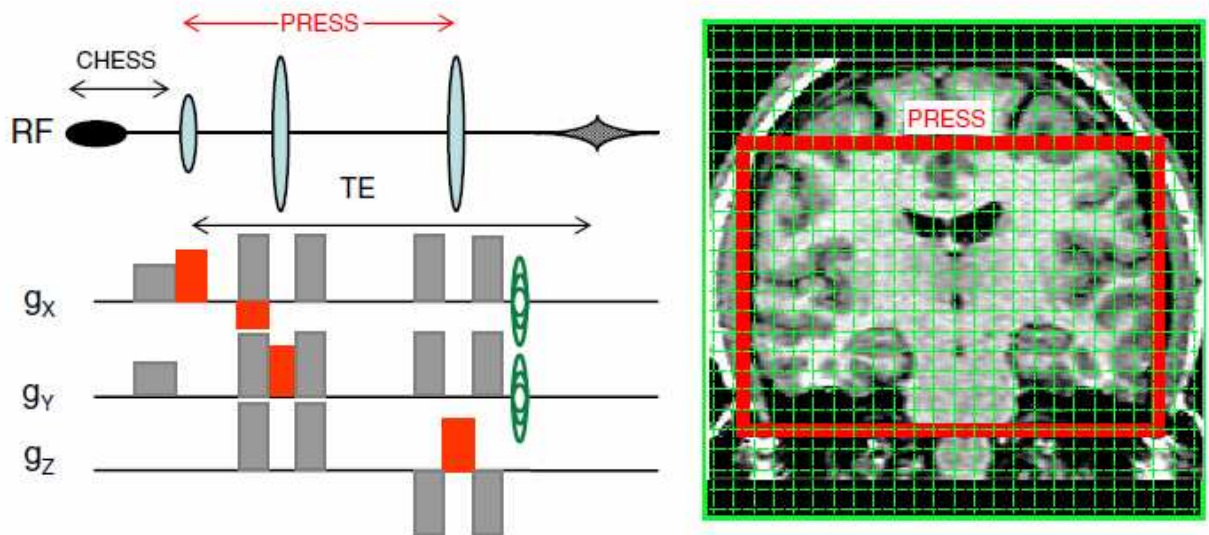


**Figura 24: Tecniche di localizzazione multi-voxel: griglia di acquisizione. Scansione MRI (sezioni sagittale e trasversale di un parenchima cerebrale) utilizzata per un esame MRS multivoxel e corrispondente griglia degli spettri protonici ottenuti tramite applicazione delle codifiche di fase sul volume di interesse. Si noti che i voxel ai bordi del VOI sono stati esclusi perché corrotti da artefatti**

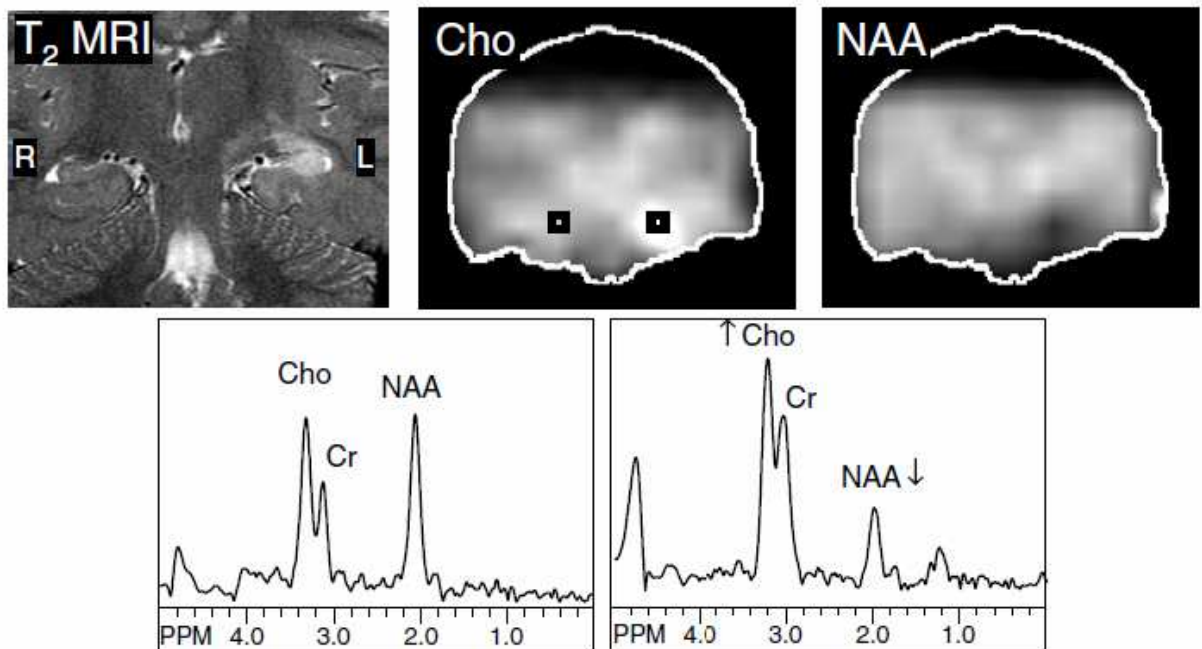
La sequenze di acquisizione più comunemente utilizzate nelle indagini H-MRSI sono le *imaging 2D o 3D* con tecnica di eccitazione PRESS. Queste consistono nell'applicazione di due gradienti di codifica di fase lungo le direzioni spaziali  $x$  e  $y$  (e  $z$ , nel caso in cui si esegua una codifica tridimensionale) e successivamente di un gradiente di lettura, per la registrazione del segnale.

Le sequenze PRESS sono usate soprattutto nel caso della spettroscopia del cervello, al fine di restringere l'acquisizione a specifici volumi cerebrali, nel tentativo di:

- ottimizzare nella regione di interesse l'omogeneità del campo, che sarebbe difficile da ottenere in corrispondenza di volumi di acquisizione molto grandi;
- ridurre il numero di codifiche di fase richieste (più è esteso il campo di vista, maggiore è il numero di codifiche necessarie per ottenere una prestabilita risoluzione spaziale, e più lunghi diventano i tempi di acquisizione);
- eliminare i segnali di componenti disturbo provenienti dalle regioni esterne a quella di interesse (lipidi contenuti nello scalpo e nel grasso retro-orbitale).



**Figura 25: Indagine H-MRS 2D-PRESS-MRSI: viene utilizzata una sequenza PRESS per eccitare la magnetizzazione di un ampio volume cerebrale e poi due gradienti di codifica di fase ( $g_x$  e  $g_y$ ) per localizzare gli spettri provenienti da regioni contenute nel volume eccitato**



**Figura 26: Scansione 2D-PRESS-MRSI: applicazione di una sequenza 2D-PRESS-MRSI su paziente con lesione ippocampale sinistra (visualizzata con imaging RM standard T2 pesato), registrata in presenza di un campo da 1.5 Tesla. Le immagini metaboliche e gli spettri selezionati in regioni di interesse nei due ippocampi mostrano che la lesione possiede bassi segnale di NAA e alto segnale di Cho (e Cre), consistenti con un processo neoplastico. La diagnosi alternativa (sclerosi temporale mesiale) raramente mostra livelli aumentati di colina. Si nota anche la presenza del segnale, seppur poco intenso, del lattato, in corrispondenza di 1.3 ppm sulla scala delle frequenze nello spettro della lesione**

Riassumendo:

Spettroscopia “*single voxel*”:

- + buon rapporto S/R in brevi scan time;
- volume selezionato è di forma geometrica;
- volume di forma geometrica  $\neq$  forma anatomica.

Spettroscopia “*multi voxel*”:

- + overview della distribuzione spaziale dei metaboliti;
- lunghi tempi di acquisizione;
- ridotto rapporto S/R.

### I.4.3 L'imaging spettroscopico a bassa risoluzione spaziale

Nelle tecniche *multi-voxel*, in cui si esamina una regione vasta di parenchima e si estraggono segnali da voxel multipli, ciascun segnale acquisito in realtà porta con sé il contributo delle risonanze provenienti da tutto il parenchima. Il problema di come poter discriminare spazialmente l'informazione spettrale ed associare correttamente a ciascun voxel all'interno del parenchima il suo effettivo segnale viene risolto attraverso la tecnica di codifica di fase.

In questa parte del lavoro verrà discusso il profondo legame tra codifica spaziale e *trasformata di Fourier*, operatore matematico capace di convertire la matrice di segnali temporali acquisiti in un'immagine spettroscopica, ovvero in una mappa di distribuzione spaziale delle loro intensità, in funzione della frequenza di precessione dei nuclei da cui tali segnali sono stati generati. Tale legame consente di descrivere i complessi meccanismi che stanno alla base della formazione di un'immagine RM, utilizzando un popolare formalismo matematico conosciuto come *k-spazio* [10].

Ad oggi, la tecnica più comunemente utilizzata per ricostruire spazialmente i dati MRSI codificati in fase è la trasformata discreta di Fourier (FT), che, però, si dimostra inadeguata per la ricostruzione di dati sottocampionati (come sono quelli acquisiti con indagini H-MRS *in vivo*), e fornisce immagini corrotte da artefatti e con bassa risoluzione spaziale [2].

### I.4.4 Tecniche di codifica spaziale: interpretazione nel *k-spazio*

Un oggetto campione, sottoposto ad una pulsazione RF in presenza di un campo magnetico statico esterno, emette un segnale di risonanza  $s(t)$  corrispondente all'integrale delle densità di magnetizzazione locali  $M(x,t)$  calcolato sull'intero volume del campione.

Detta  $\rho(x, f)$  la funzione spettrale incognita, che descrive la distribuzione spaziale della frequenza di oscillazione degli spin e quindi l'informazione spettrale proveniente dall'oggetto esaminato (*spettro RM*), il segnale può essere descritto dal seguente modello:

$$s(t) = \iint \rho(x, f) e^{-i2\pi f t} dxdf \quad (I.3)$$

in accordo con la teoria di Fourier, secondo la quale ogni segnale può essere ottenuto mediante la somma di infinite funzioni sinusoidali, ovvero di oscillazioni, ciascuna caratterizzata da una propria ampiezza, frequenza e fase.

Dall'equazione (I.3) non è possibile ricostruire  $\rho(x,f)$ : l'informazione spaziale è infatti inestricabilmente mescolata all'informazione in frequenza [21] e per essere rilevata necessita di essere "codificata", attraverso l'utilizzo di gradienti di campo.

Applicando però un gradiente di campo  $G(t) \cdot x$  variabile linearmente lungo la direzione  $x$  dello spazio di acquisizione si ottiene che l'angolo di fase assunto al tempo  $t$  da ciascun spin nel suo moto di precessione una volta terminata l'eccitazione RF, dipende non più solo dalla sua frequenza  $f$  di oscillazione ma anche dalla sua posizione spaziale  $x$ , rispetto al gradiente applicato.

La frequenza angolare istantanea (ovvero la variazione della fase rispetto al tempo) sarà adesso determinata da:

$$\frac{d\phi}{dt} = \omega = \gamma B_{Tot}(t)$$

- con:
- $\gamma$  rapporto giromagnetico caratteristico della specie atomica in esame;
  - $B_{Tot}(t) = B_0 \cdot (1 - \sigma) + G(t) \cdot x$  campo magnetico totale risentito dal sistema di spin.

Da cui segue che:

$$\frac{d\phi}{dt} = \omega_{eff} + \gamma G(t) \cdot x, \text{ con } \omega = \gamma B_{eff} \quad (I.4)$$

Integrando rispetto al tempo entrambi i membri dell'equazione (I.4), otteniamo che:

$$\phi = \omega_{eff} t + \gamma \int_0^t G(\tau) \cdot x d\tau \quad (I.5)$$

Poniamo  $k(t) = -\gamma \int_0^t G(\tau) d\tau$  e definiamo *frequenza spaziale* questa grandezza [10]; la formula che rappresenta la fase di ciascuna oscillazione componente il segnale acquisito diventa

$$\phi = \omega t + k(t) \cdot x.$$

Tenendo conto di questo risultato e del fatto che  $\omega = 2\pi f$ , aggiorniamo l'equazione (I.3) nell'ipotesi semplificativa che il gradiente  $G(t)$  sia costante e che quindi  $k = -\gamma G t$ .

Ne risulta che:

$$s(t) = s[k(t), t] = \iint \rho(x, f) e^{-i2\pi(f t + k \cdot x)} dx df \quad (I.6)$$

Nelle indagini MRSI i dati sono quindi ottenuti nel dominio  $\Omega_k$  delle frequenze spaziali e nel dominio temporale  $\Omega_t$ , e vengono ricostruiti all'interno del dominio spaziale  $\Omega$  ed in quello spettrale  $\Omega_f$  [64]. Il dominio  $\Omega_k$  è detto  $k$ -spazio, formalismo matematico con il quale vengono descritti ed interpretati i concetti di base della codifica dell'informazione spettroscopica (ad opera di gradienti lineari).

Nel caso più generale di indagini tridimensionali, il set di raw-data viene acquisito sottoforma di matrici 4-D, ogni cui elemento corrisponde al segnale temporale  $s(k_x, k_y, k_z, t)$  acquisito in corrispondenza delle codifiche di fase  $k_x, k_y, k_z$  nell'istante di tempo  $t$ , con:

$$-\frac{N_x}{2} \leq k_x \leq \frac{N_x}{2}; \quad -\frac{N_y}{2} \leq k_y \leq \frac{N_y}{2}; \quad -\frac{N_z}{2} \leq k_z \leq \frac{N_z}{2}$$

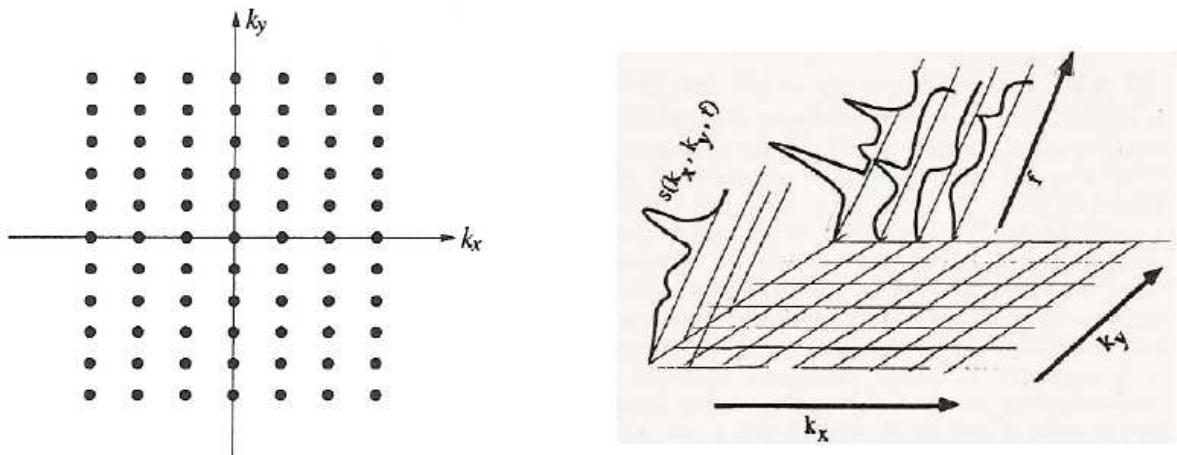


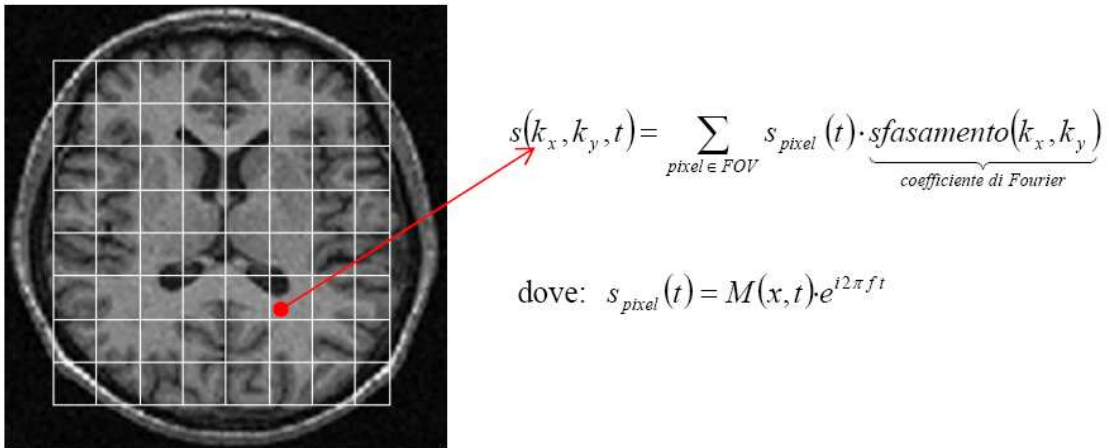
Figura 27: (A) Illustrazione di un campionamento del  $k$ -spazio; (B) Matrice degli spettri acquisiti in corrispondenza della griglia di acquisizione di un esperimento 2-D di codifica di fase

#### I.4.5 Metodo CSI: modello matematico a serie di Fourier

L'algoritmo standard di ricostruzione spaziale di mappe spettroscopiche, più comunemente implementato e utilizzato sulle apparecchiature RM (per uso clinico o di ricerca), è il metodo CSI (*Chemical Shift Imaging*). Esso ricostruisce la funzione (informazione) spettrale, basandosi sul modello matematico a serie di Fourier rappresentato dall'equazione (I.6). Questa descrive il segnale spettroscopico acquisito attraverso un esperimento di codifica di fase come

trasformata di Fourier della distribuzione di densità spettrale  $\rho(x, f)$ , rispetto al dominio spaziale e delle frequenze.

In base a quanto discusso in precedenza, si evince che un FID acquisito tramite indagine spettroscopica di codifica di fase, sarà la somma dei contributi offerti da ciascun pixel del FOV esaminato, opportunamente pesati da un fattore indicativo dello sfasamento prodotto dalla codifica corrente su quel pixel.



**Figura 28: Griglia di acquisizione in un esperimento multivoxel di codifica di fase**

Come descritto dall' equazione (I.6), la tecnica di localizzazione basata sulla codifica di fase suggerisce di rappresentare il segnale  $s(k_x, k_y, t)$  registrato in corrispondenza di ciascun punto del  $k$ -spazio come combinazione dei contributi in frequenza (oscillazione dei momenti magnetici nucleari) provenienti da tutti i pixel del parenchima esaminato, ciascuno pesato da un fattore di modulazione (*coefficiente di Fourier*), indicativo dello sfasamento operato dalla codifica corrente sul pixel.

Un segnale codificato spazialmente tramite gradienti di codifica di fase si presta quindi, per sua intrinseca natura, ad essere descritto ed analizzato attraverso un modello a serie di Fourier; in particolare esiste un'importante intima connessione tra la tecnica di codifica spaziale e l'operatore matematico *trasformata di Fourier*.

Se fosse possibile conoscere i valori assunti dalla trasformata lungo tutte le possibili direzioni, ovvero registrare il segnale eseguendo un numero infinito di codifiche di fase, saremmo in grado, in base al Teorema di Fourier [70] , di ricostruire la funzione di distribuzione originale di densità spettrale applicando alla sua trasformata (ovvero il FID acquisito) l'operatore inverso.



Applicando ai due membri dell'equazione (I.6) l'operatore inverso della trasformata di Fourier, detto *antitrasformata*, nel dominio del tempo si ricaverebbe, come soluzione unica del problema inverso di ricostruzione dell'immagine spettroscopica, la funzione:

$$\underbrace{\rho(x, f)}_{\text{SPETTRO}} = \iint \underbrace{s(k, t)}_{\text{FID}} e^{i2\pi(kx+ft)} dkdt \quad (\text{I.7})$$

Tale funzione descrive quindi la distribuzione spettrale attraverso un modello di Fourier, detto modello CSI. La tecnica di codifica di fase conduce naturalmente alla definizione del modello CSI di Fourier, e il  $k$ -spazio si rivela strumento utile per intuire lo stretto legame esistente tra segnale e trasformata di Fourier.

È evidente però che esistono dei vincoli pratici che rendono impossibile il verificarsi delle condizioni di esistenza di tale soluzione; l'ipotesi che l'informazione  $s(k, t)$  si riferisca ad un dominio temporale e frequenziale infinito (la teoria di Fourier descrive il segnale come somma di infinite oscillazioni sinusoidali) rappresenta evidentemente ad una situazione ideale.

La condizione pratica consiste infatti nell'acquisizione di un numero necessariamente limitato di eventi sperimentali connessi con il fenomeno in studio. Tale limitazione, implica la riformulazione del problema in termini discreti.

Consideriamo infatti la generica posizione  $\mathbf{x} \equiv (x, y, z)$  dello spazio clinico occupato dall'oggetto su cui si vuole eseguire un'indagine spettroscopica. Nel punto  $\mathbf{x}$ , definta la densità spettroscopica  $\rho(\mathbf{x}, f)$ , il segnale nel tempo (echo o FID) indotto in bobina dalla concentrazione di metaboliti presenti nel punto  $\mathbf{x}$  è perciò espresso dalla trasformata di Fourier della distribuzione in frequenza  $\rho(\mathbf{x}, f)$ :

$$s(t) = \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \rho(\bar{\mathbf{x}}, f) \cdot e^{-i2\pi(f_k \cdot t)} \quad (\text{I.8})$$

Materia di evidenza si può evincere considerando come, in vivo, la densità spettrale  $\rho(\mathbf{x}, f)$  non sia costante all'interno del volume parenchimale, volendo così sottintendere che  $\rho(\mathbf{x}, f)$  esprime anche dipendenza dalla posizione  $\mathbf{x}$ .

Come già accennato in precedenza, l'esperimento di spettroscopia, analogamente a quanto avviene per l'esperimento di imaging, cercherà allora di acquisire informazioni sulla distribuzione spaziale della densità spettrale applicando campi magnetici lineari  $B_{\mathbf{x}} = G_{\mathbf{x}} \cdot \mathbf{x}$

lungo le coordinate spaziali canoniche, dove  $G_x$  sono gli opportuni gradienti di campo magnetico.

Come per l'imaging RM, lo scopo di tali campi lineari è quello di apportare sfasamenti spazio-dipendenti (la cosiddetta codifica di fase) al moto di precessione protonico. Come è noto dalla equazione di Liang-Mansfield, lo sfasamento introdotto sui moti di precessione dai campi lineari di codifica di fase può essere interpretato in termini di frequenze spaziali

$\mathbf{k} \equiv (k_x, k_y, k_z)$  sulle relative coordinate spaziali, per cui il segnale sperimentale deve essere riscritto come:

$$s(\bar{\mathbf{k}}, t) = \sum_{l,m,n \in \Omega} \sum_{p=-\infty}^{+\infty} \rho(\bar{\mathbf{x}}_{l,m,n}, f_p) \cdot e^{-i2\pi(\bar{\mathbf{k}} \cdot \bar{\mathbf{x}}_{l,m,n})} \cdot e^{-i2\pi(f_p \cdot t)} \quad (\text{I.9})$$

dove  $(l,m,n)$  sono tutte le terne di possibili coordinate che descrivono il FOV di acquisizione  $\Omega$ .

E' noto che la soluzione per l'equazione (I.9) esista e che, per definirla, sia necessario acquisire informazioni sia sull'intero  $k$ -spazio  $\Omega_k$  che nell'ambito della coordinata temporale.

In generale, la soluzione della equazione (I.9) può essere scritta come:

$$\rho(\bar{\mathbf{x}}, \omega) = \sum_{j=-\infty}^{+\infty} \sum_{n \in \mathbf{K}} s(\bar{\mathbf{k}}_n, j \cdot \Delta t) \cdot e^{i2\pi(\bar{\mathbf{k}}_n \cdot \bar{\mathbf{x}})} \cdot e^{i2\pi(f \cdot j \cdot \Delta t)} \quad (\text{I.10})$$

con:

$$\bar{\mathbf{k}}_n = (n_x \Delta k_x, n_y \Delta k_y, n_z \Delta k_z), \text{ dove } \frac{-N_x}{2} \leq n_x \leq \frac{N_x}{2}, \frac{-N_y}{2} \leq n_y \leq \frac{N_y}{2}, \frac{-N_z}{2} \leq n_z \leq \frac{N_z}{2} \quad (\text{I.11})$$

In tale notazione, la soluzione espressa dall'equazione (I.10) è soddisfacente solo se il numero di campionamenti temporali (indice  $j$ ) ed il numero di campionamenti di codifica di fase (indice composito  $n$ , nell'equazione (I.11)) sono molto grandi (in teoria, infiniti).

Concludendo: il fatto che i segnali registrati durante un'indagine MRSI siano campionati in presenza di gradienti, fa sì che i raw-data che li rappresentano si prestino ad essere interpretati ed elaborati, da un punto di vista matematico, attraverso l'utilizzo dell'analisi armonica di Fourier.

## Limiti del modello CSI

In ragione di vincoli temporali imprescindibili legati alla durata massima accettabile per un esame *in vivo*, il numero massimo di codifiche di fase acquisibili è piccolo (al massimo  $16 \times 16 \times 16$  in acquisizioni 3D o  $64 \times 64$  in acquisizioni 2D).

Come è noto, la trasformata di Fourier di dati sottocampionati nel dominio delle frequenze spaziali si manifesta nella presenza di artefatti spettrali da troncamento. Tale troncamento sulle frequenze spaziali  $\mathbf{k}$  introduce cioè artefatti da oscillazione (*Gibbs*) sulla funzione spettrale ricostruita, provocando un notevole inquinamento spettrale che induce l'attribuzione di righe ed intensità spettrali a zone dell'immagine in modo aberrato (metaboliti non presenti in quelle zone, ovvero presenti con intensità effettive molto diverse da quelle stimate).

Inoltre, il numero di codifiche spaziali acquisibile è tale da imporre una severa limitazione della risoluzione spaziale sull'immagine spettroscopica ricostruita: essendo il numero di voxel spaziali in cui il FOV è diviso pari al numero di codifiche di fase acquisite, ed essendo tale numero limitato dai fattori suddetti, la dimensione lineare di un pixel è difficilmente inferiore a 10 mm, esprimendo quindi un'immagine il cui potere risolutivo spaziale non può essere superiore a 20 mm FWHM.

## Effetto del volume parziale

Il numero di codifiche è limitato di solito a matrici  $32 \times 32$  o al massimo  $64 \times 64$ , da cui segue che il voxel di un FOV standard di acquisizione ha dimensioni dell'ordine di  $1 \text{ cm}^3$ .

Un voxel così grande può ovviamente contenere anche regioni anatomiche non appartenenti al parenchima target. Si tratta del cosiddetto effetto da volume parziale, che inficia la quantificazione dello spettro.

Nella figura 29 è rappresentata una griglia di acquisizione ( $8 \times 8$  codifiche di fase).

Nel pixel di posizione (6, 6) della griglia rappresentante le  $N \times N$  codifiche di fase imposte sul FOV la densità spettrale non è costante; sono infatti contenuti due regioni anatomiche (ROI 1 = *liquor* e ROI 2 = *sostanza bianca*) spettralmente eterogenee. La tecnica di ricostruzione CSI, basata sul modello di Fourier, non è in grado di localizzare correttamente i segnali (e quindi gli spettri RM) originati da tali regioni.

Tutto il contenuto del pixel subisce infatti lo stesso sfasamento, e questo rende impossibile la discriminazione spaziale delle informazioni spettrali in esso contenute.

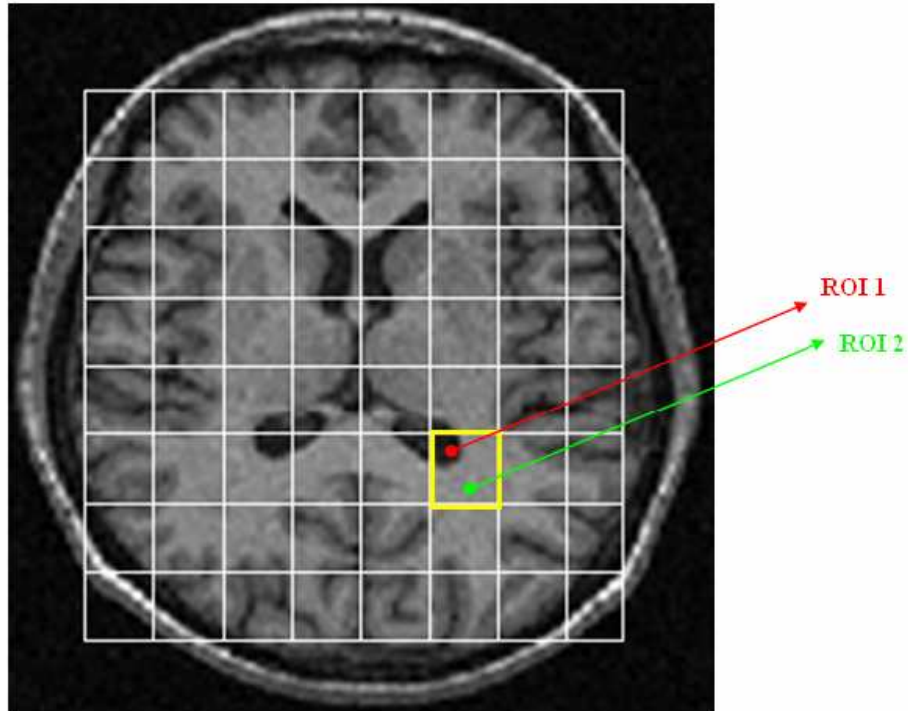


Figura 29: Rappresentazione dell'effetto da volume parziale nel caso della griglia di acquisizione CSI

### Bassa risoluzione

Come già sottolineato in precedenza, la spettroscopia RM possiede molti vantaggi rispetto alle altre tecniche di imaging per l'osservazione non invasiva di processi metabolici all'interno di sistemi biologici e molte sarebbero le sue potenziali applicazioni in studi biochimici, fisiologici e clinici.

Come descritto sopra esistono però grandi problemi relativi alla possibilità di ottenere un'accurata localizzazione spaziale dell'informazione spettrale.

L'imaging spettroscopico, in particolare quello dei metaboliti cerebrali, è per sua intrinseca natura una tecnica a bassa risoluzione; la qualità dell'immagine nel caso dell'imaging *in vivo* è limitata sia dalle caratteristiche non ideali degli spettri (basso rapporto segnale/rumore associato alle basse concentrazioni dei metaboliti, artefatti dovuti ai gradienti di codifica, componenti dominanti di disturbo quali acqua e lipidi), sia e soprattutto dai requisiti del campionamento spaziale.

Forti vincoli temporali impongono di eseguire scansioni applicando un numero ridotto di codifiche di fase. Il sottocampionamento del  $k$ -spazio (si acquisiscono segnali solo in

corrispondenza di una porzione limitata di  $k$ -spazio detta regione centrale) risulta in una bassa definizione spaziale delle immagini che da esso possono essere ricostruite. Essendo infatti  $SR = FOV / N_{codifiche}$  la risoluzione spaziale di un'immagine spettroscopica (dove FOV e  $N$  indicano rispettivamente le dimensioni del campo di vista ed il numero di codifiche di fase impiegate per codificare i segnali emessi dal FOV) si deduce che l'applicazione su un FOV abbastanza ampio ( $\sim 300 \text{ cm}^2$ ) di un numero ridotto di codifiche ( $32 \times 32$ ) definisce, nell'immagine ricostruita, un pixel di dimensioni molto grandi ( $\sim 1 \text{ cm}^2$ ).

La risoluzione dell'immagine è un fattore chiave per il riconoscimento e la quantificazione dei composti chimici, ed il fatto che il pixel, ovvero la più piccola regione nel piano in cui si riesce ad eseguire una discriminazione spaziale, abbia grandi dimensioni fa sì che al suo interno non sia in realtà assicurata l'omogeneità spettrale.

Questo causa forti limiti nell'applicazione pratica del metodo CSI.

La qualità dell'immagine nel caso dell'imaging *in vivo* è limitata sia dai requisiti del campionamento spaziale (numero ridotto di codifiche di fase,  $k$ -spazio sottocampionato) sia dalle caratteristiche spettrali non ideali. Nel dominio spaziale il numero di punti di campionamento è vincolato da limitazioni nei tempi di acquisizione e dalla bassa sensibilità per l'osservazione di metaboliti *in vivo*.

Dal momento che il campionamento è distribuito in modo uniforme su una regione relativamente piccola nel dominio delle frequenze spaziali, detto  $k$ -spazio, di circa 16-32 punti lungo ciascuna direzione spaziale, ci riferiamo a tale regione con il nome di regione centrale del  $k$ -spazio (o delle basse frequenze), per distinguerla dalla regione di campionamento molto più ampia utilizzata comunemente per le convenzionali acquisizioni MRI [64] .

#### **I.4.6 Il contenuto innovativo: l'introduzione dei “pixel naturali”**

La necessità di poter superare le limitazioni imposte dalla filosofia CSI, ha indotto a rivedere il concetto di unità elementare di acquisizione e di rappresentazione discreta di un segnale analogico, quale l'immagine sperimentale. L'idea di base e rivoluzionaria è che il pixel non è più un quadrato: viene stravolto il concetto classico di pixel, non assegnando più a questo l'innaturale forma quadrata, bensì conformandolo alla realtà anatomica dell'oggetto esaminato.



Ognuna delle  $M$  regioni di interesse  $\Omega_m$  viene definita *pixel naturale*, essendo la sua forma peculiare (e, conseguentemente, irregolare) della regione al cui interno la  $\rho_l(f)$  è considerata costante.

## II. Materiali e metodi

### Capitolo 1. Ricostruzione MRS ad alta risoluzione spaziale

L'attività del progetto di Tesi discusso in questo contesto si è posta come obiettivo lo sviluppo di un metodo di localizzazione dell'informazione spettrale, in grado di ricostruire mappe metaboliche ad alta risoluzione spaziale.

Condizione fondamentale ed irrinunciabile per la progettazione del lavoro è stato lo studio (e la validazione) dei metodi matematici proposti in letteratura come potenziali soluzioni del problema.

Tra le varie teorie che nel corso degli ultimi venti anni sono state sviluppate nel tentativo di superare i forti limiti della convenzionale tecnica di ricostruzione CSI, il progetto ha rivolto la sua attenzione in particolare ai metodi SLIM (*Spectral Localization by Imaging*) e GSLIM (*Generalized SLIM*), che sembrerebbero costituire un approccio ottimale al problema dell'imaging spettroscopico *in vivo*, per poi sviluppare ed implementare un nuovo metodo che prende il nome di starSLIM (*STatic and Radiofrequency compensated SLIM*).

I primi due metodi, proposti negli anni '90 come algoritmi di ricostruzione non basati sulle serie di Fourier, si fondano entrambi sull'idea rivoluzionaria di sfruttare informazioni *a priori* di tipo spaziale estratte da immagini anatomiche RM ad alta risoluzione (tali metodi si promettono come affascinanti potenziali tecniche di ricostruzione ad alta risoluzione).

Molti metodi sono stati sviluppati nel corso degli ultimi venti anni nel tentativo di migliorare le tecniche di ricostruzione di mappe metaboliche. In particolare, nell'intento di superare i problemi associati alla contaminazione spettrale tra voxel tipica della convenzionale tecnica di localizzazione CSI, sono stati proposti molte metodiche come valide alternative all'utilizzo della trasformata di Fourier: i cosiddetti algoritmi di "ricostruzione vincolata".

Si tratta di un approccio parametrico "model-based", nel quale l'immagine spettroscopica viene ricostruita stimando i parametri di un opportuno modello matematico, vincolato ai dati sperimentali tramite informazioni aggiuntive introdotte *a priori* nell'algoritmo per



compensare la perdita di informazione spettrale dovuta al sottocampionamento dei dati tipico degli esperimenti CSI di codifica di fase.

Tali metodi si sono dimostrati capaci di offrire una risoluzione spaziale superiore rispetto a quella caratteristica delle immagini ricostruite usando le tecniche convenzionali basate sulla trasformata di Fourier [11,83,111] .

Nell'ambito della ricostruzione vincolata, i metodi SLIM [5] e GSLIM [7] , studiati e testati nel corso di questo lavoro di tesi, sono stati proposti come approcci ottimali al problema della ricostruzione di immagini spettroscopiche ad alta risoluzione.

Nell'intento di sposare l'imaging protonico RM ad alta risoluzione con l'imaging spettroscopico per superare il problema della bassa risoluzione delle immagini CSI, essi si fondano sull'idea di base (che incontra appunto i concetti di ricostruzione vincolata e di imaging parametrico) di sfruttare informazioni aggiuntive relative alla distribuzione spaziale della funzione spettrale  $\rho(x, f)$  all'interno dell'oggetto esaminato.

In particolare, sostituendo il concetto classico di pixel quadrato (o più in generale, rettangolare) con quello rivoluzionario di pixel "naturale", i metodi SLIM e GSLIM si basano sull'utilizzo di un modello matematico detto "compartimentale".

Questo descrive il segnale RM, acquisito in corrispondenza di ciascuna delle  $N \times N$  codifiche di fase previste in un esperimento CSI 2-D, non più come somma di Fourier dei contributi provenienti da ciascuno dei pixel quadrati in cui formalmente l'applicazione delle codifiche suddivide il FOV esaminato, bensì come somma, opportunamente pesata, dei contributi relativi agli  $M$  compartimenti, i pixel naturali, di cui risulta composta la regione di tessuto esaminata.

### **II.1.1 Metodo SLIM: modello matematico compartimentale**

Il metodo SLIM (Spectral Localization by Imaging) si basa sulla definizione del pixel naturale (o generalizzato), ovvero di un compartimento spaziale di forma arbitraria entro il quale la funzione spettrale incognita  $\rho(x, f)$  possa essere definita costante [5,7] , e quindi sull'ipotesi di lavoro che lo spazio esaminato possa essere partizionato in un certo numero  $M$  di compartimenti spaziali (ROIs) omogenei da un punto di vista spettrale.

La definizione della geometria di tali compartimenti, pixel di forma arbitraria, implica l'introduzione di vincoli *a priori* sulla distribuzione spaziale della funzione spettrale.

La ricostruzione delle immagini spettroscopiche risulta quindi vincolata alle informazioni aggiuntive di tipo strutturale e morfologico che l'utente estrae, tramite opportune procedure di segmentazione, da immagini anatomiche ad alta risoluzione del FOV esaminato.

Dall'ipotesi di omogeneità dei compartimenti segue l'assunto di base del metodo SLIM: la funzione spettrale incognita  $\rho(x, f)$  può essere espressa come somma dei contributi (delle densità tipiche delle ROIs) spettrali  $\rho_m$  relativi a ciascuno dei compartimenti  $\Omega_m$  spettroscopicamente omogenei, ognuno dei quali identificato da una funzione caratteristica:

$$\chi_m(x) = \begin{cases} 1, & x \in \text{compartimento } \Omega_m \\ 0, & x \notin \text{compartimento } \Omega_m \end{cases}$$

e dal proprio spettro di frequenze  $q_m(f)$ , con  $m = 1, \dots, M$ .

La ricostruzione SLIM dell'immagine spettroscopica avviene quindi a partire dal seguente modello compartimentale [65]:

$$\rho_{SLIM}(\mathbf{x}, f) = \sum_{m=1}^M \rho_m(f) = \sum_{m=1}^M q_m(f) \chi_m(\mathbf{x}) \quad (\text{II.1})$$

Nel modello a compartimenti omogenei lo spettro acquisito in corrispondenza di una certa codifica di fase riassume l'informazione ottenuta combinando i contributi spettrali, opportunamente pesati, provenienti da tutti i compartimenti supposti omogenei. Fittando tale modello sui dati acquisiti si giunge alla definizione di un sistema del tipo:

$$\begin{cases} \text{peso1}_{ROI1} \cdot \text{spettro}_{ROI1} + \text{peso1}_{ROI2} \cdot \text{spettro}_{ROI2} + \dots + \text{peso1}_{ROI M} \cdot \text{spettro}_{ROI M} = \text{codifica1} \\ \text{peso2}_{ROI1} \cdot \text{spettro}_{ROI1} + \text{peso2}_{ROI2} \cdot \text{spettro}_{ROI2} + \dots + \text{peso2}_{ROI M} \cdot \text{spettro}_{ROI M} = \text{codifica2} \\ \vdots \\ \text{pesoN}_{ROI1} \cdot \text{spettro}_{ROI1} + \text{pesoN}_{ROI2} \cdot \text{spettro}_{ROI2} + \dots + \text{pesoN}_{ROI M} \cdot \text{spettro}_{ROI M} = \text{codificaN} \end{cases}$$

dove  $\text{peso}_n_{ROI m}$  rappresenta lo sfasamento apportato dalla *codifica* ( $n$ ) sugli spin nucleari contenuti nella  $ROI_m$ .

A differenza del metodo CSI, in cui lo spettro ricostruito  $\rho(x, f)$ , al variare dei punti nello spazio, è la ricostruzione diretta di Fourier, nel caso del metodo SLIM lo spettro ricostruito rappresenta la soluzione ai minimi quadrati di un sistema di equazioni lineari associato al modello compartimentale.

In base al nuovo concetto di pixel naturale, che risolve i limiti del metodo CSI legati agli effetti di volume parziale causati dalle grandi dimensioni del pixel quadrato definito dalle indagini di codifica di fase, lo spettro relativo ad certo volume di interesse acquisito in corrispondenza di ciascuna codifica di fase  $\mathbf{k}_n = (n_x \Delta k_x, n_y \Delta k_y, n_z \Delta k_z)$  risulta essere la somma degli spettri caratteristici di ciascuna regione di interesse spettralmente omogenea, ovvero di ciascun pixel naturale, di cui è composta l'immagine dell'oggetto esaminato.

Gli sfasamenti provocati dai gradienti di campo fanno sì che uno stesso contenuto metabolico relativo a ROIs differenti (localizzate spazialmente in modo diverso) contribuisca in modi differenti alla formazione del segnale. In SLIM alla densità spettrale di un pixel (uno degli  $N \times N$  definiti sul FOV dall'imposizione delle  $N \times N$  codifiche di fase) corrisponderà la somma delle densità tipiche di tutti i pixel naturali che lo compongono. In base al modello (II.1) si può quindi ipotizzare che ogni spettro compartimentale, ovvero ciascuna funzione incognita  $\rho(x,f)$  possa essere determinata risolvendo il seguente sistema di equazioni lineari [7] :

$$\begin{bmatrix} g_{11} & g_{12} & \cdots & g_{1M} \\ g_{21} & g_{22} & \cdots & g_{2M} \\ \vdots & \vdots & \cdots & \vdots \\ g_{N1} & g_{N2} & \cdots & g_{NM} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \rho_1(f) \\ \rho_2(f) \\ \vdots \\ \rho_M(f) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{s}_1(f) \\ \hat{s}_2(f) \\ \vdots \\ \hat{s}_N(f) \end{bmatrix} \quad (\text{II.2})$$

dove:

- i coefficienti della matrice di sistema sono detti *fattori geometrici di peso* e dipendono dall' $n$ -esimo vettore d'onda di codifica di fase  $k_n$  e dalla geometria dell' $m$ -esimo pixel "naturale"  $\Omega_m$ . Ciascuno di essi è indicativo dello sfasamento apportato dalla codifica  $k_n$  sul compartimento  $\Omega_m$ , come descritto dalla relazione:

$$g_{nm} = \int_{\Omega_m} e^{-i2\pi k_n \cdot x} dx$$

- i termini noti del sistema,  $\hat{s}_n(f)$ , rappresentano i raw-data convertiti nel dominio delle frequenze, attraverso la trasformata inversa discreta di Fourier, ovvero:

$$\hat{s}_n(f) = \sum_{n_t} s(k_n, n_t \Delta t) e^{i2\pi f n_t \Delta t}$$

Il sistema (II.2), che può essere scritto nella notazione vettoriale  $G \rho(f) = \hat{s}(f)$ , risulta determinato e quindi risolvibile in forma analitica chiusa se e solo se  $N \geq M$ .

È possibile determinare esattamente (ricostruire) ciascuna funzione spettrale (spettro compartimentale)  $\rho_m(f)$  nell'ipotesi necessaria e sufficiente di poter acquisire un numero di codifiche di fase non inferiore al numero di compartimenti omogenei.

In tal caso i coefficienti  $\rho_m(f)$  del modello (I.1), incognite del sistema, vengono calcolati risolvendo il seguente problema ai minimi quadrati [70]:

$$\min_{\rho} \|s(k, f) - s_{SLIM}(k, f)\|^2$$

dove  $s_{SLIM}(k, f) = DFT(\rho_{SLIM}(x, f))$ , con  $DFT$  = trasformata discreta di Fourier.

Il sistema può essere risolto nel senso dei minimi quadrati utilizzando il metodo di decomposizione di Cholesky, il metodo di trasformazione di Householder o il metodo di decomposizione ai valori singolari (SVD). La scelta dipende dal numero di condizionamento della matrice di sistema e dalla stabilità numerica che si desidera ottenere.

Riassumendo, l'algoritmo SLIM può fornire una localizzazione spaziale ad alta risoluzione esatta ("superresolution") con il minimo numero di codifiche di fase, purché sia valido il modello a compartimenti omogenei.

A partire da un set di dati di input, costituito dalla matrice dei raw-data sottocampionati e dalla corrispondente immagine maschera compartimentale ottenuta segmentando un'immagine anatomica dell'oggetto in esame, l'algoritmo è in grado di ricostruire spettri localizzati accurati (in corrispondenza di specifici volumi di interesse) relativi a ciascun compartimento spaziale attraverso la soluzione ai minimi quadrati di un sistema lineare di equazioni sovradeterminato.

Quando però l'ipotesi di omogeneità risulta violata (a causa di segmentazioni poco accurate e disomogeneità di campo), l'informazione spettrale del compartimento erroneamente presunto omogeneo può disperdersi in altri compartimenti [87]. Tale perdita di informazione spettrale, sebbene possa essere ridotta nel caso in cui il sistema (II.2) sia sovradeterminato e la sua matrice dei coefficienti ben condizionata, può influenzare l'accuratezza della ricostruzione.

Per superare questo problema è stato allora studiato il metodo GSLIM (Generalized SLIM), proposto dai premi Nobel Liang e Lauterbur con l'intento di generalizzare l'algoritmo SLIM, rendendolo indipendente dall'ipotesi restrittiva di omogeneità dei compartimenti.

## II.1.2 Metodo GSLIM: modello matematico a serie generalizzate

L'approccio GSLIM è basato, così come quello SLIM, su una rappresentazione parametrica della funzione spettrale. Riprendendo l'idea rivoluzionaria del pixel naturale, l'algoritmo assume un modello di ricostruzione che tiene conto anche di eventuali variazioni delle densità spettrali contenute all'interno dei compartimenti (non uniformi dal punto di vista spettrale), rendendosi così indipendente dall'ipotesi ideale di omogeneità alla base del modello compartimentale SLIM.

Aniché utilizzare i coefficienti di una serie di Fourier come fattori di peso dei contributi spettrali provenienti da ciascun compartimento, il metodo GSLIM utilizza i coefficienti di una serie generalizzata e ricostruisce la funzione incognita di distribuzione spaziale della densità spettrale, descrivendola con il seguente modello matematico (detto appunto modello a serie generalizzata):

$$\rho(x, f) = \sum_{n=1}^N a_n(f) \varphi_n(x, f) \quad (\text{II.3})$$

La serie generalizzata, strumento matematico flessibile e duttile per eccellenza, consente di introdurre, all'interno delle sue funzioni di base  $\varphi_n(x, f)$ , vincoli a priori relativi alla natura morfologica dell'oggetto esaminato, e di adattare poi tali informazioni aggiuntive alla realtà dei dati spettroscopici acquisiti, attraverso la modulazione operata dai coefficienti  $a_n(f)$  della serie.

Nell'idea di generalizzare il metodo SLIM e quindi nell'ipotesi di utilizzare come modello di base quello a compartimenti omogenei (II.1), le funzioni di base della serie generalizzata possono essere scelte nel modo seguente:

$$\varphi_n(x, f) = \rho_{SLIM}(x, f) e^{i2\pi k_n \cdot x}$$

considerando come informazione a priori gli spettri derivati con il metodo SLIM.

In questo caso la funzione spettrale, secondo il modello GSLIM, diventa:

$$\rho_{GSLIM}(x, f) = \rho_{SLIM}(x, f) \sum_{n=1}^N a_n(f) e^{i2\pi k_n \cdot x} \quad (\text{II.4})$$

In base al modello (II.1) l'equazione (II.4) può essere riscritta nella forma:

$$\rho_{GSLIM}(x, f) = \sum_{m=1}^M \rho_m(f) \cdot \sum_{n=1}^N a_n(f) e^{i2\pi k_n \cdot x} \quad (\text{II.4 b})$$

Si evince così che nel modello GSLIM a serie generalizzate, la densità spettrale  $\rho(x, f)$ , all'interno di ciascun compartimento, non è più supposta costante ma è definita come serie generalizzata i cui coefficienti  $a_n(f)$ , che vanno a moltiplicare i coefficienti di Fourier già utilizzati nel modello SLIM, modulano lo spettro SLIM pesando il contributo spettrale di ciascun compartimento e tenendo così conto di sue eventuali disomogeneità.

Laddove in SLIM gli spettri caratteristici di ciascun compartimento vengono modulati da un fattore di peso, costituito da un'unica oscillazione sinusoidale  $e^{ikx}$  (coefficiente di Fourier) indicativa dello sfasamento prodotto sul compartimento dalla codifica di fase corrente, nel modello GSLIM gli spettri sono modulati da coefficienti che nel tentativo di mediare informazioni a priori e raw-data, prevedono più oscillazioni,  $\sum_{n=1}^N a_n(f) e^{i2\pi k_n \cdot x}$  (in corrispondenza delle regioni in cui vi sono differenti concentrazioni o frequenze).

Nota la funzione spettrale  $\rho_{SLIM}(x, f)$ , ovvero l'immagine spettroscopica ricostruita con il metodo SLIM, i coefficienti  $a_n(f)$  della serie generalizzata del modello GSLIM dovranno essere determinati in modo tale che risulti:

$$s(k_n, t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{D_x} \left\{ \rho_{SLIM}(x, f) \sum_{n=1}^N a_n(f) e^{i2\pi k_n \cdot x} \right\} \cdot e^{-i2\pi(k_i \cdot x + ft)} dx df \quad (\text{II.5})$$

dove  $s(k_n, t)$  rappresenta il segnale RM (FID), acquisito idealmente in un dominio temporale infinito, in corrispondenza dell' $n$ -esima codifica di fase di un esperimento spettroscopico.

Applicando la trasformata inversa di Fourier rispetto al tempo ad entrambi i membri dell'equazione (II.5) si ottiene:

$$\hat{s}(k_n, f) = \int_{D_x} \left\{ \rho_{SLIM}(x, f) \sum_{n=1}^N a_n(f) e^{i2\pi k_n \cdot x} \right\} \cdot e^{-i2\pi k_i \cdot x} dx \quad (\text{II.6})$$

funzione che nella pratica numerica viene correttamente determinata applicando la trasformata discreta, grazie al fatto che il numero dei dati collezionati lungo l'asse temporale è sufficiente ad evitare artefatti da troncamento della serie di Fourier.

In base al teorema di convoluzione della trasformata di Fourier [70,71], l'equazione (II.6) può essere semplificata nella forma:

$$\hat{s}(k_n, f) = \sum_{n=1}^N a_n(f) H(k - k_n, f) \quad (\text{II.7})$$

dove il kernel di convoluzione è la funzione:

$$H(k, f) = \int_D \rho_{SLEM}(x, f) e^{-i2\pi k_i \cdot x} dx$$

L'equazione (II.7), scritta in forma vettoriale, diventa:

$$H(f)a(f) = \hat{s}(f) \quad (\text{II.8})$$

e quindi i coefficienti  $a_n(f)$  della serie generalizzata possono essere determinati risolvendo un sistema lineare.

Nel caso monodimensionale l'equazione (4.8) si traduce nel sistema di equazioni:

$$\begin{bmatrix} H_0 & H_{-1} & \dots & H_{-N} \\ H_1 & H_0 & \dots & H_{-N+1} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ H_N & H_{N-1} & \dots & H_0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ \vdots \\ a_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{s}_0 \\ \hat{s}_1 \\ \vdots \\ \hat{s}_N \end{bmatrix} \quad (\text{II.9})$$

dove le notazioni  $H_n$ ,  $a_n$ ,  $\hat{s}_n$  sono usate per abbreviare rispettivamente le espressioni  $H(n\Delta k, f)$ ,  $a_n(f)$  e  $\hat{s}(n\Delta k, f)$ , e dove  $n = 1, \dots, N$  ( $N$  è il numero di codifiche di fase in corrispondenza delle quale si assume possano essere acquisiti i dati).

Il sistema (II.9) possiede una matrice associata con struttura di Toeplitz e può essere risolto in modo molto efficiente attraverso l'algoritmo di Levinson o sue varianti.

Nel caso bidimensionale, riscrivendo l'equazione (II.7) nella forma scalare:

$$\hat{s}(k_x, k_y, f) = \sum_{n_x} \sum_{n_y} a_{n_x n_y}(f) H(k_x - k_{n_x}, k_y - k_{n_y}, f) \quad (\text{II.10})$$

Il sistema (II.9) diventa:

$$\begin{bmatrix} H_0 & H_{-1} & \dots & H_{-N_x} \\ H_1 & H_0 & \dots & H_{-N_x+1} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ H_{N_x} & H_{N_x-1} & \dots & H_0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ \vdots \\ a_{N_x} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \hat{s}_0 \\ \hat{s}_1 \\ \vdots \\ \hat{s}_{N_x} \end{bmatrix} \quad (\text{II.11})$$

in cui ogni elemento della matrice dei coefficienti è a sua volta una matrice di Toeplitz.

Da questo risulta che il sistema (II.11) possiede una struttura a blocchi di Toeplitz a due livelli; analogamente, nel caso  $D$ -dimensionale, la matrice associata al sistema avrà una struttura a blocchi su  $D$  livelli. L'eventuale malcondizionamento della matrice  $H$  causa difficoltà computazionali nella risoluzione del sistema, rendendo necessaria l'introduzione nel modello di opportuni regolarizzatori matematici [81]. Ne risulta che i coefficienti  $a_n(f)$  della serie generalizzata, necessari per ricostruire la funzione  $\rho_{GSLIM}(x, f)$ , possono essere determinati risolvendo il seguente sistema, versione regolarizzata del sistema (II.8):

$$[H(f) + \lambda I]a(f) = \hat{s}(f) \quad (\text{II.12})$$

dove il parametro  $\lambda$  di regolarizzazione viene scelto in base all'entità del rapporto segnale/rumore e del livello di regolarizzazione richiesto per stabilizzare la matrice  $H$ . La tecnica di regolarizzazione, oltre a garantire la stabilità numerica del metodo, limita la sensibilità nei confronti del rumore [7].



## II. Materiali e metodi

### Capitolo 2. Il metodo *starSLIM*

L'intrinseco mal condizionamento del problema spettroscopico è, inoltre, aggravato principalmente da due limitazioni:

- i) distorsioni spazialmente dipendenti dalla distribuzione del campo magnetico statico (B0),
- ii) disomogeneità nella distribuzione del campo magnetico a radiofrequenza (RF).

Il metodo *starSLIM* è un'evoluzione dei modelli precedentemente discussi in cui il kernel computazionale comprende anche la mappa di disomogeneità dei campi magnetici B0 e RF, consentendo una modellazione 3D quasi completa del problema spettroscopico. Inoltre, in questo capitolo è anche discussa la descrizione di un metodo originale per la determinazione sperimentale della mappa di disomogeneità RF specifica per il target in esame.

Le capacità di compensazione del metodo proposto sono state testate e illustrate con dati grezzi sintetici che riproducono il cervello umano.

#### II.2.1 La mappa spaziale di disomogeneità del campo magnetico RF

Le sequenze tipicamente utilizzate in MRS sono le PRESS (precedentemente descritte) in cui il vettore di magnetizzazione  $M^{(0)}$  viene deflesso impiegando un primo impulso a  $90^\circ$ .

In MRS è importante comprendere che la distribuzione spaziale dell'ampiezza dei *flip angle* è strettamente correlata all'impulso di eccitazione: a fronte di un flip angle nominale  $\alpha_n$  pari a  $\pi/2$ , la potenza RF effettivamente espressa sul target porterà alla definizione di una distribuzione spaziale effettiva  $\alpha(x)$ . Data quindi la distribuzione  $\alpha(x)$ , si può definire la mappa di distribuzione della disomogeneità associata al campo magnetico RF come segue:

$$\zeta(\mathbf{x}) = \frac{\sin(\alpha(\mathbf{x}))}{\sin(\alpha_n)} \quad (\text{II.13})$$

in cui le variazioni dal valore ideale di 1 rappresentano le informazioni legate alle disomogeneità RF che contribuiscono al segnale sperimentale.

Data una sequenza di acquisizione in cui l'impulso di eccitazione è caratterizzato da un flip angle nominale  $\alpha_n$ , la distribuzione spaziale legata all'intensità del segnale è espressa da:

$$S(\mathbf{x}; \alpha_n) = \eta(\mathbf{x}) M_z^{(0)}(\mathbf{x}) \sin(\alpha(\mathbf{x}))$$

dove  $M_z^{(0)}(\mathbf{x})$  è il segnale associato alla densità spettrale  $\rho(\mathbf{x})$ , mentre  $\eta(\mathbf{x})$  rappresenta la distribuzione di efficienza del segnale.

Analogamente, per le sequenze di acquisizione caratterizzate da flip angle nominali pari a  $(\alpha_n/2)$  e  $(\alpha_n/2 + \pi/2)$  si produrranno immagini la cui mappa di distribuzione in ampiezza è espressa da:

$$S\left(\mathbf{x}; \frac{\alpha_n}{2}\right) = \eta(\mathbf{x}) M_z^{(0)}(\mathbf{x}) \sin\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x})\right) \quad (\text{II.14})$$

$$S\left(\mathbf{x}; \frac{\alpha_n}{2} + \frac{\pi}{2}\right) = \eta(\mathbf{x}) M_z^{(0)}(\mathbf{x}) \cos\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \varepsilon(\mathbf{x})\right) \quad (\text{II.15})$$

dove i termini  $\delta(\mathbf{x})$  e  $\varepsilon(\mathbf{x})$  sono errori locali di flip angle, rappresentando la possibile rottura di proporzionalità fra flip angle nominale e la risposta del target influenzata da  $M_z^{(0)}(\mathbf{x})$ .

Sotto questo profilo, l'ipotesi di lavoro consiste nel supporre che la differenza fra  $\varepsilon$  e  $\delta$ , differenza certamente possibile, sia definita come segue:

$$\varepsilon(\mathbf{x}) = \delta(\mathbf{x}) + o(\delta(\mathbf{x}))$$

Approssimando, quindi, le equazioni (II.14) e (II.15) si ottiene:

$$\frac{S(\mathbf{x}; \alpha_n)}{S\left(\mathbf{x}; \frac{\alpha_n}{2}\right)} = u(\mathbf{x}) = \frac{\sin(\alpha(\mathbf{x}))}{\sin\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x})\right)} \quad (\text{II.16})$$

$$\frac{S(\mathbf{x}; \alpha_n)}{S\left(\mathbf{x}; \frac{\alpha_n}{2} + \frac{\pi}{2}\right)} = w(\mathbf{x}) = \frac{\sin(\alpha(\mathbf{x}))}{\cos\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x})\right)} \quad (\text{II.17})$$

Le distribuzioni  $u(\mathbf{x})$  e  $w(\mathbf{x})$  possono essere entrambi ottenuti direttamente attraverso acquisizioni di dati sperimentali, in quanto rappresentano un rapporto di *pixel-by-pixel* di diverse immagini del target spettroscopico, ottenuto mediante l'attuazione di flip angle nominali di interesse.

Il sistema di equazioni che si ricava dalle equazioni (II.16) e (II.17) porta a sviluppare il sistema come segue:

$$\frac{w(\mathbf{x})}{u(\mathbf{x})} = \frac{\sin\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x})\right)}{\cos\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x})\right)} = \tan\left(\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x})\right) \quad (\text{II.18})$$

ovvero,

$$\frac{\alpha(\mathbf{x})}{2} + \delta(\mathbf{x}) = \tan^{-1}\left(\frac{w(\mathbf{x})}{u(\mathbf{x})}\right) \quad (\text{II.19})$$

Inserendo il risultato nell'equazione (II.13), si ottiene il modello per ottenere la mappa di disomogeneità del campo magnetico RF:

$$\zeta(\mathbf{x}) = u(\mathbf{x}) \frac{\sin\left(\tan^{-1}\left(\frac{w(\mathbf{x})}{u(\mathbf{x})}\right)\right)}{\sin(\alpha_n)} \quad (\text{II.20})$$

## II.2.2 La novità del metodo *starSLIM*

Partendo dal modello sviluppato nel metodo BSLIM [8] in cui viene inserito nel kernel computazionale la mappa distribuzione spaziale  $\Delta B_0(\mathbf{x})$  delle disomogeneità del campo magnetico statico ottenuta da tecniche di *shimming*, come segue:

$$\begin{aligned} \rho_{\text{BSLIM}}(\mathbf{x}, \omega) &= \sum_{l=1}^L s_l(\omega - \Delta\omega(\mathbf{x})) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) \\ &= \sum_{k=1}^K s_l(\omega) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) \end{aligned}$$

si arriva ad ottenere la funzione di distribuzione spettrale del modello *starSLIM* espressa dalla relazione:

$$\begin{aligned} \rho_{\text{starSLIM}}(\mathbf{x}, \omega) &= \sum_{l=1}^L \zeta(\mathbf{x}) s_l(\omega - \Delta\omega(\mathbf{x})) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) \\ &= \sum_{l=1}^L \zeta(\mathbf{x}) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) s_l(\omega) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} \end{aligned} \quad (\text{II.21})$$

in cui  $\zeta(\mathbf{x})$  rappresenta la mappa di distribuzione del campo magnetico RF, come precedentemente descritto.

Per ottenere il kernel computazionale del metodo *starSLIM* si devono eseguire i passaggi descritti di seguito in maniera dettagliata.

Introducendo l'equazione (II.21) nell'equazione (I.6) precedentemente descritta si ottiene:

$$\begin{aligned} r(\mathbf{k}, t) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{\mathcal{D}} \rho_{starSLIM}(\mathbf{x}, \omega) e^{-i2\pi(\mathbf{k}\mathbf{x} + \omega t)} d\mathbf{x} d\omega \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{\mathcal{D}} \left( \sum_{l=1}^L \zeta(\mathbf{x}) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) s_l(\omega) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} \right) e^{-i2\pi(\mathbf{k}\mathbf{x} + \omega t)} d\mathbf{x} d\omega \end{aligned}$$

Dove  $r(\mathbf{k}, t)$  è il segnale MRS ottenuto da una tecnica di codifica di fase della distribuzione spettrale. Da qui si ricava facilmente:

$$r(\mathbf{k}, t) = \sum_{l=1}^L \int_{-\infty}^{\infty} s_l(\omega) e^{-i2\pi\omega t} d\omega \int_{\mathcal{D}} \zeta(\mathbf{x}) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} e^{-i2\pi\mathbf{k}\mathbf{x}} d\mathbf{x}$$

Il primo integrale può essere identificato come il segnale, funzione del tempo, correlato al compartimento  $l$ . Quindi:

$$r(\mathbf{k}, t) = \sum_{l=1}^L u_l(t) \int_{\mathcal{D}} \zeta(\mathbf{x}) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} e^{-i2\pi\mathbf{k}\mathbf{x}} d\mathbf{x}$$

Da cui si ricava la definizione di funzione di modulazione dell'ampiezza spettrale come segue:

$$\xi_l(\mathbf{x}) = \zeta(\mathbf{x}) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) = \begin{cases} \zeta(\mathbf{x}), & \text{if } \mathbf{x} \in \mathcal{D}_l \\ 0, & \text{otherwise} \end{cases}$$

La distribuzione spaziale di  $\xi_l(\mathbf{x})$  rappresenta la distribuzione della disomogeneità RF correlata al compartimento  $l$ . Quindi si ottiene:

$$r(\mathbf{k}, t) = \sum_{l=1}^L u_l(t) \int_{\mathcal{D}} \xi_l(\mathbf{x}) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} e^{-i2\pi\mathbf{k}\mathbf{x}} d\mathbf{x}$$

È possibile adesso definire il kernel integrale dell'operatore spettrale:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_l(\mathbf{k}, t) &= \int_{\mathcal{D}} \xi_l(\mathbf{x}) e^{-i2\pi\gamma\Delta B_0(\mathbf{x})t} e^{-i2\pi\mathbf{k}\mathbf{x}} d\mathbf{x} \\ &= \int_{\mathcal{D}} \xi_l(\mathbf{x}) e^{-i2\pi\Delta\omega(\mathbf{x})t} e^{-i2\pi\mathbf{k}\mathbf{x}} d\mathbf{x} \end{aligned} \quad (\text{II.22})$$

Riscrivendo in forma lineare il sistema di equazioni derivanti dall'esperimento del segnale spettroscopico, si ottiene:

$$r(\mathbf{k}, t) = \sum_{l=1}^L u_l(t) \mathcal{H}_l(\mathbf{k}, t) \quad (\text{II.23})$$

Così, l'equazione (II.23) può essere ricondotta ad un problema ai minimi quadrati: dati  $N$  punti di campionamento lungo la dimensione temporale e dati  $M$  punti di campionamento lungo la dimensione della codifica di fase del  $k$ -spazio, per ogni dato sperimentale  $r(\mathbf{k}_m, n\Delta t)$  ( $m=1,2,\dots,M$  e  $n=1,2,\dots,N$ ) i valori  $L$  di un indefinito FID spettroscopico, valutando all' $n$ -esimo punto di campionamento, possono essere ottenuti dalla seguente relazione:

$$\{u_l(n\Delta t)\}_{l=1,\dots,L} = \arg \min_{u_l(n\Delta t)} \sum_{m=1}^M \left\| r(\mathbf{k}_m, n\Delta t) - \sum_{l=1}^L u_l(n\Delta t) \mathcal{H}_l(\mathbf{k}_m, n\Delta t) \right\|^2 \quad (\text{II.24})$$

### II.2.3 L'algoritmo computazionale

Per ciascun punto di campionamento temporale  $n\Delta t$ , l'equazione (II.23) rappresenta un sistema di equazioni lineari che può essere riscritta in forma matriciale, tale che:

$$\mathcal{H}\mathbf{u} = \mathbf{r} \quad (\text{II.25})$$

dove  $H$  è un sistema matriciale ( $M \times L$ ) con rango  $P$ ,  $\mathbf{u}$  è il vettore incognito ( $L \times 1$ ), mentre  $\mathbf{r}$  è il vettore dei dati sperimentali ( $M \times 1$ ) associati all' $n$ -esimo punto di campionamento.

Utilizzando la tecnica di decomposizione ai valori singolari (SVD) al sistema di matrici, si ottiene:

$$\mathcal{H} = \mathbf{U}\mathbf{\Sigma}\mathbf{V}^*$$

dove  $\mathbf{U}$  e  $\mathbf{V}$  sono matrici isometriche,  $\mathbf{\Sigma}$  è una matrice diagonale i cui elementi  $\sigma_p$  sono i valori singolari di  $H$  e  $\mathbf{V}^*$  è la matrice trasposta di  $\mathbf{V}$ . Quindi la soluzione all'equazione (II.25) è:

$$\mathbf{u}_p = \frac{\mathbf{r}_p}{\sigma_p}$$

dove:  $\mathbf{u}_p = \mathbf{V}^* \mathbf{u}$ ,  $\mathbf{r}_p = \mathbf{U}^* \mathbf{r}$  e  $p=1,2,\dots,P$ .

Per quanto riguarda l'incorporazione di  $\zeta(\mathbf{x})$  nella matrice del sistema, potrebbe essere opportuno notare che il kernel integrale nell'equazione (II.22) può essere strutturato come:

$$\mathcal{H}_l(\mathbf{k}, t) = \mathcal{F}_{(\mathbf{x})}^T \left[ \mathcal{F}_{(t)}^T \left[ \zeta(\mathbf{x}) \mathcal{D}_l(\mathbf{x}) \delta(\omega - \Delta\omega(\mathbf{x})) \right] \right] \quad (\text{II.26})$$

In questo modo la risoluzione del problema ai minimi quadrati descritta nell'equazione (II.24) viene ben rappresentata dalla formulazione (II.26) introducendo come informazioni *a priori*:

- i) la distribuzione spaziale del bersaglio spettrale,
- ii) la mappa di distribuzione del campo magnetico  $B_0$ ,
- iii) la mappa di distribuzione del campo magnetico RF.

## II. Materiali e Metodi

### Capitolo 3. Il software di simulazione dei dati spettroscopici “SignalBuilder”

Allo studio e alla comprensione delle basi teoriche dei metodi matematici è seguito lo sviluppo in ambiente Matlab di strumenti software dedicati alla loro validazione teorica e pratica, su dati simulati e su dati acquisiti con indagini sperimentali.

A tal proposito, è stato sviluppato in ambiente Matlab il software specifico “SignalBuilder”, dedicato alla simulazione di raw-data spettroscopici ed in grado, quindi, di riprodurre dati formalmente identici a quelli estratti da un reale esperimento di spettroscopia in modalità standard CSI.

Data l’indubbia complessità del problema della ricostruzione di immagini spettroscopiche a partire da raw-data sperimentali sottocampionati, la possibilità di testare il funzionamento del metodo starSLIM (e dei metodi SLIM e GSLIM) eseguendo elaborazioni su dati simulati è risultata una delle condizioni necessarie ai fini della creazione e validazione di una tecnica ottimale di localizzazione spettroscopica.

Far lavorare gli algoritmi di ricostruzione con un set di dati grezzi sintetici significa avere la possibilità di conoscere a priori il contenuto spettroscopico che essi sono chiamati ad estrarre dai compartimenti (pixel naturali) individuati nell’immagine anatomica di riferimento nella fase di segmentazione, e quindi poter valutare oggettivamente ed efficacemente i risultati delle elaborazioni eseguite.

La filosofia del software di simulazione è la seguente:

- l’utente, in una fase preliminare, precedente l’esecuzione del programma, definisce un’immagine maschera di riferimento simulando che questa sia il risultato della segmentazione di un’immagine anatomica ad alta risoluzione dell’oggetto sottoposto ad indagine spettroscopica;
- dopodiché l’utente inserisce nel software i parametri caratteristici dell’acquisizione che egli vuole simulare, tra cui la mappa di disomogeneità B0, la mappa di

disomogeneità RF, il valore della banda passante di frequenze ammissibili e la dimensione del k-spazio;

- successivamente attribuisce ad ogni regione di interesse all'interno dell'immagine maschera selezionata una o più frequenze molecolari caratteristiche, generando così una sorta di “fantoccio software” in corrispondenza del quale verranno simulati i segnali RM.

Per ciascuna componente del segnale di ampiezza, il rapporto segnale/rumore è stato misurato in decibel (dB) e definito come:

$$SNR_k \equiv 20 \log \left( \frac{a_k}{\sigma} \right)$$

Sono sempre stati effettuati prima sperimentazioni senza l'introduzione del rumore, e successivamente con l'aggiunta del rumore di fondo.

Alla fine dell'elaborazione viene mostrata una finestra di riepilogo in cui sono indicati anche il tempo trascorso per la computazione e i file di output. Il software restituisce come file di output i file contenenti i dati spettroscopici espressi nel dominio delle frequenze: il codice restituisce set di raw-data organizzati in matrici complesse contenenti l'informazione spettroscopica relativa a ciascun punto del k-spazio sintetico.



```

InputLab1 = str2double(answer(1));
InputFreq = str2double(answer(2));
InputAmpl = str2double(answer(3));
InputT2 = str2double(answer(4));

if InputFreq == -1000
    loadLastFlag = 1;
else
    InputData(:,inputIndex) = [InputLab1; InputFreq; InputAmpl; InputT2];
end
end

clear InputFreq InputAmpl InputT2 InputLab1;
save D:\_ _ \lastInput InputData;

%%
%%
% Calcolo del nucleo computazionale
%%
%%
[FourDKer,NumVox]=create4DKernel_(KSpaceDim, ...
                                MaskImage, ...
                                IntensityLevels, ...
                                NumIntensityLevels, ...
                                VarImage, ...
                                RFIImage, ...
                                FrequencyBandWidth);

clear MaskImage VarImage RFIImage
FourDRawData=zeros(size(FourDKer));

```

Figura 31: screenshot del codice software SignalBuilder.

### III. Risultati

In questa sezione della Tesi vengono riportati i risultati ottenuti utilizzando gli strumenti teorici ed informatici descritti in precedenza.

Le elaborazioni numeriche sono state eseguite nel tentativo di testare la validità teorica e pratica dei metodi di ricostruzione di mappe metaboliche ad alta risoluzione SLIM e starSLIM, in condizione di presenza di rumore e/o di componenti di disturbo nei dati.

La prima parte del paragrafo è dedicata ai risultati dei test eseguiti su dati da simulazione; la seconda, invece, descrive i risultati ottenuti impiegando dati sperimentali.

Quindi, inizialmente vengono presentati i dati “raw” sintetici ottenuti utilizzando il software di simulazione prodotto nell’ambito di questo lavoro di Tesi, dati la cui osservazione e valutazione diretta risulta essenziale al fine di costruire un “template sperimentale”, i cui contenuti siano noti con precisione superiore alla sensibilità del metodo di elaborazione.

Infine, vengono presentate le mappe metaboliche ricostruite attraverso i metodi SLIM e starSLIM a partire da set di dati “raw” sintetici, dei quali si evidenziano i rispettivi livelli di rumore inseriti in fase di simulazione.

In conclusione al paragrafo vengono presentati i dati “raw” ottenuti da acquisizioni sperimentali.

## III. Risultati

### Capitolo 1. Test su dati simulati

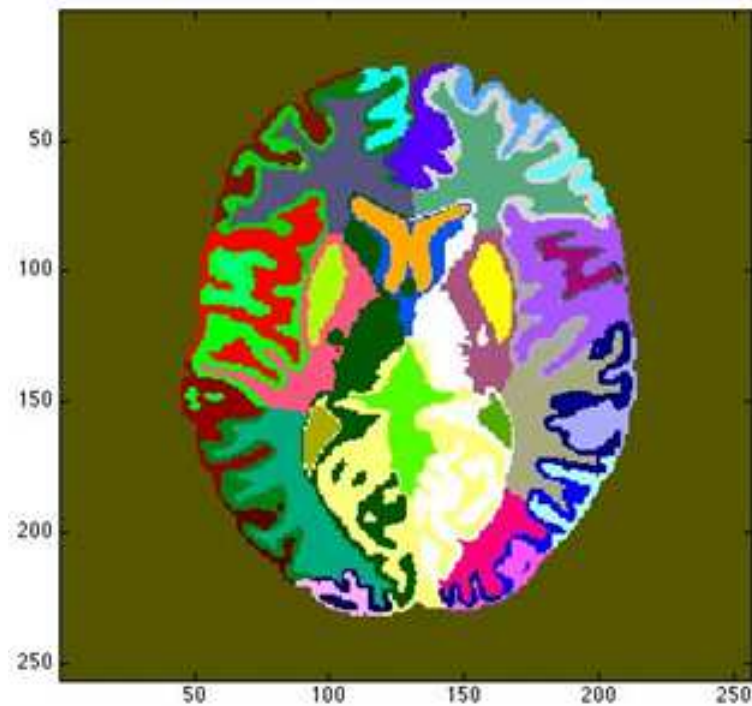
Sfruttando il software di simulazione SignalBuilder appena descritto ed utilizzando parametri di acquisizione molto simili a quelli utilizzati nell'indagine sperimentale, sono stati generati 2 set di dati spettroscopici, in corrispondenza di un fantoccio software la cui maschera è stata ottenuta segmentando in 45 compartimenti spettroscopici un'immagine anatomica RM cerebrale mediotalamica T2-pesata (figura 32):

1. dati relativi a condizioni ideali (assenza di componenti di disturbo e rumore) con la simulazione di 2 o 3 picchi metabolici random e banda di frequenza pari a  $[-400, 0]$  Hz.
2. dati relativi a condizioni non ideali (sperimentali) con la simulazione di 2 o 3 picchi metabolici random, banda di frequenza pari a  $[-400, 0]$  Hz e l'aggiunta di rumore di fondo (livello SNR investigato = 15,7 dB).

L'esperimento è stato progettato in modo aderente ad un reale protocollo sperimentale, componendo  $8 \times 8$  codifiche di fase, ognuna delle quali digitalizzata, simulando una frequenza di campionamento di 2000 Hz, utilizzando 1024 punti temporalmente equispaziati.

Ai segnali ottenuti nel secondo set di dati è stato aggiunto rumore bianco, così da simulare un livello SNR pari a 15,7 dB (15 dB è particolarmente prossimo ai livelli standard per un tomografo clinico da 3T).

Le simulazioni sono state eseguite in modo da riprodurre, per quanto possibile le condizioni sperimentali, in termini di parametri di acquisizione e contenuti metabolici del fantoccio esaminato.



**Figura 32: immagine maschera: 45 compartimenti anatomici sono stati estratti mediante un processo di segmentazione. Ogni compartimento è rappresentato da un colore diverso.**

La scelta di simulare un gran numero di compartimenti è stata voluta per riuscire a caratterizzare il comportamento del modello:

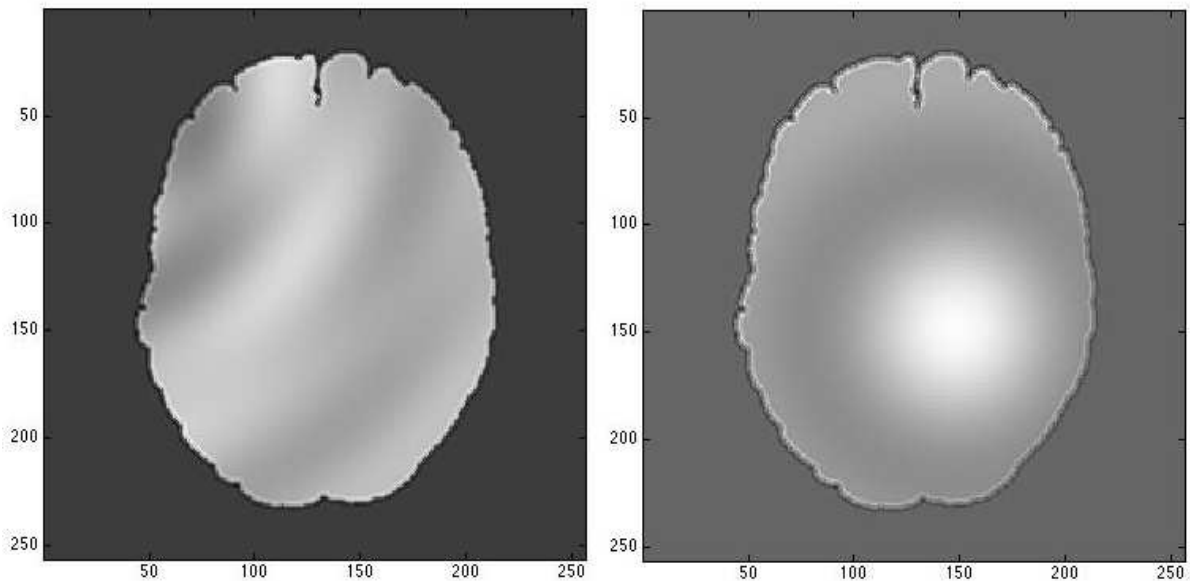
- i) quando sia l'area sia la forma del compartimento sono sottoposti a severe variazioni, e
- ii) soprattutto quando i compartimenti sono embricate uno dentro l'altro, in quanto questa è una situazione tipicamente riscontrata negli studi "in vivo".

Il software di segmentazione è stato progettato per identificare compartimenti la cui forma rispetta i profili anatomici tra tessuti vicini. In questo lavoro, quando sono stati estratti compartimenti aventi una vasta area, sono stati arbitrariamente divisi in due o tre sotto-compartimenti più piccoli, aumentando così la complessità spaziale del target spettroscopico e, di conseguenza, aumentando anche il numero di incognite nel processo di ricostruzione. Questo aumento di complessità aggrava l'instabilità numerica del problema inverso in esame, sottoponendo ad ancor più elevati carichi di lavoro la capacità di ricostruzione dei dati del metodo proposto.

La mappa di disomogeneità del campo magnetico statico impiegata nella simulazione è riportata in figura 33. Per simulare gli effetti di variazioni di suscettibilità magnetica all'interfaccia tessuto-aria, l'immagine originale è stata filtrata usando un filtro gaussiano (FWHM = 2, in unità di pixel). Le variazioni 2D della mappa di intensità sono state calcolate

per simulare una variazione corrispondente del campo statico per un massimo di 2 ppm in unità equivalenti frequenza.

Lo stesso approccio è stato seguito per la simulazione della mappa di disomogeneità del campo magnetico a radiofrequenza RF. È stata riprodotta una funzione sinc 2D che attraversa la parte non-nulla dell'immagine di destinazione; la sua ampiezza è modulata in modo tale che la relativa mappa  $\zeta(x)$  (equazione (II.20)) cade nell'intervallo [0.3, 1].



**Figura 33: immagini che rappresentano le mappe di distribuzione disomogeneità B0 (a sinistra) e RF (a destra)**

## **Risultati dei test su dati simulati**

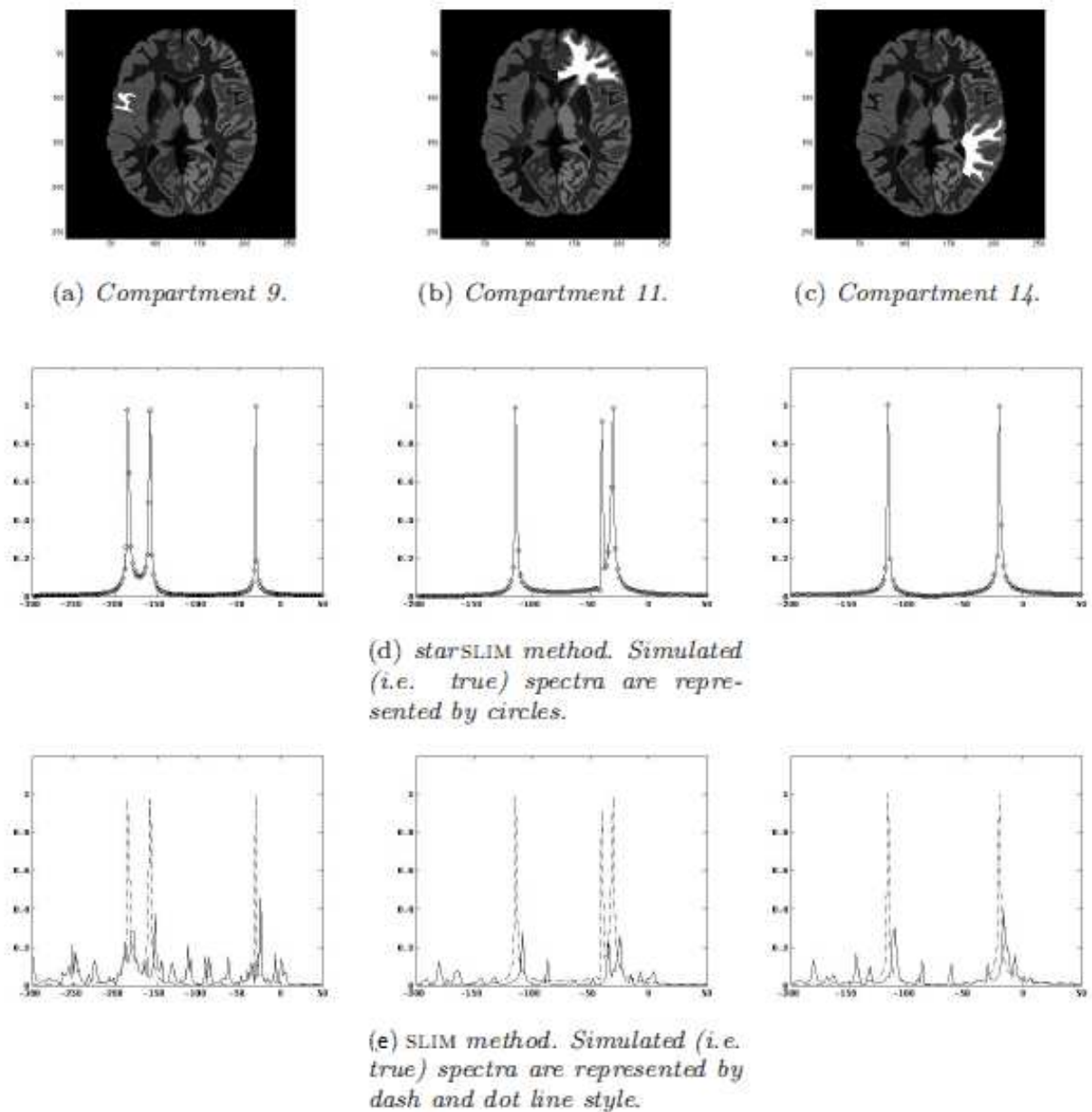
Il metodo starSLIM, presentato in questo lavoro di tesi, è stato testato confrontando i risultati di ricostruzioni di k-spazi sintetici con quelli ottenuti dalle ricostruzioni degli stessi set di dati grezzi realizzati utilizzando il metodo SLIM.

Per evitare eventuali discrepanze computazionali derivanti dal software di simulazione dei dati spettroscopici utilizzato, l'algoritmo del metodo SLIM è stato riprodotto eseguendo lo stesso codice di calcolo utilizzato per il modello starSLIM. In dettaglio, SLIM è stato implementato in modo che:

- i) la mappa correlata al campo magnetico statico fosse azzerata in ampiezza (mappa uniforme), e
- ii) trasformando la mappa disomogeneità RF in una distribuzione omogenea unitaria.

Verranno mostrati i risultati di diversi compartimenti per evidenziare il comportamento del modello di ricostruzione dei dati in presenza di varie morfologie di compartimento.

E ogni spettro è stato graficamente ricostruito sovrapponendo il corrispondente spettro vero per evidenziarne le differenze e le incongruità.



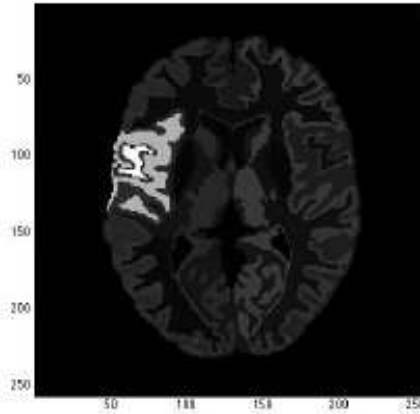
**Figura 34: Mappe metaboliche e spettri derivati dalla ricostruzione del set di dati senza rumore, relativi ai compartimenti 9, 11 e 14. Per ciascun compartimento, sono stati riportati gli spettri ricostruiti (linee continue) e gli spettri simulati in modo da facilitare il confronto. Con il metodo starSLIM si nota una corretta corrispondenza di entrambi i valori caratteristici in ampiezza e frequenza.**

In figura 34 sono mostrati gli spettri relativi alle ricostruzione del k-spazio senza l'aggiunta di rumore. Questi costituiscono un valido punto di partenza per una descrizione robusta dei

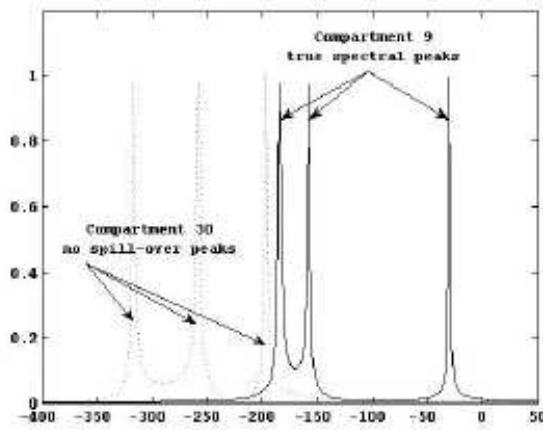
risultati ottenuti. Infatti, gli spettri derivanti dal metodo starSLIM riproducono i set di dati veri con costanza eccezionale, determinando sia le loro frequenze caratteristiche sia le loro ampiezze. E questo risultato è indipendente dalla dimensione del compartimento sotto valutazione.

Invece, è particolarmente interessante considerare l'analisi dei risultati forniti dal metodo SLIM. Questo, pur apparentemente in grado di ricostruire correttamente le frequenze caratteristiche dei picchi simulati, non riesce a riprodurre fedelmente le loro ampiezze. Inoltre, si possono osservare anche presenze di picchi spuri che, in compartimenti con una superficie totale più piccola (compartimento 9, per esempio), la loro ampiezza risultata essere maggiore.

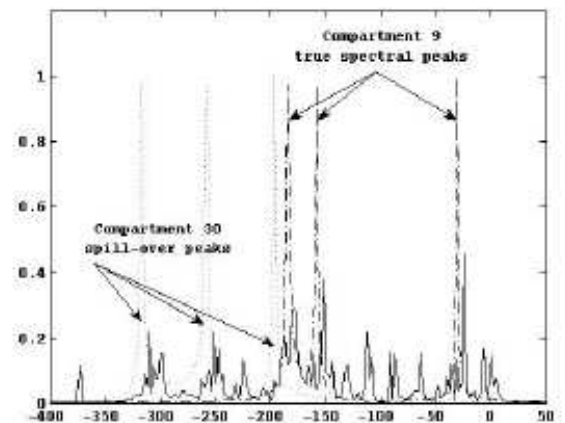
A questo proposito, è stata condotta un'analisi approfondita dell'effetto spill-over spettrale tra compartimenti adiacenti. In figura 35 viene condotta un'analisi sull'influenza di un compartimento di dimensioni piccole rispetto ad un compartimento di grosse dimensioni. Nel modello starSLIM non si riscontra nessun effetto di disturbo. Al contrario, nel metodo SLIM si nota che i compartimenti piccoli sono fortemente influenzati dalla effetto spill-over, come dimostra chiaramente la figura 35.



(a) *Compartment 9 (white) and Compartment 30 (light gray).*



(b) *starSLIM method.*

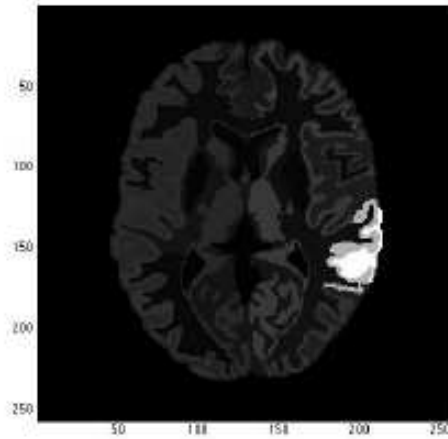


(c) *SLIM method.*

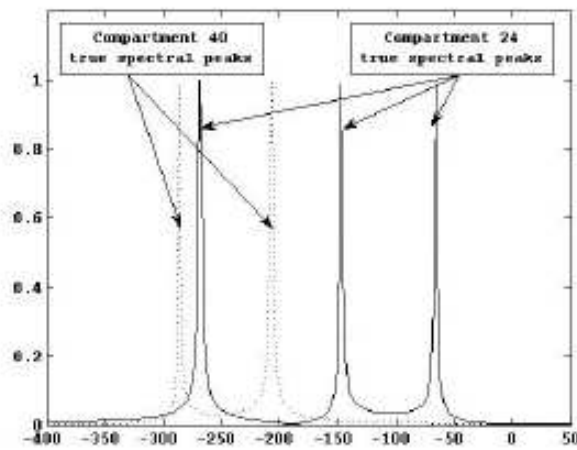
**Figura 35: Spettri ricostruiti (linee continue) dal set di dati grezzi senza l'aggiunta di rumore, relativi al compartimento 9. Il plot 34.b si riferisce al metodo starSLIM: non vi è alcuna evidenza di picchi spill-over influenti dal compartimento 30. Al contrario, nel metodo SLIM si notano forti componenti di spill-over.**

Per studiare la possibile dipendenza del effetto spill-over sulla grandezza relativa dei compartimenti in corso di valutazione, sono state eseguite delle analisi equivalenti tra due compartimenti di grandezza paragonabile e tra compartimenti di dimensioni chiaramente diverse. I risultati della prima analisi sono riportati in figura 36, in cui appare minimo l'effetto di cross-talking, se non addirittura assente. I risultati della seconda analisi, riportati in figura 37, invece confermano la presenza di effetti di cross-talk intra-compartimentali.

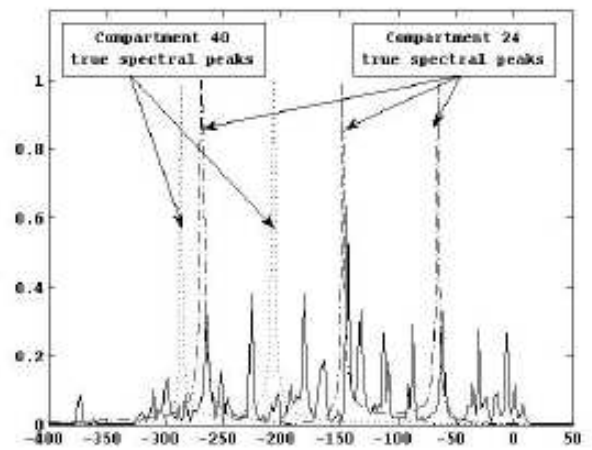




(a) *Compartment 24 (white) and Compartment 40 (light gray).*

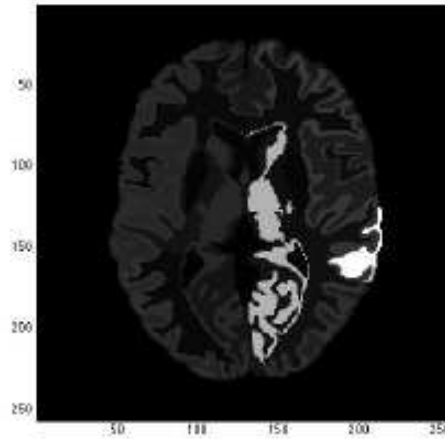


(b) *starSLIM method.*

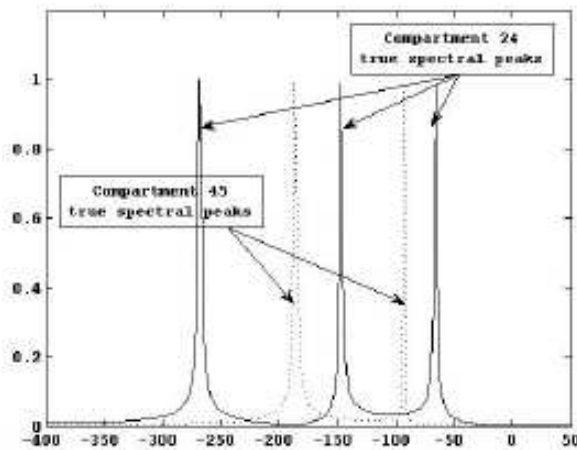


(c) *SLIM method.*

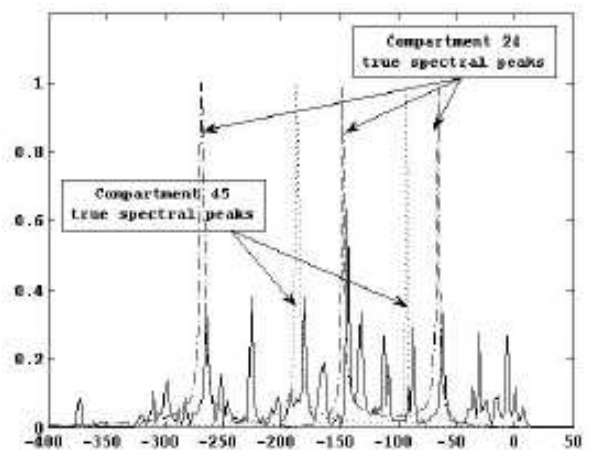
Figura 36: Spettri ricostruiti (linee continue) dal set di dati grezzi senza l'aggiunta di rumore, relativi al compartimento 24. Il plot 35.b si riferisce al metodo starSLIM: non vi è alcuna evidenza di picchi spill-over influenti dal compartimento 40. Al contrario, nel metodo SLIM si notano ancora forti componenti di spill-over.



(a) *Compartment 24 (white) and Compartment 45 (light gray).*



(b) *starSLIM method.*



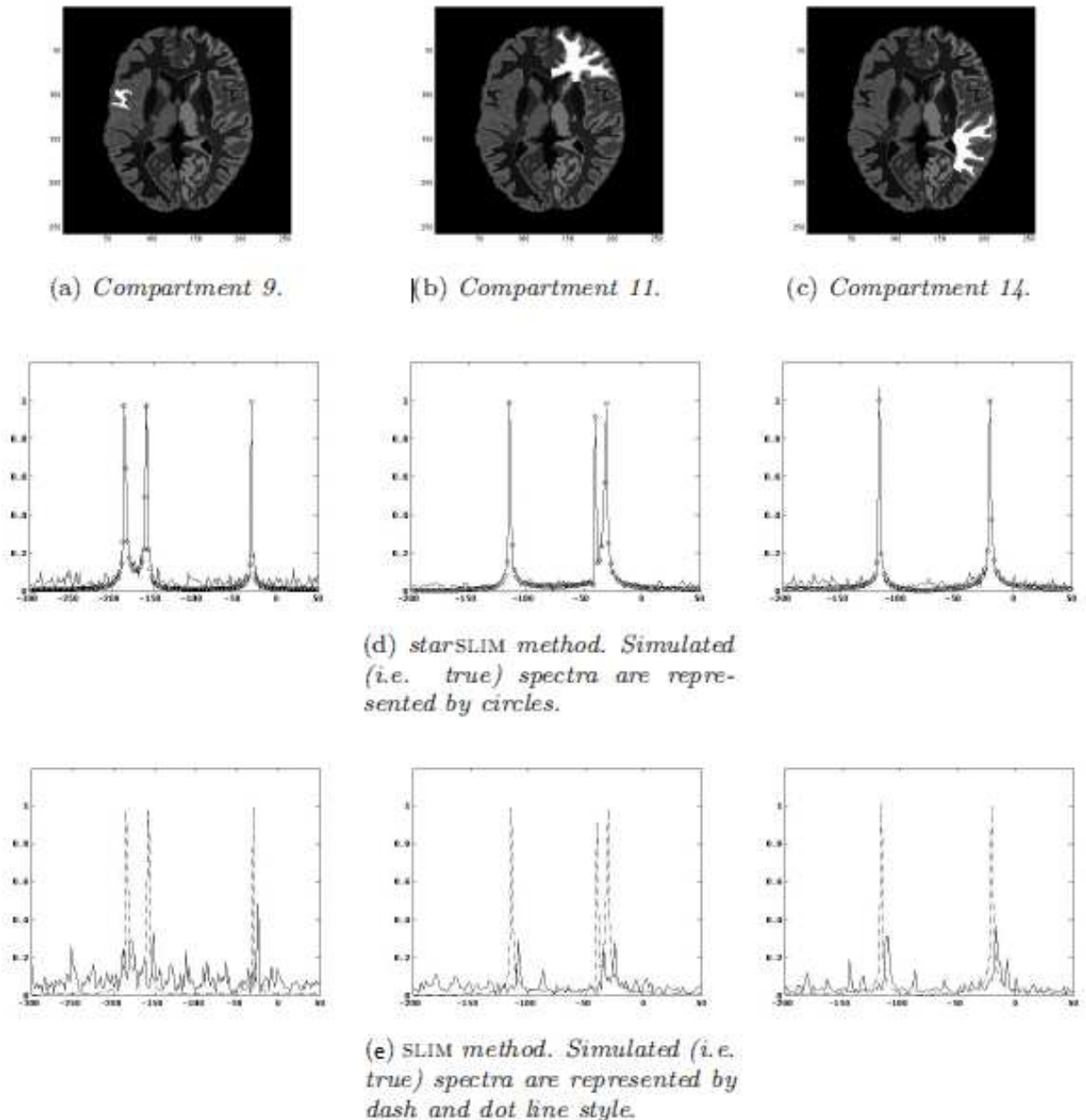
(c) *SLIM method.*

Figura 37: Spettri ricostruiti (linee continue) dal set di dati grezzi senza l'aggiunta di rumore, relativi al compartimento 24. Il plot 36.b si riferisce al metodo starSLIM: non vi è alcuna evidenza di picchi spill-over influenti dal compartimento 45. Però, a causa della grandi dimensioni del compartimento 45 e nonostante la sua distanza spaziale, gli spettri ricostruiti dal metodo SLIM presentano evidenti effetti di cross-talking.

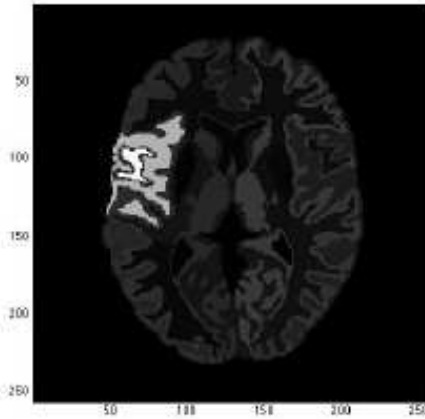
Lo stesso tipo di analisi è stata condotta sui dati simulati con un rumore di fondo pari a SNR=15,7 dB.

Per sostenere un confronto diretto dei modelli di ricostruzione dei dati, gli spettri riportati si riferiscono agli stessi comparti presentati precedentemente in figura 34. Le osservazioni sui risultati ottenuti dai dati con rumore sembrano essere sovrapponibili ai precedenti risultati (ottenuta senza l'aggiunta di rumore). L'unica differenza riguarda il metodo starSLIM, in cui si può notare come a bassi livelli del segnale gli spettri ricostruiti hanno una riduzione del fitting con le relative ampiezze ideali degli spettri simulati.

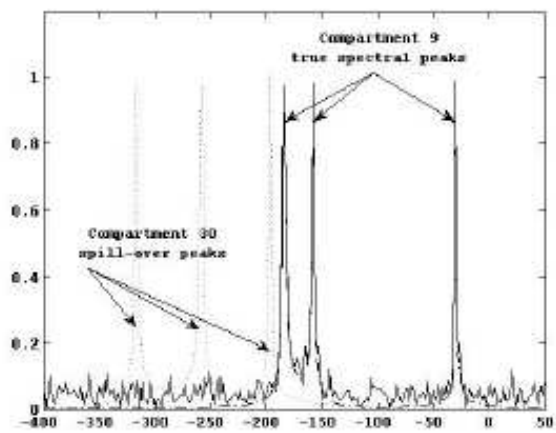
Per quanto riguarda, invece, l'effetto spill-over inter-compartimentale, nelle figure 39, 40 e 41, seguendo lo stesso schema già presentato per i dati grezzi senza rumore, si può notare la dipendenza dell'effetto cross-talking sia sull'analisi comparativa di compartimenti di dimensioni simili, sia sull'analisi tra compartimenti di dimensioni differenti, esattamente come era avvenuto nel set di dati senza rumore.



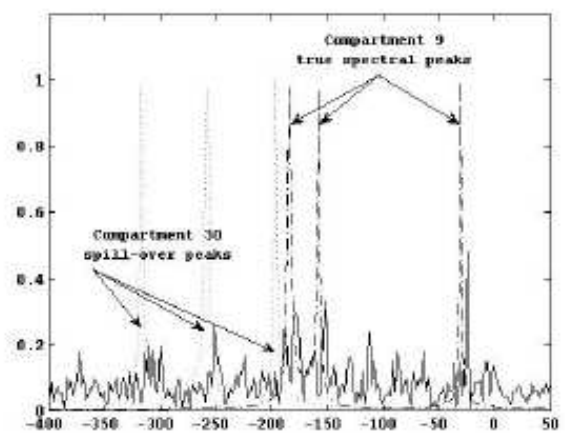
**Figura 38:** Mappe metaboliche e spettri derivati dalla ricostruzione del set di dati con rumore (SNR=15,7 dB), relativi ai compartimenti 9, 11 e 14. Per ciascun compartimento, sono stati riportati gli spettri ricostruiti (linee continue) e gli spettri simulati in modo da facilitare il confronto. Nonostante la notevole quantità di rumore aggiunto, il metodo starSLIM mostra ancora una soddisfacente corrispondenza dei picchi spettrali ricostruiti rispetto a quelli simulati sia in ampiezza sia in frequenza.



(a) *Compartment 9 (white) and Compartment 30 (light gray).*

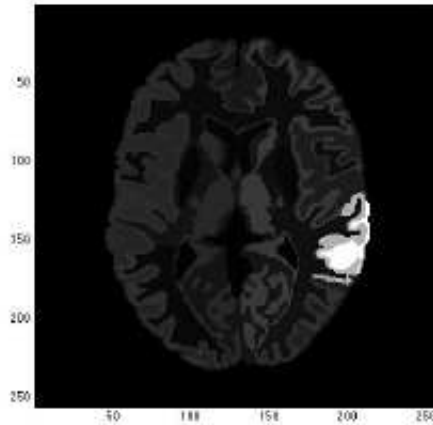


(b) *starSLIM.*

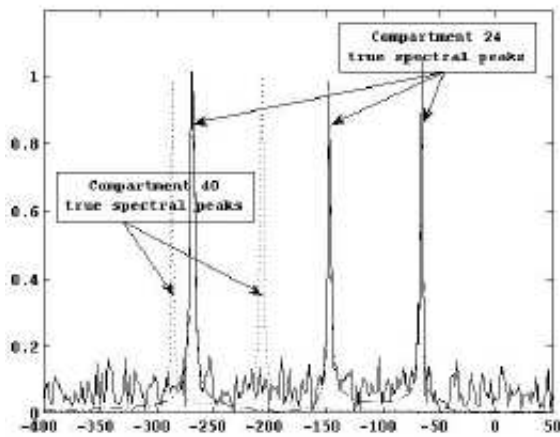


(c) *SLIM.*

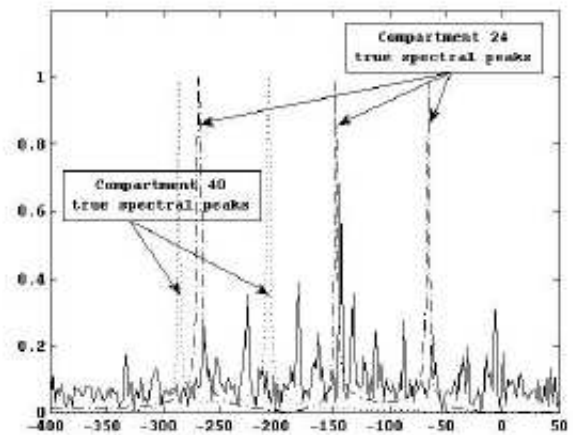
Figura 39: Spettri ricostruiti (linee continue) dal set di dati grezzi con l'aggiunta di rumore (SNR=15,7 dB), relativi al compartimento 9. Il plot 38.b si riferisce al metodo starSLIM: non vi è alcuna evidenza di picchi spill-over influenti dal compartimento 30. Al contrario, come visto con la ricostruzione dei dati grezzi senza rumore, gli spettri del metodo SLIM mostrano la presenza di picchi di spill-over influenzati dal compartimento 30.



(a) *Compartment 24 (white) and Compartment 40 (light gray).*

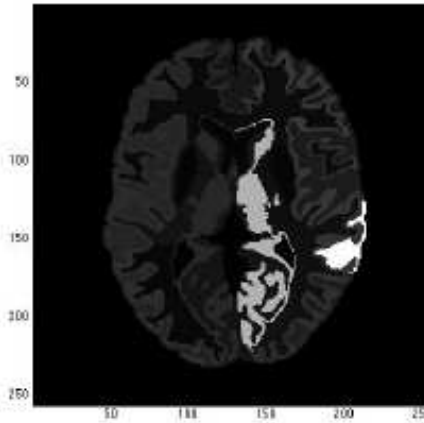


(b) *starSLIM.*

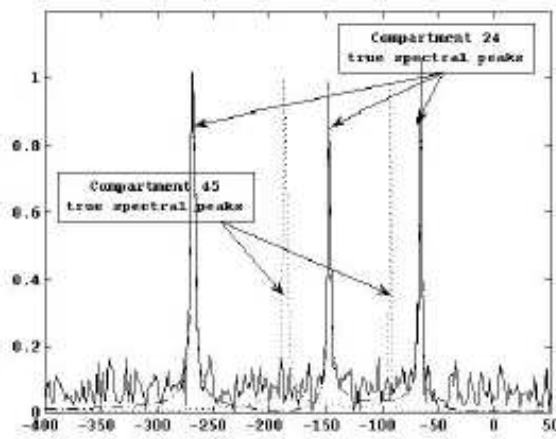


(c) *SLIM.*

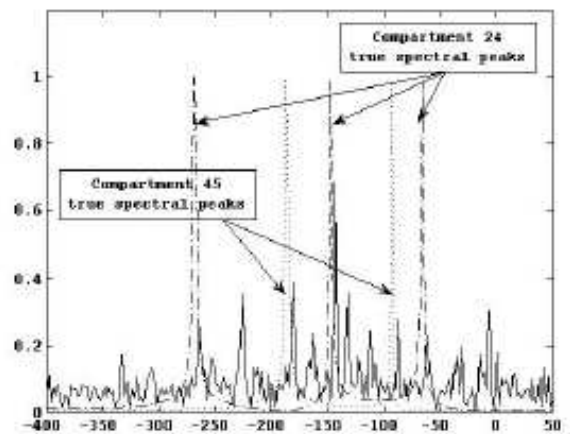
Figura 40: Spettri ricostruito dal k-spazio con rumore (linee continue) relativi al compartimento 24 (SNR=15,7 dB). Nonostante il rumore, né il plot 39.7b (risultati di metodo starSLIM), né il plot 39.c (metodo SLIM) mostrano segni di effetti spill-over dal compartimento 40. Ciò può essere dovuto alla piccola dimensione del compartimento 40 rispetto al compartimento 24.



(a) *Compartment 24 (white) and Compartment 45 (light gray).*



(b) *starSLIM.*



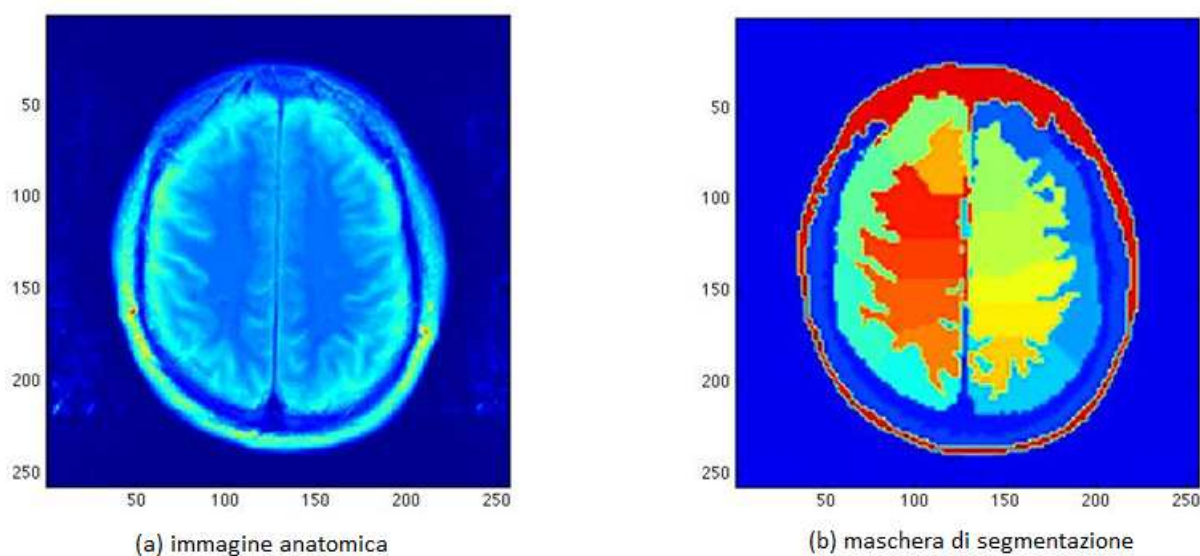
(c) *SLIM.*

Figura 41: Spettri ricostruiti (linee continue) dal set di dati grezzi con l'aggiunta di rumore (SNR=15,7 dB), relativi al compartimento 24. Le osservazioni riportate nella legenda della Fig.36 rimangono valide in questo caso. Un effetto sostanziale di spill-over è presente dal compartimento 45 negli spettri ricostruiti con il metodo SLIM.

### III. Risultati

## Capitolo 2. Test su dati sperimentali

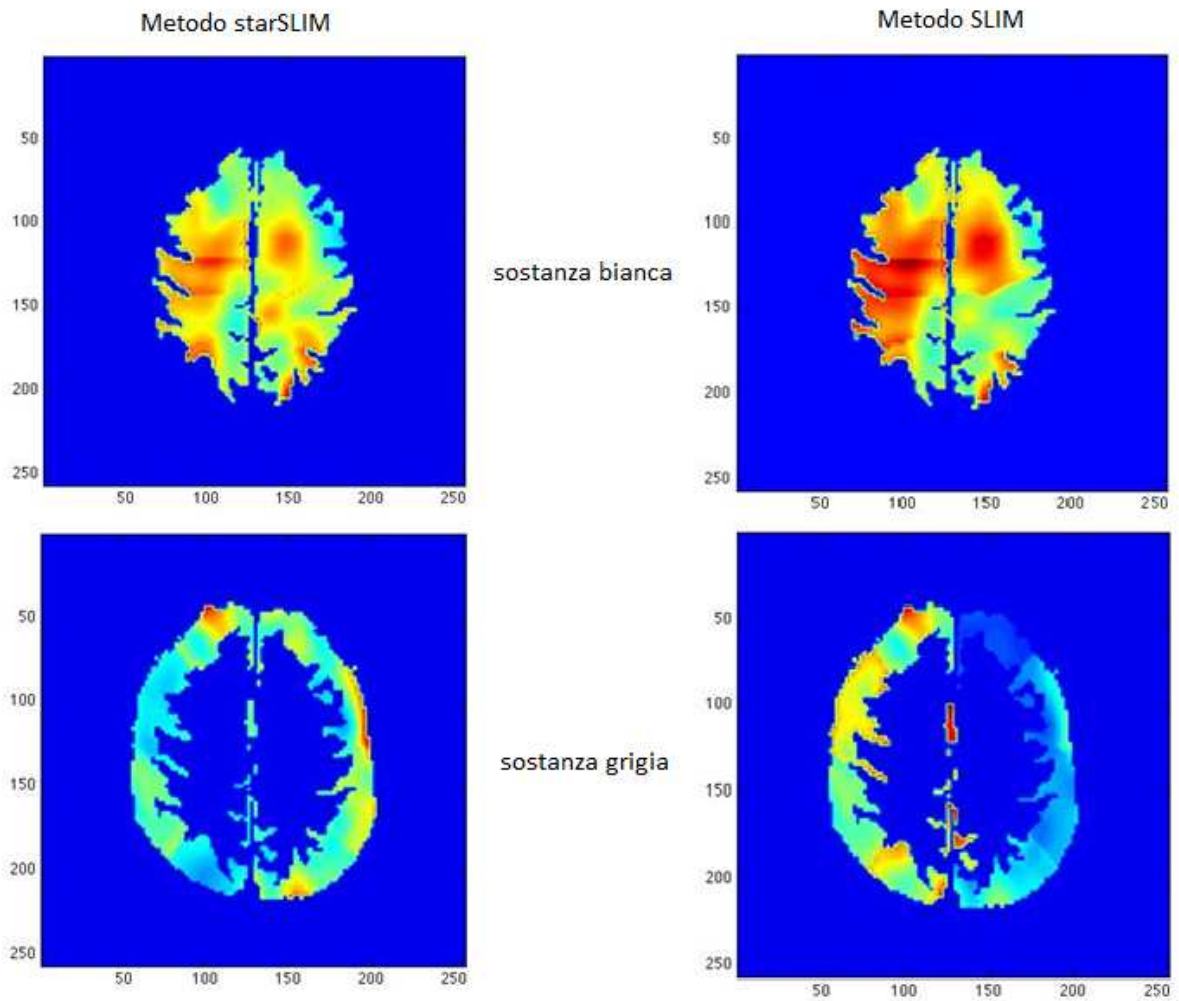
Un ultimo test per verificare la straordinaria capacità del metodo starSLIM di ricostruire i dati spettroscopici è stato effettuato “in vivo” durante un tradizionale esame di risonanza magnetica. I risultati sui primi dati sperimentali ottenuti permettono di caratterizzare meglio la sostanza bianca e la sostanza grigia con il metodo starSLIM rispetto al metodo SLIM.



**Figura 42: Slice RM cerebrale utilizzata per la sperimentazione “in vivo” del metodo starSLIM.**

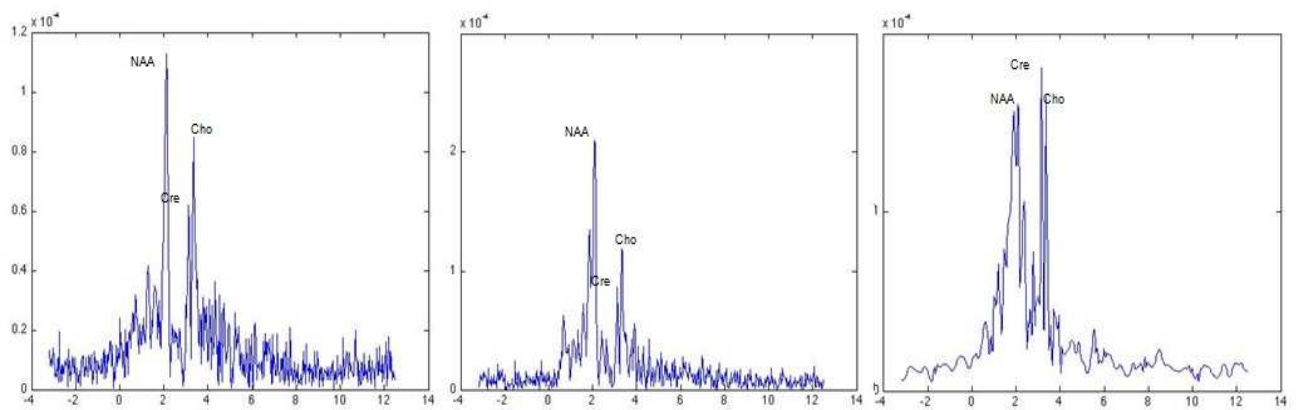
Infatti, dopo l’elaborazione dei dati in post-processing si ottengono le mappe metaboliche riportate in figura 43.





**Figura 43: risultati post-processing della sperimentazione “in vivo” dei metodi starSLIM e SLIM.**

In accordo con questi risultati, si ottengono degli spettri della sostanza bianca che ben caratterizzano e rappresentano lo studio effettuato.



**Figura 44: esempi di 3 spettri della sostanza bianca ottenuti dalla ricostruzione dei dati con il metodo starSLIM.**



## IV. Discussione e conclusioni

Questo lavoro descrive un complesso approccio fisico-matematico al problema della localizzazione spaziale della distribuzione metabolica spettrale in un organismo vivente. Tale approccio si colloca nella categoria dei metodi matematici idonei alla regolarizzazione di un problema inverso mal-condizionato.

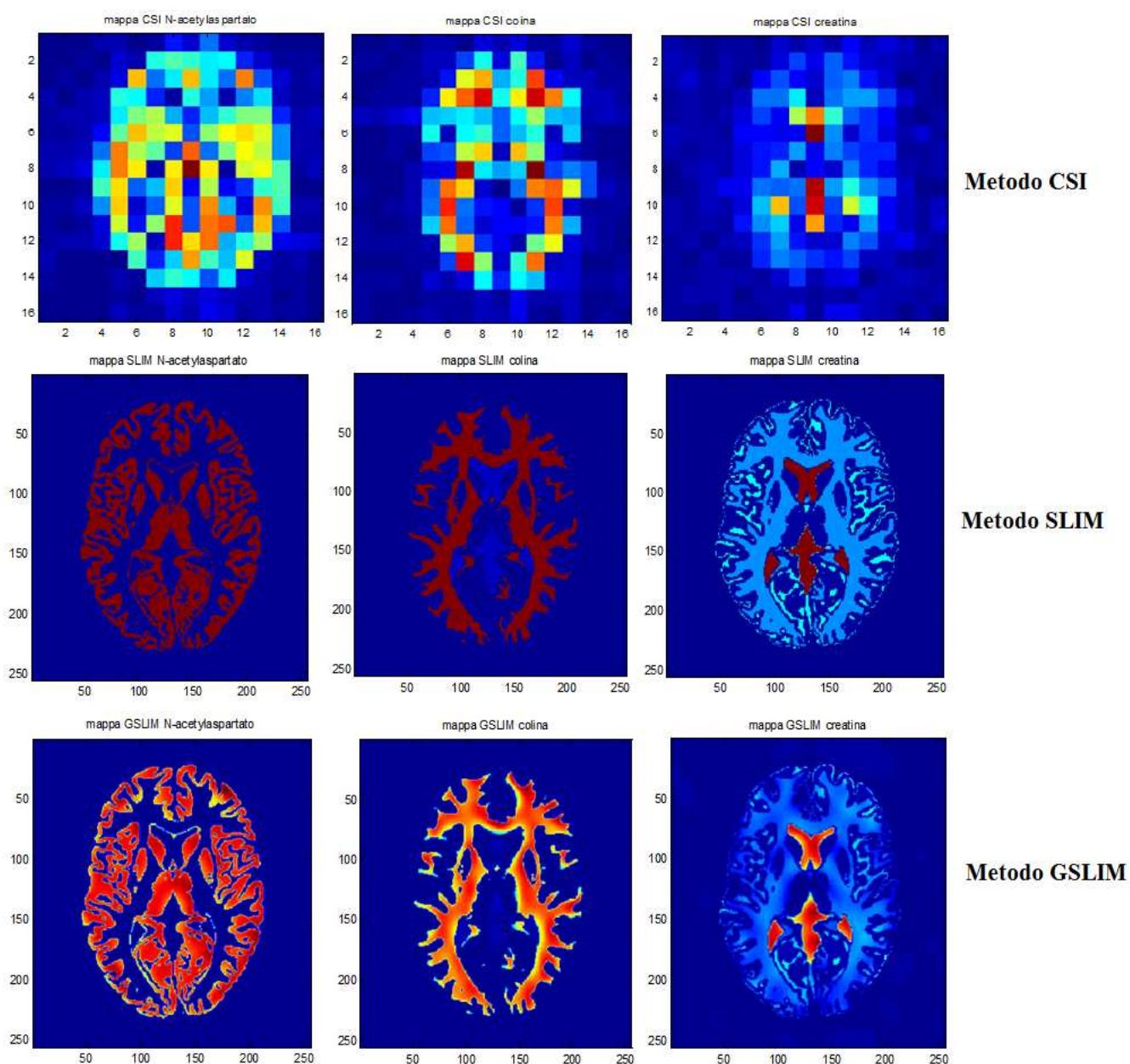


Figura 45: confronto CSI vs SLIM vs GSLIM

Le immagini spettrali ottenute mediante i metodi SLIM e GSLIM esibiscono una risoluzione spaziale identica a quella dell'immagine anatomica di riferimento, confermando così, in quest'ambito, il dato di eccellenza rispetto al metodo tradizionale CSI. Però, sebbene il modello SLIM consenta di superare i limiti della tecnica CSI, legati alla bassa risoluzione della griglia di acquisizione e quindi alle dimensioni troppo grandi del pixel, l'ipotesi su cui esso lavora, ovvero che all'interno dei compartimenti anatomici evidenziati in fase di segmentazione la densità spettrale sia omogenea, si dimostra essere troppo rigida. Quindi, con l'utilizzo dei coefficienti a serie generalizzate in GSLIM, l'immagine spettrale esibisce all'interno del singolo compartimento una lieve modulazione della distribuzione spaziale spettrale.

L'unica considerazione da sottolineare riguarda la disomogeneità marcata che il metodo GSLIM esprime nella ricostruzione delle immagini metaboliche. Tali distorsioni sono riferibili all'influenza esercitata sul modello teorico dalla disomogeneità del campo magnetico principale B<sub>0</sub> e dagli effetti delle variazioni del campo magnetico RF.

Il metodo starSLIM supera questi vincoli e consente una modellizzazione 3D del target spettroscopico nella ricostruzione di immagini MRS ad alta risoluzione spaziale. In questo modo, esattamente come nel metodo SLIM originale, si ottiene la soluzione al problema eseguendo una decomposizione a valori singolari della matrice di transizione, definita su uno spazio di Hilbert, andandola a ricercare con il metodo di risoluzione dei minimi quadrati.

Con quest'ultimo innovativo metodo viene ridotto il mal condizionamento della matrice di transizione, rispetto al metodo SLIM, introducendo informazioni fisiche *a priori* riguardanti il processo di rilevamento del segnale RM. In sostanza, questo lavoro ha studiato ed analizzato:

- i) la modulazione in frequenza della mappa spaziale relativa alla distribuzione delle disomogeneità del campo magnetico statico,
- ii) la modulazione in ampiezza della mappa spaziale relativa alla distribuzione delle disomogeneità del campo magnetico RF.

Infatti, la distribuzione spaziale intrinseca di un determinato metabolita in un tessuto biologico viene considerata, ovviamente, un parametro fisiologico spazialmente dipendente (presupposto che il metodo SLIM trascura considerando costante la distribuzione spaziale della densità spettrale compartimentale).

La simulazione di esperimenti con vari set di dati spettroscopici grezzi deve essere considerata uno strumento sensibile nella valutazione del modello di ricostruzione da adottare. La mancanza di uniformità nel modello SLIM rispetto alle condizioni sperimentali simulate ha dimostrato di tradursi sperimentalmente in:

- i) un'alterazione matematica della soluzione, portando alla comparsa di picchi spuri distribuiti casualmente nello spettro, e
- ii) nella rilevazione di cross-talk (spill-over) spettrale tra i compartimenti.

In accordo ai risultati precedentemente esposti (figure 34 e 38), l'effetto spill-over si è dimostrato una causa piuttosto rilevante nell'alterazione dell'immagine anche tra compartimenti non contigui. Inoltre, come già dimostrato, questo errore non dipende dalla presenza più o meno importante di rumore nel set di dati.

Infatti, negli spettri risultanti dalla sperimentazione su dati grezzi si dimostra che la gravità dell'effetto spill-over è strettamente dipendente dall'ampiezza del segnale inter-compartimentale: nel confronto tra compartimenti di dimensioni simili, l'influenza dell'effetto spill-over è irrilevante e può essere trascurata.

La decisione di testare il metodo *starSLIM* su un elevato numero di compartimenti è derivato anche dalla necessità di verificare il software in casi biologicamente e fisicamente verosimili, che includessero la capacità del metodo di diversificare il segnale RM proveniente da compartimenti spazialmente vicini, spazialmente lontani, di densità spettroscopica simile oppure con frequenze risonanti molto diverse.

L'affidabilità di una tecnica di MRSI come strumento di indagine diagnostica dipende principalmente da due fattori:

- i) precisa localizzazione spaziale,
- ii) coerenza quantitativa degli spettri ricostruiti.

Per quanto riguarda quest'ultimo fattore, possono sorgere ostacoli perché le disomogeneità spaziali dei campi magnetici B<sub>0</sub> e RF riescono ad influenzare il significato spettroscopico del set di dati grezzi.

In conclusione, il modello *starSLIM* presentato in questo lavoro consente di ottenere nuove soluzioni 3D ai problemi lineari inversi caratteristici della Spettroscopia di Risonanza Magnetica. L'introduzione di queste nuove ed importanti informazioni *a priori* hanno, di fatto, portato a verificare gli obiettivi prefissati:

- i) riproduzione puntuale delle intensità reali dei picchi dei metaboliti,
- ii) riduzione dell'influenza del rumore sulla stabilità degli spettri ricostruiti (riduzione dell'intrinseco mal-condizionamento del problema inverso).

Gli sviluppi che sono attesi dal progresso del metodo starSLIM riguardano una modifica alla struttura progettuale del software con l'introduzione dell'utilizzo di metodi di ricostruzione iterativi per l'elaborazione delle immagini ed un'ottimizzazione dei modelli 3D da applicare al set di dati nelle ricostruzioni MRSI.

# Bibliografia

- [1] Woodcock J and Woosley R: *The FDA Critical Path Initiative and Its Influence on New Drug Development*. <http://c-path.org/pdf/FDAcriticalpathinitiativeinfluenceonnewdrugdevelopmentWoodcockWoosley.pdf>
- [2] Bashir A, Yablonskiy DA: *Natural linewidth chemical shift imaging (NL-CSI)*. *Magn Reson Med*, 56: 7-18, 2006
- [3] Devos A, Simonetti AW, Van der Graaf M, Lukas L, Suykens JAK, Vanhamme L, Buydens LMC, Heerschap A, Van Huffel S: *The use of multivariate MR imaging intensities versus metabolic data from MR spectroscopic imaging for brain tumour classification*. *Journal of Magnetic Resonance*, 173: 218-228, 2005
- [4] Barker PB, Bizzi A, De Stefano N, Gullapalli RP, Lin DDT: *Clinical MR Spectroscopy. Techniques and applications*. Cambridge University Press, UK, 2010
- [5] Hu X, Levin DN, Lauterbur PC, Spraggins T: *SLIM: spectral localization by imaging*. *Magn. Reson. Med.*, 8: 314-322, 1988
- [6] Hu X, Wu Z: *SLIM Revisited*. *IEEE Transactions on medical imaging*, 12(3): 583-587, 1993
- [7] Liang ZP, Lauterbur PC: *A generalized series approach to MR spectroscopic imaging*. *IEEE Transactions on medical imaging*, 10(2): 132-137, 1991
- [8] Khalidov I, Van De Ville D, Jacob M, Lazeyras F, Unser M: *BSLIM: Spectral Localization by Imaging with explicit B0 field inhomogeneity compensation*. *IEEE Transactions on medical imaging*, 26(7): 990-1000, 2007
- [9] Bertero M, Boccacci P: *Introduction to inverse problems in Imaging*. IOP, 1998
- [10] Liang ZP, Lauterbur PC: *Principles of Magnetic Resonance Imaging. A signal Processing Perspective*. IEEE Press Series in Biomedical Engineering, New York, 2000
- [11] Liang ZP, Lauterbur PC: *Constrained imaging: overcoming the limitations of the Fourier series*. *IEEE EMB Magazine*, 15: 126-132, 1996

- [12] Passeri A, Mazzuca S, Del Bene V: *Radiofrequency field inhomogeneity compensation in high spatial resolution magnetic resonance spectroscopic imaging*. *Physics in Medicine and Biology*, 59(12): 2913-2934, 2014
- [13] Cormack AM: *Representation of a function by its line integral, with some radiological application*, *Journ. of Appl. Phys.*, Vol. 35, 2908-2913, 1964.
- [14] Hounsfield GN: *A method and apparatus for examination of body by radiation such as X or gamma radiation*, The Patent Office, London, 1972, patent 1283915.
- [15] Hounsfield GN: *Computerized transverse axial scanning (Tomography)*. I: Description of system, *Br. Journ. Radiol.*, Vol. 46, 1016-1022, 1973.
- [16] Radon J: *Über die bestimmung von funktionen durchihre integralwerte langs gewisser mannigfaltigkeiten*, *Bertichte Saechsiche Akad. Wissenschaften (Leipzig), Math. Phys. Klass*, Vol. 69, 262-277, 1917.
- [17] Warburg O: *The metabolism of Tumors*, Arnold and Constable, London, 1930.
- [18] Tempny CMC, McNeil BJ: *Advances in Biomedical Imaging*, *JAMA*, 2001, 285, 562-567
- [19] Hoffman JM, Gambhir SS: *Molecular Imaging: the vision and opportunity for radiology in the future*, *Radiology*, 2007, 244, 39-47
- [20] Biswal S, Resnick DL, Hoffman JM, Gambhir SS: *Molecular Imaging: integration of molecular imaging into the musculoskeletal imaging practice*, *Radiology*, 2007, 244, 651-671
- [21] Hasegawa BH: *The Physics of Medical X-Rays Imaging*, Medical Physics Publishing Company, (1991), pagg. 1-7.
- [22] Weissleder R: *Molecular imaging in cancer*. *Science* 2006;312: 1168-71.
- [23] Massoud TF and Gambhir SS: *Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light*. *Genes Dev* 2003;17: 545-80.
- [24] Walrand S, Jamar F, de Jong M and Pauwels S: *Evaluation of novel whole- body high-resolution rodent SPECT (Linoview) based on direct acquisition of linogram projections*. *J Nucl Med* 2005;46: 1872-80.

- [25] Beekman F J, van der Have F, Vastenhouw B, van der Linden A J, van Rijk P P, Burbach JP and Smidt MP: *U-SPECT-I: a novel system for submillimeter-resolution tomography with radiolabeled molecules in mice*. J Nucl Med 2005;46: 1194-200.
- [26] Montet X, Ntziachristos V, Grimm J and Weissleder R: *Tomographic fluorescence mapping of tumor targets*. Cancer Res 2005;65: 6330-6.
- [27] Wells PN: *Ultrasound imaging*. Phys Med Biol 2006;51: R83-98.
- [28] Liang HD and Blomley MJ: *The role of ultrasound in molecular imaging*. Br J Radiol 2003;76 Spec No 2: S140-50.
- [29] Atri M: *New technologies and directed agents for applications of cancer imaging*. J Clin Oncol 2006;24: 3299-308.
- [30] Dzik-Jurasz AS: *Molecular imaging in vivo: an introduction*. Br J Radiol 2003;76 Spec No 2: S98-109.
- [31] Cherry SR: *Multimodality in vivo imaging systems: twice the power or double the trouble?* Annu Rev Biomed Eng 2006;8: 35-62.
- [32] Persigehl T, Heindel W and Bremer C: *MR and optical approaches to molecular imaging*. Abdom Imaging 2005;30: 342-54.
- [33] Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Hogemann D, Tait J, Weissleder R and Josephson L: *Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI*. Mol Imaging 2002;1: 102-7.
- [34] Reynolds PR, Larkman DJ, Haskard DO, Hajnal JV, Kennea NL, George AJ and Edwards AD: *Detection of vascular expression of E-selectin in vivo with MR imaging*. Radiology 2006;241: 469-76.
- [35] Korpanty G, Grayburn PA, Shohet RV and Brekken RA: *Targeting vascular endothelium with avidin microbubbles*. Ultrasound Med Biol 2005;31: 1279-83.
- [36] Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, Klibanov AL, Kaul S, Shaffrey ME, Sklenar J and Lindner JR: *Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3*. Circulation 2003;108:336-41.
- [37] Moshitch-Moshkovitz S, Tsarfaty G, Kaufman DW, Stein GY, Shichrur K, Solomon E, Sigler RH, Resau JH, Vande Woude GY and Tsarfaty I: *In vivo direct molecular imaging of early tumorigenesis and malignant progression induced by transgenic expression of GFP-Met*. Neoplasia 2006;8: 353-63.

- [38] Mahmood U and Weissleder R: *Near-infrared optical imaging of proteases in cancer*. Mol Cancer Ther 2003;2: 489-96.
- [39] Kelloff GJ, Hoffman JM, Johnson B, Scher HI, Siegel BA, Cheng EY, Cheson BD, Shaughnessy JO, Guyton KZ, Mankoff DA, Shankar L, Larson SM, Sigman CC, Schilsky RL and Sullivan DC: *Progress and Promise of FDG-PET Imaging for Cancer Patient Management and Oncologic Drug Development*. Clin Cancer Res 2005, 11:2785-2808.
- [40] Wells P, Aboagye E, Gunn RN, Osman S, Boddy AV, Taylor GA, Rafi I, Hughes AN, Calvert AH, Price PM and Newell DR: *2-[11C]thymidine positron emission tomography as an indicator of thymidylate synthase inhibition in patients treated with AG337*. J Natl Cancer Inst 2003;95: 675-82.
- [41] Cammisa M, Scarabino T, Popolizio T et Al: *Progressi in RM. Spettroscopia protonica cerebrale*. Gnocchi Editore, Napoli, pg 29-43,1999
- [42] Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D: *Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of guai and neuronal cells*. Dev Neurosci 15:289-298, 1993.
- [43] De Stefano N, Caramanos Z, Preul et Al: *In vivo differentiation of astrocytic brain tumours and isolated demyelinating lesions of the type seen in multiple sclerosis using 1H magnetic resonance spectroscopic imaging*. Ann Neurol 44:273-278,1998
- [44] Go KG, Kamman RL, Mooyaart EL et Al: *Localised proton spectroscopy and spectroscopic imaging in cerebral gliomas, with comparison to positron emission tomography*. Neuroradiology 37:198-206,1995
- [45] Herminghaus N Möller-Hartmann W, Wittsack J et Al: *Grading of astrocytomas using spectral pattern recognition analysis of in vivo spectroscopic data*. Riv Neuroradiol 11:81-83,1998
- [46] Kim SH, Chang KH, Song IC et Al: *Brain abscess and brain tumour: discrimination with in vivo H-1 MR spectroscopy*. Radiology 204:239-245,1997
- [47] Kinoshita Y, Yokota A.: *Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy*. NMR Biomed 10: 2-12, 1997.
- [48] Kuesel AC, Sutherland GR, Hailiday W et Al : *1H-MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue*. NMR Biomed 7:149-155, 1994
- [49] Moller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T et Al: *Clinical application of proton*



*magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. Neuroradiology, 44:371-381, 2002*

[50] Rabinof J, Lani Lee P, Barker F: *In vivo 3T MR spectroscopy in the distinction of recurrent glioma versus radiation effects: initial experience. Radiology 225( vol3 ) : 871-879, dic 2002*

[51] Sallinen PK, Sallinen SL, Helen PT et Al: *Grading diffusely infiltrating astrocytomas by quantitative histopathology, cell proliferation and image cytometric DNA analysis. Comparison of 133 tumours in the context of the WHO 1979 and WHO 1993 grading schemes. Neuropathol Appl Neurobiol 26:319—331,2000*

[52] Schlemmer HP, Bachert P, Henze M et Al: *Differentiation of radiation necrosis from tumor progression using proton magnetic resonance spectroscopy. Neuroradiology 44 : 216-222,2002*

[53] Tamiya T, Kinoshita K, Ono Y et Al: *Proton magnetic resonance spectroscopy reflects cellular proliferative activity in astrocytomas. Neuroradiology 42:333-338,2000*

[54] Tedeschi G, Lundbom N, Raman R et Al: *Increased choline signal coinciding with malignant degeneration of cerebral gliomas: a serial proton magnetic resonance spectroscopy imaging study. J Neurosurg 87:516—524,1997*

[55] van Gelder NM, Sherwin AL: *Metabolic parameters of epilepsy: adjuncts to established antiepileptic drug therapy. Neurochem Res. 2003 Feb;28(2):353-65. Review.*

[56] Clarke CE, Lowry M: *Basal ganglia metabolite concentrations in idiopathic Parkinson's disease and multiple system atrophy measured by proton magnetic resonance spectroscopy. Eur J Neurol. 2000 Nov;7(6):661-5.*

[57] Yamasue H, Fukui T, Fukuda R, Kasai K, Iwanami A, Kato N, Kato T: *Drug-induced parkinsonism in relation to choline-containing compounds measured by 1H-MR spectroscopy in putamen of chronically medicated patients with schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol. 2003 Dec;6(4):353-60.*

[58] Jones RS, Waldman AD: *1H-MRS evaluation of metabolism in Alzheimer's disease and vascular dementia. Neurol Res. 2004 Jul;26(5):488-95. Review.*

[59] Block W, Bayer TA, Tepest R, Traber F, Rietschel M, Muller DJ, Schulze TG, Honer WG, Maier W, Schild HH, Falkai P: *Decreased frontal lobe ratio of N-acetyl aspartate to*

*choline in familial schizophrenia: a proton magnetic resonance spectroscopy study.* Neurosci Lett.

[60] Akaike H: *Information theory as an extension of the maximum likelihood principle.* In: *Second International Symposium on Information Theory*, pp 267-281, Edizione Petrov BN and Csaki F, Budapest, 1973

[61] Ambrose J, Hounsfield G: *Computerized transverse axial tomography.* Br J Radiol. 1973 Feb;46(542):148-9

[62] Aster RC, Borchers B, Thurber CH: *Parameter Estimation and Inverse Problems.* Elsevier Academic Press, USA, 2005

[63] Bandettini PA, Jesmanowicz A, Wong EC, Hyde JS: *Processing Strategies for Time-Course Data Sets in Functional MRI of the Human Brain.* Magn Reson Med. 1993; 30:161-173

[64] Bao Y, Maudsley A: *Improved reconstruction for MR spectroscopic imaging.* IEEE Trans Med Imaging, 26(5): 686-695, 2007

[65] Barron A, Rissanen J, Yu B: *The minimum description length principle in coding and modeling.* IEEE Transactions on information theory, 44(6): 2743-2760, 1998

[66] Beheshti S: *A new approach to order selection and parametric spectrum estimation.* IEEE: 520-523, 2006

[67] Beylkin G, Monzon L: *On approximation of functions by exponential sums.* Applied and Computational Harmonic Analysis, 19: 17-48, 2005

[68] Bloch F: *Nuclear induction.* Phys Rev. 1946; 70: 460-474

[69] Boley DL, Luk FT, Vandevoorde D: *A fast method to diagonalize a Hankel matrix.* Linear Algebra and its Applications, 284:41-52, 1998

[70] Bracewell RN: *The Fourier Transform and Its Applications.* McGraw-Hill, 1986

[71] Bracewell RN: *Fourier Analysis and Imaging.* Plenum, 2004

[72] Bronzino J: *The Biomedical Engineering Handbook.* 1995. IEEE press

[73] Brown TR, Kincaid BM, Ugurbil K: *NMR chemical shift imaging in three dimensions (in vivo biochemistry/<sup>31</sup>P imaging/metabolite mapping).* Biophysics, 79: 3523-3526, 1982

- [74] Chapman B, Turner R, Ordidge RJ, Doyle M, Cawley M, Coxon R, Glover P, Mansfield P: *Read-Time Movie Imaging from a Single Cardiac Cycle by NMR*. Magn Reson Med. 1987; 5:246-254
- [75] Clayton DB, Elliott MA, Lenkinski RE: *In vivo proton spectroscopy without solvent suppression*. Concepts in Magnetic Resonance, 13(4): 260-275, 2001
- [76] Clifford GD: *Singular value decomposition & independent component analysis for blind source separation*. Biomedical signal and image processing, 1-13, 2005
- [77] Damadian R: *Tumor detection by nuclear magnetic resonance*. Science. 1971 Mar 19; 171(976):1151-3
- [78] Fazio F, Valli G: *Tecnologie e metodologie per le immagini funzionali*. 1999. Patron editore
- [79] Fayed N, Olmos S, Morales H, Modrego JP: *Physical basis of magnetic resonance spectroscopy and its application to central nervous system diseases*. American Journal of Applied Sciences, 3(5):1836-1845, 2006
- [80] Foster MA: *Magnetic Resonance in Medicine and Biology*. 1984. Pergamon Press, New York
- [81] Golub GH, Van Loan CF: *Matrix Computations*. MD: The Johns Opkins University Press, 1983
- [82] Govindaraju V, Young K, Maudsley AA: *Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites*. NMR Biomed, 13(3): 129-153, 2000
- [83] Haacke EM, Liang ZP, Izen SH: *Constrained reconstruction: A superresolution, optimal signal-to-noise alternative to the Fourier transform in magnetic resonance imaging*. Med Phys, 16: 388, 1989
- [84] Hua Y, Sarkar TK: *On SVD for estimating generalized eigenvalues of singular matrix pencil in noise*. IEEE Transactions on signal processing, 39(4): 892-900, 1991
- [85] Kmiecik JA, Gregory CD, Liang ZP, Lauterbur PC, Dawson J: *Lactate quantitation in a gerbil brain stroke model by GSLIM of multiple-quantum-filtered signals*. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 9: 539-543, 1999
- [86] Kumar A, Welte D, Ernst RR: *NMR Fourier zeugmatography*. J Magn Reson. 1975; 18:69-83

- [87] Landi G, Loli Piccolomini E: *Fast methods for MR spectroscopic imaging*. Applied Mathematics and Computation, 380-396, 2007
- [88] Laudadio T: *Subspace-based quantification on magnetic resonance spectroscopy data using biochemical prior knowledge*, PhD thesis, Università di Lovanio (Belgio), 2005
- [89] Lauterbur PC: *All sciences is interdisciplinary-from magnetic moments to molecules to men* (Nobel lecture). Angew. Chem. Int. Ed., 44:1004-1011, 2005
- [90] Lauterbur PC: *Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance*. Nature. 1973; 242:190-191
- [91] Liang ZP: *Generalized series dynamic imaging*. IEEE:145-151, 2001
- [92] Lin YY, Hodgkinson P, Ernst M, Pines A: *A novel detection-estimation scheme for noisy NMR signals: applications to delayed acquisition data*. Journal of Magnetic Resonance, 128: 30-41, 1997
- [93] Mansfield, P: *Multi-planar image formation using NMR spin echoes*. J Phys C. 10:L55-L58. 1977
- [94] Mckeown MJ, Hansen LK, Sejnowski TJ: *Independent component analysis of functional MRI: what is signal and what is noise?* Current Opinion in Neurobiology, 13: 620-629, 2003
- [95] Mitchell DG, Cohen MS: *Chemical shift*. In: *MRI Principles*. II Edition, 5:49-56, 2004
- [96] Nagayama K, Wuthrich K, Bachmann P, Ernst RR: *Two-dimensional J-resolved <sup>1</sup>H n.m.r. spectroscopy for studies of biological macromolecules*. Biochem Biophys Res Commun. 1977 Sep 9; 78(1):99-105
- [97] Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P: *Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields*. Magn Reson Med. 1990 Apr;14(1):68-78
- [98] Patel MAS, Hu X: *A robust algorithm for reduction of truncation artefact in chemical shift images*. IEEE Transactions on Medical Imaging, 12(4): 812-818, 1993
- [99] Pulkkinen J, Hakkinen AM, Lundbom N, Paetau A, Kauppinen RA, Hiltunen Y: *Independent component analysis to proton spectroscopic imaging data of human brain tumours*. European Journal of Radiology, 56: 160-164, 2005

- [100] Purcell EM, Torrey HC, Pound RV: *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*. Phys Rev. 1946; 69:37-38
- [101] Rissanen J: *Model selection and testing by MDL principle*. In: *Information Theory and Statistical Learning*, Emmert-Streib F and Dehmer M, Springer US, chapter 2, 2009
- [102] Ross B, Bluml S: *Magnetic resonance spectroscopy of the human brain*. Anat Rec (New Anat), 265: 54-84, 2001
- [103] Santarelli MF, Landini L: *Immagini biomediche*. 2003. Servizio Editoriale Universitario di Pisa
- [104] Schuermans M, Lemmerling P, Lathauwer LD, Van Huffel S: *The use of total least squares data fitting in the shape-from-moments problem*. Signal Processing, 86: 1109-1115, 2006
- [105] Soares DP, Law M: *Magnetic resonance spectroscopy of the brain: review of metabolites and clinical applications*. Clinical Radiology, 64: 12-21, 2009
- [106] Tarantola A: *Inverse Problem Theory and Methods for Model Parameter Estimation*. SIAM, Philadelphia, 2005
- [107] Van der Veen JW, Weinberger DR, Tedeschi G, Frank JA, Duyn JH: *Proton MR Spectroscopic Imaging without Water Suppression*. Radiology, 217: 296–300, 2000
- [108] Van Huffel S: *Mathematics in biomedical signal processing*. McWhirter JG and Proudler IK, eds. Oxford University Press, 1-11, 2001
- [109] Vanhamme L, Van den Boogart A, Van Huffel S: *Improved Method for Accurate and Efficient Quantification of MRS Data With Use of Prior Knowledge*. J. Magn. Reson., 129: 35–43, 1997
- [110] Vanhamme L, Sundin T, Van Hecke P, Van Huffel S: *MR spectroscopy quantitation: a review of time-domain methods*. NMR in Biomedicine, 14(4): 233-246, 2001
- [111] Wear KA, Myers KJ, Rajan SS, Grossman LW: *Constrained reconstruction applied to 2-D chemical shift imaging*. IEEE Transactions on Medical Imaging, 16(5): 591-597, 1997
- [112] Weast RC: *Handbook of Chemistry and Physics*. 1972. Chemical Rubber Company, Cleveland

[113] Weng A, Beer M, Geier O, Hahn D, Kostler H: *Contamination reduction in the reconstruction of SLIM (CORRECT-SLIM) and its application to quantitative cardiac 31P-CSI*. Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med., 15: 3176, 2007

[114] Zandt HJA, Van der Graaf M, Heerschap A: *Common processing of in vivo MR spectra*. NMR Biomed, 14: 224–232, 2001

# Ringraziamenti

Giunto alla fine di questa “fatica”, desidero ricordare e ringraziare sinceramente il Prof. Alessandro Passeri, davvero straordinario ed encomiabile supporto in questo lungo percorso di crescita e formazione, per avermi guidato nella mia ricerca ma soprattutto nell’avermi sempre compreso, nell’avermi fatto sentire “di casa” e soprattutto nell’avermi insegnato cosa significhi “ricercare”.

Questo lavoro porta con sé molti *grazie* per gli insegnamenti e i valori che ognuno mi lascia dentro: al Prof. Alberto Pupi per la fiducia e l’enorme pazienza che mi ha concesso sul piano professionale e di crescita personale; e poi ad Anna, Cristina, Francesca, Ilaria, Silvia, Giannetto, Valentina, Luca, Andrea: a loro va la mia gratitudine e riconoscenza e i miei ricordi più dolci e sinceri di questi anni di lavoro.

Ma soprattutto questo percorso si compone di un passaggio fondamentale della mia vita: esser diventato padre mi ha fatto riscoprire i valori della famiglia. Ed è anche per questo che i miei più profondi e sentiti ringraziamenti vanno a loro: grazie di cuore mamma, grazie davvero papà, e grazie a Lù&Ale, in particolare per quel regalo che fra poco mi verrà impacchettato. Grazie di esservi presi cura di me quando io non ero in grado di farlo.

Infine gli amici di sempre: Matte, Giulia, Manu, Ire, France, Miche, Ade, Ari, Nico, Ema, Tommy, Bianca, Alex, Vale, Enri, Raffo, Andre. Voi sapete il motivo: #grazieunmucchio davvero per avermi regalato sorrisi e risate nei momenti più difficili.

*Stefano*

“ I grandi non capiscono mai niente da soli  
e i bambini si stancano a spiegargli tutto ogni volta.”

*(Il Piccolo Principe, Antoine de Saint-Exupéry)*