

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Scuola di Scienze
Corso di Laurea Magistrale in Fisica

Applicazione di tecniche di analisi
statistica e *texture analysis* all'*imaging* di
risonanza magnetica di pazienti affetti da
glioblastoma multiforme

Relatore:
Prof. Gastone Castellani

Presentata da:
Diana Elisa Chiari

Correlatori:
Dott. Mauro Iori
Dott. Roberto Sghedoni

Sessione II
Anno Accademico 2013/2014

Sommario

Il seguente lavoro di tesi si è concentrato sull'analisi statistica dei dati prodotti dall'imaging di risonanza magnetica di pazienti affetti da tumori di alto grado, in particolare glioblastoma multiforme. Le tipologie di acquisizione d'immagine utilizzate sono state l'imaging pesato in T1 e il *Diffusion-Weighted Imaging* (DWI). Lo studio è stato suddiviso in due fasi: nella prima è stato considerato un campione di pazienti affetti da glioblastoma multiforme che, dopo il trattamento, avessero manifestato una ricaduta della malattia; per questi pazienti è stato quantificato in che modo la dose erogata durante la terapia si sia distribuita sul target del trattamento, in particolare nella porzione di tessuto in cui andrà a svilupparsi la recidiva.

Nella seconda fase, è stato selezionato un campione più ristretto che disponesse, per entrambe le modalità di imaging, di un'acquisizione pre-terapia e di un numero sufficiente di esami di *follow up*; questo al fine di seguire retrospettivamente l'evoluzione della patologia e analizzare tramite metodi statistici provenienti anche dalla *texture analysis*, i dati estratti dalle regioni tumorali. Entrambe le operazioni sono state svolte tramite la realizzazione di software dedicati, scritti in linguaggio Matlab.

Nel primo capitolo vengono fornite le informazioni di base relative ai tumori cerebrali, con un'attenzione particolare al glioblastoma multiforme e alle sue modalità di trattamento.

Nel secondo capitolo viene fatta una panoramica della fisica dell'imaging di risonanza magnetica e delle tecniche di formazione delle immagini, con un'ampia sezione è dedicata all'approfondimento dell'imaging in diffusione.

Nel terzo capitolo viene descritto il progetto, i campioni e gli strumenti statistici e di *texture analysis* utilizzati in questo studio.

Il quarto capitolo è dedicato alla descrizione puntuale dei software realizzati durante questo lavoro e nel quinto vengono mostrati i risultati ottenuti dall'applicazione di questi ultimi ai campioni di pazienti esaminati.

Indice

Introduzione	7
1 I tumori cerebrali	13
1.1 Classificazione e tecniche di Grading	13
1.2 Glioblastoma multiforme	17
1.3 Metodi di analisi e trattamento convenzionale del glioblastoma	18
1.4 La comparsa della recidiva	21
2 Imaging a risonanza magnetica	23
2.1 Fisica dell'Imaging a Risonanza Magnetica	24
2.1.1 I tempi di rilassamento	27
2.2 La Formazione delle Immagini	30
2.2.1 Condizioni per la formazione di un'immagine di risonanza magnetica	30
2.2.2 <i>Image Processing</i>	34
2.3 Metodi di imaging MR non anatomici: <i>Diffusion-Weighted MRI</i>	37
2.3.1 Sequenze di acquisizione per l'imaging in diffusione	38
2.3.2 Modelli di diffusione	40
2.3.3 Metodi di analisi delle immagini DW	41
2.3.4 La diffusione anisotropa	42
3 Il progetto	43
3.1 Panoramica del progetto	44
3.2 La selezione del campione	45
3.3 La selezione delle ROI	46
3.4 I parametri statistici e la <i>Texture Analysis</i>	47
3.5 La correlazione statistica	50
4 Materiali e Metodi	53
4.1 I campioni	53
4.2 Fasi del progetto	53
4.2.1 Studio delle distribuzioni di dose: il software DAS	53
4.2.2 Analisi del <i>Follow Up</i> : il software ROISAT	58

4.3	Gli altri strumenti	63
4.3.1	La registrazione delle immagini	64
5	Applicazione dei software e risultati	67
5.1	Analisi della distribuzione di dose	67
5.2	Analisi delle sequenze di <i>follow up</i>	68
5.3	Analisi dettagliata dei casi studiati con imaging DW	70
5.3.1	Pazienti recidivanti su tempi brevi	70
5.3.2	Pazienti non recidivanti su tempi lunghi	82
5.3.3	Pazienti recidivanti su tempi lunghi	93
5.4	Sintesi dei risultati ottenuti dall'imaging DW	108
5.5	Analisi dei risultati ottenuti dalle immagini T1	109
5.6	Confronto dei risultati ottenuti dalle modalità di imaging T1 e DW	114
	Conclusioni	121
	Bibliografia	126

Introduzione

Il Glioblastoma Multiforme e, in generale, i tumori di alto grado della serie gliale (*High Grade Gliomas*) sono tra le neoplasie cerebrali più gravi e comuni che colpiscono i soggetti adulti. Sono classificate con i gradi III e IV secondo la classificazione WHO (*World Health Organization*) e sono patologie maligne, infiltranti, ad accrescimento espansivo e rapido, che danno prospettive di sopravvivenza tra i 2-3 anni, nel caso degli astrocitomi anaplastici e i 6-15 mesi⁸, per quanto riguarda i glioblastomi.

L'attuale pratica clinica si affida all'iter terapeutico standard che coinvolge la resezione chirurgica del volume solido del tumore ed il trattamento radioterapico abbinato alla chemioterapia con temozolomide, noto come protocollo Stupp²³.

Nonostante l'attacco combinato riservato a questa patologia, la prognosi rimane infausta. La natura infiltrativa di questo tipo di tumore, in particolare nel caso del GBM, rende difficile e il più delle volte impossibile individuare le diramazioni della malattia all'interno dei tessuti circostanti la parte di tumore solido, visibile attraverso l'imaging di risonanza magnetica, la modalità di imaging che permette di studiare più efficacemente i tessuti cerebrali. Nella maggioranza dei casi la terapia non si rivela in grado di controllare completamente il tumore, che, dopo un intervallo di tempo variabile da paziente a paziente, recidiva ed il più delle volte questo si manifesta entro i 2-3 cm dalla posizione originaria⁷.

Questa palese inefficacia dei metodi terapeutici tradizionali è stata studiata anche nel corso di questo lavoro, selezionando un campione di pazienti trattati presso l'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia e verificando il dato indicato dalla letteratura scientifica tramite la realizzazione di un software dedicato (denominato *Dose Analyzer Software* o DAS) che si occupasse dell'estrazione e dell'analisi dei dati dosimetrici.

I risultati ottenuti confermano come sia mandatorio promuovere nuove tipologie di trattamento, come quella indicata nel progetto di ricerca proposto dall'Arcispedale Santa Maria Nuova ed approvato dal Ministero della Sanità, dedicato alla valutazione di un programma di terapia combinata di pazienti con tumore cerebrale in fase avanzata, che includa l'utilizzo di un innovativo acceleratore lineare ad alto rateo di dose (*flattering filter free*). Lo studio si propone di verificare se la somministrazione di alte dosi/frazione

(piano di trattamento ipofrazionato), tramite il metodo del *dose painting*⁶ (intesa come redistribuzione *ad hoc* della dose), sulle aree tumorali maggiormente radioresistenti, possa migliorare l'efficacia del trattamento radiante, risparmiando i tessuti sani.

L'obiettivo primario proposto dal progetto dell'ASMN, all'interno del quale si inserisce il suddetto lavoro di tesi, è la valutazione della risposta al trattamento valutata sia morfologicamente che quantitativamente.

L'idea che ha guidato il lavoro è stata quella di realizzare specifici software per monitorare, a posteriori, l'evoluzione della risposta per un campione di pazienti affetti da tumore cerebrale di alto grado utilizzando in particolare due tipologie di imaging a risonanza magnetica, le acquisizioni pesate in T1 (tempo di rilassamento longitudinale) e in diffusione (DW).

L'imaging a risonanza magnetica è una tecnica di acquisizione d'immagine che sfrutta le proprietà dei protoni mobili che costituiscono i tessuti, qualora questi siano sottoposti ad un campo magnetico.

E' una metodica molto potente che consente di studiare in maniera non invasiva la struttura dei tessuti dal livello biochimico e cellulare fino a quello dell'organismo macroscopico ed è perciò utilizzata come metodo diagnostico per moltissime patologie, tra cui quelle tumorali.

La scelta di concentrarsi su immagini DW e pesate in T1 è legata a motivi sia pratici che teorici: in primis sono state selezionate le tipologie di imaging maggiormente utilizzate nella normale pratica clinica e che, quindi, sono di più semplice reperibilità; in secondo luogo perché, soprattutto per quanto riguarda l'imaging in diffusione, si stanno sviluppando nuovi metodi di analisi statistica che potrebbero consentire l'ottenimento di nuove informazioni, più quantitative, utilizzando proprio le metodiche già a disposizione nella normale pratica clinica.

L'imaging pesato in diffusione è molto interessante in ambito oncologico, perché permette di evidenziare le caratteristiche di densità cellulare dei tessuti: infatti, poiché il tumore è caratterizzato da una cellularità superiore a quella del tessuto sano per via della riproduzione incontrollata delle cellule neoplastiche, ad esso corrisponde una ridotta possibilità di diffusione dei nuclei idrogeno del tessuto rispetto alla condizione non patologica.

Essendo in grado di rilevare un'informazione a livello cellulare, la ricerca sta cercando di dimostrare se questa tecnica sia in grado di rendersi conto più precocemente delle modificazioni del tessuto e rilevare le infiltrazioni tumorali in anticipo rispetto a quanto non sia possibile fare con il semplice imaging morfologico, dimostrando, pertanto, un reale potere predittivo rispetto all'evoluzione della malattia.

Per fare ciò, è stato selezionato un campione di pazienti trattati presso l'ASMN, che corrispondesse alle caratteristiche desiderate, ovvero fosse affetto da glioma di alto grado e disponesse di un numero sufficiente di acquisizioni per entrambe le modalità di imaging.

E' stata, quindi, analizzata l'evoluzione della patologia, estraendo i dati provenienti da due "strutture" (volumi), note con *Clinical Target Volume* (CTV) e *Gross Tumor Volume* (GTV)¹⁵¹⁹; esse sono delineate durante la definizione del piano di trattamento di radioterapia e rappresentano la regione del tumore, venendo definite tramite le conoscenze cliniche e le informazioni morfologiche ottenute dall'imaging. E' stato poi ricavato l'istogramma della distribuzione dei valori estratti dalle due aree sopra descritte, per entrambe le tipologie di imaging e si è osservato come la sua forma si modificasse nel corso del tempo.

Tali modificazioni sono state quantificate per mezzo di parametri statistici di base e provenienti dalla *texture analysis*, metodo d'indagine applicato alle immagini digitali per estrarne informazioni relative alla disposizione spaziale delle intensità dei livelli di grigio dei pixel che la costituiscono⁹.

L'analisi di tutto il campione, dalla fase di estrazione dei dati fino al confronto statistico dei risultati, è stata svolta tramite un secondo software, anch'esso realizzato appositamente in questo lavoro di tesi, denominato ROISAT.

Tale strumento verrà utilizzato all'interno del progetto di ricerca finanziato dal Ministero della Sanità e condotto dall'ASMN precedentemente esposto e nel quale questo lavoro di tesi si introduce.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato nella realizzazione della mia Tesi.

Il mio relatore, il Prof. Castellani, che supervisionato questo lavoro; il Servizio di Fisica Medica presso l'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia presso il quale ho svolto il mio tirocinio di tesi, soprattutto la Radioterapia Oncologica e la Diagnostica per Immagini.

Un ringraziamento particolare va ai miei correlatori, il Dr. Iori, direttore del Servizio di Fisica Medica dell'ASMN e il Dr. Sghedoni, responsabile del settore di Risonanza Magnetica, per il loro aiuto, supporto e disponibilità in tutti questi mesi di lavoro.

Capitolo 1

I tumori cerebrali

I tumori intracranici sono una categoria di neoplasie che colpiscono gli organi principali del cervello o, più genericamente, tutto ciò che è contenuto all'interno del cranio e/o coinvolge il Sistema Nervoso Centrale (SNC). Poiché la massa tumorale si sviluppa all'interno della scatola cranica, che è inespansibile, l'aumento di volume prodotto provoca una compressione, uno spostamento degli organi vicini e/o un rigonfiamento cerebrale. Quest'ultimo è dovuto alle lesioni della barriera ematoencefalica ed è responsabile della formazione dell'edema. In alcuni casi, in conseguenza dello sviluppo della massa tumorale, può verificarsi un blocco del liquor che scorre intorno al cervello provocando una dilatazione dei ventricoli cerebrali che può degenerare in idrocefalo, ovvero in un accumulo del liquido cefalo-rachidiano a livello dei ventricoli con conseguente aumento della pressione intracranica.

1.1 Classificazione e tecniche di Grading

Una prima distinzione delle neoplasie intracraniche è realizzata individuando i processi espansivi di tipo primario e quelli di tipo secondario. I tumori primari sono quelli che originano direttamente dal cervello e possono essere sia benigni che maligni. I benigni si contraddistinguono per avere contorni netti, crescita lenta e raramente diffondono, mentre gli altri, al contrario, hanno bordi irregolari, sviluppo rapido ed espansione infiltrante nei tessuti circostanti. I tumori secondari, invece, sono principalmente una conseguenza di metastasi provenienti da neoplasie sviluppatesi in altri organi esterni al cervello e dai quali le cellule oncogene migrano tramite il flusso sanguigno; i più frequenti sono, ad esempio, il carcinoma della mammella e il cancro del polmone.

Catalogati sotto la generica etichetta di “primarie”, o anche primitive, esistono molteplici tipologie di neoplasie e per classificarle sono stati ideati numerosi sistemi che si basano su diverse proprietà del tumore. La più comune, che fornisce la nomenclatura più generalmente accettata, è la

classificazione istologica che fa corrispondere ad ogni tipologia cellulare (citotipo) diverse possibili evoluzioni tumorali (oncotipi). In altre parole, vengono elencate tutte le possibili degenerazioni cancerogene che si possono originare da un determinato tessuto. Le classi individuate sono sei e la più vasta risulta essere quella dei tumori derivanti dal tessuto neuroepiteliale, mentre quelle non neuroepiteliali comprendono i tumori dei nervi periferici, delle meningi, dei linfomi, quelli alle cellule germinali e della regione sellare. La settima classe è quella delle neoplasie metastatiche che coincidono con quelle secondarie precedentemente esposte. Ogni oncotipo può avere un diverso stadio di maturazione al quale corrisponde un certo grado di malignità. La definizione di queste due caratteristiche avviene sulla base della *teoria della dedifferenziazione*, la quale afferma che, oltre alla manifestazione di una proliferazione incontrollata, la degenerazione tumorale di una cellula comporta una crescente perdita degli attributi specifici che la caratterizzano come appartenente ad un determinato tessuto. Questo processo è noto come *anaplasia*, durante il quale la cellula regredisce riacquisendo proprietà simili a quelle che aveva in alcuni stadi della sua maturazione embriologica. Il livello di anaplasia di una cellula tumorale è linearmente proporzionale al suo grado di malignità.

Un'altra classificazione molto utilizzata è quella **immunoistochimica e genetica**, soprattutto nei casi in cui la catalogazione istologica sia dubbia, permettendo una definizione più dettagliata dal punto di vista sia diagnostico che prognostico. Tramite analisi di biologia molecolare, si procede con l'individuazione di particolari mutazioni genetiche o marker molecolari che siano caratteristici di certi oncotipi e siano quindi discriminanti tra le varie tipologie di tumore. In particolare, nella classificazione vengono annoverati i geni ritenuti oncogeni o oncosoppressori, la cui mancata o favorita attivazione è responsabile della proliferazione incontrollata e del processo di dedifferenziazione.

Da un punto di vista più prettamente radiologico, è necessario un altro tipo di classificazione, ovvero quella **topografica**, poiché tiene conto della diversa incidenza delle neoplasie endocraniche in relazione alla regione in cui si sviluppano. Stabilirne correttamente la collocazione permette di ridurre il numero di tumori che rientrano nella diagnosi differenziale. Gli aspetti da definire sono se la neoplasia è intra- o extra-assiale, sopra- o sotto-tentoriale, se sia in sede intraventricolare reale o apparente, se si trova sulla linea mediana e se presenta aspetti di benignità o malignità.

Come l'incidenza delle diverse tipologie neoplastiche dipende dalla localizzazione topologica, così la comparsa di certi oncotipi può manifestarsi solo all'interno di particolari periodi della vita di un individuo (infanzia, età adulta o vecchiaia). Quindi nella determinazione della tipologia tumorale occorre tener conto anche della **classificazione in base all'età**.

Un'altra importante catalogazione è quella per stabilire il livello di mali-

Classe	Descrizione
/0	Neoplasie benigne
/1	Neoplasie incerte se benigne o maligne
/2	Neoplasie in situ
/3	Neoplasie maligne/infiltranti primitive
/6	Neoplasia maligna secondaria
/9	Neoplasia maligna incerta se primaria o secondaria

Tabella 1.1

gnità di un tumore ed è nota come *grading*. Nel caso delle neoplasie cerebrali è un'operazione molto più complessa di quanto non sia per altri distretti corporei, poiché la distinzione tra benigno e maligno è meno netta. Alcune delle caratteristiche istologiche che in genere vengono considerate sono il numero di mitosi per campo (indice mitotico), la cellularità, la velocità di crescita, la presenza di necrosi, la densità capillare, l'uniformità. In genere la malignità si riscontra per elevati valori di tutti i fattori istologici citati, fatta eccezione per l'uniformità che spesso risulta scarsa. In realtà, per le forme tumorali in esame, ad un'apparenza di benignità come una lenta velocità di espansione, un'elevata uniformità e un basso indice mitotico possono associarsi comportamenti maligni come l'infiltrazione di intere regioni cerebrali. Allo stesso modo, anche la collocazione topografica è rilevante, poiché un tumore benigno sviluppatosi in una regione non raggiungibile chirurgicamente può risultare fatale. Infine, occorre ricordare che alcuni fattori istologici prognostici di malignità possono avere valenze diverse a seconda dell'oncotipo. Nonostante le difficoltà descritte finora, è assolutamente fondamentale individuare dei parametri citoistologici che permettano di determinare lo stato di evoluzione del tumore (stadiazione) e il suo livello di anaplasia. A questo scopo sono stati sviluppati quattro metodi di classificazione: il primo e più generale è l'IDC-O (International Classification of Disease for Oncology) che distingue le forme tumorali primitive in quattro classi, con l'aggiunta di altre due categorie per le neoplasie secondarie. In Tabella 1.1 sono riportati riassuntivamente le caratteristiche distintive dei diversi gruppi:

Gli altri tre metodi di classificazione, invece, sono stati pensati specificamente per catalogare i tumori della glia, che sono circa il 40%²⁴ dell'incidenza totale delle neoplasie intracraniche. I criteri su cui si basano sono mostrati sinteticamente in Tabella 1.2; per il metodo St. Anne-Mayo le "caratteristiche istologiche" citate a cui si fa riferimento sono l'atipia nucleare (che comprende polimorfismo delle cellule, ipercromasia nucleare, alterazioni del rapporto nucleo/citoplasma, sviluppo dell'apparato nucleolare, mitosi asimmetriche e pluripolari), la mitosi, la proliferazione endoteliale e la necrosi.

Metodo Kernohan	Descrizione	Metodo St. Anne-Mayo	Descrizione	Metodo WHO	Descrizione
Grado 1	astrocitomi benigni	Grado 1	non presenta nessuna delle caratteristiche istologiche di riferimento	Grado I	lenta crescita, non maligni, lunga sopravvivenza; comparsa di recidiva solo per rimozione chirurgica incompleta
Grado 2	astrocitomi di basso grado	Grado 2	presenta una sola delle caratteristiche istologiche di riferimento (in genere atipia nucleare)	Grado II	crescita relativamente lenta, comportamento semi-benigno e sopravvivenza post-operatoria di circa 5 anni
Grado 3	astrocitomi anaplastici	Grado 3	presenta due delle caratteristiche istologiche di riferimento (in genere atipia nucleare e mitosi)	Grado III	maligni, accrescimento espansivo e infiltrante, spesso recidivano come tumori di grado più alto; sopravvivenza 2-3 anni
Grado 4	glioblastomi	Grado 4	presenta 3 o 4 delle caratteristiche istologiche di riferimento	Grado IV	crescita rapida, tumori maligni, elevata aggressività e accrescimento infiltrante; sopravvivenza 6-15 mesi

Tabella 1.2: Criteri di classificazione dei tumori della glia

È importante sottolineare che i tumori gliali, in particolare quelli della serie astrocitaria, possono presentare livelli di anaplasia molto differenti all'interno della massa neoplastica e occorre selezionare in maniera accurata il tessuto da utilizzare per definirne il grado di malignità, pena una sotto-stima della sua effettiva pericolosità (un sistema efficace, per individuare le regioni di tessuto da prelevare per ottenere una biopsia significativa, è la spettroscopia a risonanza magnetica multivoxel, MV-MRS⁴. Informazioni utili si possono ricavare anche dalle tecniche di risonanza magnetica, come la spettroscopia del protone e l'imaging di perfusione, che danno indicazioni relative alla concentrazione di metaboliti e il livello di neoangiogenesi, fattori strettamente correlati con il grading istologico e la prognosi del paziente.

1.2 Glioblastoma multiforme

Finora è stata fornita una panoramica generale delle modalità con cui può manifestarsi una neoplasia endocranica e di come poterne stabilire il livello di aggressività attraverso la determinazione di parametri istologici indicativi. Ai fini di questo studio, è però opportuno concentrarsi sulla descrizione di una singola forma di neoplasia cerebrale, il glioblastoma multiforme.

Si tratta di una neoplasia della glia che origina dalla sostanza bianca profonda, in genere frontale. Secondo la classificazione istologica, è un tumore di IV grado della serie astrocitaria, che appartiene alla categoria delle neoplasie neuroepiteliali; relativamente alla classificazione topografica fa parte dei tumori intrassiali sopratentoriali primitivi, ovvero che sono collocati all'interno dell'encefalo e sopra il tentorio del cervelletto. Per entrambe le classificazioni si tratta della patologia con il livello di malignità più elevato. È più frequente nell'adulto, in particolare nella fascia d'età compresa tra i 45 e i 69 anni³; secondo Eurocare, in Europa ha un'incidenza di circa 0.3 casi ogni 100.000 abitanti⁸ ed è stata evidenziata una lieve prevalenza nel sesso maschile (1,4:1⁸). È costituito da astrociti neoplastici scarsamente differenziati, affetti da proliferazione incontrollata. In genere, si presenta come una lesione intracerebrale circondata da un edema di estensione variabile, fattori entrambi responsabili dell'effetto massa, ma ha anche un comportamento rapidamente infiltrante e a carattere distruttivo. Può anche avere una distribuzione bi-emisferica se interessa le fibre del corpo calloso. Manifesta frequenti metastasi e noduli tumorali nell'emisfero controlaterale, ma in genere non si estende al di fuori del sistema nervoso centrale (SNC). Può avere due origini distinte: o come conseguenza dell'evoluzione maligna di un astrocitoma di basso grado verso forme sempre meno differenziate o comparire *de novo* (breve storia clinica e nessuna lesione precedente). Quest'ultimo è il caso più frequente. Dal punto di vista anatomopatologico, si presenta come una lesione disomogenea, irregolare, con grossolane e multiple componenti emorragiche e necrotiche, queste ultime circondate da cellule a

pseudo-palizzata. È caratterizzato dalla formazione di cellule giganti, da una spiccata neo-angiogenesi e dalla proliferazione dell'endotelio vasale. Gli aspetti istologici sono, invece, la marcata cellularità, un elevato indice mitotico e il pleiomorfismo nucleare e citoplasmatico. Benché le cause genetiche alla base dello sviluppo della patologia siano ancora ignote, l'analisi immunostochimica ha individuato alcuni candidati oncogeni e oncosoppressori che potrebbero essere coinvolti nel processo. Una caratteristica notata nel 60-95% dei casi¹ è la mancanza del cromosoma 10 nelle cellule tumorali. Sul suo braccio lungo è presente il gene PTEN che funge da oncosoppressore tramite la proteina fosfatasi PTEN da esso prodotta: essa è coinvolta nella regolamentazione del ciclo cellulare, prevenendo che la cellula cresca troppo o che si divida in maniera incontrollata. A questa perdita, spesso, si associa un aumento dell'attività del recettore per EGF (Epidermal Growth Factor), una proteina, comune nel corpo umano, che ha il compito importante di stimolare la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza delle cellule. Ovviamente, un aumento non regolato della sua attività comporta degli squilibri nella gestione di queste funzioni, che, unito all'inibizione del PNET trasforma l'EGF in una sorta di oncogeno²¹. Nel caso di insorgenza de novo del glioblastoma si manifesta anche un aumento della produzione del VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare) e del PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine), entrambi altamente coinvolti nel processo di angiogenesi, il cui sviluppo incontrollato è caratteristico del cancro. Il PDGF è un altro fattore di crescita, ma derivato dalle piastrine. Oltre ad essere un'altra delle numerose proteine che regolano la crescita cellulare e la divisione, ha anche lei un ruolo importante nell'angiogenesi, oltre ad avere la capacità di velocizzare il processo di riproduzione cellulare. Diversamente da quanto visto finora, nel caso di insorgenza del GBM come evoluzione a partire da un astrocitoma di basso grado si osservano alterazioni del recettore alpha del PDGF e delle proteine p53 e p16. Entrambe le proteine, in condizioni non patologiche, si comportano da oncosoppressori, ma la loro attività può venire fortemente inibita in caso di una mutazione o delezione del gene che li codifica.

1.3 Metodi di analisi e trattamento convenzionale del glioblastoma

Dopo questa riassuntiva descrizione della patologia in esame, è opportuno fare una breve panoramica dei metodi comunemente utilizzati in medicina per diagnosticare e trattare il glioblastoma.

Diagnosi

Per quanto riguarda le neoplasie cerebrali, la diagnostica per immagini è lo strumento principe ed esistono molteplici tecniche di acquisizione. Di seguito verrà riportata una selezione delle metodiche principali con un'attenzione particolare alle caratteristiche morfologiche, fisiche o chimiche che sono in grado di evidenziare. Per una spiegazione dettagliata delle singole tecniche di imaging e dei processi fisici su cui si basano, si rimanda, invece, al Capitolo 2.

Una delle tecniche maggiormente consolidate e utilizzate è la **tomografia computerizzata** (CT, Computed Tomography), che, prima dell'avvento delle tecniche di risonanza magnetica, ricopriva un ruolo dominante nella diagnostica dei tumori intracranici, insieme alla radiografia tradizionale e all'angiografia. Per quanto riguarda la CT, i vantaggi principali sono la rapidità dell'acquisizione, la non invasività, la facilità d'accesso allo strumento (un tomografo è disponibile nella maggior parte delle strutture ospedaliere) e la limitata entità di controindicazioni. Nonostante che, a confronto con le tecniche RM, sia caratterizzato da uno scarso contrasto tra i diversi tessuti cerebrali, è comunque sfruttata nelle immagini di screening di soggetti sintomatici con sospetta patologia espansiva, per il monitoraggio degli effetti secondari prodotti dalla lesione (come l'effetto massa e l'edema), per valutare la stadiazione e il follow up nella ricerca di metastasi e per il monitoraggio del decorso post-operatorio a breve termine²⁵. Con questa tecnica di acquisizione, il tumore appare come una lesione dalla morfologia irregolare, prevalentemente ipodensa, in maniera particolare in corrispondenza delle aree necrotiche, ma con aree solide iperintense, espressione del rapido accrescimento, risultando, quindi, fortemente disomogenea nel suo complesso. La CT è importante anche perché fornisce informazioni complementari a quelle della risonanza, ad esempio nel caso delle componenti tissutali calcifiche o adipose e delle strutture ossee.

Delle altre due tecniche citate, solo l'**angiografia** conserva ancora un ruolo significativo (per quanto limitato) nell'ambito della diagnosi e pianificazione della terapia per questo genere di patologie. Il suo utilizzo specifico è circoscritto al mostrare la componente vascolare del tumore, dando indicazioni per l'analisi differenziale, ma anche e soprattutto utili alla pianificazione del trattamento chirurgico. In rapido sviluppo troviamo l'utilizzo dell'angio-RM, benché, per il momento, tale modalità sia ancora lontana dalle capacità risolutive dell'angiografia digitale più comunemente utilizzata.

Chi, però, ricopre il ruolo dominante nella diagnostica per immagini dei tumori cerebrali è la **risonanza magnetica** (RM), declinata in molteplici tecniche di imaging, ognuna di queste basata su diversi parametri e caratteristiche fisiche del tessuto (si veda Capitolo 2). La multiparametricità di questa metodica è la proprietà che le ha consentito di aumentare enorme-

mente le potenzialità diagnostiche rispetto alle tecniche tradizionali, poiché consente di osservare la lesione con diversi contrasti di segnale (pesature) fornendo un grande quantità di informazioni. Inoltre, permette di dare una buona definizione dell'aggressività e invasività del tumore. Un'altra prerogativa importante è l'alta sensibilità e risoluzione di contrasto che consentono una definizione morfologica e stadiativa molto precisa, riducendo il numero di falsi negativi prodotti dalla CT. Infine, la multiplanarità dell'acquisizione permette una dettagliata ricostruzione 3D della lesione e della sua localizzazione, fondamentale per pianificare la fase chirurgica.

Alla luce delle potenzialità esposte, le tecniche di risonanza svolgono un ruolo predominante nella caratterizzazione dei tumori cerebrali, nella diagnosi differenziale e nell'impostazione terapeutica; inoltre, sono le più idonee per seguire il *follow up* post-chirurgico nel caso venga diagnosticata una recidiva.

Terapia

Le terapie applicate ai pazienti con glioblastoma, in genere, si dividono in due categorie:

- terapie di supporto;
- terapie curative.

Le **terapie di supporto** hanno la funzione di alleviare i sintomi e migliorare le condizioni neurologiche del paziente. In particolare, vengono utilizzati farmaci antiepilettici (prescritti solo in pazienti che hanno manifestato crisi epilettiche prima della diagnosi, l'uso profilattico non pare fornire benefici ed è sconsigliato) e corticosteroidi per ridurre l'edema peritumorale e, di conseguenza, l'effetto massa e la pressione endocranica.

Si parla, invece, di **terapie curative**, quando si agisce direttamente sul tumore allo scopo di eliminarlo o, almeno, di controllarlo il più possibile. Il primo approccio è chirurgico e ha lo scopo di rimuovere il più possibile la massa tumorale, cercando di preservare le strutture vitali del cervello e minimizzare i rischi di deficit neurologico post-operatori. La resezione chirurgica consente di ottenere una diagnosi istologica accurata, ridurre l'effetto massa prodotto dal tumore e/o dall'edema, ristabilire o mantenere il flusso del fluido cerebro-rachidiano e conseguire una potenziale guarigione attraverso la rimozione totale della neoplasia. In realtà, questo ultimo obiettivo non viene praticamente mai conseguito in questo genere di patologie, al massimo quello che si ottiene è un loro arginamento per renderle meglio trattabili da radioterapia e chemioterapia. La sola rimozione parziale non sembra dare alcun beneficio dal punto di vista delle aspettative di sopravvivenza. Talvolta può capitare che l'asportazione chirurgica non sia possibile, ad esempio per la collocazione del tumore, per la relazione con il flusso di sangue del

cervello e il grado d'invasione nei tessuti circostanti, per l'età del paziente e il suo stato di salute o per un'eventuale multifocalità della neoplasia.

Proprio a causa dell'impossibilità di una rimozione totale, ma allo stesso tempo dell'inutilità di una sola resezione parziale, dopo il trattamento chirurgico si procede con quello radioterapico. A volte è scelto anche come prima opzione terapeutica nel caso in cui l'asportazione fisica non sia praticabile. Normalmente viene indirizzata sulla parte dell'encefalo interessata dall'intervento, o, in generale, quella dove è collocata la parte solida del tumore, comprendendo anche un margine esterno di estensione variabile (solitamente di 1-2 cm) allo scopo di agire anche su eventuali infiltrazioni nel tessuto circostante, benché in maniera sommaria. Purtroppo non essendo visibili tramite le attuali modalità di imaging, il rischio è di colpire tessuto sano non infiltrato e tralasciarne parti che invece sarebbero contaminate dalla migrazione delle cellule tumorali. Lo scopo della radioterapia è quello di agire direttamente sul DNA di queste ultime danneggiandolo con una serie di applicazioni sufficientemente frequenti da non permettere alla cellula di riparare le lesioni, impedendole, di conseguenza, la riproduzione e inducendola all'apoptosi. A questo scopo, la dose prescritta totale standard è generalmente di 60 Gy erogata in 30 sedute da 2 Gy al giorno (ma esistono altre modalità di piani di trattamento, dove varia la dose totale fornita e la quantità di radiazione giornaliera a seconda del caso patologico). La scelta dei 60 Gy è dovuta al fatto che questa dose è stata valutata come il miglior compromesso tra un sufficiente controllo locale della malattia ed un rischio accettabile induzione di radionecrosi nel volume irraggiato. L'applicazione della radioterapia successivamente al trattamento chirurgico raddoppia il rate di sopravvivenza⁵.

Infine, l'ultima fase terapeutica è la chemioterapia: anch'essa ha lo scopo di danneggiare il DNA delle cellule neoplastiche eventualmente rimaste dopo i trattamenti precedenti per indurre l'apoptosi. È stato dimostrato, dallo studio di Stupp *et al.*²³, che il trattamento combinato di radioterapia e temozolomide (farmaco chemioterapico principalmente utilizzato) aumenta significativamente le prospettive di sopravvivenza: 2.5 mesi in più rispetto all'esclusivo utilizzo della radioterapia dopo l'intervento chirurgico, per un totale di 14.5 mesi di sopravvivenza media, mentre il rate di sopravvivenza a due anni è del 26.5% rispetto al 10.4% dell'altro metodo. In generale, il trattamento (noto anche con "protocollo Stupp") è ben tollerato e la tossicità aggiuntiva è minima, diventando, di conseguenza, lo standard terapeutico per tutti i soggetti affetti da GBM.

1.4 La comparsa della recidiva

Quanto esposto nel paragrafo precedente relativamente allo standard di trattamento del glioblastoma multiforme, nel 90-95% dei casi non è sufficiente ad

estirpare la malattia che, nell'arco di 7-9 mesi, ricorre all'interno dei 2-3 cm di distanza da dove si era sviluppato il tumore primario⁷. Il problema è sempre legato alla natura infiltrativa di questo genere di tumore, che impedisce un'eliminazione totale di tutte le cellule cancerogene: esse sopravvivono in piccoli agglomerati nel parenchima cerebrale normale e da esso si sviluppano formando una recidiva. Questa caratteristica è la ragione della prognosi così infausta legata a questa malattia, che stima un tempo di sopravvivenza medio del soggetto colpito di 15 mesi da dopo il trattamento e di cui solo il 10% sopravvive fino a 5 anni. Molti sono gli ostacoli principali che si frappongono ad un avanzamento terapeutico nella cura di questo tumore, tra questi si hanno la natura eterogenea della malattia e la mancanza di modelli animali sufficientemente simili allo scenario clinico umano, a cui si aggiungono i non ben conosciuti processi di evoluzione della recidiva, dovuti principalmente alla mancanza di uniformità nella definizione dei criteri per la ricorrenza del tumore e una certa variabilità delle filosofie di trattamento²⁵.

Capitolo 2

Imaging a risonanza magnetica

L'**imaging a risonanza magnetica nucleare (MRI)** è una tecnica di imaging che consente di studiare in maniera non invasiva la struttura e la funzione dei tessuti dal livello biochimico e cellulare fino a quello dell'organo macroscopico. L'imaging a risonanza magnetica tradizionale si basa sulle proprietà dei protoni mobili (presenti in quantità elevatissima all'interno del corpo umano, poiché fanno parte delle molecole d'acqua che compongono i tessuti) sottoposti a specifici campi magnetici, di intensità generalmente compresa tra gli 0.2 T e i 3 T per usi clinici (e fino a 7 T per usi sperimentali). Sono proprio queste proprietà, che, differendo da tessuto a tessuto, danno origine al contrasto intrinseco dell'immagine, che, tuttavia, può essere ulteriormente potenziato mediante l'utilizzo di opportuni mezzi di contrasto che consentono di indagare in maniera specifica determinati tessuti.

L'MRI è utilizzata come metodo diagnostico di moltissime patologie e occupa un ruolo di rilievo anche in ambito oncologico: in particolare per questo settore, risulta particolarmente indicata per la determinazione del flusso sanguigno e della sua perfusione, nell'identificazione di tumori di tessuti molli o di lesioni simil-tumorali, per l'oncologia addominale e pelvica (cancro alla prostata, ecc..) e in neuroncologia.

L'aspetto interessante di questa tecnica è la varietà dell'indagine che è possibile svolgere modificando le modalità di acquisizione: oltre all'informazione anatomica, ottenuta grazie ad algoritmi dedicati che ricostruiscono la posizione spaziale e temporale dei protoni mobili all'interno del campo magnetico applicato, è possibile, ad esempio, indagare i composti biochimici dei tessuti, se si utilizza la **spettroscopia a risonanza magnetica (MRS)**, oppure la mobilità dei protoni all'interno della regione in esame, se si esegue un **imaging a risonanza magnetica pesato in diffusione (MR-DWI)**. In generale, l'utilizzo di **imaging multiparametrico** fornisce una maggiore quantità di informazione e, in particolare, l'abbinamento di MRI e MRSI

è particolarmente indicato per la determinazione dello stato del tumore e l'eventuale presenza di metastasi.

Com'è noto, esistono molti altri metodi di acquisizione d'immagine, di tipo anatomico o funzionale, che si basano su processi fisici diversi dalla MR e che sono in grado di fornire informazioni di differente natura. Anche in questo caso, un utilizzo combinato delle varie tecniche (detto **imaging multimodale**) consente di ottenere un quadro più completo della situazione clinica, ad esempio accoppiando modalità ad alta risoluzione, come MRI o CT, con altre ad alta sensibilità, come PET o SPECT.

2.1 Fisica dell'Imaging a Risonanza Magnetica

Il fenomeno fisico della risonanza magnetica nucleare fu scoperto da Felix Bloch ed Edward Purcell, indipendentemente, nel 1946 e sfruttato inizialmente come tecnica di spettroscopia per ottenere informazioni sulla chimica molecolare e la struttura dei materiali. I due fisici si resero conto della possibilità di manipolare la magnetizzazione residua di spin collocati all'interno di un campo magnetico, irradiandoli ad una ben precisa frequenza ω , detta frequenza di Larmor.

Lo spin è una grandezza fisica associata alle particelle cariche, a cui corrisponde un certo momento angolare e che può assumere valore nullo, intero o frazionario: nel primo caso, non risentirà di un campo magnetico applicato, negli altri due sì e, nel caso specifico dell'MRI, risultano particolarmente interessanti le particelle con spin frazionario. Appartiene a quest'ultima categoria il nucleo di idrogeno (o, equivalentemente, il protone), in quanto è uno dei componenti della molecola d'acqua oltre ad essere uno dei costituenti principali dei nuclei degli atomi dei tessuti. Per questi motivi è particolarmente importante dal punto di vista biologico e, nel corso della trattazione, si tenderà a riferirsi ad esso come caso specifico.

Una particella carica rotante possiede spin, momento angolare di spin \vec{I} e momento angolare orbitale \vec{L} ; la sua natura orbitante dà luogo ad un momento magnetico $\vec{\mu}$:

$$\vec{\mu} = \gamma(\vec{L} + \vec{I}) = \gamma(\vec{J}) \quad (2.1)$$

con \vec{J} momento angolare totale e γ rapporto giromagnetico, ovvero rapporto tra il momento magnetico e il momento angolare del sistema.

Nuclei con spin I , collocati all'interno di un campo magnetico, dispongono di $2I + 1$ possibili livelli di energia non degeneri (discreti). Nel caso del protone, che ha spin $1/2$, i possibili livelli saranno due, uno a bassa energia (*low-energy* o *ground state*), nel quale lo spin tende ad allinearsi parallelamente alla direzione del campo magnetico B , e l'altro ad alta energia (*high-energy* o stato eccitato) se le due direzioni sono antiparallele. Le

particelle sottoposte al campo sono assimilabili a dipoli magnetici e tendono ad allinearsi con esso, subendo un momento torcente equivalente al rate di cambiamento del momento angolare in funzione del tempo:

$$\frac{d\vec{J}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (2.2)$$

Il momento magnetico del nucleo, nel tentare di allinearsi con la direzione di B_0 precece intorno ad essa con un rate dato dalla **frequenza di Larmor** ω_0 :

$$\frac{d\phi}{dt} = \omega_0 = \gamma B_0 \quad (2.3)$$

Il moto di precessione (sempre presente a meno che il vettore di magnetizzazione non sia perfettamente allineato con la direzione del campo) della particella carica induce delle piccole correnti elettromagnetiche all'interno di una bobina che venga posta vicino al sistema (principio di induzione elettromagnetica di Faraday). E' con questo sistema che viene rilevato il segnale proveniente dai nuclei.

Nota la frequenza di Larmor e considerando che nuclei dotati di spin, immersi in un campo magnetico, sono descrivibili secondo il modello dell'oscillatore armonico, si definisce il gap tra i due livelli di energia (nel caso del protone) come:

$$\Delta E = \left(\frac{1}{2} + n\right) \hbar \omega_0 \quad (2.4)$$

con n che assume valore 1 per il livello di energia inferiore e 2 per lo stato eccitato.

Una rappresentazione schematica del processo è riportata in Figura 2.1.

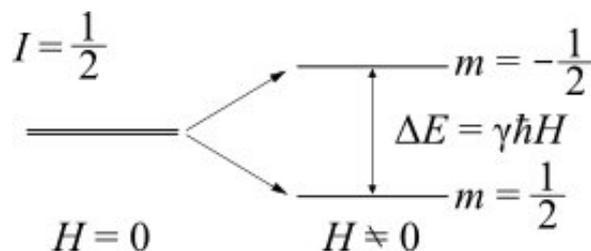


Figura 2.1: Schematizzazione dello splitting dei livelli di energia per un sistema costituito da protoni sottoposto ad un campo magnetico

La risonanza magnetica nucleare si ottiene irraggiando il sistema con una frequenza tale che l'energia trasferita equivalga la differenza tra i due livelli e il protone possa passare da quello ad energia inferiore a quello ad energia superiore. Questo fenomeno è definito **risonanza magnetica nucleare** ed il modo più semplice per ottenerla si ha applicando un campo magnetico a radiofrequenza B_1 , trasverso a B_0 , di intensità tale da soddisfare la

condizione esposta, cioè:

$$\hbar\omega_1 = |E_\alpha - E_\beta| = \hbar\gamma B_1 \quad (2.5)$$

dove α indica lo stato fondamentale e β quello eccitato.

Il campo magnetico applicato B_1 perturba il sistema, inducendo la magnetizzazione M ad allontanarsi dalla direzione del campo B_0 e determinandone la precessione intorno a tale asse. L'angolo di *flipping* prodotto risulta essere:

$$\theta = \gamma \int_0^{t_f} B_1(t) dt \quad (2.6)$$

Per dare una definizione di magnetizzazione bisogna considerare un sistema di particelle cariche con spin sottoposto ad un campo magnetico: benché la tendenza generale degli spin sia quella di allinearsi con il campo, in realtà non tutti saranno orientati allo stesso modo, poiché, a causa dell'agitazione termica, una parte si disporrà parallelamente e un'altra antiparallelamente, secondo la distribuzione di Boltzmann:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = \exp\left[\frac{\Delta E}{k_B T}\right] \quad (2.7)$$

dove k_B è la costante di Boltzmann pari a $1,381 \times 10^{-34} J/K$, mentre T è la temperatura in kelvin. La magnetizzazione è la somma vettoriale di tutti i singoli momenti magnetici e delle loro orientazioni angolari rispetto ad un certo asse del sistema:

$$M_z = N \langle \mu \cos\theta \rangle = \frac{N}{k_B T} \frac{\partial}{\partial(B)} \ln(Q_1(B_0, T)) \quad (2.8)$$

con Q_1 funzione di partizione del singolo spin, B_0 campo magnetico esterno e θ angolo formato tra il momento magnetico μ e B_0 . Nel limite di campo debole si ha che la magnetizzazione netta, all'equilibrio, lungo la direzione z è:

$$M_0^z \approx \frac{N\mu^2}{k_B T} B_0 = N \frac{\gamma^2 \hbar^2}{4} \frac{B_0}{k_B T} \quad (2.9)$$

L'applicazione del campo magnetico trasverso B_1 , precedentemente citato, fa sì che, oltre alla precessione del vettore magnetizzazione intorno a B_0 (Figura 2.2a), si aggiunga un fenomeno di nutazione (Figura 2.2b), ovvero un'oscillazione dell'asse della particella intorno alla direzione di B_1 , la cui ampiezza è determinata dalla intensità e dalla durata del campo applicato. Al fine di semplificare la trattazione dei fenomeni in esame, è opportuno utilizzare un sistema di riferimento rotante alla frequenza di Larmor ω_0 , in modo tale che l'unico effetto visibile sia l'allontanamento dell'asse di magnetizzazione dalla direzione di B_0 . Il fenomeno realmente interessante dal

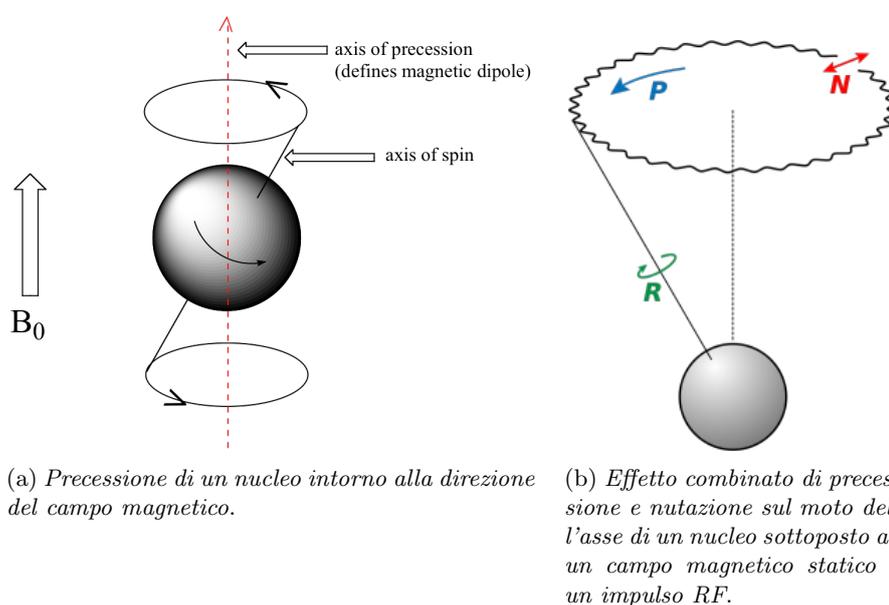


Figura 2.2: Precessione e nutazione di un nucleo atomico

punto di vista delle informazioni che è possibile ricavare (sia per quanto riguarda le immagini anatomiche che funzionali) non è tanto il comportamento dei protoni soggetti soltanto al campo B_0 , o come esso si modifica quando vengono influenzati anche dalla perturbazione B_1 , quanto i tempi e i modi in cui tenderanno a riportarsi alla condizione di equilibrio allo spegnersi della perturbazione esterna e permanendo solo campo magnetico esterno iniziale. E' sulla base a questo fenomeno che si parla di **tempi di rilassamento**.

2.1.1 I tempi di rilassamento

Come accennato in precedenza, la possibilità di acquisire immagini di risonanza magnetica, cioè ottenere un contrasto visibile tra le diverse tipologie di tessuto, è dovuto alle proprietà dei protoni mobili che li costituiscono, in particolare ai loro **tempi di rilassamento**. Finora si è considerato semplicemente l'influsso di campi magnetici esterni su un insieme di spin, ma non la presenza di disomogeneità locali del campo e l'interazione tra i singoli spin.

I tempi di rilassamento si distinguono in due tipologie a seconda della componente della magnetizzazione coinvolta:

Rilassamento longitudinale T_1 : come già discusso, un sistema di nuclei avente magnetizzazione netta, sottoposto ad un campo magnetico esterno, tenderà ad allinearsi parallelamente ad esso, raggiungendo lo stato di minore energia. Se viene perturbato da un campo magnetico B_1 , trasver-

sale a B_0 , verrà costretto ad allontanarsi dal suo stato iniziale, per tutta la durata della sua applicazione. Una volta spento, gli spin rilassano tornando alla loro posizione originaria, dissipando l'energia che era stata trasferita loro dalla perturbazione per scostarli dalla loro condizione di minor energia. Viene detto **T1** il tempo impiegato da circa il 63% ($1 - \frac{1}{e}$) degli spin per ritornare allo stato iniziale e si ottiene dall'equazione di Bloch:

$$M_z = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{T1}} \right) \quad (2.10)$$

con M_0 magnetizzazione di equilibrio e M_z componente della magnetizzazione lungo l'asse z coincidente con la direzione di B_0 . Il valore di T1 dipende dal campo magnetico a cui è sottoposto, infatti:

$$T1 = A\omega_0^B = A(\gamma B_0)^B \quad (2.11)$$

dove A e B dipendono dal tessuto d'interesse. Ad ogni modo, è opportuno tenere conto che la validità di questa relazione non è stata testata per intensità di campo magnetico superiori a 3 T.

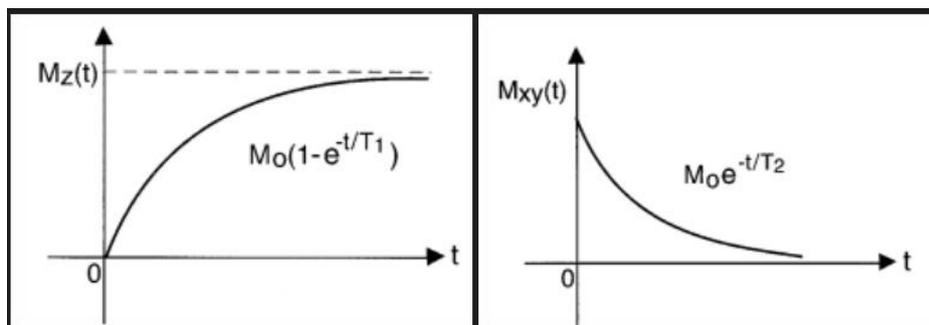


Figura 2.3: Andamento delle componenti longitudinale (riquadro di sinistra) e trasversale (riquadro di destra) del vettore magnetizzazione allo spegnimento dell'impulso a radiofrequenza.

Rilassamento trasversale T2 : le condizioni iniziali sono le medesime esposte nel caso precedente e nuovamente il sistema viene perturbato tramite un campo magnetico trasversale a radiofrequenza B_1 , stavolta però considerando il comportamento della componente trasversale della magnetizzazione. Quest'ultima, sotto l'effetto di B_0 ruota intorno alla direzione z con frequenza di Larmor ω_0 . Poiché si muove in un campo affetto da disomogeneità locali i protoni subiscono una dispersione della precessione, ovvero il pacchetto di particelle rotanti perde coerenza. Questo fenomeno è noto come rilassamento trasversale o rilassamento spin-spin e T2 è il tempo

impiegato da circa il 63% del pacchetto originale di spin per perdere coerenza. Anche in questo caso la soluzione è governata dall'equazione di Bloch per la componente trasversale della magnetizzazione:

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T2}} \quad (2.12)$$

Sia $T1$ che $T2$ sono diversi a seconda del tessuto considerato ed è proprio grazie a questa proprietà che si è in grado di ottenere il contrasto nelle immagini di risonanza, però, contrariamente al, rilassamento in $T1$, dove con lo scorrere del tempo la componente longitudinale della magnetizzazione aumenta e torna a ripristinarsi come era in origine, durante il rilassamento in $T2$ la componente trasversale decade esponenzialmente. Diversamente da quanto affermato prima per il tempo di rilassamento $T1$, il $T2$ non sembra risentire particolarmente delle variazioni di campo magnetico applicato. Ciò è probabilmente dovuto proprio al meccanismo fisico su cui si fonda, infatti è l'interazione fra spin che determina il rilassamento, piuttosto che quella con il campo magnetico e perciò dipende principalmente dall'orientazione, dall'interazione e dalla distanza fra i dipoli (interazioni molecolari). Le considerazioni fatte finora relativamente al rilassamento trasversale sono un po' semplicistiche, infatti non tengono conto di un altro fattore che interviene nella perdita di coerenza tra gli spin, ovvero le disomogeneità locali del campo magnetico statico applicato: esse accelerano il processo di rilassamento dando luogo ad una misura di $T2$ inferiore a quella che sarebbe caratteristica del tessuto ed è in genere denotata con $T2^*$. La relazione tra il tempo di rilassamento osservato $T2^*$ e quello reale $T2$ è data da:

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \frac{1}{T2'} \quad (2.13)$$

dove $T2$ è la componente dovuta alle interazioni molecolari e $T2'$ è quella originata dalle disomogeneità di campo.

La produzione del segnale : Come già esposto, il segnale utilizzato per la costruzione delle immagini di risonanza proviene dalla magnetizzazione, che precede intorno alla direzione del campo magnetico statico mentre si riallinea con esso, dopo essere stata perturbata dall'applicazione del campo a radiofrequenza. Viene rilevato servendosi del principio di induzione elettromagnetica: una carica in movimento, immersa in un campo magnetico, induce una corrente all'interno di un circuito chiuso ad essa vicino. La forza elettromotrice ha origine dalla variazione del flusso magnetico, originato, in questo caso, dal moto di precessione della carica. Il segnale è calcolato come:

$$S \approx C \frac{\Delta\Phi_B}{\Delta t} = C\omega_0 M_{\perp} \quad (2.14)$$

Se si assume che l'angolo di nutazione prodotto dall'azionamento del campo magnetico trasverso sia di 90° , ovvero la magnetizzazione giaccia completamente nel piano trasverso, si può dire che $M_\perp = M_0^z$

Considerando la definizione di magnetizzazione di equilibrio in approssimazione di campo debole (equazione 2.9) si ha che il segnale è dato da:

$$S \approx C\omega_0 M_\perp = C\gamma B_0 \frac{N}{k_B T} \frac{\gamma^2 \hbar^2}{4} B_0 = C \frac{N}{k_B T} \frac{\gamma^3 \hbar^2}{4} B_0^2 \quad (2.15)$$

E' importante notare la dipendenza dal quadrato dell'intensità del campo statico, da cui si ottiene che all'aumentare di B_0 si avrà anche un aumento dell'intensità del segnale. L'utilizzo di scanner ad alto campo permette, inoltre, di ottenere una maggiore velocità di acquisizione, una migliore risoluzione e una superiore sensibilità alle piccole differenze dei tessuti.

2.2 La Formazione delle Immagini

Il primo ad individuare un metodo per la produzione di immagini NMR bidimensionali per analisi chimiche fu Laterbour nel 1973, che ebbe l'intuizione di servirsi di un gradiente lineare di campo magnetico in modo da associare, decomponendo il segnale in serie di Fourier, ad ogni frequenza una posizione spaziale diversa all'interno del volume esaminato. La ricostruzione dell'immagine veniva ottenuta con un metodo molto simile a quello utilizzato per le immagini CT, ossia mediante l'acquisizione di numerose proiezioni monodimensionali a diversi angoli e sfruttando successivamente il procedimento della *Filtered Back Projection*. Come verrà spiegato in seguito, oggi, in genere, non ci si serve più di questo sistema, poiché i dati per produrre un'immagine 2D vengono acquisiti in maniera tale da contenere già l'informazione bidimensionale, un procedimento molto più rapido rispetto all'utilizzo delle proiezioni.

2.2.1 Condizioni per la formazione di un'immagine di risonanza magnetica

Come già visto in precedenza, perché un sistema di spin, immerso in un campo magnetico, entri in risonanza, è necessario irraggiarlo con un impulso RF che coincida con la frequenza di Larmor del sistema, sottoposto al campo magnetico statico B_0 , calcolata tramite l'equazione 2.3. Poiché $\omega = 2\pi f$ con f frequenza precessionale espressa in Hertz, si può scrivere che:

$$f = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.16)$$

con $\frac{\gamma}{2\pi}$ espresso in $\left[\frac{Hz}{T}\right]$. Questa relazione è di particolare importanza, poiché esprime come sia possibile variare il valore di f manipolando l'intensità del campo magnetico. Le variazioni di frequenza e fase forniscono

l'informazione necessaria per ricostruire il segnale in relazione alla posizione e al numero di nuclei che precedono in un dato punto. Piccole variazioni di campo magnetico sono sufficienti per provocare differenze rilevabili nel moto di precessione e di conseguenza nel segnale raccolto, ma, ai fini della ricostruzione dell'immagine, è necessario che tali variazioni siano note, controllabili e si conosca con precisione la posizione in cui il campo assume una certa intensità. Facendo sì che il campo magnetico statico vari localmente, i protoni di precederanno con frequenza diversa a seconda della posizione che occupano. Il segnale così ottenuto è dato, di conseguenza, dalla sovrapposizione di molte frequenze, perciò risulta necessario utilizzare la trasformata di Fourier per decodificarlo e associare a ciascuna frequenza una posizione nota. Il segnale, prodotto nella spira dalla precessione della magnetizzazione e che decade secondo un tempo costante $T2$ al termine dell'impulso RF, è detto **FID** (*Free Induction Decay*).

Da quanto esposto finora, risulta chiaro che, per la ricostruzione dell'immagine, è di fondamentale importanza localizzare con precisione da dove proviene il segnale; per farlo bisogna, di volta in volta, selezionare una slice di interesse, eccitare i protoni appartenenti a quella slice, essere in grado di ricevere il segnale prodotto da tali protoni e di ricostruirlo per ottenere un'immagine utilizzabile. Le caratteristiche principali del tessuto sono la densità delle specie nucleari e i tempi di rilassamento $T1$ e $T2$: è dalle loro differenze che dipende il contrasto dell'immagine, mentre la durata dell'applicazione dell'impulso a radiofrequenza e del gradiente di campo influiscono sulla raccolta di queste informazioni.

Come precedentemente affermato, il segnale rilevato è una convoluzione di contributi provenienti da protoni che sperimentano campi magnetici locali diversi e che, di conseguenza, avranno frequenze di Larmor leggermente diverse gli uni dagli altri. Di per sé, quindi, il segnale non dà informazioni che permettano di ricostruire l'immagine del volume in esame: ciò diventa possibile solo attraverso un'opera di decodifica e ricostruzione del segnale che conduce alla generazione di mappe che rappresentano la densità e i tempi di rilassamento dei protoni all'interno dei tessuti e dalle quali si giunge, infine, all'immagine in toni di grigio comunemente utilizzata. I metodi per produrre queste immagini sono moltissimi, si utilizzano sequenze di impulsi a radiofrequenza che vengono variati in intensità e durata, così come cambiano, da un metodo all'altro, i momenti in cui viene acceso o spento il gradiente lineare, piuttosto che il sistema di ricezione e digitalizzazione e quante volte queste operazioni si verificano. La successione di questi eventi viene graficata tramite specifici diagrammi temporali, noti come *pulse sequence diagrams*, in cui vengono specificati anche tempo di eco (TE), la sua ampiezza massima e il tempo di ripetizione (TR) della sequenza di impulsi (un esempio è mostrato in Figura 2.4). Con **eco** si intende il segnale sinusoidale ottenuto dalla rifocalizzazione della magnetizzazione trasversa, che decade nel tempo secondo un andamento sinusoidale (il FID), quando

la perturbazione viene spenta e la magnetizzazione viene richiamata nello stato di equilibrio iniziale. La rifocalizzazione del decadimento dovuto al FID fa sì che si riproduca il picco del segnale (l'eco), che tornerà poi a decadere sempre ad opera dello sfasamento della componente trasversale. I metodi con cui è possibile produrre l'eco sono diversi e si suddividono in due principali categorie: quelli che sfruttano sequenze di impulsi RF e quelli che si servono dell'inverso del gradiente di campo magnetico statico. Del primo gruppo, verranno analizzate in particolare due sequenze, di cui la prima è la sequenza di **spin echo**, che viene utilizzata per misurare l'autentico tempo di rilassamento trasversale $T2$. La sequenza di impulsi tipicamente impiegata è:

$$90^\circ - \tau - 180^\circ \quad (2.17)$$

dove l'impulso a 90° è quello d'eccitazione che porta la magnetizzazione nel piano xy ; nel tempo τ gli spin si sfasano per le disomogeneità del campo e si produce un FID. L'impulso a 180° è il rifasatore, che ruota gli spin nel piano xy di un angolo 2π ; la rotazione inverte l'ordine di precessione, causando la rifocalizzazione del segnale. L'eco prodotto viene acquisito al tempo 2τ e convertito in informazione nel processo di ricostruzione dell'immagine. Per effetto della rifocalizzazione, la componente trasversale della magnetizzazione tornerà circa al suo stato originario, ma quella longitudinale avrà un'ampiezza inferiore a causa degli effetti dovuti al reale tempo di rilassamento $T2$ del tessuto d'interesse.

Un'altra tipologia di sequenza di impulsi, utilizzata, in questo caso per la misura del tempo di rilassamento longitudinale $T1$, è l'*inversion recovery pulse sequence*, strutturata come di seguito:

$$180^\circ - TI - 90^\circ - 180^\circ - TE \quad (2.18)$$

Il primo impulso ribalta il vettore magnetizzazione rispetto al piano xy , in maniera tale:

$$M_z(0) = -M_0 \quad (2.19)$$

Tra questo impulso e il successivo a 90° viene lasciato trascorrere un tempo TI (tempo d'inversione) e, infine, viene applicato un ulteriore impulso a 180° che porta la magnetizzazione longitudinale sul piano trasverso in modo che si possa produrre il segnale.

Il metodo dei *gradienti di eco* per produrre imaging fa, invece, parte della seconda categoria. All'interno di un sistema di imaging, i gradienti vengono implementati lungo tutte e tre le direzioni spaziali e il vettore gradiente è calcolato come:

$$\vec{G} = \frac{\partial B_z}{\partial x} \hat{x} + \frac{\partial B_z}{\partial y} \hat{y} + \frac{\partial B_z}{\partial z} \hat{z} \equiv G_x \hat{x} + G_y \hat{y} + G_z \hat{z} \quad (2.20)$$

dove G_x , G_y e G_z sono le componenti ortogonali del gradiente. Il campo magnetico prodotto lungo la direzione z sarà dato da:

$$\vec{B} = (B_0 + G_x \hat{x} + G_y \hat{y} + G_z \hat{z}) \hat{z} \quad (2.21)$$

L'eco di gradiente viene prodotto attraverso l'utilizzo di gradienti di campo, piuttosto che attraverso l'applicazione di impulsi a radiofrequenza. Il gradiente lineare viene acceso durante il FID in modo da produrre un rapido sfasamento degli spin e viene mantenuto acceso per un certo tempo t , determinato dal completo decadimento del segnale. Una volta avvenuto, viene applicato un gradiente di polarità inversa, mantenuto attivo per lo stesso tempo del gradiente iniziale, che permette la rifocalizzazione degli spin e la produzione dell'eco al tempo TE. L'assenza dell'impulso a 180° , usato per la rifocalizzazione, impedisce l'eliminazione dei contributi dovuti alle disomogeneità di campo e alla suscettibilità del tessuto, quindi il decadimento è più rapido, poiché avviene in un tempo $T2^*+$, invece che $T2$. Inoltre, l'utilizzo dell'eco di gradiente permette di sfruttare *flip angle* minori di 90° , a differenza di quanto avviene per lo spin eco, riducendo i tempi di ripetizione e, di conseguenza, quelli di acquisizione. Poiché il *flip angle* incide sul contrasto dell'immagine, per tempi di ripetizione brevi è auspicabile l'utilizzo di angoli piccoli.

Un'altra sequenza di acquisizione, sempre della famiglia delle *inversion recovery pulse sequences*, è la FLAIR (*FLuid Attenuated Inversion Recovery*): in questa tecnica il tempo di inversione è sufficientemente lungo da annullare o attenuare quasi completamente il segnale proveniente dal fluido cerebrospinale, minimizzando gli artefatti o gli effetti di volume parziale da esso prodotti²⁶. Si tratta di una tipologia di imaging fortemente pesata in T2, che consente la rilevazione di piccole lesioni con contrasto relativamente basso, risultando una sequenza di acquisizione di qualità superiore rispetto alla tradizionale *spin-echo* o *fast spin-echo*.

Esistono molte altre possibili sequenze di acquisizione, ma il dettaglio più importante da sottolineare è la possibilità di ottenere immagini con contrasto diverso semplicemente modificando la sequenza di eccitazione che la macchina esegue, evidenziando in particolare un certo tessuto d'interesse o ottenendo informazioni di carattere funzionale, invece che semplicemente morfologico.

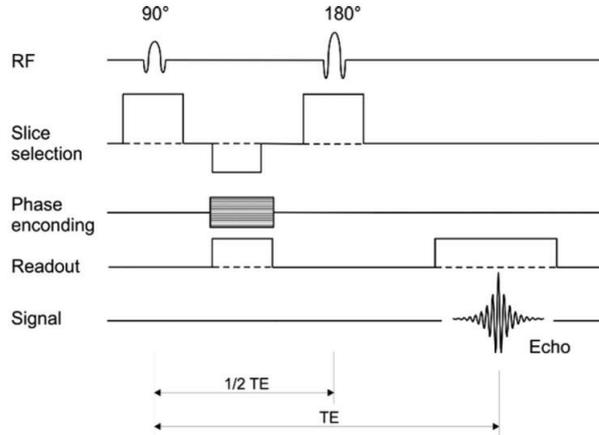
E' possibile anche aumentare il contrasto di fase tra i tessuti servendosi di opportuni agenti chimici, ovvero sostanze paramagnetiche con la prerogativa di abbattere considerevolmente i tempi di rilassamento del tessuto in cui vengono iniettati. Tra i più utilizzati, in particolare nell'angiografia MR oppure per aumentare il contrasto dei tumori cerebrali nel caso in cui vi sia un deterioramento della barriera ematoencefalica, vi è una molecola sintetica, il Gd-DTPA (noto anche come acido gadopentetico), composto chimico in cui il gadolinio (Gd^{3+}) viene associato ad una molecola di grandi dimensioni, il DTPA (dietilenetriamminepentacetato). In questo modo, i tempi di rilassamento verranno alterati solo nelle aree accessibili all'agente di contrasto.

2.2.2 *Image Processing*

Le tecniche per ricostruire l'immagine MR dal segnale acquisito hanno l'obiettivo di risalire alla densità degli spin in un determinato voxel e determinare, all'interno dello stesso volume, le caratteristiche di rilassamento. Per una ricostruzione accurata delle immagini, vengono usati tre gradienti:

- *slice selection*: l'*imaging* di un volume si ottiene selezionandone di volta in volta una singola fetta dalla quale vengono ricavati, per ogni voxel, le informazioni relative alle caratteristiche dei tessuti all'interno del volumetto e le loro differenze. La selezione della *slice* avviene tramite l'applicazione di un impulso RF di frequenza pari o a quella di Larmor del gradiente di campo statico o, alternativamente, ad una banda limitata di frequenze, centrate sempre intorno a ω_0 . Ha la forma di una funzione *sync* e viene applicato in contemporanea all'accensione del gradiente di selezione della slice, in questo modo solo gli spin che avranno la corretta frequenza all'interno del gradiente entreranno in risonanza all'applicazione dell'impulso RF;
- *codifica in frequenza*: si ottiene tramite la variazione lineare del campo magnetico locale, in modo tale che ad ogni posizione, lungo una certa direzione, corrisponda un frequenza diversa;
- *codifica di fase*: serve a produrre i dati necessari per fornire informazioni sulla seconda dimensione nella ricostruzione di un'immagine bidimensionale. Questo approccio rende molto più rapido il processo di generazione dell'immagine rispetto al metodo FBP. Il gradiente di *phase encoding* ha una funzione concettualmente simile a quello di *frequency encoding*: viene acceso per un tempo limitato dopo che gli spin sono stati ruotati nel piano trasverso dall'impulso RF, in modo tale che spin collocati in aree diverse siano caratterizzati da fasi diverse. Nei successivi periodi di ripetizione TR , il gradiente di fase viene incrementato al fine di riempire quello che viene definito *k-space* (che verrà descritto successivamente) e dal quale, tramite trasformata di Fourier, si può risalire ad un'immagine che rappresenti la distribuzione degli spin nel tessuto d'interesse.

k-space È lo spazio dei dati raccolti (segnali) dal volume di cui si vuole produrre una rappresentazione ed è il coniugato dello spazio dell'immagine, di conseguenza ha le dimensioni dell'inverso di una lunghezza ed è correlato con l'immagine attraverso la trasformata di Fourier. Nel caso di un'immagine 2D, è bidimensionale e contiene l'informazione relativa a quest'ultima sotto forma di segnale. La parte centrale è occupata dalle basse frequenze che contengono l'informazione relativa al contrasto e alla forma dell'oggetto da rappresentare, mentre, spostandosi dal centro verso l'esterno, si trovano

Figura 2.4: *Pulse sequence diagram* di una sequenza *spin echo*

le alte frequenze, che sono quelle che definiscono i contorni dell'immagine risultante dal processo di ricostruzione. Il segnale ricevuto è la trasformata di Fourier della densità degli spin all'interno dell'oggetto studiato e si esprime come:

$$S(k_x, k_y, k_z) = \int \int \int \rho(x, y, z) e^{-i2\pi(k_x x + k_y y + k_z z)} dx dy dz \quad (2.22)$$

dove ρ è la densità degli spin, mentre k è la frequenza spaziale nelle tre direzioni, tale che $k = k(t)$ e dimensionalmente si esprime in cm^{-1} . L'equazione 2.22 è equivalente alla forma seguente:

$$S(k_x, k_y, k_z) = F[\rho(x, y, z)] \quad (2.23)$$

dove F indica la trasformata di Fourier.

La registrazione delle informazioni nel k -spazio è un processo discreto a causa sia della necessità di digitalizzare il segnale nell'iter di ricostruzione dell'immagine, sia dell'applicazione, in step discreti, del gradiente di codifica di fase. Poiché si ha a che fare con una conversione del segnale in forma discreta, è necessario che il campionamento sia regolato in base al teorema di Nyquist-Shannon, che afferma che, per evitare affetti di aliasing, la frequenza con cui viene eseguito deve essere maggiore o, al limite, uguale al doppio della più alta frequenza spaziale presente nell'immagine. La dimensione del pixel risulterà quindi essere inversamente proporzionale a due volte k_{xmax} o k_{ymax} a seconda che si consideri l'asse x o y .

Le modalità di riempimento del k -spazio sono molteplici e dipendono dalla sequenza di impulsi utilizzata, dai parametri scelti per la digitalizzazione dell'immagine e dalle finalità della sequenza selezionata. In una normale acquisizione di *spin echo* o *gradient echo*, per i quali il gradiente di lettura

G_x è mantenuto costante, verrà acquisita, per ogni ripetizione della sequenza, una linea del k -space. Quando il gradiente di codifica di fase è nullo, la riga acquisita è l'asse k_x , quando viene aggiunto un impulso di gradiente tra eccitazione a RF e accensione del gradiente di lettura, viene acquisita una linea più in alto o più in basso nel k -spazio, dove ogni riga è tale che $k_y = \text{cost}$. In formule:

$$k_x = \gamma G_x t \quad (2.24)$$

$$k_y = \gamma G_y t \quad (2.25)$$

dalle quali appare chiaro come ogni riga del k -space venga acquisita tramite variazione del corrispondente gradiente.

Il metodo appena esposto appartiene alle strategie di campionamento rettangolare.

Una volta completato il riempimento del k -space si può risalire all'immagine eseguendo la trasformata di Fourier dei dati campionati, ottenendo delle mappe che mostrano la distribuzione, all'interno dei tessuti, degli spin isocromi; lo stesso risultato può essere ottenuto tramite tecniche di proiezione analoghe a quelle della tomografia computerizzata.

Le relazioni riportate nelle equazioni 2.24 e 2.25 consentono di chiarire come la risonanza magnetica sia in grado di ottenere una risoluzione spaziale tanto ridotta (dell'ordine di grandezza degli 0.2 mm) utilizzando impulsi a radiofrequenza. Questo si spiega riconsiderando la definizione di segnale, data dall'equazione 2.22: si consideri il volume da esaminare, costituito da più elementi con densità di spin diverse e sottoposto ad una magnetizzazione di equilibrio $M_0(r)$, proporzionale alla densità dei nuclei all'interno di ciascun voxel (individuato dalla posizione r); se si esprime il segnale proveniente da questo volume in funzione del tempo, la sua definizione sarà:

$$S(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(r) e^{i\omega(r)t} dr \quad (2.26)$$

analoga alla 2.22, o, equivalentemente:

$$S(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} M_0(r) e^{-i\gamma G r t} dr \quad (2.27)$$

In quest'ultimo caso, si vede bene come il segnale assuma una forma analoga a quella dello scattering di un'onda piana avente lunghezza d'onda $\lambda = \frac{2\pi}{k}$, che diventa, sostituendo le 2.24 e 2.25:

$$\lambda = \frac{2\pi}{\gamma G t} \quad (2.28)$$

La lunghezza d'onda λ rappresenta la risoluzione del sistema di imaging, che quindi non dipende dalla lunghezza d'onda della radiofrequenza, bensì dal rapporto giromagnetico degli atomi considerati (in genere i nuclei idrogeno) e dal gradiente del campo.

2.3 Metodi di imaging MR non anatomici: *Diffusion-Weighted MRI*

La DW-MRI è solo una delle molteplici tecniche di imaging a risonanza che forniscono un'informazione di tipo funzionale del tessuto esaminato. Si dedica a questa tecnica uno spazio particolare vista la centrale importanza che ha assunto all'interno di questo studio.

L'imaging pesato in diffusione permette di evidenziare alcune caratteristiche dei tessuti che sono particolarmente distintive tra sani e tumorali. La prerogativa fondamentale di una neoplasia è la manifestazione di una riproduzione cellulare incontrollata, che aumenta la cellularità del tessuto, diminuendo la frazione di volume extra-cellulare (ECVF) rispetto all'equivalente sano. Al contrario, come conseguenza del trattamento, si avrà una tendenza alla normalizzazione di questi parametri, dando luogo ad un decremento della densità cellulare e ad un aumento dell'ECVF, ma producendo, come effetto negativo, una compromissione dell'integrità della membrana cellulare. Le microstrutture del tessuto e le sue modificazioni influiscono sulla diffusione delle molecole d'acqua all'interno di esso, in quanto variano il loro moto quando interagiscono con questi ostacoli fisici. L'imaging pesato in diffusione è sensibile al moto delle molecole d'acqua e le premesse su cui si basa derivano dalle osservazioni di Hahn e di Carr e Purcell, che scoprirono che la sequenza di *spin echo* è influenzata dalla diffusione delle molecole all'interno del campione.

La diffusione delle molecole è dovuta al moto browniano, che, in assenza di barriere fisiche, sperimentano uno sparpagliamento distribuito secondo un andamento gaussiano. La deviazione standard della distribuzione delle dislocazioni descrive lo spostamento quadratico medio in una dimensione:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (2.29)$$

con D coefficiente di diffusione molecolare, che delinea il rate di diffusione. Dipende dalla temperatura, dalla dimensione delle particelle e dalla viscosità del mezzo.

Le molecole d'acqua nei tessuti non hanno un moto assimilabile a quello dell'acqua libera, poiché viene continuamente alterato dalla collisione con strutture anatomiche: tramite l'imaging pesato in diffusione è possibile stimare quello che viene detto **coefficiente apparente di diffusione** (*Apparent Diffusion Coefficient*, ADC) di queste molecole. Lo studio della diffusione delle molecole d'acqua permette quindi di studiare la conformazione dei tessuti, la loro integrità e classificare tessuto normale e patologico servendosi dei valori di ADC²². Per quanto le complesse interazioni tra acqua e microstrutture tissutali non siano state ancora completamente comprese, si è riconosciuto un ruolo importante alla cellularità e all'ECVF, come già visto, ma anche alla permeabilità delle membrane e alla tortuosità del percorso seguito dalle molecole, a causa delle collisioni con le strutture del tessuto. In

particolare, si è riscontrata una proporzionalità inversa tra densità cellulare e valore di ADC, di conseguenza, in regioni tumorali caratterizzate da elevata cellularità, ci si aspetta che il coefficiente assuma valori bassi, poiché è diminuito il volume d'acqua extra-cellulare rispetto a quello intra-cellulare. Bassi valori di ADC si riscontrano anche quando, successivamente alla comparsa della necrosi, la zona patologica comincia a ripopolarsi di cellule sane. Aumenta, invece, in presenza di necrosi, a causa della conseguente rottura delle membrane e all'aumento del liquido extra-cellulare (Figura 2.5).

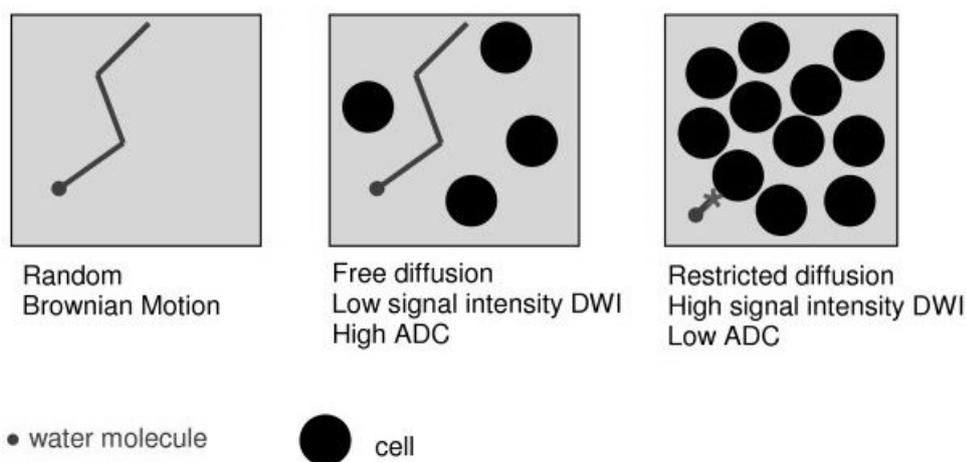


Figura 2.5: Esempi di diffusione di una molecola d'acqua: in assenza di ostacoli, con diffusione libera; con bassa densità cellulare e cammino libero medio più ridotto; con alta cellularità e libero cammino brevissimo, quindi limitata possibilità di diffusione

2.3.1 Sequenze di acquisizione per l'imaging in diffusione

La maggior parte delle sequenze di imaging utilizzate al giorno d'oggi per l'acquisizione di immagini DW si fondano sulla *pulse gradient spin echo* (PGSE), che ha lo scopo principale di studiare la diffusione traslazionale. Si basa sull'applicazione di due gradienti pulsati (a differenza della spin eco tradizionale che ne utilizza uno solo) prima e dopo un impulso a radiofrequenza di 180° . Entrambi hanno ampiezza G , sono azionati a distanza di un certo intervallo di tempo Δ e rimangono accesi per un periodo δ . L'effetto dell'applicazione del primo gradiente sarà quello di marcare gli spin, in modo tale che i protoni abbiano fase diversa a seconda della posizione che occupano all'interno del volume. Tale fase sarà pari a:

$$\phi_1 = \gamma \int z_1 G dt = \gamma G z_1 \delta \quad (2.30)$$

Nel periodo di tempo Δ , in cui il gradiente è spento, gli spin sono liberi di diffondere secondo la mobilità di cui dispongono; all'applicazione del secondo

2.3. METODI DI IMAGING MR NON ANATOMICI: DIFFUSION-WEIGHTED MRI39

gradiente assumeranno una nuova fase, che, analogamente a prima, sarà:

$$\phi_2 = \gamma \int z_2 G dt = \gamma G z_2 \delta \quad (2.31)$$

Come si può notare, in entrambi i casi la fase dipende dalla posizione z e nel caso in cui la molecola d'acqua rimanga stazionaria (idealmente si assume $z_1 = z_2$), la fase risultante sarà nulla, poiché la fase indotta dal secondo gradiente sarà uguale e opposta alla prima e, quindi, gli effetti prodotti dai due gradienti si elideranno vicendevolmente. Il processo induce la rifocalizzazione degli spin e la formazione di un eco del segnale. Nel caso in cui le posizioni delle molecole, in corrispondenza dell'applicazione dei due gradienti, siano diverse, il secondo impulso non sarà sufficiente a riportare in fase gli spin, determinando un abbattimento del segnale. Ovviamente, nel caso reale, uno spostamento, per quanto minimo, sarà sempre presente, producendo uno *shift* di fase del momento magnetico di spin:

$$m = m_0 e^{i\gamma G \delta (z_2 - z_1)} \quad (2.32)$$

con m_0 ampiezza del momento magnetico nel caso di gradiente $G = 0$, mentre l'argomento dell'esponenziale è detto fattore di fase. Il segnale raccolto è il risultato della magnetizzazione di volume ed è dato dalla sovrapposizione dei vettori di magnetizzazione dei singoli spin. La relazione tra il segnale ottenuto e il coefficiente di diffusione è dato da:

$$\frac{S}{S_0} = e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 D (\Delta/3 - \delta)} \quad (2.33)$$

con S_0 segnale ottenuto in assenza di gradiente. L'argomento dell'esponenziale può essere riscritto come $b \cdot D$ con b , fattore di attenuazione, dato da $\gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\frac{\Delta}{3} - \delta \right)$.

E' molto importante scegliere correttamente il valore del fattore b , grandezza che dipende dalle caratteristiche del sistema di imaging. Per farlo è necessario tenere conto dell'anisotropia del tessuto in esame e da che tipo di parametro si intende osservare, cioè il segnale (quello prodotto direttamente dall'applicazione della sequenza di acquisizione e che si rivela iperintenso nelle regioni a bassa diffusività e ipointenso nel caso opposto), valido per considerazioni qualitative, oppure il valore di ADC, calcolato in mm^2/s , per analisi quantitative. Va regolato anche rispetto al valore di ADC caratteristico del tessuto, la sua perfusività e il rumore di fondo.

L'ottimizzazione di b consente, nel primo caso, di massimizzare il contrasto intrinseco del segnale, che può essere utile per circoscrivere il tumore ed evidenziarne infiltrazioni nel tessuto, mentre per quanto riguarda la misura del valore di ADC, è importante per la riduzione del rumore. Come si vede

dalla propagazione degli errori calcolata relativamente alla formula:

$$\frac{S(TE)}{S_0} = e^{-b \cdot D} \quad (2.34)$$

si ha:

$$\sigma_{ADC} = \frac{D_0}{SNR_0} \sqrt{\frac{\sum_n (b_n N - \sum_n b_n)^2 e^{2b_n D_0}}{N \sum_n b_n^2 - (\sum_n b_n)^2}} \quad (2.35)$$

D_0 equivale all'ADC del tessuto, mentre SNR_0 è il rapporto segnale-rumore per $b = 0s/mm^2$, ovvero in assenza di gradiente. Il b value non è l'unica causa di abbassamento del segnale, oltre alla diffusione random delle particelle, ad esso contribuiscono anche il flusso d'acqua attraverso tutto il volume considerato, il flusso sanguigno e, come già accennato, il rumore.

In generale, si potrebbe stilare una lista di possibili valori di b a seconda del tessuto in esame, ma ai fini pratici spesso i valori di ADC per tessuto sano e malato non si conoscono a priori, quindi è consigliabile eseguire un certo numero di acquisizioni a diversi b per scegliere quello ottimale.

Echo Planar Imaging La sequenza di acquisizione più comunemente utilizzata per l'imaging in diffusione è, però, la PGSE abbinata ad un EPI (Echo Planar Imaging) di lettura¹⁰, una tecnica di *scanning* molto rapida, che ben si adatta alle esigenze di questa tipologia di imaging, poiché dispone di un'elevata risoluzione temporale. Questa prerogativa è dovuta al fatto che con una sola eccitazione si acquisisce un'immagine completa, operazione possibile poiché tutte le linee del k-spazio vengono riempite tramite inversioni multiple del gradiente, che passa rapidamente dal massimo positivo al massimo negativo $N_y/2$ volte (con N_y dimensione lungo y del k-space [controllare]) all'interno di un singolo tempo di decadimento $T2^*$. Questo produce multipli gradienti di eco all'interno di una singola acquisizione dopo un solo impulso a radiofrequenza, cioè all'interno di una singola misura o *shot*.

La velocità di questa tecnica consente di ridurre enormemente gli artefatti dovuti al movimento del paziente, ma allo stesso tempo la rapida e continua inversione del gradiente stressa molto le bobine, perciò è stata sviluppata anche una tecnica alternativa alla *single-shot*, cioè la *multishot*: la lettura viene frazionata in più impulsi RF e il k-spazio risulta segmentato in acquisizioni multiple. Ovviamente la procedura è più lenta, ma, rispetto alla prima, riduce gli errori causati dalla suscettività magnetica.

2.3.2 Modelli di diffusione

Quanto affermato finora si basa sul presupposto che la relazione tra segnale e coefficiente di diffusione sia monoesponenziale, ma si tratta di un'assunzione semplicistica, che non tiene conto della complessità dell'ambiente interno del tessuto e come esso influisce sulla diffusione. Sono, quindi, stati

proposti altri modelli: ad esempio, quello biesponenziale, che sembrerebbe appropriato per descrivere la diversa diffusione delle molecole d'acqua che si trovano all'interno delle cellule o nello spazio inter-cellulare, assume la seguente forma:

$$\frac{S(TE)}{S_0} = fe^{-b \cdot D_1} + (1-f)e^{-b \cdot D_2} \quad (2.36)$$

Bennett et al², invece, proposero un modello multiesponenziale in grado di indagare la distribuzione dei coefficienti di diffusione nei tessuti:

$$\frac{S(TE)}{S_0} = e^{-(b \cdot DDC)^\alpha} \quad (2.37)$$

dove *DDC* sta per *Distributed Diffusion Coefficient* e α è l'indice di eterogeneità del voxel, uguale a 1 se la relazione è mono-esponenziale, inferiore ad 1 in tutti gli altri casi.

Per quanto l'utilizzo di andamenti multiesponenziali possa fornire un'informazione molto più precisa, in realtà è spesso sconsigliabile il loro utilizzo, a causa dell'ambiguità spesso riscontrata nell'interpretazione dei risultati e le numerose potenziali sorgenti d'errore. Inoltre, per essere completamente caratterizzati, richiedono un gran numero di immagini e un sistema di imaging con valore di b molto elevato, con conseguente allungamento dei tempi di acquisizione e aumento del rumore, che domina sul segnale. In linea di massima, è ragionevole assumere un comportamento monoesponenziale nella maggior parte delle applicazioni della DWI in contesti tumorali.

2.3.3 Metodi di analisi delle immagini DW

L'acquisizione dei valori di diffusione è utilizzata per fare comparazioni quantitative fra diversi gruppi come, ad esempio, valutare la risposta alla terapia di popolazioni trattate diversamente, confrontare pazienti sani e malati, seguire le variazioni dei valori di diffusione relativi ad uno stesso paziente nel corso del tempo.

Le metodologie di analisi che si possono condurre sono, in genere, la definizione di una regione d'interesse (ROI) dalla quale estrarre i valori di ADC relativi ad ogni voxel. Su di essi si possono condurre analisi statistiche, in genere il calcolo della media, ma anche di molti altri parametri statistici che diano informazioni sulla forma della distribuzione di tali valori all'interno della regione e che permettano di valutare come essa si modifica nel corso del tempo (ad esempio, seguendo il follow up di un paziente, come avviene in questo studio). Un'idea della forma della distribuzione si può avere realizzando l'istogramma dei dati ricavati dalla ROI, ottenuto graficando il numero di conteggi in funzione dei valori di ADC. Questo tipo di approccio consente di ottenere utili informazioni relative all'eterogeneità del tessuto

selezionato, benché venga a perdersi la conoscenza della collocazione spaziale.

Un metodo alternativo, che conserva questa informazione ed è spesso usato per analizzare tumori al cervello eterogenei, è il *Functional Diffusion Mapping*, che confronta i valori di ADC, provenienti da immagini acquisite in tempi diversi, voxel per voxel, fittandoli con il metodo dei minimi quadrati. Con questo metodo vengono individuati i voxel che modificano significativamente la loro diffusività e vengono generalmente indicati sull'immagine originaria attraverso un codice di colori che indica la natura della loro variazione.

2.3.4 La diffusione anisotropa

Come già evidenziato in precedenza, le molecole d'acqua, che si muovono all'interno di uno spazio in cui sono presenti ostacoli, modificano il loro *path* naturale, circostanza che le porterebbe a discostarsi dalla posizione iniziale isotropicamente. Questo non avviene all'interno di strutture altamente organizzate, dove la diffusione è altamente anisotropa e il coefficiente di diffusione misurato dipende fortemente dalla direzione in cui è applicato il gradiente di diffusione. Poiché la diffusione all'interno di un tumore è tendenzialmente isotropa, nel caso insorga in un tessuto molto strutturato l'alterazione della diffusività può aiutare a delineare meglio il tumore e le sue infiltrazioni. Applicando numerosi gradienti (almeno 6, ma spesso, a seconda dei parametri che si intende calcolare, è necessario utilizzarne molti di più) lungo diverse direzioni non collineari e su piani diversi, si costruisce un tensore \mathbf{D} di valori di ADC che dà informazioni sulla struttura tridimensionale del tessuto. Ad ogni coefficiente corrisponderà il *b value* con il quale è stato ricavato, per cui anche \mathbf{b} sarà in forma di matrice. La tecnica è nota come *Diffusion Tensor Imaging* o DTI. Dal tensore è possibile calcolare molti scalari invarianti per rotazione, di cui i principali sono la traccia, che dà la diffusività totale ed è calcolata dalla somma degli autovalori, la diffusività media, che equivale all'incirca all'ADC calcolato con la DWI e si ottiene dal valor medio degli autovalori e infine la *Fractional Anisotropy* (FA). Quest'ultima è l'indice della variazione della diffusione rispetto alla direzione misurata e può assumere valori compresi tra 0 e 1, nel caso che la diffusione sia isotropa (0) o completamente anisotropa (1).

Capitolo 3

Il progetto

Nel capitolo precedente sono state esposte le nozioni fondamentali relative alle tecniche di imaging a risonanza magnetica nucleare e come queste siano particolarmente indicate per lo studio delle neoplasie, soprattutto per quelle che si sviluppano all'interno di tessuti molli. Questo vale anche e soprattutto per i tumori cerebrali, di cui fa parte il glioblastoma multiforme, che è l'oggetto di studio di questo lavoro di tesi e le cui caratteristiche principali sono state descritte nel capitolo 1. Come già evidenziato in precedenza, la prognosi di questo tipo di patologia è infausta nella maggioranza dei casi, dimostrando la scarsa efficacia del tradizionale protocollo di trattamento²³ e lasciando intendere che persistano tuttora molti aspetti non noti riguardo questa patologia. E' quindi estremamente importante cercare di sviluppare nuovi strumenti di analisi, ma anche vedere di utilizzare in maniera innovativa le sorgenti di informazione già a disposizione nella normale pratica clinica, cosa che si è cercato di realizzare in questo studio.

E' proprio in questo contesto che si inserisce il progetto condotto dall'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia, dedicato alla valutazione di un programma di terapia combinata di pazienti con tumore cerebrale in fase avanzata, che includa l'utilizzo di un innovativo acceleratore lineare ad alto rateo di dose (*flattering filter free*). Lo studio si propone di verificare se la somministrazione di alte dosi/frazione (piano di trattamento ipofrazionato), tramite il metodo del *dose painting*, ovvero un'opportuna redistribuzione della dose sulle diverse aree del tumore (caratterizzato da un'elevata cellularità quindi una maggiore resistenza alla terapia), possa migliorare l'efficacia del trattamento radiante, mantenendo costante la dose sui tessuti sani.

Gli obiettivi primari proposti dal progetto dell'ASMN, all'interno del quale si inserisce il suddetto lavoro di tesi, sono l'analisi della risposta al trattamento valutata sia morfologicamente che quantitativamente. Tutto ciò si intende verificarlo tramite l'applicazione di tecniche di analisi statistica, tra le quali l'utilizzo di indicatori statistici di base in grado di evidenziare e descrivere la risposta al trattamento, cosa che è proprio quanto si è cercato

di fare in questo lavoro di tesi.

3.1 Panoramica del progetto

Il progetto dell'ASMN ha le sue premesse proprio nelle considerazioni relative alla breve sopravvivenza dei pazienti affetti da questa malattia.

A tal proposito, si è deciso di impostare questo lavoro di tesi in due fasi: nella prima, si è voluto verificare il dato negativo associato alla prognosi del glioblastoma multiforme, ovvero la sua tendenza a ripresentarsi, dopo la terapia, nella regione in cui si era sviluppato originariamente. Per fare ciò, è stato selezionato un campione di 20 pazienti, in cura presso l'Arcispedale, affetti da tumore cerebrale di IV grado, che, successivamente al trattamento, avessero manifestato una recidiva.

Poiché la letteratura afferma che tale eventualità è riscontrata nella maggioranza dei casi⁸ (dato confermato anche nel corso di questo studio, nello specifico i risultati verranno mostrati in seguito), constatando che la formazione della recidiva avviene proprio nella regione cerebrale maggiormente trattata, se ne deduce una generale insufficienza dell'iter terapeutico convenzionale, giustificando la sperimentazione di trattamenti alternativi, come quello pianificato nel progetto dell'ASMN di Reggio Emilia precedentemente discusso.

Gli strumenti statistici realizzati in questa sede, implementati per essere utilizzati nell'analisi dei dati dei soggetti che verranno sottoposti alla procedura sperimentale, sono stati testati, durante questo lavoro, su un campione di sei pazienti selezionati tra quelli trattati presso l'Arcispedale Santa Maria Nuova.

Da qui è partita la seconda fase del progetto: i pazienti del secondo campione (la descrizione di entrambi i campioni verrà fornita in maniera dettagliata nel capitolo seguente) sono stati selezionati sulla base delle loro caratteristiche patologiche (dovevano essere affetti da tumore cerebrale di alto grado, III o IV secondo la classificazione WHO) e sulla tipologia di imaging disponibile. L'obiettivo preposto è appunto quello di monitorare l'intera evoluzione del tumore dalla fase pre-terapia per tutte quelle successive attraverso l'analisi dei dati forniti dalle acquisizioni di *follow up*.

Le tecniche di imaging a risonanza su cui ci si è prevalentemente concentrati sono state le acquisizioni pesate in T1 e quelle in diffusione, ma tale scelta è stata esclusivamente di carattere pratico (elevata disponibilità di immagini acquisite con queste modalità), in quanto è facilmente estensibile a qualsiasi altra tipologia di acquisizione.

L'idea portante di questo studio è consistita nel verificare se fosse possibile trovare degli indicatori statistici attendibili dell'evoluzione della malattia, attraverso l'analisi delle informazioni provenienti da alcuni metodi di imaging a risonanza magnetica. L'importante consiste soprattutto nel cercare

di leggere nuove informazioni da tecniche già note e di uso comune nella pratica clinica corrente, ma che potrebbero non essere ancora state sfruttate al pieno delle loro potenzialità. Questo consente di ottimizzare le procedure standard, senza appesantire né il medico né il paziente di ulteriori esami.

3.2 La selezione del campione

La selezione di un campione per la prima fase del progetto non si è rivelata eccessivamente complicata: sono stati arruolati pazienti affetti da GBM, che avessero manifestato una recidiva nel corso del *follow up* successivo alla terapia. Tutti i pazienti trattati dispongono di un *treatment planning*, con annessa mappa di dose e geometria delle strutture circoscritte dal medico-radioterapista; con strutture si intendono i volumi di tessuto che identificano la regione tumorale (GTV, CTV, PTV), che deve ricevere, in linea di principio, la massima dose pianificata, o gli OAR (*Organs At Risk*)¹¹¹⁹, che, sempre in linea teorica, non dovrebbero ricevere alcuna dose. Ovviamente, ciò non è possibile, perciò è necessario raggiungere un compromesso ed erogare la dose di radiazione in modo da colpire *il più possibile* i primi e *il meno possibile* i secondi.

L'unica circostanza che ha obbligato ad escludere qualche paziente, è stata la mancata delineazione, per alcuni, della regione in cui si è sviluppata la recidiva nel corso del *follow up*.

Per la seconda fase dello studio, invece, l'arruolamento di pazienti idonei si è rivelato molto più complesso, poiché è stato necessario scegliere pazienti, affetti da tumore cerebrale di alto grado (HGG), che disponessero di una serie, più o meno lunga, di acquisizioni per entrambe le tecniche, in modo da poterne seguire il *follow up* e valutare le modificazioni dei valori dei parametri nel tempo. I pazienti selezionati in questo caso sono sei, poiché è decisamente più difficile, per questo tipo di analisi, disporre di un ampio campione che corrisponda alle caratteristiche desiderate. Le limitazioni sono prevalentemente dovute alla scarsa disponibilità di pazienti con un numero sufficiente di acquisizioni e alle modalità con cui queste sono state ottenute: infatti, lo studio condotto è retrospettivo e ha sfruttato esami, in forma anonima, prelevati dall'archivio dell'Arcispedale di Reggio Emilia, senza aver potuto impostare una selezione a priori del campione e una pianificazione delle modalità di acquisizione. A questo si aggiungono problemi tecnici dovuti all'operazione di registrazione delle immagini (che, in alcuni casi ne inficia la qualità in maniera non accettabile), oltre al fatto che, fortunatamente, si tratta di una patologia rara, quindi con un ridotto numero di casi.

Nonostante ciò, si è riusciti ad individuare sei pazienti, che sono stati suddivisi in tre categorie principali:

- pazienti che manifestano recidiva e hanno un breve *follow up* (quindi con patologia particolarmente aggressiva, a rapido decorso)
- pazienti con recidiva, ma con prolungato *follow up* (lungoviventi)
- pazienti che, dopo il trattamento, non hanno manifestato ricadute e sono, a tutti gli effetti, considerati guariti.

L'obiettivo dell'analisi è stato quello di monitorare, per ogni paziente, gli andamenti di un certo numero di parametri statistici ritenuti significativi, allo scopo di verificare se presentano comportamenti diversi a seconda dell'evoluzione post-trattamento della patologia.

3.3 La selezione delle ROI

Il calcolo dei parametri statistici è stato eseguito sui dati prelevati da specifiche regioni di interesse (ROI), in particolare ne sono state considerate due, che circoscrivono in maniera diversa la zona patologica e sono note con il nome di CTV (*Clinical Target Volume*) e GTV (*Gross Tumor Volume*). La definizione di queste strutture è spesso controversa, a causa del carattere infiltrativo della patologia; in genere per GTV si intende la regione ad alto contrasto nelle immagini pesate in T1, mentre per il CTV ci sono due approcci possibili: uno geometrico, che estende semplicemente il contorno del GTV di 2-3 cm al fine di includere eventuali infiltrazioni di cellule tumorali nei tessuti, non quantificabili attraverso le attuali tecniche di imaging, oppure uno anatomico, che include all'interno del CTV tutta la regione edematosa che circonda il tumore solido e risulta iperintensa nelle immagini pesate in T2¹¹.

I volumi maggiormente utilizzati per le analisi statistiche sono il CTV e il GTV definiti dal medico-radiologo durante la pianificazione del trattamento. Si è impostato anche un altro tipo di metodo per circoscrivere le regioni da esaminare, che consiste in una loro segmentazione automatica, che sfrutta il diverso contrasto prodotto dal tumore solido e dalla regione edematosa, tra immagini pesate in T1 e in T2.

Entrambi gli approcci sono stati attuati tramite l'utilizzo di un software dedicato, appositamente realizzato durante questo lavoro di tesi e che verrà ampiamente discusso nel prossimo capitolo.

Una volta individuate le ROI, sono state estratte le distribuzioni dei valori dei pixel in esse contenuti e ne è stata monitorata l'evoluzione nel corso del *follow up*, attraverso il calcolo di una selezione di parametri statistici, al fine di verificare quali di essi risultassero maggiormente indicativi, ad un'analisi preliminare, dei cambiamenti nella conformazione delle distribuzioni durante il decorso della patologia.

3.4 I parametri statistici e la *Texture Analysis*

Finora si è parlato di analisi delle distribuzioni dei pixel: in realtà, non si tratta di una definizione precisa, poiché ciò con cui si ha a che fare sono istogrammi, rappresentazioni discrete delle distribuzioni dei valori dei pixel all'interno della frazione del volume totale considerata.

Su di essi vengono calcolati una serie di parametri e grandezze, scelti sulla base di considerazioni statistiche oppure fra quelli più frequenti negli studi riguardanti la *texture analysis*⁹²⁷, tema che verrà approfondito nei successivi paragrafi.

Questi dati sono:

- Media
- Varianza
- Skewness
- Kurtosis
- Moda
- Errore Standard della media
- Rapporto deviazione standard-media
- Uniformità
- Entropia

Media, varianza, skewness e kurtosis sono i primi quattro momenti di una distribuzione e rientrano nella “statistica descrittiva”; com'è noto la media è calcolata come:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (3.1)$$

mentre la varianza è data da:

$$\sigma^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (3.2)$$

dove x_i rappresenta il valore di ogni pixel dell'immagine (si è scelta la formulazione con $N-1$ al denominatore, poiché non è noto a priori il valore di \bar{x} , ma è stimato dai dati; al contrario bisognerebbe sostituire $N-1$ con N). La deviazione standard σ è la radice quadrata della varianza, mentre l'errore standard (uno stimatore più robusto rispetto al precedente) è calcolato come $\frac{\sigma}{\sqrt{N}}$.

Skewness e kurtosis sono momenti centrali di terzo e quarto ordine che rappresentano rispettivamente quanto sia simmetrica e piccata una distribuzione in esame rispetto ad una gaussiana standard. Sono calcolate come:

$$Skw = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left[\frac{x_i - \bar{x}}{\sigma} \right]^3 \quad (3.3)$$

$$Krt = \left\{ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left[\frac{x_i - \bar{x}}{\sigma} \right]^4 \right\} - 3 \quad (3.4)$$

e sono entrambe adimensionali.

La skewness è positiva quando la distribuzione ha una coda che si estende verso i valori positivi delle x , viceversa risulterà negativa; è uguale a zero per distribuzioni simmetriche, come la gaussiana.

Anche la kurtosi varia tra valori positivi e negativi, approssimandosi allo zero per distribuzioni normali; assume valori tanto più positivi quanto più la distribuzione è piccata (*leptokurtica*), viceversa, se risulta più appiattita di una gaussiana, la kurtosi sarà negativa e la distribuzione è definita *platikurtica*.

L'errore standard associato a questi parametri, nel caso idealizzato di distribuzione gaussiana e media non nota a priori, ma stimata dal campione, è $\sqrt{\frac{6}{N}}$ per la skewness e $\sqrt{\frac{24}{N}}$ per la kurtosis, anche se nei casi reali si tratta in genere di errori molto sottostimati.

L'ultimo parametro annoverato tra i descrittori statistici è la moda, che rappresenta il valore di x_i che ricorre con maggior frequenza all'interno della distribuzione.

Tutte le grandezze citate finora sono state calcolate tramite funzioni di Matlab, mentre il rapporto tra deviazione standard e media è risultato dalla semplice divisione dei due valori precedentemente calcolati.

Uniformità ed entropia sono, invece, due grandezze spesso utilizzate in *texture analysis*, calcolate dall'istogramma dell'immagine esaminata. Sono definiti come:

$$U(x) = \sum_{i=1}^N p^2(x_i) \quad (3.5)$$

$$S(x) = - \sum_{i=1}^N p(x_i) \log_2(p(x_i)) \quad (3.6)$$

dove $p(x_i)$ rappresenta la frequenza con cui si presenta un certo valore x_i all'interno dell'istogramma. L'uniformità assumerà valore massimo 1 nel caso

in cui i livelli di grigio dell'immagine siano tutti popolati allo stesso modo; al contrario, poiché l'entropia è una misura di variabilità, per immagini "costanti" sarà uguale a 0.

La *texture analysis* è un metodo d'indagine di relativamente recente introduzione, che viene applicato alle immagini digitali al fine di estrarre caratteristiche e proprietà (*features*) della sua *texture*. Non esiste una definizione rigorosa di *texture*, ma può essere considerata come un indicatore che descrive le proprietà della "trama" dell'immagine, dandoci informazioni relative alla disposizione spaziale delle intensità o dei colori.

Gli approcci possibili sono tre:

- Statistico: la *texture* viene caratterizzata descrivendo il livello di levigatezza (*smoothness*), grossolanità (*coarseness*) o regolarità (*regularity*) di un'immagine; è una misura quantitativa della dislocazione delle intensità dei pixel dell'immagine, stimata tramite il calcolo di parametri statistici. È il metodo più utilizzato per la generalità dei suoi risultati e la semplicità del calcolo.
- Strutturale: si basa sul riconoscimento di pattern all'interno della *texture* dell'immagine, individuati, ad esempio, dalla ricorrenza di determinate strutture geometriche ripetute. È come se si trattasse di circoscrivere N *texture* primitive (*texels*), che, combinate insieme, diano origine al pattern complesso che costituisce l'immagine.
- Spettrale: è indicato per descrivere la direzionalità o la periodicità di particolari pattern all'interno dell'immagine, che si manifestano con punti particolarmente luminosi dello spettro di Fourier dell'immagine stessa.

Nel corso di questo studio preliminare, si è prediletto l'approccio statistico: tutti i parametri esposti finora, non solo uniformità ed entropia, sono tra i più frequentemente utilizzati anche in *texture analysis* per un approccio di base.

Un dato interessante che è stato riscontrato e che è stato il perno su cui si è fondato questo studio è una modificazione dell'istogramma di una medesima regione patologica, nel corso del tempo, nel caso di riformazione della recidiva della malattia, piuttosto che in condizioni di guarigione o di tessuto sano, che sono state quantificate tramite i parametri prima elencati. Si specifica che, caso delle immagini T1, a differenza delle DWI, non sono state prese in considerazione media e moda, poiché sono grandezze correlate prettamente al valore assunto dai pixel della regione e non dalla forma della distribuzione. Questo fatto diventa un problema per tale tipologia di acquisizione, a causa della mancanza di significato fisico dei valori associati ai pixel che costituiscono l'immagine: infatti si tratta di "valori macchina",

che, pur basandosi sui principi fisici dei tempi di rilassamento, sono condizionati da costanti di proporzionalità e parametri di acquisizione del sistema di imaging, che possono rendere i valori numerici ottenuti ingiustificatamente differenti tra un'immagine e l'altra. Questo diversamente dalle acquisizioni DW, che sono in grado di associare ad ogni pixel un valore di ADC, che è, di per sé, una grandezza fisica.

Per completezza, si specifica che esiste anche un altro tipo di strategia per fare *texture analysis*, che non è stata messa in atto direttamente in questa sede, poiché si tratta di un metodo più sofisticato e non pienamente applicato nel campo dell'imaging radiologico. Benché quanto ottenuto nel corso di questo studio sembri incoraggiante, è bene tener presente che la statistica è estremamente esigua e non consente di fare considerazioni di carattere generale, ma solo preliminari. D'altronde, lo scopo di questo lavoro è stato la realizzazione di una metodica d'indagine e di strumenti di analisi, la loro applicazione per l'ottenimento di risultati statisticamente significativi richiede una pianificazione a lungo termine che non era possibile far rientrare temporalmente all'interno questo studio.

Ad ogni modo, qualora quanto evidenziato venga effettivamente confermato, l'intenzione è di sviluppare anche la parte del progetto dedicata alla *texture analysis*, ovvero procedere attraverso l'analisi statistica non del semplice istogramma dell'immagine (in questo caso un'immagine 3D, ovvero il volume di tessuto patologico), ma della sua **matrice di co-occorrenza**, ovvero una matrice che immagazzina l'informazione relativa alla dislocazione spaziale delle intensità dei pixel all'interno della regione considerata, secondo una certa relazione Q di vicinanza, stabilita a priori.

A questo punto, la matrice sulla quale vengono calcolati i descrittori statistici (che possono essere, di nuovo, uniformità ed entropia, ma anche omogeneità, correlazione, contrasto, probabilità massima) sarà quella di co-occorrenza. Sarà interessante verificare se i risultati ottenuti attraverso l'approccio tradizionale potranno essere smentiti o migliorati tenendo conto anche della dislocazione spaziale dei pixel all'interno del volume.

3.5 La correlazione statistica

Una volta ricavati i parametri statistici d'interesse, si è provveduto a visualizzarne l'andamento nel corso del tempo, paziente per paziente, mettendo a confronto i valori ottenuti nelle due strutture selezionate, che circoscrivono l'area patologica (CTV e GTV). E' opportuno segnalare una limitazione, che in parte condiziona l'indagine, legata alla consequenzialità temporale delle immagini analizzate e risulterà più chiara nel Capitolo 5: infatti, sempre per i motivi citati in precedenza, la mancata pianificazione delle acquisizioni per i vari pazienti comporta una non sempre disponibilità degli esami d'interesse

cadenzati con la medesima frequenza temporale, o perché mancanti, o perché acquisiti con apparecchiature con risoluzione inferiore. Inoltre, bisogna ricordare che, a tutt'oggi, un protocollo di acquisizione così cadenzato non rappresenta lo standard clinico riconosciuto per tale patologia. Questo implica che, nonostante vengano ovviamente analizzate in ordine cronologico, l'intervallo temporale tra acquisizione e acquisizione sia variabile, impedendo il confronto diretto tra pazienti diversi, ma solo all'interno di un medesimo paziente.

Consapevoli di queste criticità, si è proceduto ad un confronto degli andamenti dei parametri statistici ricavati da CTV e GTV di uno stesso paziente, in modo che il numero di punti (ovvero il numero di esami di *follow up*) fosse il medesimo e le acquisizioni avessero la stessa distanza temporale l'una dall'altra.

Il confronto è avvenuto valutando il loro livello di correlazione tramite test parametrici e non parametrici, come il coefficiente di correlazione lineare di Pearson e le *rank correlation* di Spearman e di Kendall. Questo al fine di confermare o smentire l'esistenza di una correlazione significativa ($P < 0.05$), tra l'evoluzione dei valori assunti dai parametri statistici in esame.

Questi test valutano l'associazione tra variabili ordinali o continue e assumono valore 1 per perfetta correlazione, -1 per perfetta anticorrelazione e prossimo a 0 in caso di non correlazione. Per tutti e tre i test, l'ipotesi nulla è quella di non associazione tra i due set di dati.

Il coefficiente r di Pearson è calcolato come:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}} \quad (3.7)$$

dove x_i e y_i sono gli elementi delle curve a confronto (ovvero gli andamenti dei parametri statistici in esame), mentre la significatività p è calcolata come:

$$t = r \sqrt{\frac{N-2}{1-r^2}} \quad (3.8)$$

Questo test è un buon metodo per verificare la forza di una correlazione nel caso ne si conosca già l'esistenza, ma non si dimostra una statistica particolarmente robusta qualora questa correlazione sia da stabilire o si voglia valutarne la forza rispetto ad un'altra. Si è deciso perciò di affiancarlo ad altri due metodi, in questo caso non parametrici, per confermarne i risultati.

Le correlazioni non parametriche o di *rank* si basano sulla sostituzione del valore di ogni elemento x_i del campione con il suo *rank* (rango) rispetto a tutti gli altri elementi: ciò si traduce nell'associargli un numero di 1 a N a seconda della posizione che occuperebbe all'interno del set di elementi se questo fosse ordinato.

Nel caso della statistica di Spearman, il coefficiente di correlazione è definito come il coefficiente di correlazione lineare fra i *rank*, il che si traduce

in:

$$r_s = \frac{\sum_i (R_i - \vec{R})(S_i - \vec{S})}{\sqrt{\sum_i (R_i - \vec{R})^2} \sqrt{\sum_i (S_i - \vec{S})^2}} \quad (3.9)$$

con R_i e S_i ranghi associati ai vari elementi del campione.

La significatività di un valore diverso da zero si quantifica con:

$$t = r_s \sqrt{\frac{N-2}{1-r_s^2}} \quad (3.10)$$

E' evidente come le equazioni 3.9 e 3.10 abbiano la medesima forma delle equazioni 3.7 e 3.8.

L'ultimo metodo utilizzato, il calcolo del τ di Kendall, è ancora più “non-parametrico”, poiché, invece di basarsi sulla differenza dei *rank*, si serve solo dell'ordine relativo fra gli elementi del campione, ovvero ciascuno di essi può essere maggiore, minore o uguale al precedente, eliminando quindi anche la necessità di assegnare i ranghi. Ad ogni modo, questo test non risulta particolarmente diverso dal precedente, i coefficienti r_s e τ sono fortemente correlati tra loro e in alcune applicazioni risultano essere, a tutti gli effetti, lo stesso test.

Supponendo di dover valutare la correlazione di due campioni x e y , si considerino N punti di coordinate (x_i, y_i) e si confrontino $\frac{1}{2}N(N-1)$ coppie di questi punti, valutando se sono *concordi* (ovvero, l'ordine relativo tra i *rank* dei due x_i è uguale a quello dei due y_i) o *discordi* (se vale il viceversa). Nel caso in cui o i ranghi dei due x_i o quelli dei due y_i risultassero uguali, alla coppia non viene assegnata nessuna delle due classificazioni, ma vengono battezzati rispettivamente “coppia y extra” e “coppia x extra”; il coefficiente τ viene così calcolato:

$$\tau = \frac{\text{concordi} - \text{discordi}}{\sqrt{\text{concordi} + \text{discordi} + \text{extra } y} \sqrt{\text{concordi} + \text{discordi} + \text{extra } x}} \quad (3.11)$$

Ulteriori indagini statistiche, ad esempio per verificare l'esistenza di differenze significative tra individui con decorsi patologici diversi (si vedano le tre categorie esposte precedentemente), non sono state effettuate per la disponibilità di soli due esponenti per gruppo.

Capitolo 4

Materiali e Metodi

4.1 I campioni

Come già accennato nel precedente capitolo, questo studio si è svolto in due fasi successive, ricorrendo a due diversi campioni di pazienti: il primo costituito da 18 pazienti con diagnosticato tumore cerebrale di quarto grado, che dopo il trattamento, hanno manifestato una recidiva. Il campione è composto da 12 uomini (67 %) e 6 donne (33 %) (controllare) con età media, all'epoca della diagnosi, rispettivamente di 55,1 e 61.3 anni. Tutti hanno subito l'iter terapeutico standard con resezione chirurgica, trattamento radioterapico e chemioterapia. Un riassunto delle principali informazioni relative al campione è mostrato in Tabella 4.1.

Il secondo campione è, invece, composto da 6 pazienti, con diagnosticato HGG (*High Grade Glioma*), di III o IV grado, che disponessero di un sufficiente numero di acquisizioni di *follow up* (compatibilmente con la sopravvivenza del paziente), pesate in T1 e DW. Un riassunto delle principali informazioni relative al campione è mostrato in Tabella 4.2.

4.2 Fasi del progetto

4.2.1 Studio delle distribuzioni di dose: il software DAS

Come già spiegato nel Capitolo 1, la tendenza del glioblastoma multiforme a manifestare una recidiva, per di più in prossimità della regione maggiormente trattata, è elevatissima, nell'ordine del 90-95% dei casi. Lo scopo della prima parte di questo studio è stato confermare questi dati forniti dalla letteratura [inserire fonti] su un campione di pazienti selezionato presso l'ASMN.

A tale scopo, durante questo lavoro di tesi, è stato realizzato un software dedicato, in linguaggio Matlab (by The MathWorks, Inc.), che denominato DAS (*Dose Analyzer Software*). Per ogni paziente si è fatto ricorso alle CT di centratura, acquisite in fase di pre-trattamento radioterapico, sulle quali

Pz	Sesso	Età	D. N. (Gy)	95% D. N. (Gy)
1	M	77	60	57
2	F	55	60	57
3	M	47	60	57
4	M	24	60	57
5	F	66	60	57
6	M	62	60	57
7	M	52	60	57
8	F	65	60	57
9	M	55	60	57
10	M	62	30	28.5
11	M	53	60	57
12	F	39	60	57
13	F	78	25	23.8
14	M	62	60	57
15	M	69	25	23.8
16	M	42	60	57
17	F	65	60	57
18	M	56	60	57

Tabella 4.1: Elenco dei soggetti affetti da GBM e trattati secondo il protocollo Stupp, selezionati per lo studio della distribuzione di dose nella regione della recidiva. I pazienti vengono individuati con degli indici (colonna *Pz*; a fianco sono riportati sesso, età, dose nominale D.N. pianificata per il trattamento e il valore soglia del 95% della dose nominale

vengono disegnate le strutture (CTV, GTV, recidiva, ma anche gli OAR, ovvero gli organi a rischio) e vengono simulate le distribuzioni di dose del trattamento radiante¹⁹. Il programma riceve in input una variabile *cell array*, detta `planC`, realizzata per ogni paziente attraverso un altro software, CERR (*Computational Environment for Radiotherapy Research*), sempre in linguaggio Matlab, disponibile in rete. Ogni `planC` contiene un certo numero di `struct` (di solito sono 21 o 22 a seconda del paziente, anche se nella maggior parte dei casi non vengono sfruttate tutte), che raccolgono informazioni diverse a seconda del tipo di immagini che vi vengono immagazzinate. Ognuna di queste strutture è dedicata ad un genere di informazioni diverso, dai dati relativi al paziente, ai dettagli sul trattamento, ma le `struct` più importanti sono la numero 3, che comprende i set di acquisizioni, la 4, che raccoglie tutte le caratteristiche relative a posizione e geometria delle strutture e la 9, contenente dati solo nei `planC` realizzati per immagini CT, che gestisce le informazioni sulla mappa di dose.

CERR è un software dalle molteplici funzioni: è in grado di importare e

Pz	Sesso	Età	WHO	# f.u.	Sopravv (mesi)
1	M	62	IV	9 (DWI e T1)	25 (tuttora in vita)
2	F	45	IV	4 (DWI e T1)	8 40
3	M	64	IV	6 (DWI)-8 (T1)	(tuttora in vita)
4	M	52	IV	6 (DWI e T1)	22 (tuttora in vita)
5	M	43	III	10 (DWI e T1)	65 (tuttora in vita)
6	M	56	IV	5 (DWI e T1)	9

Tabella 4.2: Elenco dei soggetti affetti da HGG, selezionati per lo studio del decorso della patologia da prima a dopo il trattamento. I pazienti vengono individuati con degli indici (colonna *Pz*; a fianco sono riportati sesso, età, grado del tumore, numero di acquisizioni disponibili, presenza delle immagini pre-terapia e immediatamente successive (prima acquisizione dopo il trattamento), intervallo temporale medio intercorso tra un'acquisizione e l'altra e sopravvivenza del paziente, calcolata come periodo di tempo trascorso tra l'epoca della diagnosi e l'ultimo esame effettuato.

mostrare piani di trattamento per una gran quantità di sistemi di *treatment planning*, sia commerciali che di utilizzo accademico (nel caso in esame, le immagini sono in formato DICOM). Tramite il comando Import (vedi Figura 4.1), CERR crea un unico oggetto (*planC*, appunto) che contiene tutte le sequenze dell'acquisizione CT insieme ai dati relativi alle strutture e alla mappa della dose erogata ai tessuti. Il comando Viewer consente di visualizzare le sequenze sui tre diversi piani (assiale, sagittale, coronale), di sovrapporre la CT e la mappa di dose oppure due acquisizioni qualsiasi, diverse per tipologia o per momento in cui sono state realizzate. In Figura 4.2, è riportato il primo caso: la CT di un paziente è mostrata sovrapposta, nei diversi piani, alla mappa di dose e ai contorni delle strutture; lo strumento consente di regolare la trasparenza della mappa e dell'immagine tomografica una rispetto all'altra e di visionare tutte le strutture contemporaneamente o solo alcune d'interesse (elencate nel pannello in basso a destra). Inoltre, permette di modificare le opzioni di visualizzazione delle immagini, attraverso lo zoom, la variazione dell'intervallo di livelli di grigio (tramite i comandi Window, Center e Width), la colormap con cui visualizzare la CT e di scorrere tra le varie *slice* dell'acquisizione tramite i bottoni S+ e S-.

In Figura 4.3, è, invece, visibile il secondo esempio, ovvero la sovrapposizione di due immagini dello stesso soggetto acquisite con metodiche diverse. CERR è in grado di effettuare una registrazione automatica delle immagini e permette di correggere eventuali imprecisioni con il pannello di comandi visibile a sinistra nell'immagine. Nonostante ciò, per questo studio, si è deciso di affidare l'allineamento delle immagini a Plastimatch, un software dedicato per queste operazioni, come verrà approfondito nel paragrafo successivo.

CERR consente di effettuare anche molte altre operazioni, come disegnare manualmente ROI che verranno inserite all'interno del piano come nuove strutture, oppure valutazioni del piano di dose, calcolo del DVH, DLH (*Dose Location Histogram*) e IVH (*Intensity Volume Histogram*), realizzare piani di trattamento e molto altro, su cui però non ci si dilungherà ulteriormente, poiché trascende dalle finalità di questo lavoro.

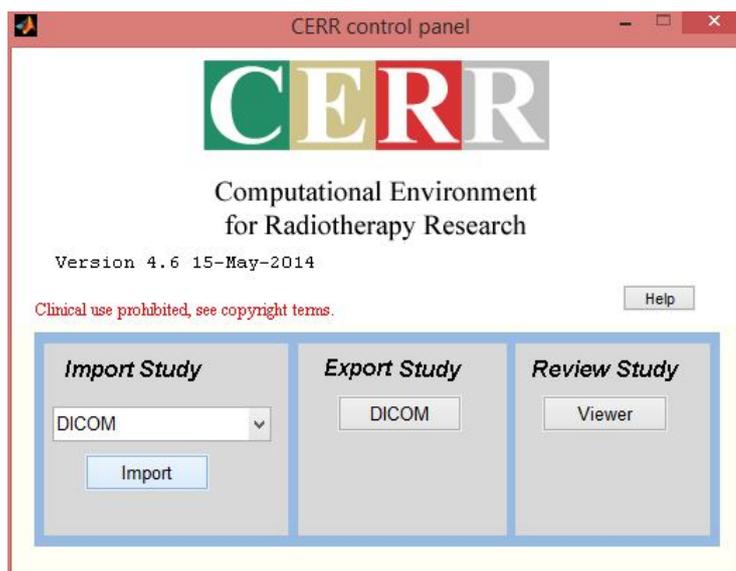


Figura 4.1: Pannello di controllo di CERR: a sinistra è visibile il comando per l'importazione di un set di immagini DICOM, che conduce alla produzione del `planC`, al centro quello per l'esportazione di un piano di trattamento realizzato su CERR e l'ultimo permette di visualizzare le acquisizioni contenute nel `planC` precedentemente ottenuto

Una volta ricavati gli oggetti `planC` per ogni paziente selezionato, il DAS consente di analizzare in blocco tutto il campione di pazienti, in maniera sequenziale.

Vengono realizzate due matrici tridimensionali, la prima che contiene la

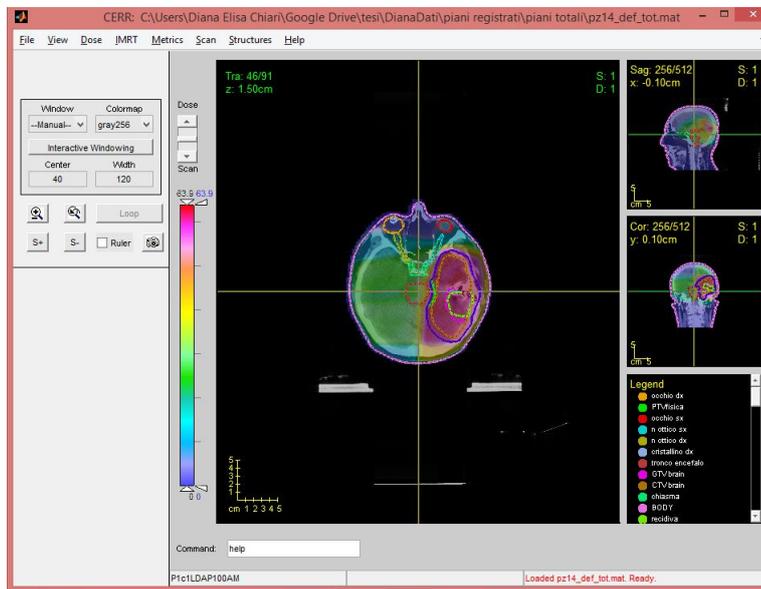


Figura 4.2: Pannello di lavoro della modalità *Viewer*: è mostrata l'immagine di una CT con sovrapposta la mappa di dose del piano di trattamento e le strutture disegnate dal medico-radioterapista.



Figura 4.3: Pannello di lavoro della modalità *Viewer*: è visibile un esempio di sovrapposizione di due immagini dello stesso soggetto, acquisite con modalità differenti, in questo caso CT e DWI. CERR attua automaticamente la registrazione delle immagini, ma consente anche correzioni manuali tramite i comandi nel pannello a sinistra della finestra di visualizzazione

mappa di dose su tutto il volume della CT e l'altra, binaria, che rappresenta la maschera della recidiva, sempre realizzata su tutto il volume. Quest'ultima deve essere "registrata nello spazio della dose", ovvero ridimensionata in modo da avere la stessa risoluzione della matrice che contiene la mappa di dose; infatti, la dimensione delle immagini CT (su cui vengono disegnate le strutture) è 512×512 pixel, mentre per la mappa è 99×82 pixel. Queste due matrici sono gli argomenti di una funzione realizzata ad hoc, *histRec*, che le moltiplica (operazione corrispondente all'AND logico) e ha il compito di realizzare l'istogramma complessivo di tutti i dati del volume risultante, insieme a tutta una serie di altre possibili operazioni selezionabili all'occorrenza, che verranno approfondite nel paragrafo seguente. In questo caso, restituisce l'istogramma della distribuzione della dose all'interno del volume e realizza il DVH (*Dose-Volume Histogram*): quest'ultimo è un istogramma che correla la dose di radiazione pianificata nel *treatment planning* con il volume di tessuto irraggiato, cioè mostra quanta percentuale di tessuto riceve una certa dose. Nel nostro caso, il volume esaminato è quello della recidiva ed è possibile capire quanta parte di quest'ultimo (prima della rimanifestazione della malattia) avesse ricevuto una dose $>$ del 95% di quella nominale, ovvero quella stabilita nel piano di trattamento. Questo permette di farsi un'idea della qualità del trattamento e se la comparsa della recidiva possa essere imputata ad un irraggiamento insufficiente.

Il software registra, per ogni paziente, il nome della struttura che contrassegna la recidiva (non c'è omogeneità nella denominazione delle strutture e possono esserci alcune differenze da paziente a paziente), le dosi massima e minima erogate e i dati relativi alle frazioni di tessuto colpite dai diversi valori di dose, salvandoli nel file di testo "isodose_curves.txt"; inoltre, restituisce in output una matrice riassuntiva dei dati del campione, contenente l'indice numerico associato al paziente, affiancato dalla dose nominale pianificata, dal 95% della stessa (indicato come valore soglia, ovvero, per irraggiamenti del tessuto target uguali o superiori a questa dose, la zona si possa considerare correttamente trattata [fonti]) e dalla percentuale di volume colpita da una quantità di radiazione maggiore o uguale al 95% della D.N.

4.2.2 Analisi del *Follow Up*: il software ROISAT

Come già discusso nel precedente capitolo, i risultati riportati da quest'indagine, relativamente alla distribuzione della dose rispetto al volume in cui si presenta la recidiva, confermano gli scarsi dati di controllo riportati dalla letteratura. Vista la scarsa conoscenza delle modalità con cui si verifica una recidiva di questa forma tumorale, ci si è posti l'obiettivo di seguire l'evoluzione di un set di pazienti, ai quali fosse stato diagnosticato un glioblastoma o in generale un tumore di alto grado (quindi III o IV, secondo la classificazione WHO). La scelta di includere entrambi i tipi di HGG è dovuta alle

difficoltà nel recuperare un numero sufficiente di soggetti affetti da GBM, che disponessero di un numero accettabile di sequenze di *follow up*; questa estensione è stata comunque ritenuta ragionevole, poiché non ci si attendono sostanziali differenze nel comportamento, sia in assenza che in presenza di malattia, delle distribuzioni dei valori delle immagini di risonanza, tra i due gradi della neoplasia. Le caratteristiche dei pazienti del campione sono mostrate in Tabella 4.2.

La selezione dei pazienti è avvenuta sulla base di una distinzione empirica tra tre tipologie di soggetti affetti da HGG: quelli che manifestano una forma particolarmente aggressiva e, dopo la terapia, ripresentano in poco tempo una recidiva, che determina una sopravvivenza molto breve (inferiore ad un anno), quelli che dopo la terapia hanno una ricaduta, ma in tempi più lunghi e con minore virulenza, permettendo una sopravvivenza prolungata (superiore ai due anni) e infine, i pazienti che dopo il trattamento non ricadono e vengono considerati liberi da malattia.

L'osservazione delle distribuzioni dei valori dei pixel delle immagini MR pesate in T1 e in diffusione, prelevate dalle ROI CTV e GTV che circoscrivono l'area patologica, ha mostrato delle evidenti modificazioni nel corso dell'evoluzione della patologia, diverse a seconda che l'individuo considerato rientri in una delle tre categorie distinte precedentemente; ci si è, quindi, posti l'obiettivo di creare degli strumenti e un metodo di analisi, che permettesse di seguire queste evoluzioni e di quantificare gli *shift* e le alterazioni degli istogrammi nel corso del tempo attraverso il calcolo di un set di parametri statistici e non, che potessero risultare indicativi.

Questa idea ha condotto alla creazione di un secondo software, ROISTAT (*Region Of Interest Statistical Analysis Tool*), sempre in linguaggio Matlab, la cui interfaccia è mostrata in Figura 4.4.

Questo *tool* è stato realizzato in due versioni; la prima è completamente automatica ed è stata quella principalmente utilizzata in questo studio: riceve come argomento il `planC` del paziente esaminato e da esso seleziona il set di immagini di risonanza su cui si desidera condurre l'indagine. Dopodiché circoscrive i volumi dai quali prelevare i dati, servendosi delle strutture, anch'esse presenti nella variabile `planC`, che, nel nostro caso, saranno il CTV e il GTV delineati dal medico (ma il software permette di selezionare qualsiasi altra struttura).

I volumi d'interesse vengono definiti sulla base dell'acquisizione pre-terapia e mantenuti inalterati per tutte le altre acquisizioni di *follow up*: questo procedimento ha i suoi vantaggi, poiché consente di esaminare l'evoluzione di una stessa porzione di tessuto nel corso del tempo. È un sistema generalmente accettabile, proprio in conseguenza a quanto affermato in precedenza, relativamente alla tendenza della recidiva a ripresentarsi nella stessa regione in cui si era inizialmente formato il tumore. Ovviamente esistono le eccezioni e una di queste è presente anche nel campione selezionato (Pz no. 4 nella Tabella 4.2), in cui la recidiva si sviluppa alla periferia

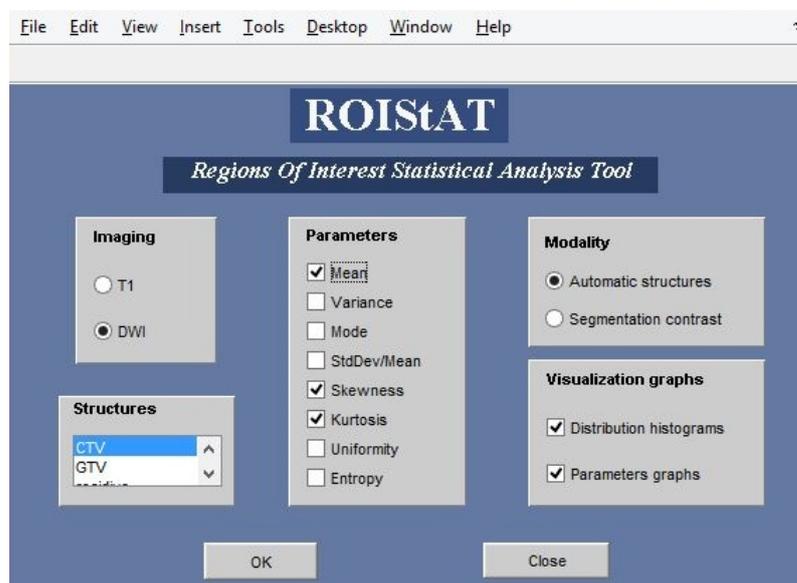


Figura 4.4: Interfaccia del software ROISAT realizzato in questo lavoro di tesi per l'analisi statistica dei dati provenienti dalle immagini di risonanza. Una volta selezionato il **planC** del paziente da esaminare, selezionando la cartella "Open" che si trova dentro "File", si può scegliere la tipologia di imaging che si vuole analizzare (per il momento la scelta disponibile è solo tra T1-weighted e DWI, ma verrà ampliata per consentire un utilizzo più generale), la struttura dalla quale estrarre i dati, quale dei parametri statistici si desidera calcolare e se si vogliono visualizzare i grafici degli andamenti dei parametri e/o quelli degli istogrammi nel corso del *follow up*. Si noti che è già presente la scelta tra l'utilizzo delle strutture automatiche e quelle segmentate sulla base del contrasto: in realtà la funzione è provvisoria e deve essere ancora completata.

della neoplasia iniziale e si espande in tutto il tessuto circostante. Il metodo condotto dal ROISAT non è quindi sufficiente ed è stata sviluppata una variante, che permette di selezionare i volumi di interesse sulla base del contrasto prodotto nelle immagini T1.

Anche questo strumento è stato sfruttato in alcune fasi di questo progetto, ad esempio nel caso del paziente citato e per l'indagine condotta sulle immagini T1, poiché ha consentito di ottenere risultati più precisi rispetto all'altro sistema. Si sta lavorando per generalizzare l'applicazione a qualsiasi risoluzione d'immagine e paziente. Una implementata questa funzionalità si confida possa diventare un interessante strumento che potrebbe affiancare il medico-radioterapista nella definizione dei volumi durante la pianificazione dei trattamenti. L'obiettivo finale è rendere i due moduli di ROISAT uno strumento unico che consenta di passare da una modalità all'altra a seconda dell'esigenza, selezionando ROI già esistenti o realizzandone di nuove, tramite la segmentazione delle immagini condotta sulla base del contrasto e

producendo in tempo reale un'analisi statistica della regione.

Entrambi i moduli del software forniscono in output i parametri calcolati sull'istogramma dei valori estratti dai volumi d'interesse: questi vengono ricavati da ognuna delle distribuzioni relative alle diverse acquisizioni di *follow up* e vengono raccolti in un foglio di Excel, denominato "DataTypeNumPz.xlsx", dove "Type" indica la tipologia di acquisizione (per questo progetto saranno o ADC -per le immagini DW- o T1; il software ha comunque la possibilità di estendersi naturalmente a qualsiasi altra tipologia di imaging) e "NumPz" è l'indice con cui viene indicato il paziente esaminato.

Il cuore della parte di software dedicata all'estrazione dei parametri si basa su due funzioni principali, concatenate una nell'altra: `structprop` e `histRec`, quest'ultima sfruttata anche in DAS.

La sintassi di `structprop` è:

```
[H.type, namef]=structprop(planC,maskM3D,str,pz,Type,Hst)
```

La funzione riceve obbligatoriamente cinque argomenti, l'ultimo è facoltativo. Il primo è il `planC` del paziente esaminato, dal quale verranno estratte le sequenze di *follow up* sottoposte all'analisi; `maskM3D` indica la maschera della struttura selezionata, il cui nome deve essere indicato nella variabile `str`. Quest'ultima, insieme a `pz` e `Type`, serve per il corretto indirizzamento del salvataggio dei dati uscenti da `histRec` in opportuni fogli di Excel. `Hst` viene inserita come argomento di questa funzione, ma per essere direttamente indirizzata alla funzione `histRec`, inserita all'interno di `structprop`; è un comando che permette o meno di far uscire in output i grafici degli istogrammi dei volumi e può assumere il valore 'HIST' o essere lasciata vuota nel caso non si sia interessati a visionarli. All'interno di ROI-StAT non viene in genere utilizzata questa opzione, poiché la produzione dei grafici è lasciata ad una funzione molto più ottimizzata in questo senso, `folupalyzer`, che verrà presentata tra breve.

`structprop` ha il compito di estrarre le immagini delle varie sequenze di acquisizione dal `planC`, salvando ognuna come una matrice tridimensionale `mx3Dtype`; le `mx3Dtype` rappresentano un set d'immagini alla volta e, una volta prodotte, vengono inviate singolarmente a `histRec`. Proprio per questo tutto il processo, compresa `structprop`, è inserito all'interno di un ciclo `for`: in questo modo, al termine del *loop* saranno state analizzate tutte le sequenze di *follow up*.

Oltre all'estrazione dei set di immagini relativi ad ogni acquisizione, la funzione organizza i dati prodotti da `histRec` all'interno di un appropriato documento Excel, nel quale i diversi fogli saranno dedicati a strutture differenti (CTV, GTV, ecc).

In output, la funzione fornisce l'istogramma `H.type` dei valori dei pixel della ROI e il nome del foglio di calcolo su cui verranno immagazzinati i risultati dei calcoli statistici (`namef`), svolti nella seconda parte del programma.

H.type viene prodotto da `histRec`, la cui sintassi è la seguente:

```
[H_type,paramtype, Datatype]=histRec(mx3Dtype,maskM3D, Type)
```

I significati delle variabili argomento sono quelli già esposti. All'interno della funzione vengono moltiplicate `mx3Dtype` e `maskM3D`, il cui risultato sarà una matrice 3D, delle stesse dimensioni dei due fattori, che conterrà le informazioni relative ai valori dei pixel appartenenti solo alle ROI selezionate. Poiché la distribuzione dei valori dei pixel viene considerata su tutto il volume, il contenuto della matrice risultato viene linearizzato e sulla stringa di dati ottenuta viene calcolato l'istogramma, che risulta quindi essere un istogramma di volume. L'utilizzo di un istogramma realizzato con i dati presi da tutto il volume in esame è un approccio comune anche ad altri studi sullo stesso tema¹³¹⁷.

`histRec` calcola tutti questi parametri nel caso delle acquisizioni DWI, mentre omette media, moda e varianza nel caso delle T1, poiché, come già visto, i valori associati ai pixel in questo genere di immagini non sono grandezze fisiche reali, ma parametri macchina, dipendenti dallo strumento utilizzato, dal *setting*, dal tipo di sequenza di acquisizione utilizzata e molto altro. Nel capitolo seguente verrà mostrata un'immagine delle distribuzioni delle immagini T1 a dimostrazione della totale arbitrarietà degli intervalli di valori che possono occupare. I dati ottenuti sono immagazzinati all'interno della variabile `paramtype` fornita in output, insieme a `Datatype`, che può essere richiesto all'occorrenza e che rappresenta il set linearizzato dei valori dei pixel del volume in esame.

Una volta applicate queste funzioni a tutte le strutture desiderate, ROI-StAT svolge anche un'analisi statistica della correlazione esistente tra gli andamenti dei parametri provenienti dai diversi volumi selezionati, utilizzando, come già esposto nel Capitolo 3, tre diversi tipi di correlazione, una parametrica (correlazione lineare di Pearson) e due non parametriche (*rank correlation* di Spearman e Kendall), riportando i dati in un altro foglio di Excel, denominato "Significatività *TypeNumPz.xlsx*", con "*Type*" e "*NumPz*" che assumono gli stessi valori precedenti. Per fare ciò, ci si serve di un'altra funzione fondamentale, `folupanalyzer`, che ha il compito di richiamare i dati che sono stati immagazzinati nei fogli di calcolo dalle altre due funzioni, infatti `folupanalyzer` può essere usata anche indipendentemente dal resto del programma se si dispone già dei dati desiderati. Tutto ciò di cui necessita è il nome del file (`namef`) da cui deve attingere le informazioni, la tipologia di imaging (`gen`) e l'indice che identifica il paziente selezionato (`pz`), come mostrato dalla sua sintassi:

```
folupanalyzer(namef, gen, pz, type)
```

L'argomento `type` è facoltativo e serve solo quando si utilizza la seconda versione di ROIStAT, attivando la modalità `man`, che ha lo scopo di differenziare

la destinazione del salvataggio dei dati ottenuti dal processo di elaborazione su altri fogli di lavoro, diversi da quelli utilizzati quando la modalità `man` è spenta, in modo da evitare sgradevoli sovrapposizioni o cancellazioni di dati precedenti.

Le correlazioni statistiche vengono condotte da `folupanalyzer` tramite un'altra funzione, sempre creata *ad hoc*, chiamata `elab_rank`: con essa è possibile svolgere automaticamente e con una sola riga di codice tutti e tre i confronti statistici tra gli andamenti di uno stesso parametro nelle diverse strutture selezionate (o almeno, questo è l'utilizzo che si è scelto per questo lavoro, in realtà le capacità della funzione sono molto più generali, permettendo di confrontare qualsiasi set di dati gli vengano introdotti come argomento).

Poiché si ha a che fare con degli andamenti, `folupanalyzer` esegue anche il calcolo della variazione percentuale dei valori assunti dai parametri statistici nel corso del *follow up* rispetto all'acquisizione iniziale (in genere quella pre-terapia), scelta come *baseline* di riferimento. Anche questi dati vengono raccolti in un altro foglio di Excel, stavolta sotto il nome di "Var-PercParamTypeNumPz.xlsx". La scelta di salvare tutti i risultati in fogli di calcolo è molto comoda, benché appesantisca in parte il programma, poiché consente una lettura chiara dei dati al termine dell'elaborazione e una loro manipolazione rapida.

Infine, il programma restituisce i plot degli andamenti, nel corso del tempo, dei parametri calcolati e i grafici delle relative distribuzioni, ordinate secondo l'evoluzione temporale; tutte le immagini vengono automaticamente salvate nella cartella corrente di Matlab in formato .jpg (ma è possibile scegliere un qualsiasi altro formato).

4.3 Gli altri strumenti

Finora si è discusso quasi unicamente dell'utilizzo dei software prodotti in questo lavoro di tesi, DAS e ROISAT con i suoi due diversi moduli, senza approfondire particolarmente i necessari step precedenti alla loro applicazione. Le varie sequenze di acquisizione non sono, però, direttamente utilizzabili, ai fini di questo lavoro, così come vengono scaricate dal PACS (*Picture Archiving and Communication System*, un sistema hardware e software che consente l'archiviazione, trasmissione, visualizzazione e stampa delle immagini diagnostiche digitali).

Come già discusso in precedenza, ciò che ci si propone di fare è selezionare dei particolari volumi d'interesse dalle diverse tipologie di imaging per estrarne dei dati e questo vale sia per la prima che per la seconda fase del progetto.

Questi volumi sono definiti, nella maggioranza dei casi, dalle strutture disegnate dal medico sulle immagini CT e proprio per questo motivo ven-

Algoritmi di registrazione	ITK	Plastimatch
Align-center	X	
Translation	X	
Rigid	X	
Affine	X	
Viscous Fluid	X	X
B-spline	X	X

Tabella 4.3: Elenco degli algoritmi di registrazione disponibili su Plastimatch

gono dette “ancorate” a queste ultime, ovvero individuate dal medesimo sistema di coordinate. Per questo motivo, se si vuole considerare lo stesso volume su un’altra tipologia di imaging, sarà necessario attuare una “registrazione” delle immagini, operazione di ridimensionamento, traslazione e rotazione, che consenta di sovrapporre il più correttamente possibile due immagini acquisite con tempi e modalità diversi. Infatti anche due acquisizioni eseguite con lo stesso metodo, ma in momenti separati devono essere registrate, poiché il paziente potrebbe non essere stato posizionato nello stesso modo dell’acquisizione precedente oppure quest’ultima potrebbe essere stata effettuata con un diverso orientamento.

Questo procedimento è necessario, benché non indolore: infatti, la registrazione produce un’inevitabile compromissione dei dati, anche se, nella maggioranza dei casi, si tratta di controindicazioni accettabili.

Portare a termine questa operazione è possibile tramite due software disponibili online, CERR e Plastimatch. Di seguito verrà chiarito il procedimento.

4.3.1 La registrazione delle immagini

Plastimatch un software open-source, dedicato alla registrazione volumetrica di alta qualità delle immagini mediche, dalla CT, al MRI, alla PET. Permette registrazioni uni-modali, cioè tra immagini della stessa tipologia e multi-modali, tra tipologie diverse.

Plastimatch è stato concepito per poter offrire all’utente la registrazione automatica delle immagini, in due modalità possibili: o a più fasi o a singola fase. Gli algoritmi disponibili a questo scopo sono diversi, alcuni nativi del software, altri basati su ITK, *Insight segmentation and registration ToolKit*, (vedi Tabella 4.3).

Per ognuno di questi algoritmi di registrazione è possibile scegliere il tipo di ottimizzazione da utilizzare e la metrica. Le metriche disponibili sono Mean Square Error (MSE), Mutual Information (MI) e Mattes Mutual Information (MATTES) per gli algoritmi di ITK e MSE e MI per quelli di Plastimatch. Nella registrazione a più fasi è possibile scegliere algoritmi e

metriche diverse in ogni fase e salvare i risultati intermedi. In uscita il software fornisce un file di testo con i parametri della trasformazione applicata all'immagine e l'immagine trasformata. Per effettuare la registrazione, Plastimatch necessita di un file di testo che contenga i percorsi delle immagini da registrare e le istruzioni per la registrazione vera e propria (tipo di trasformazione, tipo di metrica, numero di step, parametri per la convergenza, ecc.). L'algoritmo scelto per la registrazione delle immagini è quello di registrazione rigida, poiché sono immagini di cranio quindi meno soggette a deformazioni tra una acquisizione e l'altra. La registrazione rigida ha sei gradi di libertà: 3 per la traslazione (x,y,z) e 3 per la rotazione rispetto agli assi. Come metrica è stata utilizzata la Mattes Mutual Information, poiché le immagini sono in multimodalità. Per ogni coppia di immagini è stato scritto un file di testo contenente le istruzioni di registrazione, essendo la registrazione fortemente dipendente dalle immagini selezionate. In tutte e tre i casi la registrazione è a due step: uno step iniziale di allineamento dei centri delle immagini (align-center) e uno step di registrazione rigida.

Grazie al comando `system` è possibile richiamare Plastimatch all'interno dell'ambiente di Matlab in modo da salvare i risultati dell'operazione direttamente nel `planC` generato con CERR. Le immagini, per essere registrate da Plastimatch, devono essere in formato *Meta-Image* (.mha; formato simile al DICOM), quindi, è necessario convertirle tutte in questa estensione. Poiché le strutture sono ancorate alla CT, si è scelto di tenerla come immagine fissa sulla quale registrare tutte le altre. Una volta registrate vengono salvate nel `planC`, che conterrà la CT pre-terapia (detta anche "di centratura", poiché utilizzata per il posizionamento del paziente durante le acquisizioni MR), tutta la serie di set di immagini MR di *follow up*, opportunamente registrate, le strutture e il piano di dose. Sarebbe stato possibile realizzare un unico `planC` che contenesse tutte le sequenze di *follow up* per entrambe le tipologie d'immagine, ma, per ragioni di comodità e completa automatizzazione nell'elaborazione dei dati, si è preferito realizzare due oggetti separati, uno per le DWI e l'altro per le T1. Nei casi in cui è stata utilizzata la seconda versione del ROISAT, si è realizzato un terzo `planC`, contenente le immagini FLAIR (come già accennato, il software è stato realizzato, perché possa essere applicato, senza difficoltà, a qualsiasi tipologia di acquisizione; lo stesso vale anche per le routines per la registrazione delle immagini). Infatti, come spiegato nel capitolo precedente, la definizione del GTV si basa tendenzialmente sul contrasto prodotto nelle acquisizioni pesate in T1, mentre il CTV è il risultato o di un'estensione dei contorni del GTV o comprende la regione di edema, che acquista contrasto nelle immagini T2. Il *tool* realizzato aderisce al secondo approccio, quindi, qualora si voglia segmentare autonomamente la regione edematosa, è necessario disporre anche di questo set d'immagini.

Completata la panoramica sugli strumenti realizzati e/o utilizzati per questo lavoro, nel prossimo capitolo verranno mostrati i risultati forniti dall'applicazione di DAS e ROISAT sui campioni selezionati.

Capitolo 5

Applicazione dei software e risultati

5.1 Analisi della distribuzione di dose

Come già spiegato, il software DAS è stato concepito per quantificare in che modo la dose erogata durante il trattamento si distribuisca sul target del trattamento, in particolare nella porzione di tessuto in cui andrà a svilupparsi la recidiva. Il DAS analizza la mappa di dose in relazione alle ROI (o ai VOI - *Volumes of Interest*-, come sarebbe più corretto chiamarli in questi contesti) e restituisce, per ogni paziente, l'istogramma della distribuzione di dose su tutto il volume e il DVH (si veda Fig. 5.1).

In Figura 5.2, è mostrata a titolo di esempio una parte del file di testo, prodotto dal DAS, che riassume le caratteristiche della distribuzione di dose del paziente 1.

Il dato di maggiore interesse, relativo alla percentuale di volume da cui ripartirà la patologia e che riceve una dose $\geq 95\%$ della dose prescritta (detta

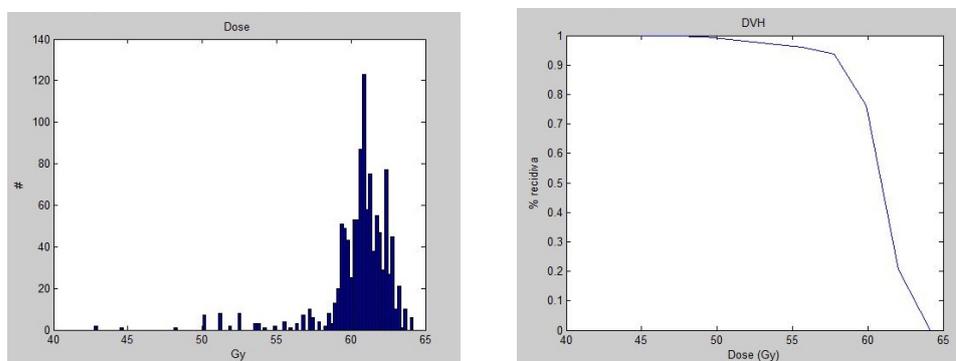


Figura 5.1

```

|
Paziente: pz01_def_tot.mat
Nome struttura: CTV recidiva

Curve di isodose:

Minima dose ricevuta: 59.27 Gy
Massima dose ricevuta: 63.08 Gy
Il 95.60% della recidiva riceve una dose > 59.65 Gy
Il 85.16% della recidiva riceve una dose > 60.04 Gy
Il 65.29% della recidiva riceve una dose > 60.42 Gy
Il 44.69% della recidiva riceve una dose > 60.80 Gy
Il 27.47% della recidiva riceve una dose > 61.18 Gy
Il 12.45% della recidiva riceve una dose > 61.56 Gy
Il 4.21% della recidiva riceve una dose > 61.94 Gy
Il 1.56% della recidiva riceve una dose > 62.32 Gy
Il 0.46% della recidiva riceve una dose > 62.70 Gy
Il 0.00% della recidiva riceve una dose > 63.08 Gy

```

Figura 5.2

anche dose nominale), è riportato nella matrice di output, visualizzabile dalla *command window* di Matlab.

Aggiornando la Tabella 4.1 del capitolo precedente, si vede, come già anticipato, che la ricomparsa di una recidiva non può essere imputata ad un trattamento non correttamente localizzato sulla zona patologica; infatti, l'80% dei pazienti del campione riceve una dose maggiore o al limite uguale al 95% della dose nominale su una frazione superiore al 75% del volume totale su cui si sviluppa la recidiva (vedi Tabella 5.1).

5.2 Analisi delle sequenze di *follow up*

Di seguito sono analizzati i risultati prodotti sul set di immagini di *follow up* per le immagini DWI e T1 del secondo campione da 6 pazienti (vedi Tabella 4.1).

Verranno riportati i grafici che rappresentano l'evoluzione temporale, nel corso del *follow up*, delle distribuzioni dei valori di ADC e T1 delle regioni esaminate, insieme a quelli degli otto parametri statistici selezionati, calcolati su di esse. Trattandosi di uno studio preliminare e retrospettivo, non è stato possibile recuperare un numero accettabile di pazienti con le caratteristiche desiderate da poter creare un campione statisticamente significativo. L'interesse principale dello studio è stato rivolto alla realizzazione di strumenti che possano essere implementati, in un futuro prossimo, all'interno di un progetto su più larga scala, condotto dall'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia, precedentemente descritto nel Capitolo 3.

Si è quantificato, tramite criteri di opportunità e fattibilità, che il campione sarà costituito da 30 pazienti: a quel punto, si avrà a disposizione

Pz	Sesso	Età	D. N. (Gy)	95% D. N. (Gy)	% R. R. ≥ D. N. (Gy)
I	M	77	60	57	100
II	F	55	60	57	95.2
III	M	47	60	57	100
IV	M	24	60	57	96.2
V	F	66	60	57	91.4
VI	M	62	60	57	63.8
VII	M	52	60	57	85.4
VIII	F	65	60	57	88.3
IX	M	55	60	57	95.6
X	M	62	30	28.5	97.4
XI	M	53	60	57	75.2
XII	F	39	60	57	100
XIII	F	78	25	23.8	99.1
XIV	M	62	60	57	62.9
XV	M	69	25	23.8	29.4
XVI	M	42	60	57	80
XVII	F	65	60	57	83.4
XVIII	M	56	60	57	96.3

Tabella 5.1: Elenco dei soggetti selezionati per lo studio della distribuzione di dose nella regione della recidiva. I pazienti vengono individuati con degli indici (colonna *Pz*) in numero romano, per evitare confusioni con la denominazione del secondo campione; a fianco sono riportati sesso, età, dose nominale D.N. pianificata per il trattamento, il valore soglia del 95% della dose nominale e la percentuale di volume della regione della recidiva (R.R.) che ha ricevuto una dose uguale o maggiore del valore soglia

un numero statisticamente sufficiente di soggetti con un setting adeguato di acquisizioni di imaging desiderate e tempi comparabili di monitoraggio della patologia.

Ciò che si intende descrivere, in questa prima fase, sono i motivi che hanno condotto all'implementazione delle *routines* di cui si è diffusamente discusso nel capitolo precedente: infatti, alcune delle tecniche di analisi statistica scelte per questo progetto condotto dall'ASMN sono state selezionate per descrivere, mediante indicatori statistici di base, la distribuzione della risposta al trattamento valutata mediante criteri morfologici e, quantitativamente, in termini di cambiamento percentuale dei parametri di imaging.

Nonostante sia prematuro trarre considerazioni statisticamente significative, è interessante mostrare i risultati ottenuti tramite questi strumenti,

poiché, da un’analisi preliminare, potrebbero aprire prospettive molto interessanti. Ottimale sarebbe dimostrare che possono essere sfruttate per monitorare gli effetti della terapia sull’evoluzione della neoplasia e, quindi, valutare la risposta al trattamento, avendo anche un comportamento predittivo relativo alla ricomparsa o meno di una ricaduta della patologia.

Seppur in nessun lavoro presente in letteratura sia stato analizzato l’intero *follow up* dei pazienti, studi recenti⁴¹²¹³¹⁶¹⁷²⁰, condotti su questo specifico argomento, riportano dati in linea con quanto evidenziato in questo lavoro.

Nel paragrafo seguente, verranno descritti i risultati ottenuti dall’applicazione di ROIS_TAT al campione: i sei pazienti verranno considerati a coppie, poiché sono presenti due esponenti per ciascuna categoria. Per “categoria” si intende la distinzione empirica, stilata nel capitolo precedente, tra pazienti che ricadono in breve tempo e hanno un rapido decorso della malattia che li conduce al decesso (paragrafo 5.3.1), quelli che non manifestano recidiva dopo il trattamento (paragrafo 5.3.2) e coloro che ripresentano la malattia, ma su tempi più lunghi e dispongono di un prolungato *follow up* (paragrafo 5.3.3).

Verranno trattati separatamente i risultati ottenuti dalle immagini in diffusione e da quelle pesate in T1 (per queste ultime si veda il paragrafo 5.5).

5.3 Analisi dettagliata dei casi studiati con imaging DW

5.3.1 Pazienti recidivanti su tempi brevi

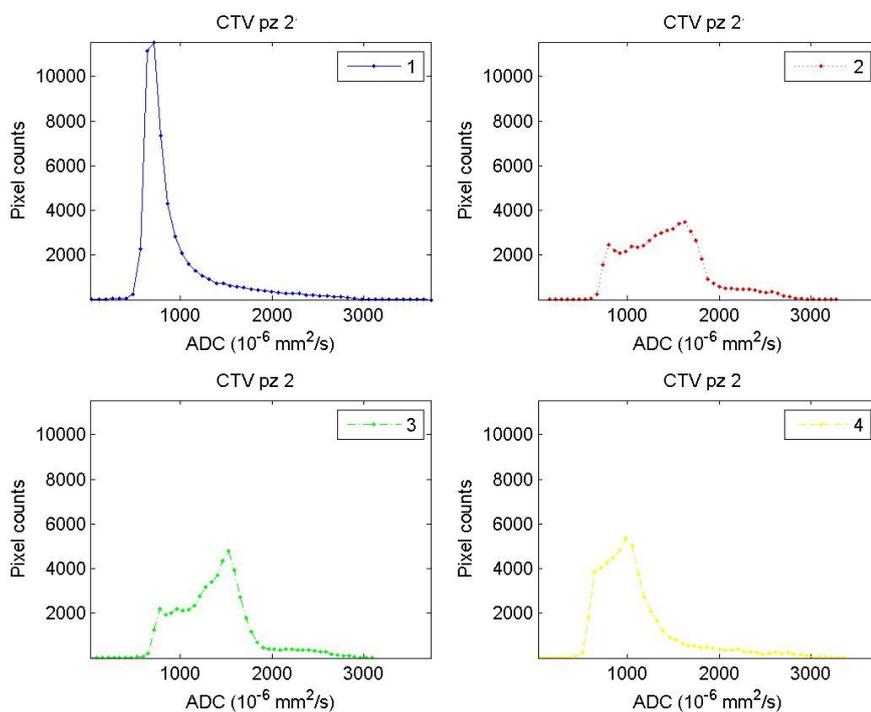
Paziente 2

Il paziente esaminato è il “Pz 2”, riportato in Tabella 4.2: appartiene alla categoria dei recidivanti breve-viventi, poiché viene diagnosticata la ricaduta già dalla terza acquisizione di *follow up*. Il paziente è deceduto a meno di un anno dalla diagnosi.

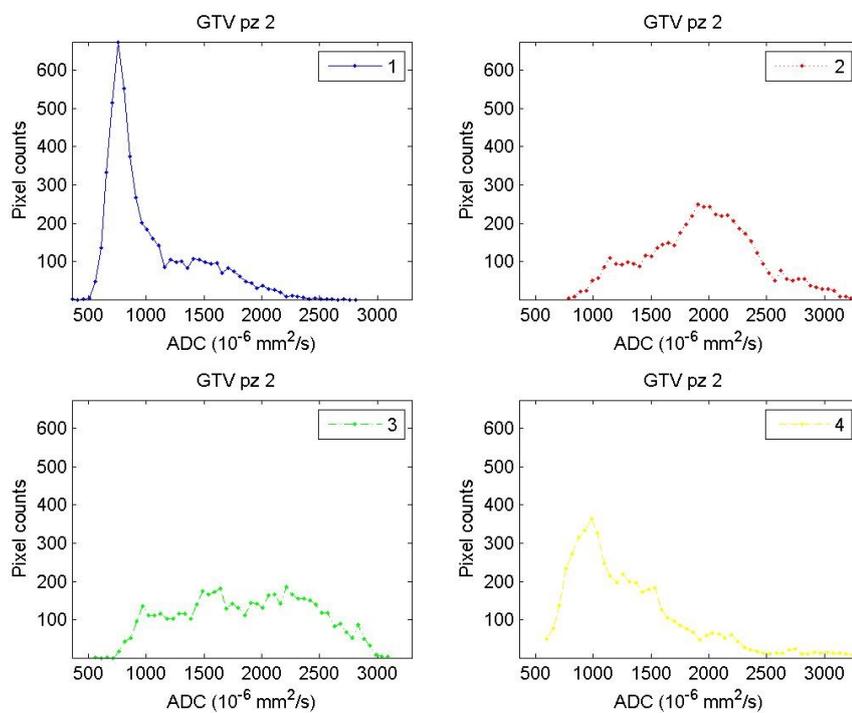
In Figura 5.3, sono riportati i grafici che rappresentano l’evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC all’interno delle strutture CTV e GTV, nel corso del tempo. I quattro riquadri corrispondono alle quattro sequenze acquisite dalla diagnosi in poi, partendo dall’esame pre-terapia e, a seguire, i tre *follow up*; tutte le sequenze sono state acquisite a distanza temporale di circa 3 mesi le une dalle altre.

In conseguenza al trattamento, la forma della distribuzione cambia (Figura 5.3a, primo e secondo riquadro): la distribuzione relativa all’immagine pre-terapia risulta molto piccata e spostata verso bassi valori di ADC, sia per quella estratta dal CTV, sia, in particolare per quella del GTV. In entrambi i casi, è molto pronunciata la coda allungata verso la direzione delle

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW71



(a) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del CTV.



(b) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del GTV.

Figura 5.3: Evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC nel corso del follow up; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up* del paziente 2 di Tabella 4.2

x positive, soprattutto per il GTV, indicando una forte componente necrotica: ciò è dovuto al fatto che la radioterapia causa la morte delle cellule della regione su cui è indirizzata e ne consegue una diminuzione della densità cellulare e un aumento della necrosi, determinando una diffusione apparente delle molecole d'acqua nei tessuti più elevata. A differenza dell'altra struttura, però, questa distribuzione presenta una coda più spessa anche a sinistra, andando a comprendere valori di diffusione apparente molto più bassi che per il CTV.

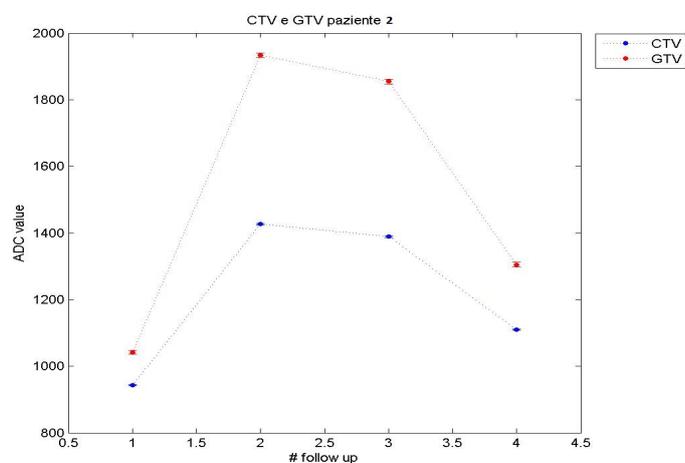
Questo aspetto è importante, poiché la porzione di istogramma relativa ai valori di ADC inferiori è, secondo i lavori di Rahman *et al.* e Pope *et al.*¹⁷¹⁸²⁰, quella realmente significativa per la determinazione della prognosi della malattia e il fatto che comprenda valori così bassi, in questo caso, potrebbe essere indice della particolare aggressività della neoplasia.

Il trattamento produce un sostanziale abbattimento del picco iniziale, visibile nelle distribuzioni di entrambe le strutture. Gli istogrammi si spostano verso valori molto elevati indicando rispettivamente un aumento dell'area edematosa e della regione necrotica, ma l'infiltrazione delle cellule tumorali non è stata arrestata, come si vede dalla terza acquisizione: i valori di ADC tornano ad abbassarsi e le distribuzioni cominciano a restringere l'intervallo di valori su cui si estendono, tendendo alla riformazione di un picco ad ADC più bassi. Questo comportamento è anticipato nel caso del CTV rispetto al GTV e viene mantenuto anche nell'istogramma dell'ultima immagine, in cui la propensione alla formazione di un unico picco è evidente in entrambe le strutture e si rivela fatale per il paziente, nonostante la distribuzione non abbia fatto in tempo a riassumere la conformazione di partenza.

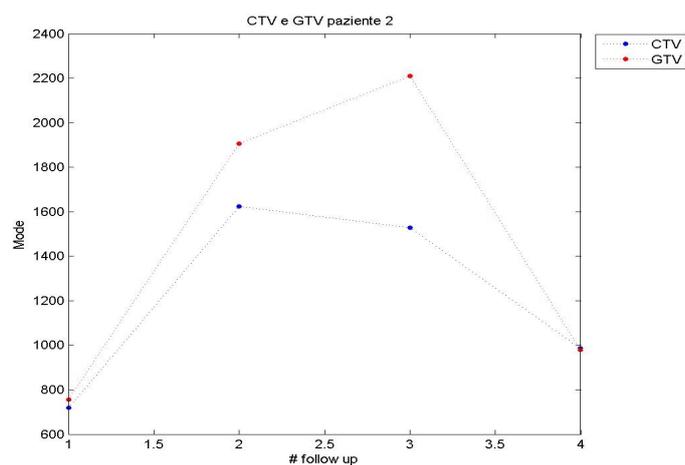
Nelle Figure 5.4, 5.5 e 5.6 sono riportati i grafici degli andamenti dei parametri statistici calcolati sulle distribuzioni appena esaminate.

Dall'osservazione dei plot si notano immediatamente due cose: gli andamenti appaiono netti, ma allo stesso tempo, poco indicativi perché costituiti solo da quattro punti a causa dell'esiguità del *follow up* disponibile (infatti, nessun test non parametrico è riuscito ad individuare correlazioni o non correlazioni realmente significative tra i gli andamenti dei parametri; solo la correlazione lineare di Pearson, peraltro il metodo meno robusto dei tre, segnala una perfetta correlazione tra le medie delle due strutture). È opportuno specificare che, ai fini di una corretta interpretazione dei risultati, l'errore standard associato agli andamenti è, in realtà, irragionevolmente piccolo: questo perché il numero N di pixel della regione è elevato e perché non sono conteggiate tutta una serie di sorgenti d'errore, dovute agli strumenti e ai parametri di acquisizione, così come all'operazione di registrazione, che ne aumenterebbero considerevolmente l'entità. Purtroppo la loro determinazione non è un'operazione semplice e non è rientrato negli scopi di questo studio approfondire tale aspetto, che verrà necessariamente riaffrontato, in maniera rigorosa, nel corso del progetto in cui si introduce questo lavoro di

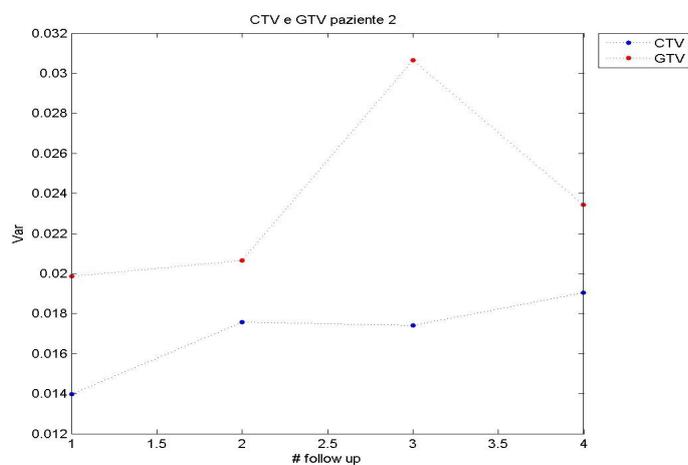
5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW73



(a) *Media.*

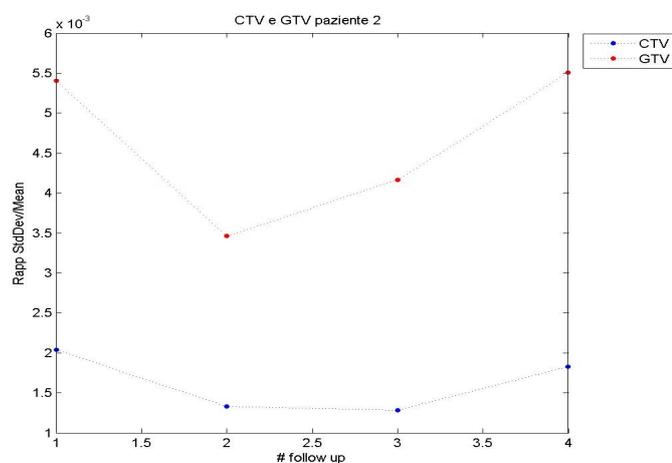


(b) *Moda.*

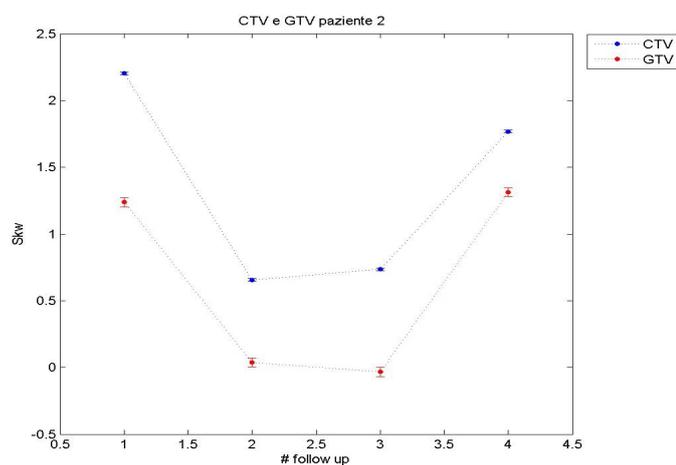


(c) *Varianza.*

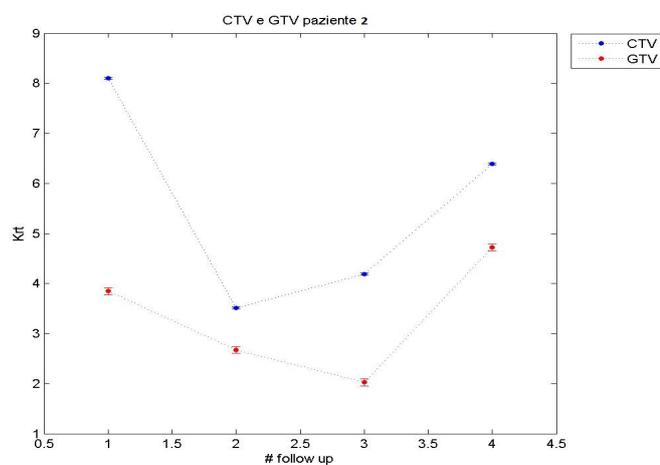
Figura 5.4: Andamenti di media, moda e varianza delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 2 di Tabella 4.2



(a) Rapporto deviazione standard-media.



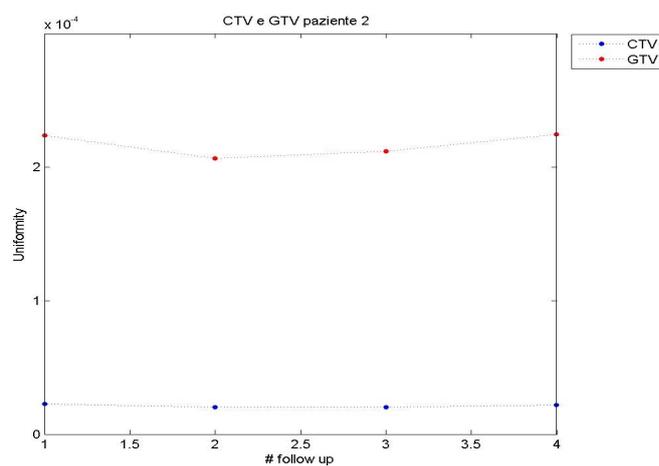
(b) Skewness.



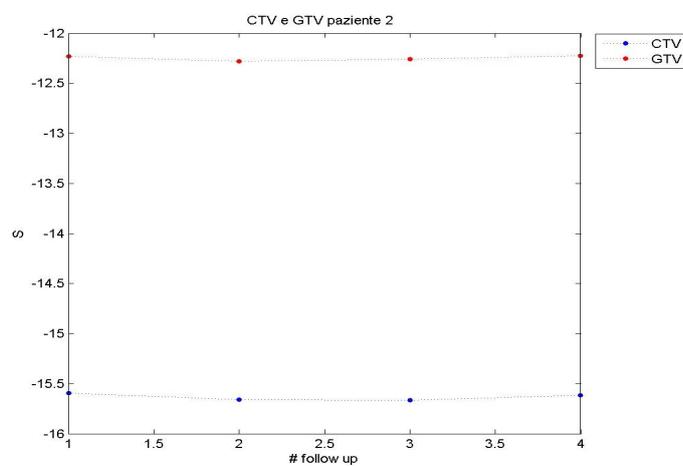
(c) Kurtosis.

Figura 5.5: Andamenti del rapporto tra deviazione standard e media e di skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 2 di Tabella 4.2

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW75



(a) *Uniformità.*



(b) *Entropia.*

Figura 5.6: Andamenti di uniformità ed entropia delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 2 di Tabella 4.2

tesi. Questo problema, naturalmente, affligge la stima di tutti i parametri che verranno valutati, per quanto sia ugualmente possibile fare osservazioni interessanti, che giustificano gli approfondimenti che si intende condurre nei mesi a venire.

Ad ogni modo, i valori assunti dai parametri rispecchiano abbastanza bene quanto constatato durante l'osservazione diretta degli istogrammi: la media per entrambe le strutture aumenta del 51% da prima a dopo il trattamento (si veda Tabella 5.2 per le varianze percentuali rispetto alla *baseline* e quelle relative) per poi decrescere inizialmente in maniera graduale (-2,6% e -4% rispetto al valore raggiunto alla prima acquisizione di *follow up*, rispettivamente per CTV e GTV) e poi più brusca (-20% e -30% di abbassamento nel passaggio da terza a quarta acquisizione, rispettivamente per CTV e GTV), riportandosi in prossimità del valore originario.

Appare evidente come i valori di ADC relativi al GTV siano decisamente maggiori di quelli del CTV: questo è facilmente spiegabile osservando le regioni considerate: il GTV, infatti, comprende tutta la zona di tumore solido, NON escludendo la parte di necrosi, caratterizzata da valori di ADC molto più elevati (Figura 5.7).

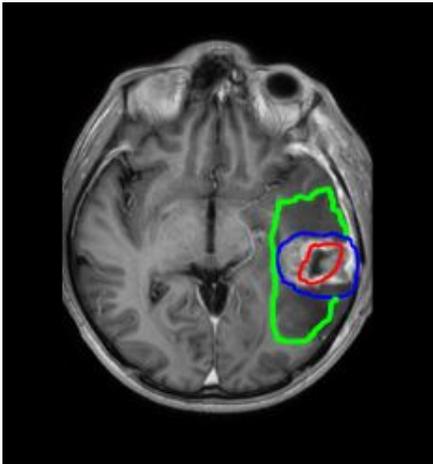
La moda ha un comportamento analogo, ma con un salto ancora più evidente tra prima e dopo la terapia (differenza del 126% e del 152% per CTV e GTV), sebbene il CTV si renda conto prima del peggioramento della patologia, cominciando gradualmente a calare già nel passaggio tra seconda e terza acquisizione (-5%), forse per il procedere dell'infiltrazione tumorale all'interno del tessuto invaso dall'edema; al contrario, il GTV continua a crescere (probabilmente a causa di un'estensione della necrosi), per poi crollare anch'esso nel passaggio tra terzo a quarto esame (-35,5% e -55,7% per CTV e GTV) a testimonianza di un forte aumento della cellularità in tutta l'area tumorale e quindi una ripresa della malattia.

La varianza non sembra fornire informazioni particolarmente interessanti, né lasciar presumere l'esistenza di un qualche tipo di andamento.

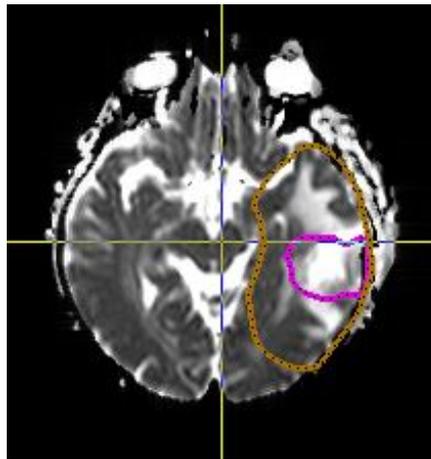
Al contrario, il rapporto tra deviazione standard e media, la skewness e la kurtosis mostrano comportamenti promettenti. Gli andamenti sono piuttosto simili e tutti e tre manifestano una forte diminuzione nel passaggio da prima a dopo il trattamento, dimostrando di risentire fortemente delle modificazioni del tessuto in conseguenza alle applicazioni radioterapiche e chemioterapiche; differente è la risposta nella transizione dalla prima acquisizione di *follow up* alla seconda: nel caso del rapporto deviazione standard-media si rivela più predittivo il GTV, che segnala una crescita superiore al 20%, al contrario del CTV, che rimane circa costante, con anzi una leggera flessione verso il basso (ca. -3,6%).

Per quanto riguarda skewness e kurtosis, è il CTV ad interpretare meglio l'evoluzione della patologia, in maniera più evidente per il secondo parametro, dove il suo valore incrementa di quasi il 20% per il CTV, mentre continua a decrescere per il GTV (ca. -25%). Osservando gli istogram-

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW77



(a) *Slice estratta dalla sequenza di immagini pesate in T1, ottenute nell'acquisizione di pre-terapia. Cerchiata in blu, è la zona ad alto contrasto che individua la regione di tumore solido; la parte in rosso è la necrosi conseguente alla morte delle cellule ipossiche e quella in verde è l'area invasa dall'edema, che, però, non viene evidenziata nelle immagini T1.*



(b) *Slice estratta dalla sequenza di immagini pesate in diffusione, ottenute nell'acquisizione di pre-terapia. Il perimetro marrone individua la struttura CTV disegnata sulla CT, mentre quello circoscritto in fucsia è il GTV. Com'è evidente, il segnale più intenso si ha in corrispondenza della necrosi, spazio privo di cellule, in cui le molecole d'acqua hanno maggiore libertà di movimento; sempre intenso è quello proveniente dall'edema, mentre di molto inferiore è quello del tessuto "sano" circostante, così come il sottile bordo scuro che circonda la zona necrotica, che corrisponde alla parte a più elevata cellularità del tumore.*

Figura 5.7: Stessa *slice* di cervello osservata con due tecniche di imaging differenti

mi è abbastanza giustificabile la diversa intensità nella risposta delle due grandezze, poiché non ci sono modificazioni particolarmente evidenti nella simmetria delle due distribuzioni, mentre la terza sviluppa un picco molto più pronunciato rispetto alla seconda, nel caso del CTV. Non si riscontra un analogo comportamento per il GTV.

Uniformità ed entropia, invece, hanno la prerogativa (riscontrata anche negli altri pazienti del campione) di stabilizzarsi su valori costanti, caratteristici della regione, per tutto il corso del *follow up*. Sono due grandezze correlate (coefficiente di correlazione > 0.94 per tutti e tre i test, con $P \ll 0.05$, sia per il CTV che il GTV), poiché la prima quantifica l'uniformità dell'istogramma dell'immagine, dove per uniformità si intende grado di similarità tra le occorrenze che popolano ciascun bin dell'istogramma (l'immagine è perfettamente uniforme -tutta grigia-, se le frequenze sono uguali in ogni intervallo), mentre la seconda il suo livello di variabilità, un concetto non troppo dissimile, perciò è legittima l'analogia degli andamenti.

In questo caso si ha un'entropia di -12.25 ± 0.03 per il GTV e -15.63 ± 0.03 per il CTV, mentre l'uniformità è rispettivamente $(2.17 \pm 0.09) \times 10^{-5}$ e $(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-5}$.

Variazione percentuale rispetto all'acquisizione pre-terapia (baseline)															
Acq	Mean			Mode			Std.Dev/Mean			Skw			Krt		
	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)
1-2	51,2	85,7	126,2	126,2	152,1	-34,7	-35,9	-70,2	-96,9	-56,6	-30,4				
1-3	47,2	78,1	113,0	192,5	-3,6	20,3	-66,6	-102,6	-48,3	-47,3					
1-4	17,6	25,3	37,3	29,6	42,5	32,2	-19,7	6,1	-21,1	22,7					
Variazione percentuale di ogni acquisizione rispetto alla precedente															
Acq	Mean			Mode			Std.Dev/Mean			Skw			Krt		
	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)	CTV (%)	GTV (%)	(%)
1-2	51,2	85,7	126,2	152,1	-34,7	-35,9	-70,2	-96,9	-56,6	-30,4					
2-3	-2,6	-4,1	-5,8	16,0	-3,6	20,3	12,1	-186,1	19,1	-24,2					
3-4	-20,1	-29,7	-35,5	-55,7	42,5	32,2	140,7	-4110,9	52,7	132,8					

Tabella 5.2: Variazioni percentuali dei parametri statistici di ogni acquisizione rispetto a quelli dell'esame pre-terapia (*baseline*) e di ogni acquisizione rispetto alla precedente per il paziente 2 di Tabella 4.2

Paziente 6

Il paziente 6 di Tabella 4.2 è l'altro esponente del campione che appartiene alla categoria dei breve-viventi, poiché ha manifestato una recidiva in tempi brevi ed è deceduto in meno di un anno.

In Figura 5.8 è mostrata l'evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC, relative all'acquisizione pre-terapia e a quelle successive del *follow up*.

Anche in questo caso è evidente l'abbattimento tra la fase precedente e quella successiva alla terapia. In seguito, invece, viene mantenuta una conformazione sostanzialmente costante per tutto il *follow up* a parte un innalzamento e restringimento del picco in corrispondenza dell'ultima fase, rilevata molto bene dalla kurtosis che tra quarta e quinta acquisizione aumenta del 37% e del 55%, rispettivamente per CTV e GTV. Similmente si comporta la skewness, segnalando in particolare la discontinuità tra penultimo e ultimo esame. Contrariamente ai casi precedenti, entrambi i parametri non sembrano prevedere il peggioramento, rimanendo abbastanza costanti tra la seconda e la quarta acquisizione; con ogni probabilità, la lesione non è mai stata completamente rimossa (almeno per quanto riguarda la parte visibile ovviamente), quindi ciò che viene rilevato è solamente il passaggio da situazione abbastanza stabile a quello di ripresa di attività più intensa.

A differenza dell'altro paziente, non si riscontrano andamenti interessanti negli altri parametri, tranne che per la media che sembra tendere ad una progressiva seppur lieve crescita per poi avere una flessione verso il basso del 5% e del 18% rispettivamente per CTV e GTV nel passaggio tra quarta e quinta acquisizione, in accordo con quanto segnalato anche da skewness e kurtosis.

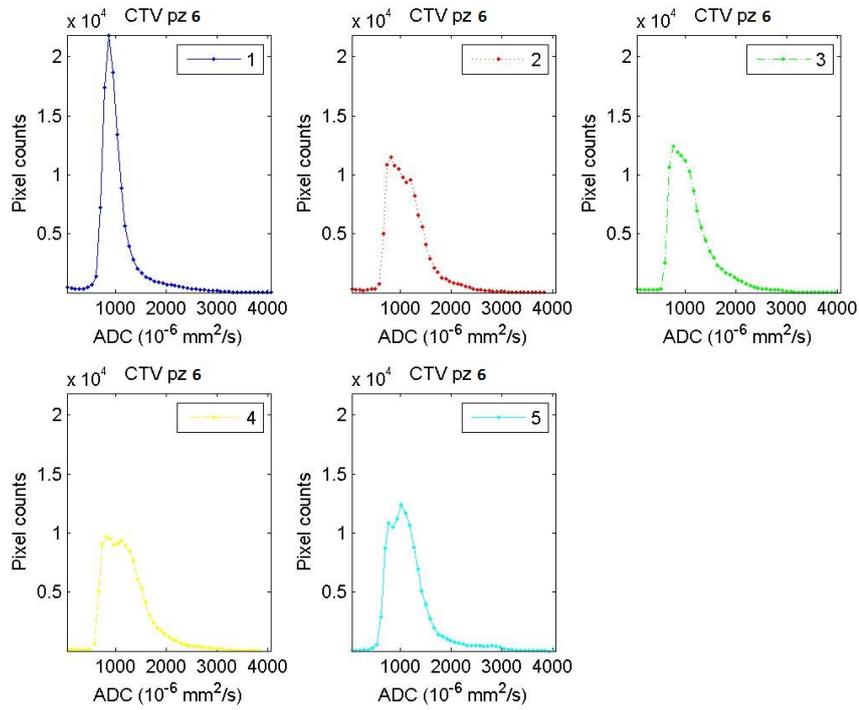
Infine, per uniformità ed entropia si riscontra il medesimo comportamento precedentemente osservato: la prima si stabilizza sui valori di $(9.6 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ e $(4.27 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ per CTV e GTV, mentre la seconda sui $16,77 \pm 0.01$ e 14.58 ± 0.01 , rispettivamente per le stesse strutture.

**Variazione percentuale
rispetto all'acquisizione
pre-terapia (baseline)**

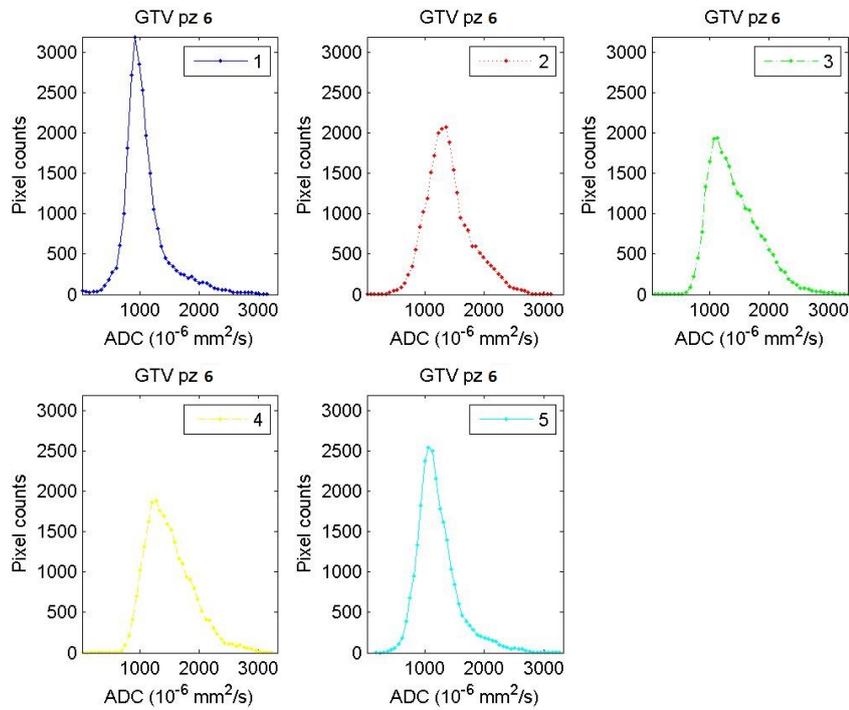
	Skw		Krt	
	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	-42.3	-59.4	-40.9	-47.3
1-3	-37.4	-46.2	-43.9	-47.6
1-4	-44.46	-47.9	-50.4	-46.2
1-5	-23.6	-15.9	-32.0	-16.6

Tabella 5.3: Variazione percentuale di skewness e kurtosis di ogni acquisizione rispetto a quelli dell'esame pre-terapia (*baseline*) per il paziente 6 di Tabella 4.2

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW81



(a) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del CTV.



(b) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del GTV.

Figura 5.8: Evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC nel corso del follow up; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up* del paziente 6 di Tabella 4.2

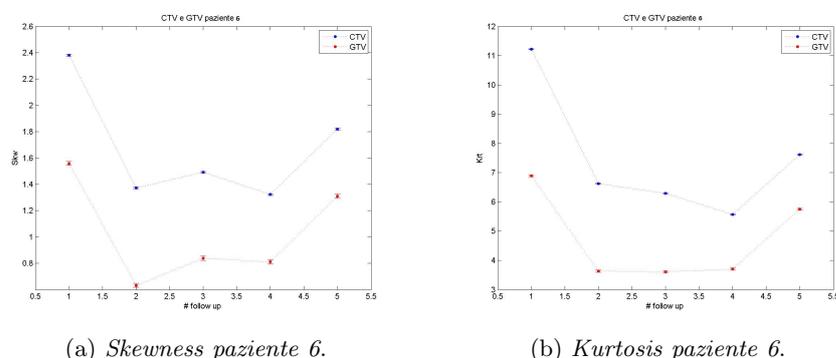


Figura 5.9: Andamenti dei parametri skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 6 di Tabella 4.2

Variazione percentuale rispetto all'acquisizione precedente				
	Skw		Krt	
Acq	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	-42.3	-59.4	-40.9	-47.3
1-3	8.6	32.6	-5.1	-0.6
1-4	-11.3	-3.2	-11.5	2.7
1-5	37.6	61.4	36.9	55.1

Tabella 5.4: Variazione percentuale di skewness e kurtosis di ogni acquisizione rispetto alla precedente per il paziente 6 di Tabella 4.2

5.3.2 Pazienti non recidivanti su tempi lunghi

Paziente 3

Il paziente esaminato è il “Pz 3”, riportato in Tabella 4.2: appartiene alla categoria dei liberi da malattia, poiché, dopo la terapia, non ha presentato ricadute su un tempo superiore alla media di sopravvivenza. Il paziente è tuttora in vita dopo 3 anni e 8 mesi.

Le sole sei acquisizioni riportate sono in parte dovute alla mancanza di alcune sequenze (probabilmente non prescritte al tempo dell'esame) e in parte sono frutto di una necessaria selezione, dovuta a problemi avuti con la registrazione delle immagini che ha compromesso alcune di esse in maniera inaccettabile. Oltre a ciò si aggiunge che, essendo un paziente con un *follow up* prolungato, alcune acquisizioni furono ottenute ancora con il tomografo da 1 T, invece che quello da 1,5 T, attualmente in uso e si è deciso di scartarle; benché il risultato dell'imaging in diffusione non sia influenzato,

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW83

in linea di principio, dall'intensità del campo, si è cercato ugualmente di uniformare il campione esaminato.

Ovviamente questi inconvenienti creano problemi di discontinuità tra le acquisizioni e i punti dei grafici, rappresentati equidistanti gli uni dagli altri, possono non corrispondere ad acquisizioni immediatamente consecutive, ma distanziate da intervalli temporali variabili. Questa è naturalmente una limitazione ai fini di un'analisi corretta, ma essendo coincisa con i pazienti lungoviventi, che dovrebbero, quindi, presentare un andamento sostanzialmente costante con il procedere del *follow up*, si è ritenuto non inficiasse particolarmente l'interpretazione dei risultati. Si specifica che tale assunzione può essere valida solo ad uno stadio preliminare dell'analisi, come in questo caso; per confronti più rigorosi non sarà più possibile trascendere da una determinazione precisa della distanza temporale tra le acquisizioni

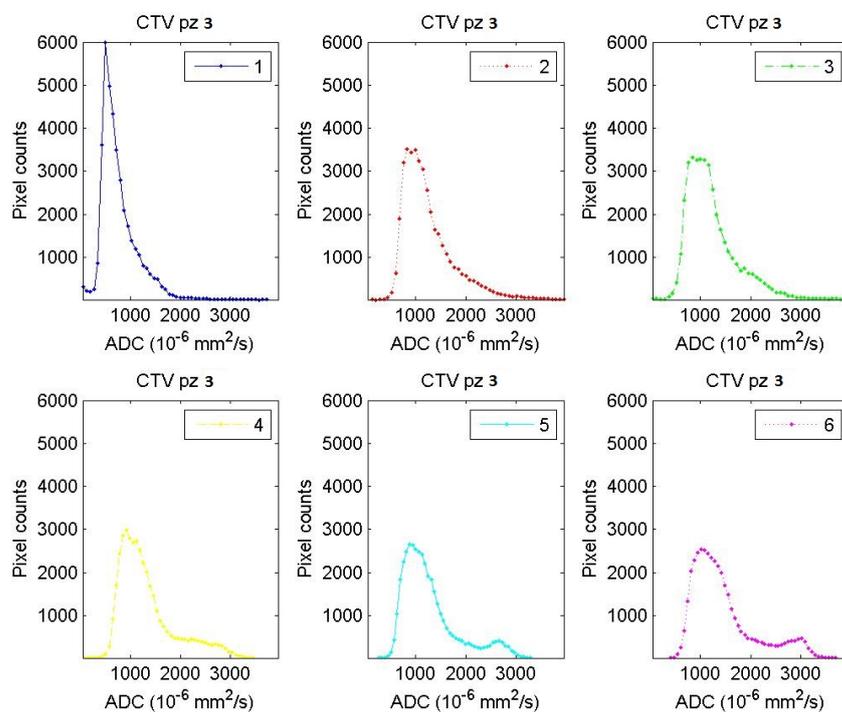
Come prima, vengono riportati e commentati gli istogrammi estratti dalle strutture CTV e GTV relativi alle sei acquisizioni (Figura 5.10); il primo corrisponde all'esame pre-terapia e i successivi costituiscono il *follow up*.

Com'è immediatamente visibile, il comportamento delle distribuzioni è conforme alle attese e ben si adatta alle considerazioni dedotte dai i pazienti precedenti. Come prima, si nota una diminuzione del picco iniziale, molto stretto e con una coda positiva maggiormente sviluppata rispetto all'altra, per il CTV e piccato, ma con un'evidente conformazione bimodale, dovuta alla presenza di necrosi, per il GTV. La componente necrotica è sempre presente, a causa dei motivi già esposti in precedenza relativi alle modalità di selezione delle ROI.

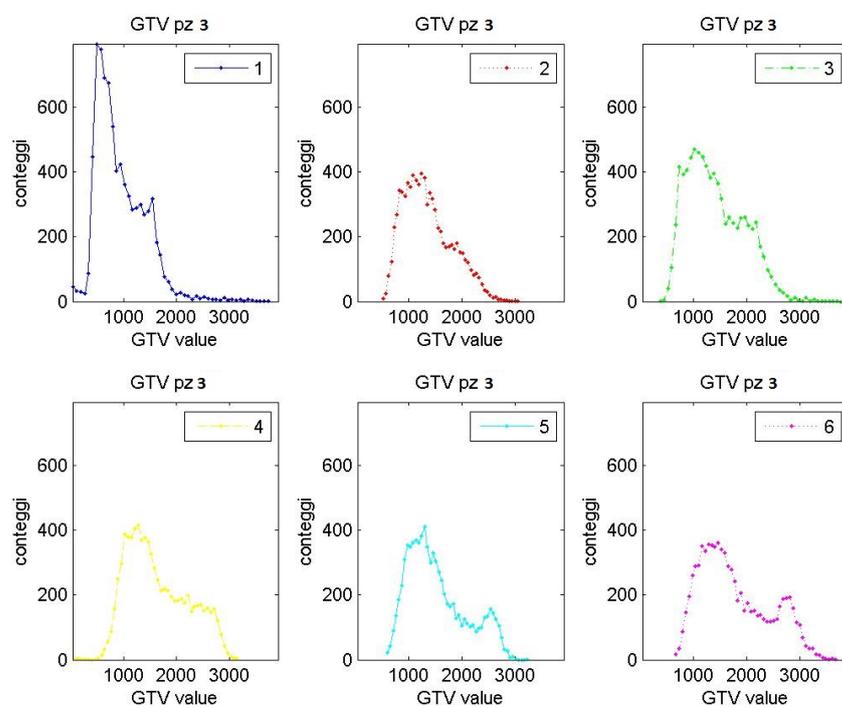
La tendenza all'abbassamento del picco e allo spostamento graduale della distribuzione verso valori sempre maggiori (comportamento che, se si tratta di uno *shift* costante e non sporadico, è sintomo di miglioramento dello stato del paziente¹³¹⁶) è costante per tutto il *follow up*, stazionandosi, per entrambe le strutture, su conformazioni decisamente più appiattite rispetto alla condizione iniziale (confermato dalle variazioni percentuali della kurtosis visibili in Tabella 5.5) e bimodali, con il picco più basso, spostato verso alti valori di ADC.

Di seguito viene mostrato come i parametri statistici interpretino queste modificazioni degli istogrammi (Figure 5.11, 5.12 e 5.13).

Si vede chiaramente come media, moda e, in maniera meno netta, anche varianza tendano ad un progressivo aumento, in linea con le considerazioni precedentemente estrapolate dall'osservazione dei grafici (si veda Tabella 5.5 per le variazioni percentuali). Si specifica che lo spostamento della moda che viene valutato è sempre riferito al picco più alto dei due. E', comunque, un parametro che si presta a revisione, vista la ricorrente tendenza delle distribuzioni ad acquisire una conformazione bimodale.



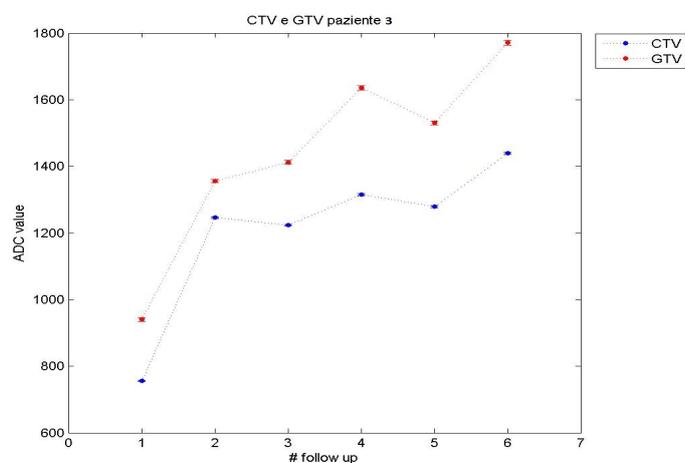
(a) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del CTV.



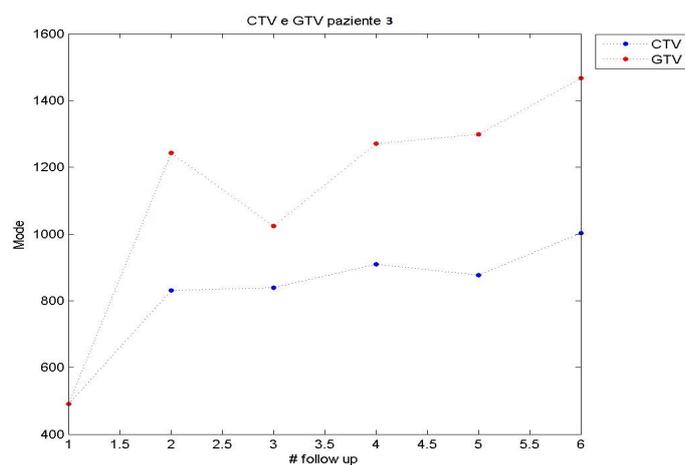
(b) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del GTV.

Figura 5.10: Evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC nel corso del follow up; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up* del paziente 3 di Tabella 4.2

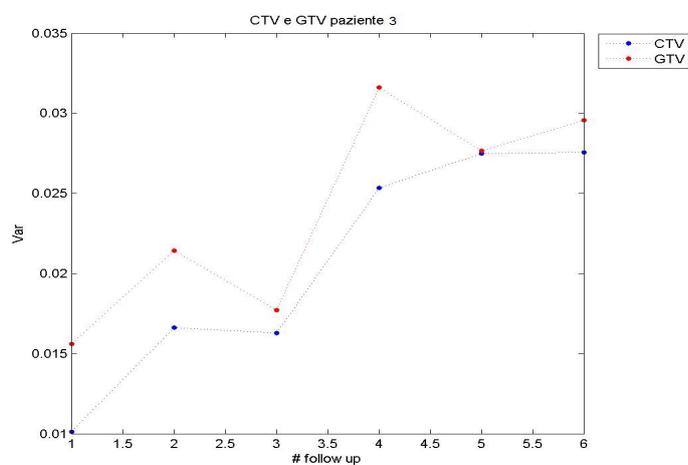
5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW85



(a) *Media.*

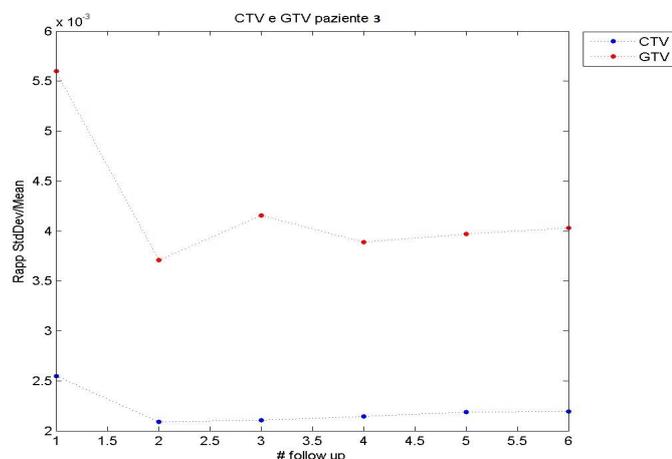


(b) *Moda.*

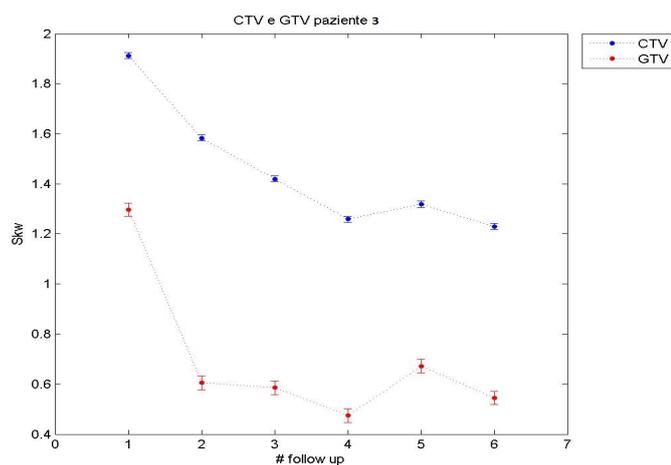


(c) *Varianza.*

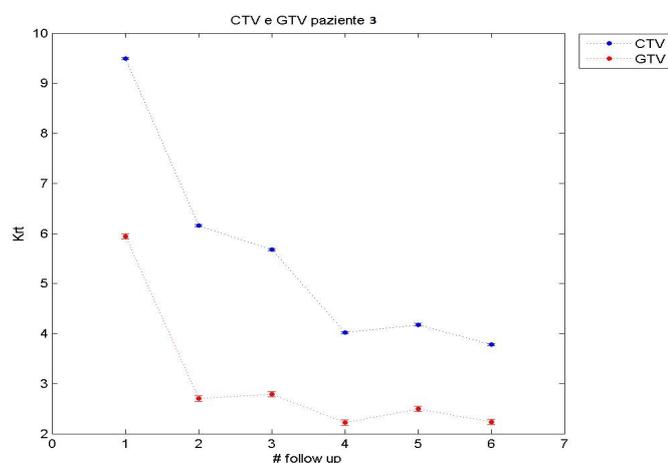
Figura 5.11: Andamenti di media, moda e varianza delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 3 di Tabella 4.2



(a) Rapporto deviazione standard-media.



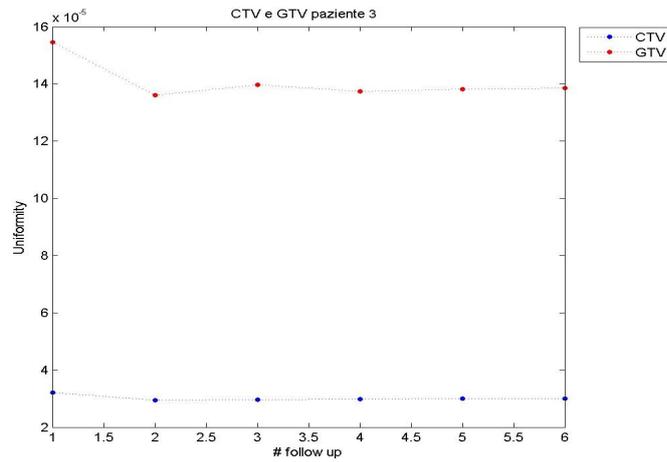
(b) Skewness.



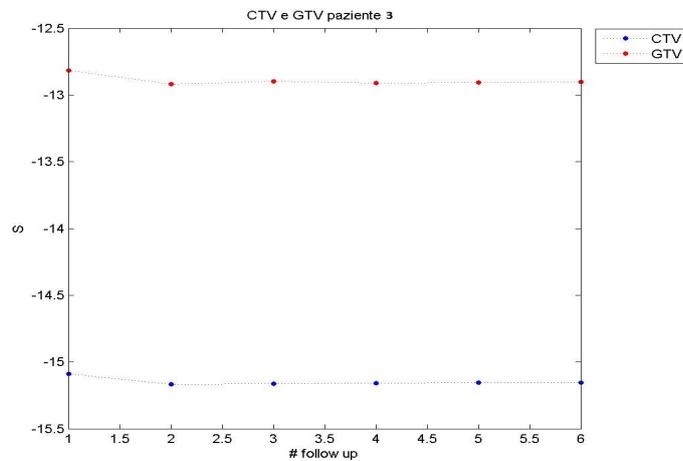
(c) Kurtosis.

Figura 5.12: Andamenti del rapporto tra deviazione standard e media e di skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 3 di Tabella 4.2

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW87



(a) *Uniformità.*



(b) *Entropia.*

Figura 5.13: Andamenti di uniformità ed entropia delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 3 di Tabella 4.2

Il rapporto tra deviazione standard e media, dopo una rapida discesa iniziale (-34% rispetto all'acquisizione pre-terapia per il GTV, solo un -17% per il CTV) si stabilizza su un andamento abbastanza costante, dimostrando che l'aumento del valor medio e la larghezza della distribuzione vanno di pari passo.

Come sempre, risultano molto descrittivi skewness e kurtosis, che evidenziano la quasi costante diminuzione di asimmetria e un progressivo appiattimento a partire dalla situazione pre-trattamento. Per le variazioni percentuali si faccia sempre riferimento a Tabella 5.5

Infine, uniformità ed entropia confermano gli andamenti sostanzialmente costanti per tutto il corso del *follow up*, stabilizzandosi intorno ad un valore di entropia pari a -15.15 ± 0.02 per il CTV e -12.89 ± 0.04 per il GTV e uniformità di $(3.0 \pm 0.1) \times 10^{-5}$ per il CTV e $(1.41 \pm 0.07) \times 10^{-4}$ per il GTV.

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW89

Variazione percentuale rispetto all'acquisizione pre-terapia (baseline)												
Acq	Mean			Std.Dev/Mean			Skw			Krt		
	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	64,7	44,2	69,6	153,5	-17,9	-33,7	-17,2	-53,3	-35,1	-54,4		
1-3	61,7	50,2	71,2	108,8	0,7	12,1	-25,8	-54,9	-40,2	-53,0		
1-4	73,8	73,9	85,5	159,4	1,8	-6,5	-34,1	-63,4	-57,6	-62,6		
1-5	69,0	62,8	78,8	165,1	1,9	2,1	-31,0	-48,2	-56,0	-58,1		
1-6	90,2	88,4	104,5	199,2	0,3	1,6	-35,7	-58,0	-60,1	-62,4		
Variazione percentuale di ogni acquisizione rispetto alla precedente												
Acq	Mean			Std.Dev/Mean			Skw			Krt		
	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	64,7	44,2	69,6	153,5	-17,9	-33,7	-17,2	-53,3	-35,1	-54,4		
2-3	-1,8	4,1	1,0	-17,6	0,7	12,1	-10,3	-3,3	-7,8	3,0		
3-4	7,5	15,8	8,3	24,2	1,8	-6,5	-11,3	-18,9	-29,1	-20,5		
4-5	-2,8	-6,4	-3,6	2,2	1,9	2,1	4,7	41,5	3,8	12,3		
5-6	12,5	15,7	14,4	12,9	0,3	1,6	-6,8	-18,9	-9,4	-10,3		

Tabella 5.5: Variazioni percentuali dei parametri statistici di ogni acquisizione rispetto a quelli dell'esame pre-terapia (*baseline*) e di ogni acquisizione rispetto alla precedente per il paziente 3 di Tabella 4.2

Paziente 5

Analogamente al paziente 3, il “Pz 5” di Tabella 4.2, dopo la terapia, non ha presentato ricadute su un tempo superiore alla media di sopravvivenza ed è tuttora in vita dopo 5 anni e 5 mesi. Questa lunga sopravvivenza è probabilmente determinata dal fatto che il tumore diagnosticato è un glioma di III grado, l’unico del campione. Ad ogni modo, dalla descrizione ci si aspetta di trovare analogie con il paziente 3 analizzato precedentemente.

Anche in questo caso è opportuna una precisazione: analogamente a quanto riscontrato per l’altro soggetto della medesima categoria, il numero ridotto di acquisizioni utilizzate non corrisponde a quello che ci si aspetterebbe dopo cinque anni di controlli. I motivi sono gli stessi esposti per il paziente 3.

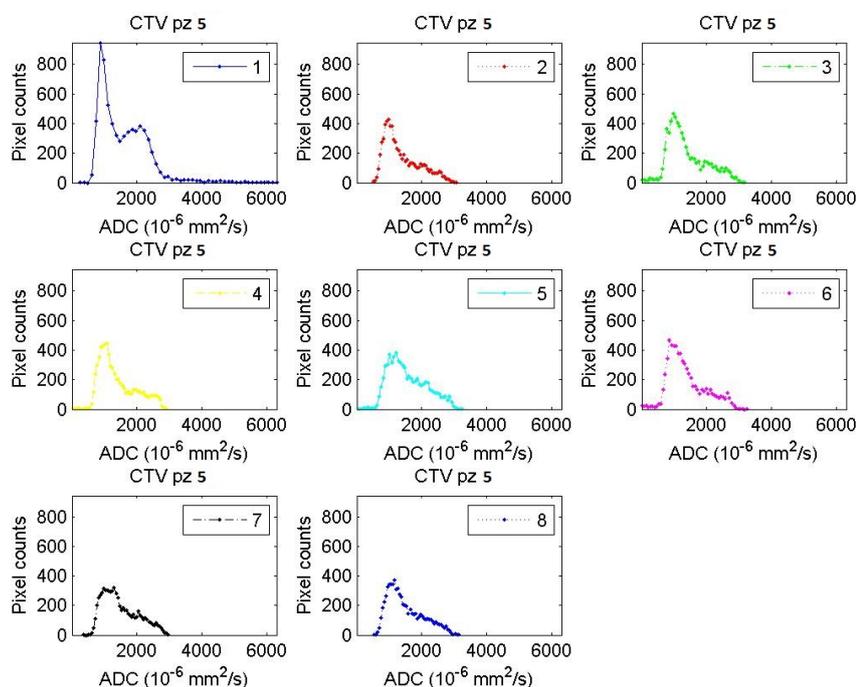
Di seguito vengono proposte le distribuzioni relative alle otto sequenze disponibili del Paziente 5 (Figura 5.14).

Variazione percentuale rispetto all’acquisizione pre-terapia (baseline)					
		Skw		Krt	
Acq	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	
1-2	-49,5	-101,1	-64,6	-82,0	
1-3	-57,1	-131,4	-63,3	-76,1	
1-4	-55,3	-135,4	-66,4	-74,5	
1-5	-68,3	-120,7	-68,2	-62,2	
1-6	-58,4	-127,6	-62,2	-79,2	

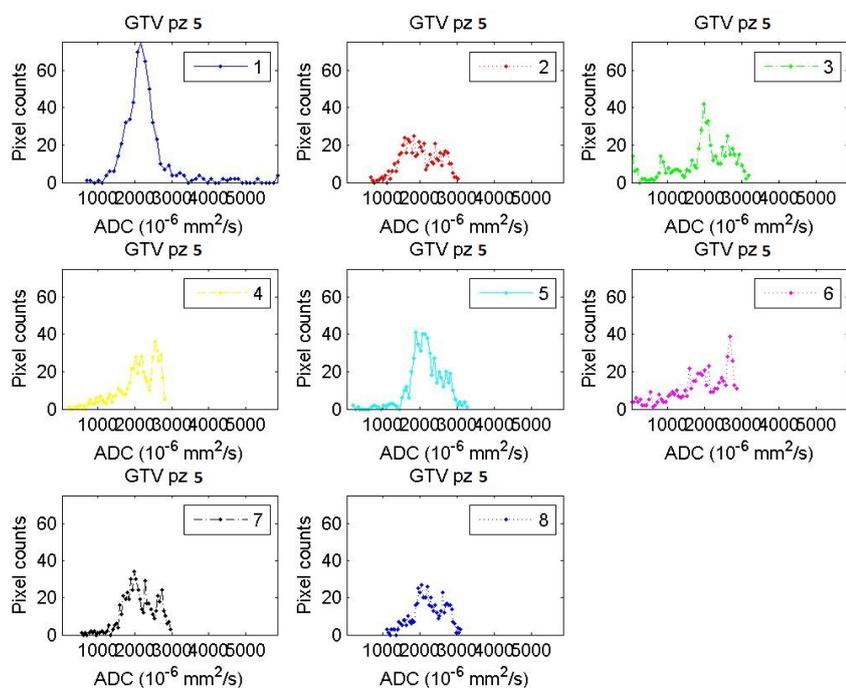
Tabella 5.6: Variazione percentuale di skewness e kurtosis di ogni acquisizione rispetto a quelli dell’esame pre-terapia (*baseline*) per il paziente 5 di Tabella 4.2

Ad una semplice osservazione dei grafici, sembrerebbe esserci una sostanziale conformità con quanto visto per il paziente 3: dopo il trattamento il picco della distribuzione si abbatte e l’istogramma mantiene una conformazione decisamente più appiattita ed allargata, sia per il CTV che per il GTV; per quest’ultimo, però, la conformazione risulta più fluttuante nonostante che, sulla lunga distanza, non tenda a riportarsi alla situazione iniziale, mentre il CTV si mantiene sostanzialmente stabile. Poiché si sta osservando un intervallo di tempo molto lungo, queste fluttuazioni, in particolare nella regione originaria della malattia, potrebbero essere dovute ad assestamenti del tessuto, che tenta di restaurarsi. Al contrario, il tessuto racchiuso all’interno del CTV sembra mantenersi più o meno uguale a se stesso.

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW91



(a) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del CTV.



(b) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del GTV.

Figura 5.14: Evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC nel corso del follow up; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up* del paziente 5 di Tabella 4.2

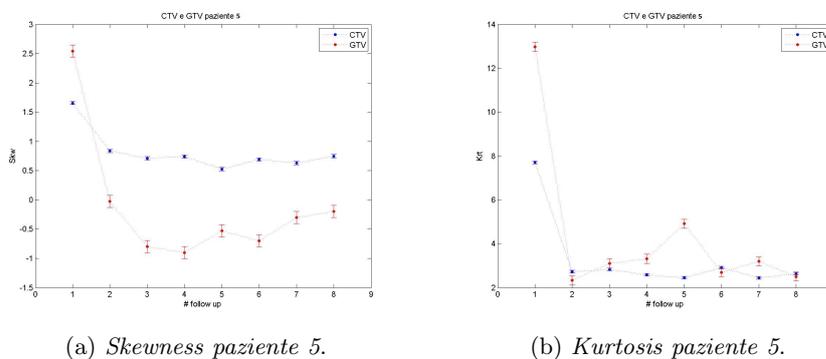


Figura 5.15: Andamenti dei parametri skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 5 di Tabella 4.2

Variatione percentuale rispetto all'acquisizione precedente				
	Skw		Krt	
Acq	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	-49,5	-101,1	-64,6	-82,0
1-3	-15,0	2819,2	3,7	33,0
1-4	4,1	12,7	-8,5	6,9
1-5	-29,0	-41,4	-5,2	48,2
1-6	31,3	33,1	18,7	-45,0

Tabella 5.7: Variazione percentuale di skewness e kurtosis di ogni acquisizione rispetto alla precedente per il paziente 5 di Tabella 4.2

Per brevità verranno riportati solo i grafici degli andamenti di skewness e kurtosis, che di nuovo interpretano meglio di tutte le altre grandezze le modificazioni macroscopiche degli istogrammi. Nonostante il GTV rimanga lo stesso più fluttuante rispetto ai risultati ottenuti per l'altra struttura, per entrambe le regioni si evidenzia chiaramente un crollo iniziale relativo al passaggio da pre a post terapia e un successivo plateau per tutte le altre acquisizioni, ad indicare una sostanziale stabilità della malattia.

Gli altri parametri verranno omessi, poiché hanno una lettura meno chiara, soprattutto per quanto riguarda i parametri che descrivono il GTV. Il comportamento più "scomposto" delle distribuzioni dei valori estratti da questo volume si ripercuote sugli andamenti dei suoi parametri rendendo media, moda, varianza e rapporto deviazione standard-media grandezze poco indicative, soprattutto vista la mancanza di un opportuno errore associato. Decisamente più stabili sono gli andamenti dei questi stessi parametri

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW93

per il CTV, che mantengono valori abbastanza costanti per tutto il *follow up*, come sembrerebbe ragionevole per una situazione clinica sostanzialmente stabile.

Anche uniformità ed entropia mantengono il loro comportamento abituale e l'entropia si posiziona su un valore medio di -9.02 ± 0.06 per il GTV e -12.64 ± 0.02 per il CTV, mentre l'uniformità risulta maggiore di un ordine di grandezza rispetto agli altri casi, per entrambe le strutture: $(1.68 \pm 0.05) \times 10^{-4}$ per il CTV e $(2.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ per il GTV.

5.3.3 Pazienti recidivanti su tempi lunghi

Paziente 1

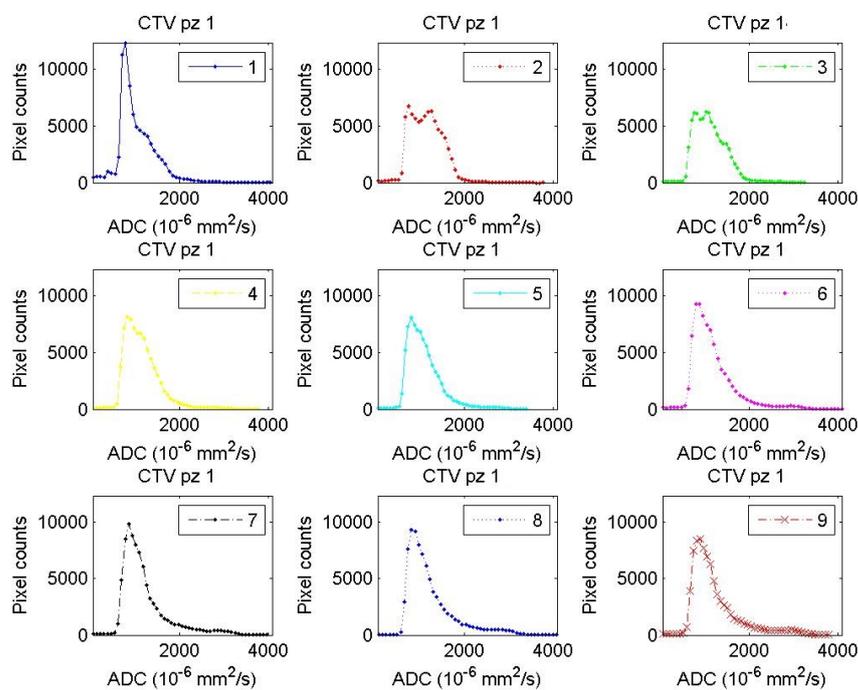
Il "Pz 1", riportato in Tabella 4.2 appartiene all'ultimo gruppo, poiché la ricomparsa della recidiva viene diagnosticata in corrispondenza del quinto esame di *follow up* (ca. 15 mesi dopo il trattamento). Il paziente è tuttora in vita.

In Figura 5.16, sono riportati i grafici che rappresentano l'evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC all'interno delle strutture CTV e GTV, nel corso del tempo. I nove riquadri corrispondono alle nove sequenze acquisite dalla diagnosi in poi, partendo dall'esame pre-terapia e, a seguire, gli otto *follow up*; tutte le sequenze sono state acquisite a distanza temporale di circa 3 mesi le une dalle altre.

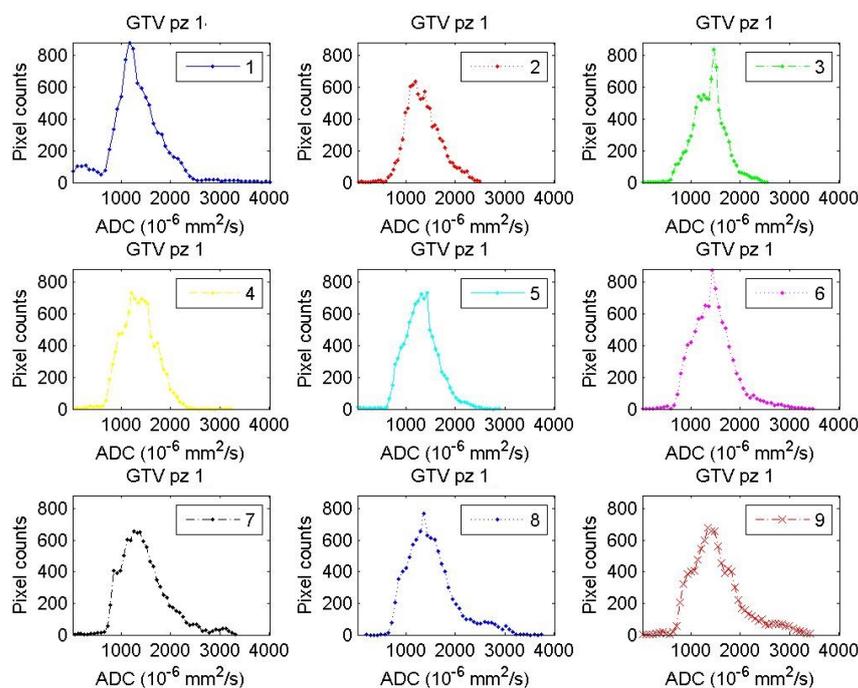
Nel primo riquadro, in alto a sinistra nella Figura 5.16a, è mostrato l'istogramma dei valori di ADC all'interno del CTV, contornato dal medico-radioterapista nella fase precedente al trattamento. Per questo paziente, il CTV è stato disegnato sulla base del contrasto prodotto dall'edema nelle immagini pesate in T2 e ampliandone leggermente i contorni.

Come si può vedere in Figura 5.16a, la distribuzione è piccata verso valori di ADC intorno ai $1200 \times 10^{-6} mm^2/s$, ma mostra una spalla verso valori più elevati (intorno ai $1500 \times 10^{-6} mm^2/s$). Il picco racchiude un'informazione mista, poiché "bassi" valori di ADC possono corrispondere a regioni tumorali ad aumentata cellularità, ma che, nel caso dei tessuti cerebrali, non differiscono in maniera troppo evidente da quelli che caratterizzano i tessuti sani, creando ambiguità nell'interpretazione dei risultati. La spalla verso gli ADC più elevati corrisponde, invece, alle zone necrotiche, generate dalla morte "per soffocamento" (ipossia) delle cellule tumorali che si trovano nella parte centrale del tumore solido e dalle regioni invase dall'edema, provocato dall'infiltrazione della neoplasia all'interno dei tessuti sani (Figura 5.7).

Questa interpretazione è confermata da molti altri studi¹²¹³¹⁶²⁰: in particolare, è stata indicata come particolarmente interessante, ai fini prognostici, la porzione di istogramma relativa ai valori di ADC inferiori, che conterrebbero l'informazione realmente significativa per distinguere se, ad esempio, la comparsa, successiva al trattamento, di una regione ad alto contrasto nelle



(a) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del CTV.



(b) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del GTV.

Figura 5.16: Evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up*

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW95

immagini morfologiche corrisponda ad una reale ripresa della malattia o solo una reazione temporanea alla terapia (*pseudo-progression*); in questi studi è stata riconosciuta la regione ad alto contrasto in T2 (circostrita nel nostro caso dalla struttura CTV o estratta tramite la segmentazione operata dalla seconda versione di ROISAT) come molto indicativa in questo senso, in particolare dal punto di vista prognostico e predittivo relativamente alla risposta alla terapia.

In conseguenza al trattamento, si verifica un notevole abbattimento del picco corrispondente agli ADC inferiori, mentre risultano maggiormente frequenti, rispetto alla prima acquisizione, i pixel con valori di diffusione maggiori, andandosi a creare un secondo picco, all'incirca della stessa entità del primo e che quasi ingloba la "spalla" notata in precedenza; la conformazione risultante è bimodale, caratterizzata da un generale spostamento dell'istogramma verso valori maggiori rispetto a prima del trattamento.

Questa conformazione viene mantenuta anche nell'acquisizione successiva, benché la separazione tra i due picchi sia di molto ridotta e la spalla verso i valori elevati di ADC risulti maggiormente distinta. Con ogni probabilità quest'ultima corrisponde alla regione di necrosi, mentre lo spostamento del secondo picco verso valori inferiori di diffusione apparente potrebbe essere dovuto ad una regressione della regione edematosa in conseguenza alla terapia, così come ad un aumento della cellularità a seguito di un'infiltrazione della malattia nel tessuto osservato¹⁶.

La riduzione dei valori di ADC dell'istogramma procede in maniera graduale, ma costante nel corso del *follow up* portando alla riformazione completa di un picco unico in corrispondenza della sesta acquisizione, in coincidenza della quale è stata diagnosticata la ricomparsa della patologia servendosi delle normali immagini anatomiche.

Questo fatto è molto interessante: infatti, se questo comportamento risultasse indicativo nella definizione dell'evoluzione della patologia e venisse confermato su un adeguato campione di pazienti, sarebbe possibile utilizzare le DWI per prevedere in anticipo la propensione della neoplasia a riproporsi nella regione esaminata, poiché la tendenza alla riformazione del picco unico era visibile ben prima della sesta acquisizione.

Le distribuzioni successive sembrano mantenere una conformazione abbastanza stabile, senza alterazioni evidenti.

Per quanto riguarda il GTV, invece, gli istogrammi si modificano in maniera decisamente meno evidente e la loro forma non varia in maniera sostanziale nel periodo di tempo osservato. L'unica analogia immediatamente riscontrabile è l'abbassamento del picco tra le acquisizioni precedente e successiva al trattamento, che però viene ripristinato quasi completamente già dalla terza, alla quale segue una lenta e non costante diminuzione nel corso del *follow up*.

Di seguito sono riportati i grafici degli andamenti dei parametri statistici calcolati sulle distribuzioni appena viste (Figure 5.17 e 5.18).

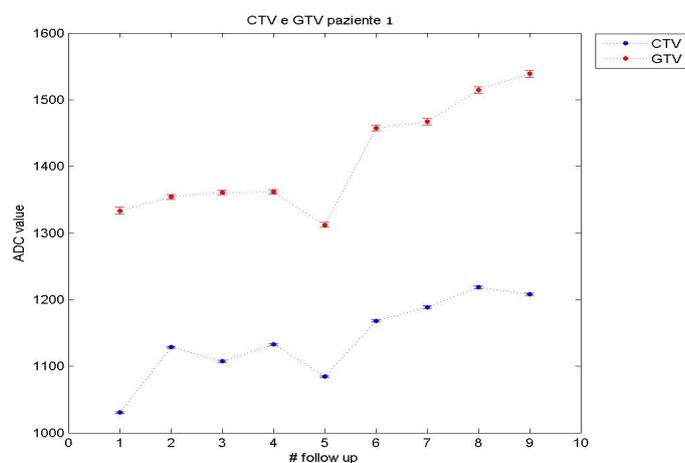
Come già accennato, sono già stati condotti altri progetti con un taglio molto simile a quello esposto in questo lavoro, anche se la letteratura in proposito è ancora abbastanza scarsa, poiché si tratta di un ambito in via di espansione. Tuttavia, le strade finora percorse per affrontare la tematica in questione sono simili a quelle intraprese in questo lavoro e si ritrova anche una buona conformità dei risultati. L'unica differenza è che, in genere, vengono esaminati solo uno o due dei parametri statistici di seguito analizzati: qui si è inteso produrre una panoramica più ampia, identificando quali di queste grandezze possano essere promettenti a fini prognostici e quali, invece, sono presumibilmente scarsamente indicative.

In Figura 5.17a è mostrato l'andamento del valor medio della distribuzione con associato il relativo errore standard $\frac{\sigma}{\sqrt{N}}$. L'andamento è simile nelle due curve, benché occupino due intervalli di valori shiftati di circa $300 \text{ mm}^2/\text{s}$ l'una rispetto all'altra. La tendenza sembrerebbe ad un progressivo e graduale aumento, benché non sia possibile definire con quanta confidenza questo comportamento sia reale, poiché l'errore associato risulta irragionevolmente piccolo.

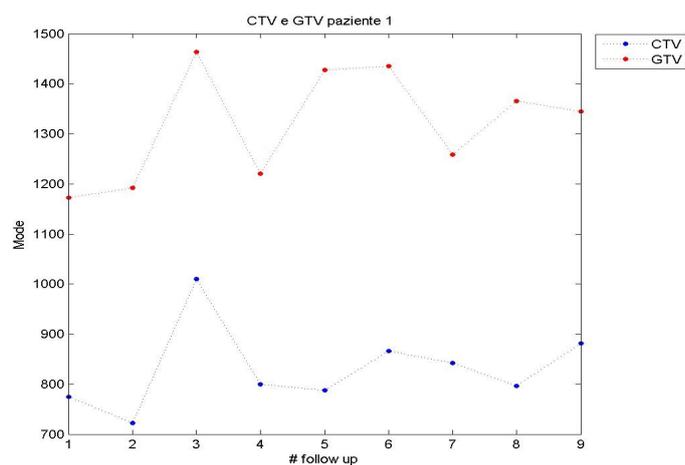
Ad ogni modo, la tendenza abbastanza costante alla crescita del valore del coefficiente di diffusione apparente (vedi Tabella 5.8) sembra non essere in grado di descrivere lo *shift* "regressivo" delle prime distribuzioni successive al trattamento, riconosciuto durante l'osservazione diretta dei grafici. Inoltre, sembra contraddire quanto atteso: infatti, il riproporsi di una ricaduta della malattia dovrebbe comportare un aumento della cellularità del tessuto con una conseguente diminuzione dell'ADC¹³, come, in effetti, è stato riscontrato nei pazienti 2 e 4 del campione, anch'essi con diagnosticata recidiva. Lutz *et al.*, che osservano in specifico l'evoluzione del segnale delle immagini pesate in T2, nel loro campione dispongono di una maggioranza di soggetti che hanno un'evoluzione del valor medio di ADC verso una graduale diminuzione, ma anche alcuni che si comportano in modo apparentemente anomalo, come in questo caso. Una possibile giustificazione che viene data è che l'edema peritumorale possa espandersi senza una concomitante infiltrazione cellulare, situazione che, invece si verifica negli altri casi. Infatti, il segnale iperintenso, visibile nelle immagini T2, che, tradizionalmente, si è ritenuto desse informazioni solo relative all'edema, in realtà può essere provocato anche da altri fattori, come l'infiltrazione cellulare ed effetti collaterali dovuti alla terapia¹³. Lo stesso comportamento viene indicato, sempre nel lavoro di Lutz, anche nei casi di pseudoprogressione.

E' stata individuata una correlazione significativa tra gli andamenti della media nelle due regioni, con tutti e tre i metodi statistici utilizzati, sia parametrici che non parametrici (> 0.8 in tutti i casi, con $P \ll 0.05$).

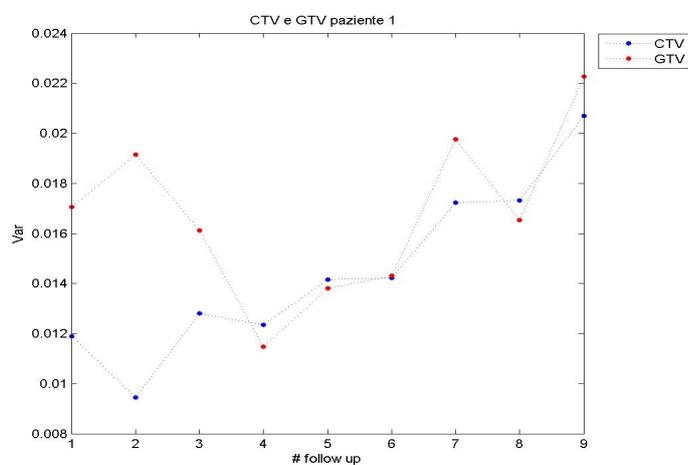
5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW97



(a) *Media.*

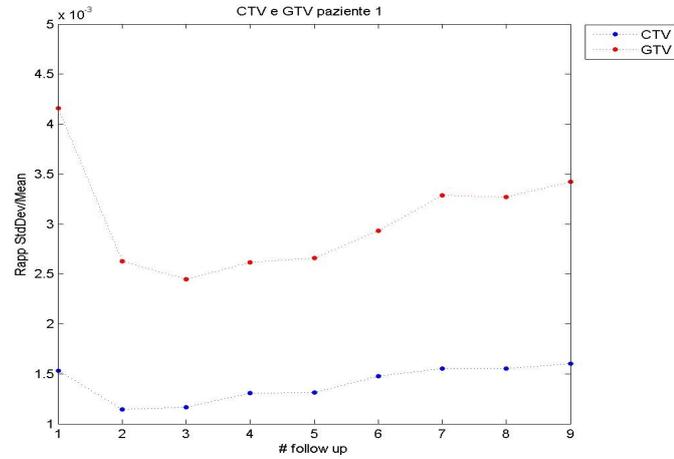


(b) *Moda.*

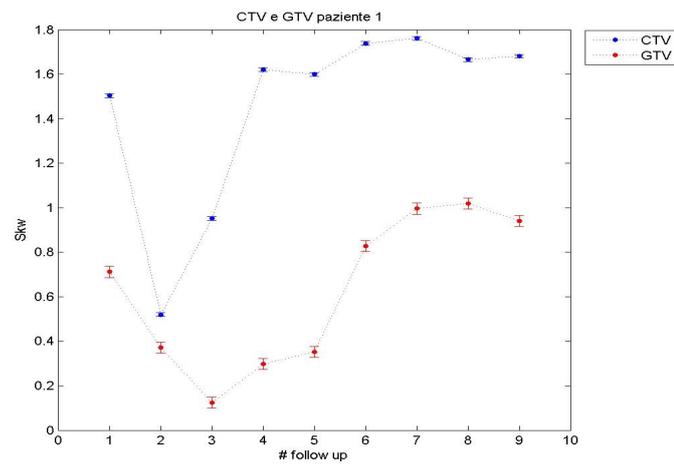


(c) *Varianza.*

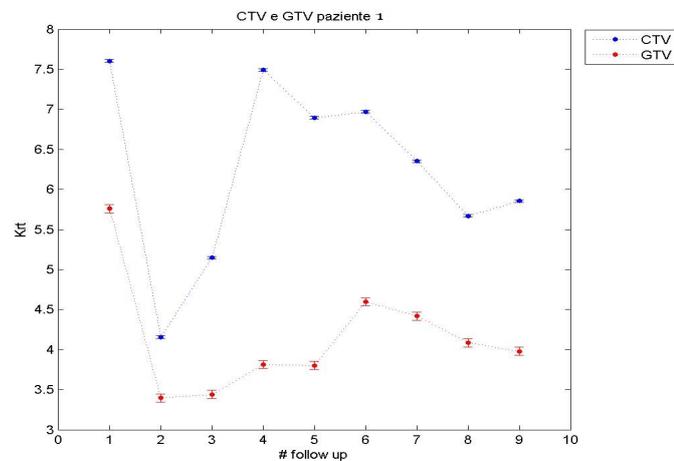
Figura 5.17: Andamenti di media, moda e varianza delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2



(a) Rapporto deviazione standard-media.



(b) Skewness.



(c) Kurtosis.

Figura 5.18: Andamenti del rapporto tra deviazione standard e media e di skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori di ADC delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW99

Osservando il grafico dell'evoluzione della moda (Figura 5.17b) non si nota un andamento significativo, in parte anche a causa della conformazione bimodale assunta dalle distribuzioni dopo il trattamento, sebbene con entità differente. Per entrambe le regioni, i valori appaiono abbastanza fluttuanti, l'unico dato indicativo è che, come per il parametro precedente, sono decisamente più alti per il GTV (oscillano intorno ad un valor medio di circa $1300 \times 10^{-6} mm^2/s$), rispetto al CTV (in media $< 900 \times 10^{-6} mm^2/s$).

In figura 5.17c, sono riportati i valori assunti dalla varianza calcolata come riportato nell'equazione 3.2. Benché non sia un comportamento particolarmente definito, sembrerebbe manifestarsi una tendenza ad un generale aumento con il decorso della patologia, decisamente più netto nel caso del CTV. Una maggiore varianza dei valori assunti dai pixel della regione potrebbe essere imputata alla disomogeneità caratteristica del GBM.

I successivi tre grafici presentano andamenti decisamente più incoraggianti. In Figura 5.18a è riportato il grafico del rapporto tra deviazione standard e media, calcolati sulle nove distribuzioni di Figura 5.16: l'andamento presenta un primo scarto verso il basso tra acquisizione pre- e post-terapia, per poi riprendere una lenta e graduale risalita che tende a riportarsi al valore originario pre-trattamento. Questo è dovuto ad un aumento della deviazione standard superiore a quello che si ottiene per la media della distribuzione e ciò è accettabile, poiché il GBM è un tumore che si sviluppa in maniera estremamente eterogenea. Le variazioni percentuali del parametro, calcolato per ognuna delle distribuzioni del *follow up* rispetto a quello relativo all'immagine pre-terapia sono riportate in Tabella 5.8, dove, per completezza, sono mostrate anche le variazioni percentuali relative tra ogni acquisizione e quella precedente.

Tutti i test parametrici utilizzati individuano, anche in questo caso, una buona correlazione (i coefficienti di correlazione sono compresi tra 0.7 e 0.8 con $P = 0.01$) tra gli andamenti relativi alle due strutture.

Molto interessanti sono gli andamenti di skewness e kurtosi (Figure 5.18b e 5.18c): si tratta dei parametri che senza dubbio rappresentano nella maniera più esplicativa le modificazioni delle distribuzioni nel corso del *follow up*, interpretando le diverse fasi dell'evoluzione della patologia. Come già discusso, la skewness rappresenta l'asimmetria di una distribuzione, assumendo valori tanto più positivi quanto più la coda verso le x positive diventa pesante e viceversa nel caso contrario, tendendo a zero per una conformazione sostanzialmente simmetrica. Quello che evidenziano gli andamenti del parametro sia per CTV che GTV è che vi è una certa asimmetria prima del trattamento, in particolare per il *clinical target volume*, con la coda di destra maggiormente pronunciata (come in effetti si riscontra nel primo riquadro di Figura 5.16); il *gross tumor volume* ha una skewness anch'esso positiva, ma che si discosta di poco dallo zero, evidenziando un'asimmetria meno pronunciata. La tendenza ad assumere una configurazione

maggiormente simmetrica è mantenuta dal GTV anche nella terza acquisizione, mentre la skewness del CTV riprende immediatamente la risalita, mostrando fin da subito la tendenza dell'istogramma a riportarsi verso valori inferiori. Questo comportamento è confermato anche nei lavori di Lutz *et al.*. Lo *shift* è riscontrabile anche nell'acquisizione successiva, comportando un notevole salto verso l'alto (+70.3% rispetto all'esame precedente; si veda 5.8) del valore di skewness del CTV, che supera addirittura quello iniziale (maggiore del 7,8 %; si veda Tabella 5.8); stavolta anche la distribuzione del GTV risente della stessa alterazione, benché di entità decisamente minore. La tendenza all'aumento della skewness è confermata anche da M. Nowosielsky *et al.*, nel cui lavoro si afferma che, in caso di progressione del tumore, la coda di destra è più accentuata rispetto a quella di sinistra che rimane più ripida e in generale l'istogramma diventa sottile e piccato, dando origine ad una distribuzione più omogenea e concentrata intorno a valori di ADC inferiori¹⁶. Le motivazioni biologiche alla base di questo comportamento vengono imputate all'aumentata cellularità del tessuto, conseguente alla crescita tumorale.

Contrariamente a prima, nelle acquisizioni successive la skewness del CTV non subisce sostanziali alterazioni, procedendo nel corso del *follow up* in maniera sostanzialmente costante, diversamente dal GTV che prosegue la sua risalita per stabilizzarsi dalla sesta acquisizione in poi, ovvero da quanto viene diagnosticata la recidiva. Il GTV, quindi, confermerebbe il dato ottenuto dall'immagine morfologica, mentre il CTV sembrerebbe anticipare l'evoluzione della patologia. La prerogativa della regione ad alto contrasto in T2 (compresa all'interno del CTV nel caso in esame) di avere un carattere predittivo relativamente alla prognosi della malattia è riconosciuto in quasi la totalità degli studi sull'argomento¹²¹³¹⁶²⁰.

D'altro canto, la kurtosi è ancora più interessante, ma anche di più difficile interpretazione: inizialmente (pre-terapia) entrambe le distribuzioni sono molto piccate (in maniera particolare quella relativa al CTV), subiscono un forte abbattimento dopo il trattamento, per poi riacquisire un valore di kurtosi pari a quello originario, nel giro di quattro acquisizioni successive, per quanto riguarda il CTV, mentre nel caso del GTV l'aumento graduale prosegue fino alla sesta, benché non si riporti a quello originario. Fin qui, il comportamento è sovrapponibile a quanto visto per la skewness, compresa la reazione anticipata, rispetto al GTV, del CTV, che ripristina i valori pre-terapia sempre con due acquisizioni d'anticipo (ca. 6 mesi) rispetto all'altra ROI. A partire dalla quarta-sesta acquisizione rispettivamente, l'andamento si modifica rispetto a quanto visto in precedenza: la tendenza è ad una graduale diminuzione, per entrambe le regioni, dei valori assunti dal parametro.

Non è possibile dare una spiegazione certa che giustifichi questo comportamento: quello che si potrebbe inferire, confrontando i risultati ottenuti con altri pazienti liberi da malattia o recidivanti, è un non-peggioramento

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW101

della patologia, che, dopo la diagnosi della recidiva, tenderebbe, nonostante tutto, a mantenersi stabile. Questo giustificerebbe la sostanziale invarianza della skewness dalla quinta acquisizione in poi e l'aumento del valore medio di ADC, diversamente da quanto atteso. Naturalmente si tratta di una considerazione assolutamente preliminare, senza alcuna pretesa di essere un'interpretazione definitiva e generalizzabile.

Nel caso della skewness, i test statistici non segnalano correlazioni significative tra gli andamenti dei parametri delle due strutture (tranne nel caso del test di Spearman che individua una debole correlazione, $r_s = 0.68$, con $P = 0.05$); per quanto riguarda la kurtosis, invece, viene individuata una significativa non correlazione, con tutti i coefficienti compresi tra 0.55 e 0.65 e $P < 0.05$.

Infine, uniformità ed entropia: l'uniformità assume valori molto piccoli (nell'ordine dei 10^{-4}) indicando un'accentuata disomogeneità del tessuto, in particolare nella regione edematica. Allo stesso modo si ha un'entropia maggiore (in valore assoluto) nel caso del CTV rispetto al GTV. Non notandosi particolari modificazioni degli andamenti nel corso del *follow up* (ad eccezione di una lieve flessione nel passaggio tra prima e dopo la terapia), è più interessante annotare se le due aree patologiche si stabilizzano su valori caratteristici, riscontrabili anche in altri pazienti. In questo caso, l'uniformità è pari a $(1.41 \pm 0.05) \times 10^{-5}$ per il CTV e $(1.13 \pm 0.05) \times 10^{-4}$ per il GTV, mentre l'entropia si stabilizza intorno ai -16.22 ± 0.03 per il CTV e -13.17 ± 0.05 per il GTV.

Variazione percentuale rispetto all'acquisizione pre-terapia (baseline)																
Acq	Mean			Mode			Std.Dev/Mean			Skw			Krt			
	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	9,5	1,6	-6,8	1,7	-25,3	-36,8	-65,5	-47,7	-45,3	-41,1						
1-3	7,5	2,1	30,3	24,8	-24,0	-41,1	-36,7	-82,5	-32,3	-40,3						
1-4	9,9	2,1	3,2	4,1	-14,6	-37,0	7,8	-58,1	-1,5	-33,8						
1-5	5,2	-1,6	1,7	21,8	-14,2	-36,0	6,4	-50,5	-9,3	-34,0						
1-6	13,3	9,3	11,7	22,4	-3,7	-29,5	15,6	16,4	-8,3	-20,2						
1-7	15,4	10,1	8,6	7,4	1,2	-20,9	17,2	40,0	-16,5	-23,3						
1-8	18,3	13,6	2,7	16,5	1,4	-21,3	10,8	43,2	-25,4	-29,1						
1-9	17,3	15,4	13,8	14,8	4,7	-17,6	11,8	32,2	-23,0	-30,9						
Variazione percentuale di ogni acquisizione rispetto alla precedente																
Acq	Mean			Mode			Std.Dev/Mean			Skw			Krt			
	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)	CTV (%)	GTV (%)
1-2	9,5	1,6	-6,8	1,7	-25,3	-36,8	-65,5	-47,7	-45,3	-41,1						
2-3	-1,8	0,5	39,9	22,7	1,7	-6,9	83,2	-66,6	23,8	1,3						
3-4	2,3	0,0	-20,8	-16,6	12,4	7,0	70,3	139,7	45,6	10,9						
4-5	-4,3	-3,6	-1,5	17,0	0,5	1,6	-1,3	18,2	-8,0	-0,3						
5-6	7,7	11,1	9,9	0,6	12,2	10,1	8,7	135,2	1,1	20,9						
6-7	1,8	0,7	-2,8	-12,3	5,2	12,2	1,4	20,3	-8,9	-3,9						
7-8	2,5	3,2	-5,5	8,4	0,1	-0,5	-5,4	2,3	-10,8	-7,6						
8-9	-0,9	1,6	10,8	-1,5	3,3	4,6	0,9	-7,7	3,3	-2,5						

Tabella 5.8: Variazioni percentuali dei parametri statistici di ogni acquisizione rispetto a quelli dell'esame pre-terapia (*baseline*) e di ogni acquisizione rispetto alla precedente per il paziente 1 di Tabella 4.2

Paziente 4

Il paziente 4 di Tabella 4.2 richiede una trattazione particolare: si tratta, infatti, di un soggetto, che, successivamente ad una situazione stabile, tendente ad apparente miglioramento, alla quarta acquisizione (circa un anno dopo la terapia) si ripropone una recidiva della malattia in una regione periferica rispetto a quella inizialmente trattata e che si sviluppa molto rapidamente invadendo il tessuto circostante, come si vede in Figura 5.19.

Confrontando le zone colpite dalla recidiva con le strutture disegnate dal medico sulla CT (Figura 5.19), si nota chiaramente che durante l'evoluzione della patologia, la recidiva sconfinava dalla regione precedentemente occupata e analizzare solo la struttura individuata prima della terapia risulta riduttivo.

Si nota, anche, che una piccola regione ad alto contrasto rimane nell'acquisizione successiva al trattamento (Figura 5.19b, area cerchiata in rosso). Sembra sparire nelle due acquisizioni successive, per poi ripresentarsi, praticamente nella stessa posizione, in corrispondenza della quarta sequenza di *follow up* (Figura 5.19e, area cerchiata in rosso). Nell'esame successivo, la patologia ha dilagato, invadendo velocemente tutti i tessuti circostanti.

Si è deciso quindi di condurre un'indagine ad hoc e, servendosi della seconda versione di ROIS_{AT}, è stata segmentata quella piccola regione ad alto contrasto evidenziata nella seconda sequenza di acquisizione (cerchio rosso in Figura 5.19b) ed estratti i valori di ADC, da quella stessa regione, su tutta la serie di immagini.

Nelle Figure 5.21 e 5.23 sono riportati i plot degli istogrammi e i grafici con gli andamenti più interessanti. Separatamente (Figura 5.22) viene mostrato il grafico dell'andamento del valor medio di ADC con associate le immagini delle slice, in modo da interpretarne più chiaramente l'evoluzione.

Osservando le distribuzioni di Figura 5.21 si vede chiaramente una configurazione abbastanza stretta e piccata, che tende a modificarsi, inizialmente, verso una forma più allargata e appiattita, salvo poi tornare a stringersi ed alzarsi, in maniera ancora superiore rispetto alla situazione iniziale, in corrispondenza della quinta acquisizione. L'ultimo istogramma è stato inserito per completezza, ma non ha reale significato nella comprensione dell'evoluzione della malattia: infatti, come mostrato in Figura 5.22, in corrispondenza dell'ultima acquisizione, la regione considerata è stata quasi completamente invasa dalla necrosi, caratterizzata da valori di diffusione elevatissimi.

Dato il comportamento anomalo e apparentemente imprevedibile di questa forma neoplastica, si è valutato quali dei parametri statistici calcolati in questo studio potessero rivelarsi potenzialmente predittivi della degenerazione della malattia. In Figura 5.22, si vede come la media corrisponda a quanto risulta manifesto anche dall'osservazione dell'immagine anatomica, ma non fornisce indicazioni ulteriori. Poiché ci si aspetta un aumento del-

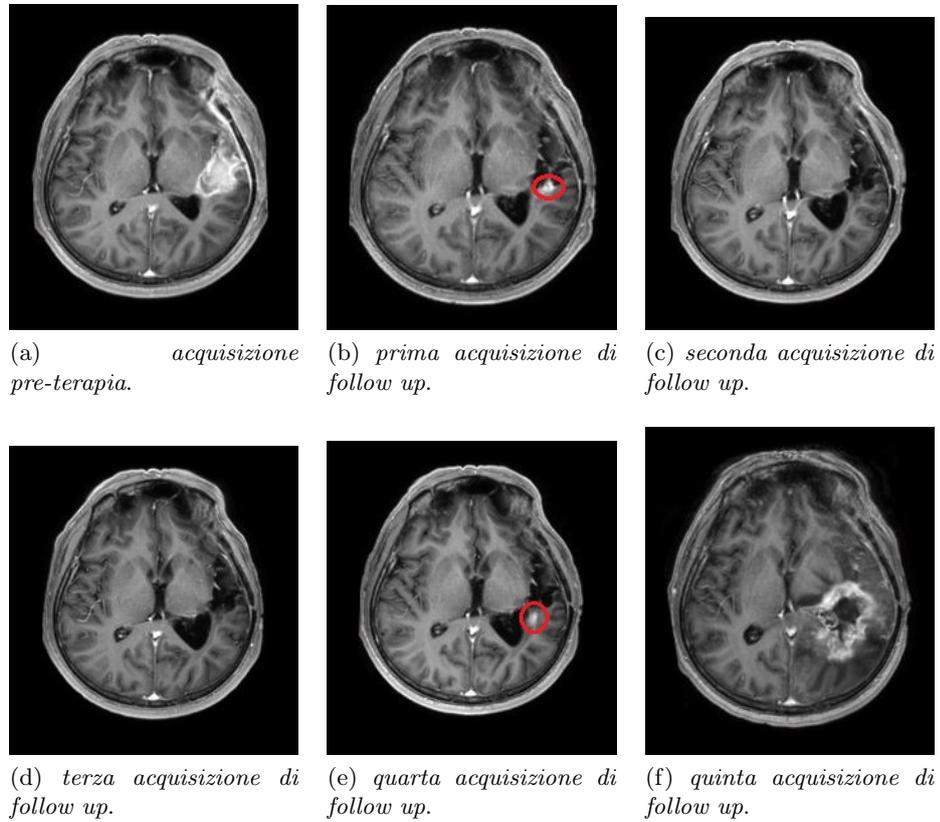


Figura 5.19: Evoluzione della medesima slice cerebrale lungo la serie di acquisizioni del paziente 4 di Tabella 4.2; nei riquadri b) ed e) è stata circoscritta una piccola regione ad alto contrasto dopo il trattamento

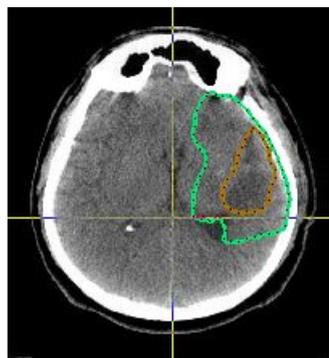


Figura 5.20: Immagine CT della medesima slice di Figura 5.19 con disegnato in verde il *clinical target volume* e in marrone il *gross tumor volume*

5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW105

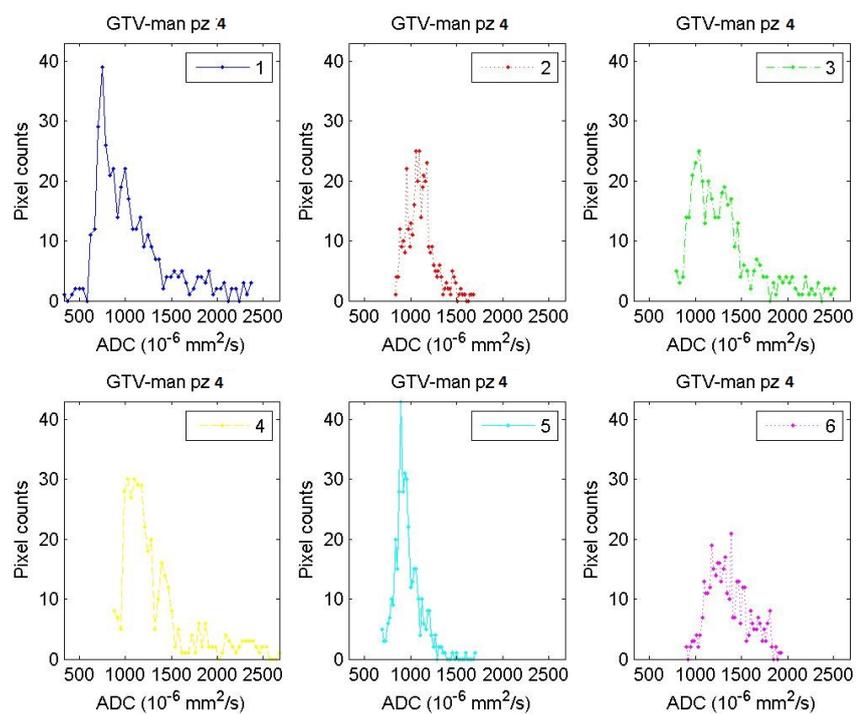


Figura 5.21: Evoluzione delle distribuzioni dei valori di ADC nel corso del follow up per la regione ad alto contrasto in T1, circoscritta in Figura 5.19; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up* del paziente 4 di Tabella 4.2

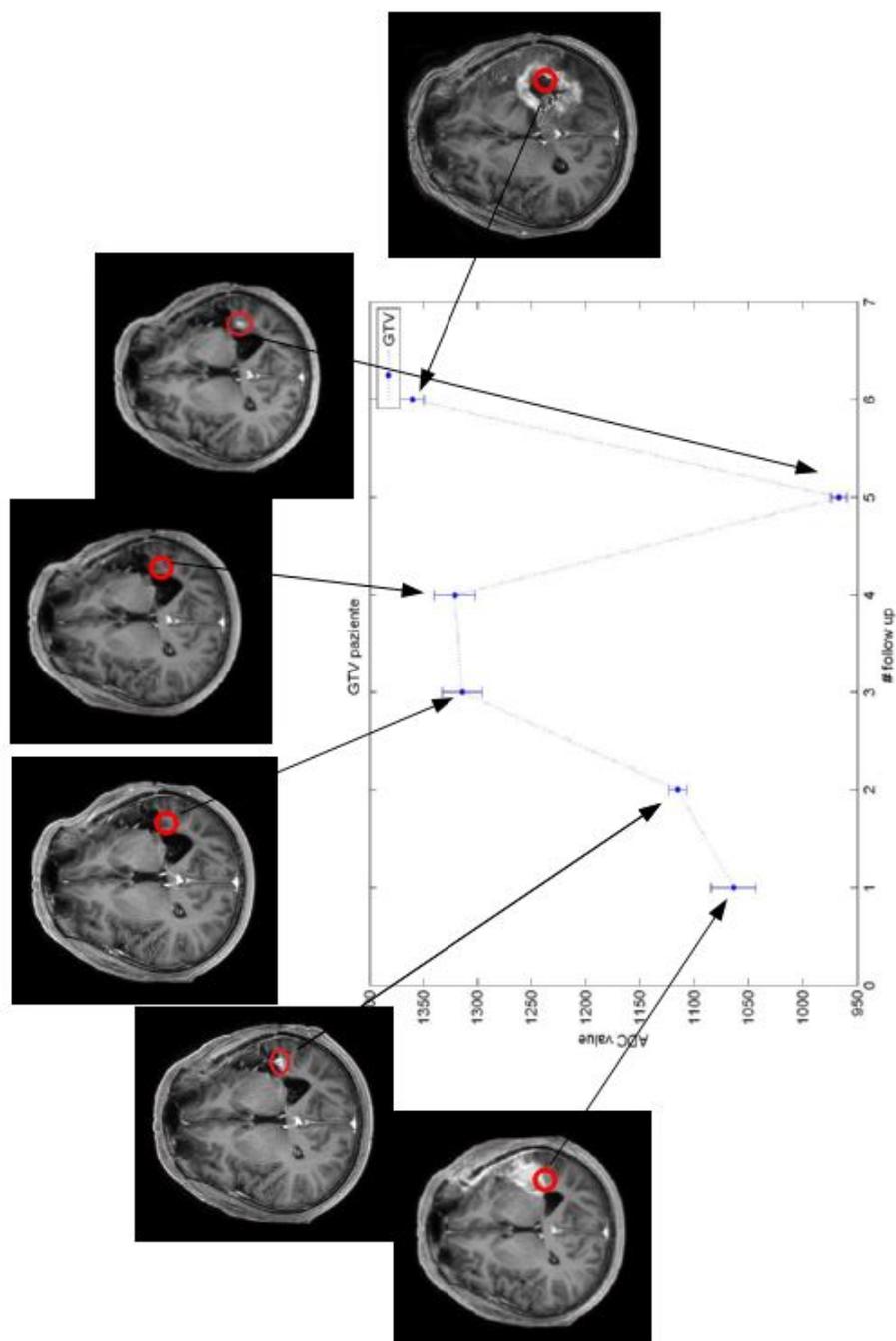
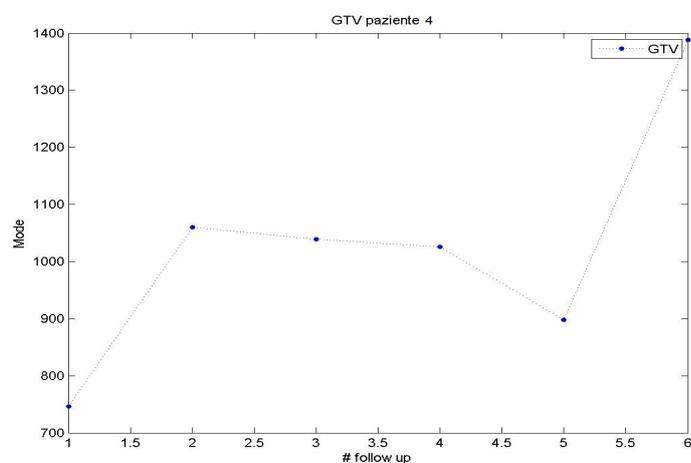
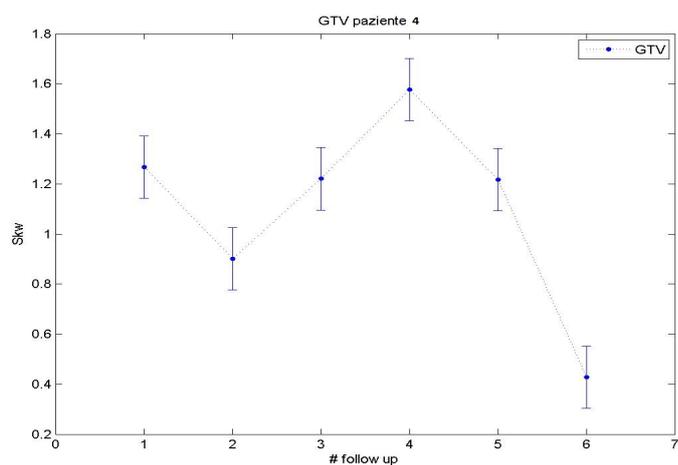


Figura 5.22: Grafico dell'evoluzione temporale della media affiancato alle immagini di una slice esemplificativa. Si vede come la regione, prima della terapia, sia invasa dal tumore e quindi abbia una cellularità molto elevata, con conseguente basso valore di ADC. Quest'ultimo tende ad alzarsi dopo il trattamento, benché la zona sia ancora contrastata in T1. Allo scomparire della regione ad alto contrasto, la media aumenta del ... e si mantiene stabile anche nell'acquisizione successiva, per poi crollare (inserire percentuale) al manifestarsi della recidiva.

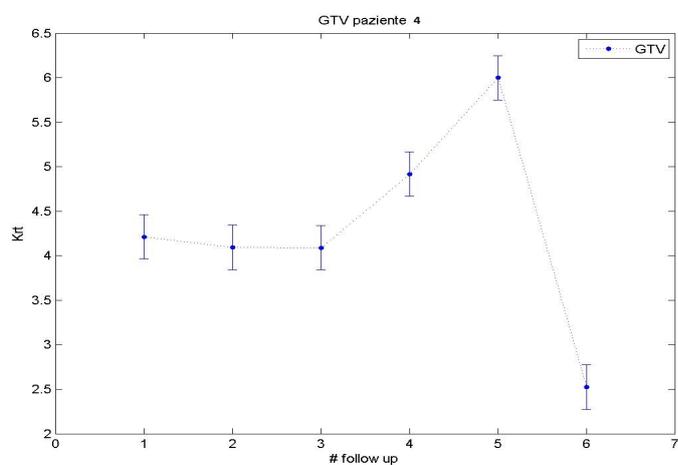
5.3. ANALISI DETTAGLIATA DEI CASI STUDIATI CON IMAGING DW107



(a) *Moda.*



(b) *Skewness.*



(c) *Kurtosis.*

Figura 5.23: Andamenti di moda, skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori di ADC della regione evidenziata in Figura 5.19, nel corso del *follow up* del paziente 4 di Tabella 4.2

la cellularità con il peggioramento della malattia, ci si attende anche una diminuzione della diffusione e in effetti la moda sembrerebbe avere questa tendenza (si veda Tabella ... per le variazioni percentuali), ad eccezione naturalmente dell'ultimo punto, riferito alla regione necrotica e che si invita a non considerare.

Per quanto riguarda la skewness non si hanno informazioni molto interessanti, poiché i primi cinque punti fluttuano intorno ad un valor medio di $1,2 \pm 0,2$, senza individuare un qualche andamento particolare. Questo, comunque, corrisponde abbastanza bene a quanto osservato per i pazienti precedenti, infatti, la skewness è una buona interprete dell'evoluzione della malattia quando viene calcolata sulla regione edematica.

Chi si rivela particolarmente interessanti è la kurtosis, che rimane circa costante nelle prime tre acquisizioni, ma ricomincia a crescere già dalla quarta, in anticipo rispetto a quanto riscontrato dalle immagini visibili in Figura 5.19.

Variazione percentuale rispetto all'acquisizione pre-terapia (baseline)		Variazione percentuale di ogni acquisizione rispetto alla precedente	
Krt		Krt	
Acq	GTV (%)	Acq	GTV (%)
1-2	-2,8	1-2	-2,8
1-3	-2,9	2-3	-0,1
1-4	16,7	3-4	20,2
1-5	42,4	4-5	22,0
1-6	-40,1	5-6	-57,9

Tabella 5.9: Variazione percentuale della kurtosis di ogni acquisizione rispetto a quelli dell'esame pre-terapia (*baseline*) e di ogni acquisizione rispetto alla precedente per il paziente 4 di Tabella 4.2

Si è omesso di riportare i grafici di varianza e rapporto deviazione standard-media, poiché non si è ritenuto che i loro andamenti dessero informazioni rilevanti. Per quanto riguarda uniformità ed entropia il loro comportamento è sempre quello di mantenersi costante per tutto il *follow up* e, in questo caso, l'entropia si assesta su un valor medio di -8.51 ± 0.08 , mentre l'uniformità è $(0.53 \pm 0.04) \times 10^{-4}$.

5.4 Sintesi dei risultati ottenuti dall'imaging DW

Vista la grande quantità di informazioni fornita nelle precedenti pagine, si dedica questa sezione ad un riassunto dei risultati maggiormente interessanti ottenuti dall'analisi dei dati forniti dall'imaging in diffusione.

Nonostante ogni paziente evidenzi una sua specificità nell'evoluzione del tumore da cui è affetto, per alcuni parametri sono stati individuati andamenti caratteristici a seconda della categoria alla quale il soggetto appartiene. In sintesi:

- I parametri statistici che si sono rivelati i migliori indicatori dell'evoluzione della patologia per tutti i pazienti esaminati, sono skewness e kurtosis.
- Si è riscontrato che in caso di peggioramento della patologia entrambe le grandezze aumentano il loro valore: questo coincide ad un restringimento della forma della distribuzione, che diventa maggiormente piccata, insieme ad un aumento della sua asimmetria a favore di un ingrossamento della coda verso gli alti valori di ADC (si vedano i grafici riportati nelle Figure 5.5b e c, 5.9, 5.18 e 5.23 c). Solo la skewness del paziente 4 non dimostra un andamento molto netto in questo senso, ma bisogna considerare che si è analizzata una porzione molto piccola del volume tumorale.
- In caso di miglioramento delle condizioni del paziente i valori tendono a calare e stabilizzarsi per entrambe le grandezze, il che significa che le distribuzioni diventano più appiattite e simmetriche (si vedano i grafici delle Figure 5.12b e c e 5.15).
- In alcuni pazienti sono stati individuati anche altri parametri con andamenti interessanti, ma non è stato possibile fare considerazioni generalmente valide sul loro comportamento.
- Uniformità ed entropia sono caratterizzate entrambe da un andamento pressoché costante per tutto il corso del *follow up*, indipendentemente dalla categoria d'appartenenza del paziente.

5.5 Analisi dei risultati ottenuti dalle immagini T1

Ai fini di dimostrare le potenzialità del software e la sua applicabilità a tipologie di imaging differenti, si è scelto di calcolare i valori dei parametri statistici relativi alle immagini pesate in T1 degli stessi pazienti analizzati precedentemente.

Ciò che per il momento sembra possa desumersi, specificando sempre che si tratta di un'analisi preliminare, priva della necessaria statistica per poter trarre conclusioni definitive, è che:

1. non è stato possibile riconoscere analogie negli andamenti per pazienti appartenenti alla stessa categoria; in qualche caso, sembrano distinguibili degli andamenti nei valori assunti dai parametri nel corso del

follow up (progressiva crescita o decrescita, ad esempio), ma non è sembrato che un certo comportamento corrisponda al tipo di evoluzione intrapresa dal tumore

2. anche nei casi in cui sembra riscontrabile un andamento, non sembra in grado di fornire informazioni ulteriori a quelle riscontrabili con la semplice osservazione dell'immagine morfologica; ad ogni modo, questo fatto è comprensibile, poiché i dati vengono estratti da quelle stesse immagini
3. i parametri statistici, calcolati dai dati estratti dalle strutture CTV disegnate dal medico-radioterapista, hanno un comportamento che si distacca molto da quello del GTV e non sembrano delineare un andamento riconoscibile. A questo proposito, si è deciso di sfruttare nuovamente la seconda versione del ROISAT, estraendo i dati dalle segmentazioni prodotte sulla base del contrasto delle immagini FLAIR (la nuova regione è stata battezzata, per semplicità, CTV-man) e T1 (analogamente si parla di GTV-man); con questa modalità le variazioni dei parametri sono molto simili tra le due strutture e anche gli andamenti hanno un'evoluzione maggiormente comprensibile. E' interessante notare come non si fosse riscontrato questo problema durante l'analisi delle immagini DW.

A causa dell'impossibilità di desumere delle considerazioni generali, anche in maniera qualitativa, si eviterà di proporre e commentare i grafici di ognuno dei pazienti di Tabella 4.2, al fine di non appesantire inutilmente la trattazione.

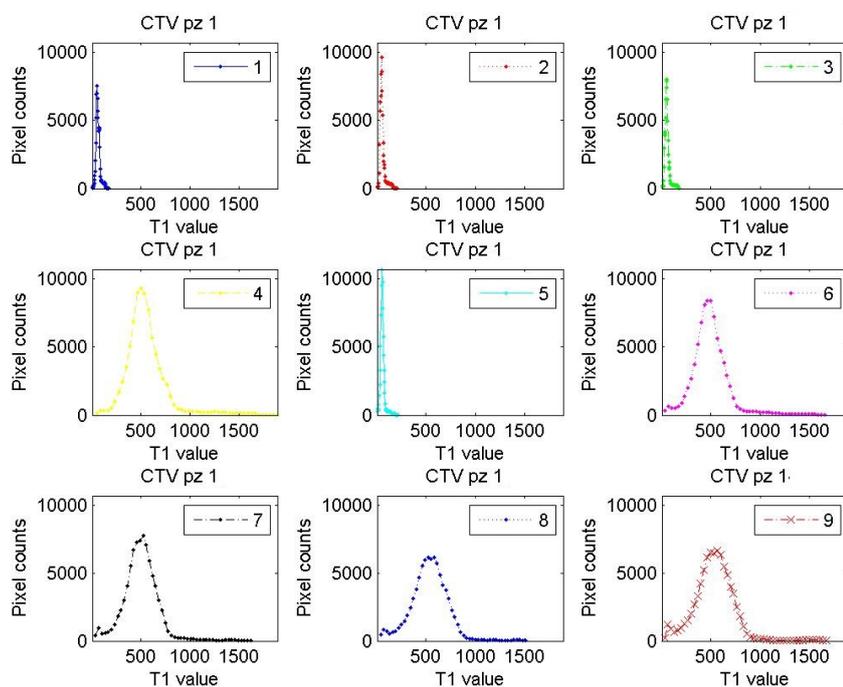
A titolo esemplificativo, si mostreranno al completo solo quelli del paziente 1, per chiarire, anche visivamente, quanto appena affermato.

Mostrare le distribuzioni di Figura 5.24 è una scelta di tipo dimostrativo: si vuole far capire cosa si intende per non-significatività dei valori T1. Come appare evidente, i range di valori su cui si distribuiscono gli istogrammi sono diversi in posizione e ampiezza, a seconda delle modalità con cui sono state acquisite le immagini. Ciononostante, è possibile ottenere informazioni relative alla loro forma, poiché quella continua a rimanere indicativa, indipendentemente dai valori associati ai pixel.

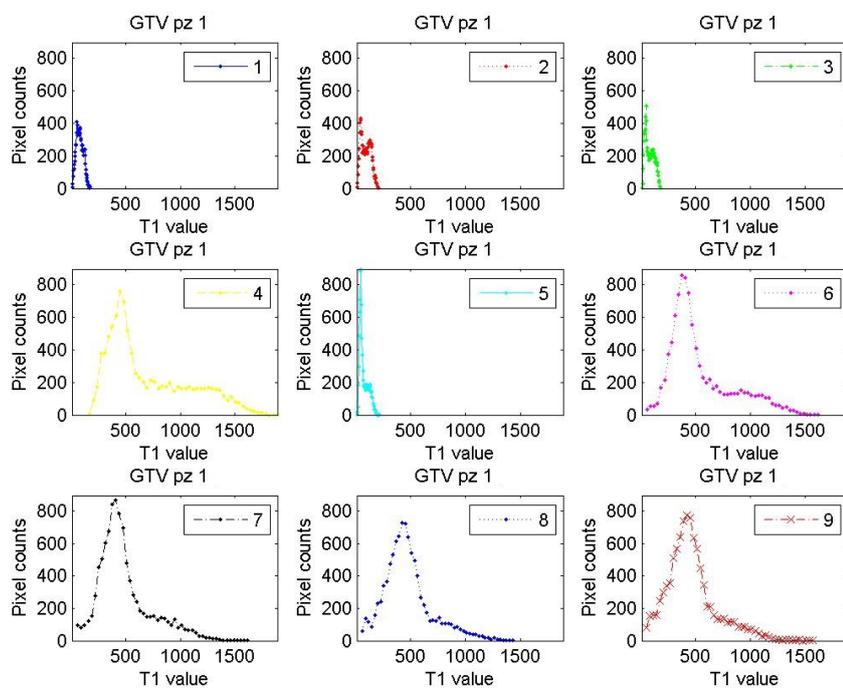
Ovviamente cogliere ad occhio le differenze di conformazione tra le varie distribuzioni risulta molto più difficile ora, perciò è meglio affidarsi all'interpretazione degli andamenti dei parametri (Figure 5.25 e 5.26).

Come anticipato, risulta evidente, soprattutto per skewness e kurtosis, ma in parte anche per la varianza, che il comportamento dei parametri estratti dalle due strutture è molto diverso e quello del CTV non sembra avere particolare significato. Per contro, si è deciso di verificare se effettuare

5.5. ANALISI DEI RISULTATI OTTENUTI DALLE IMMAGINI T1 111

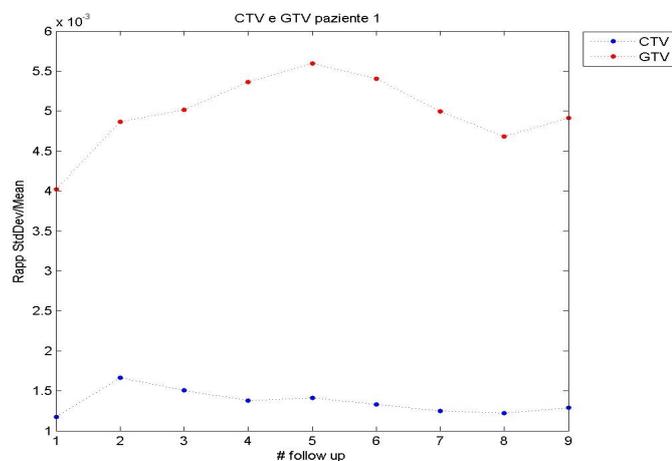


(a) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del CTV.

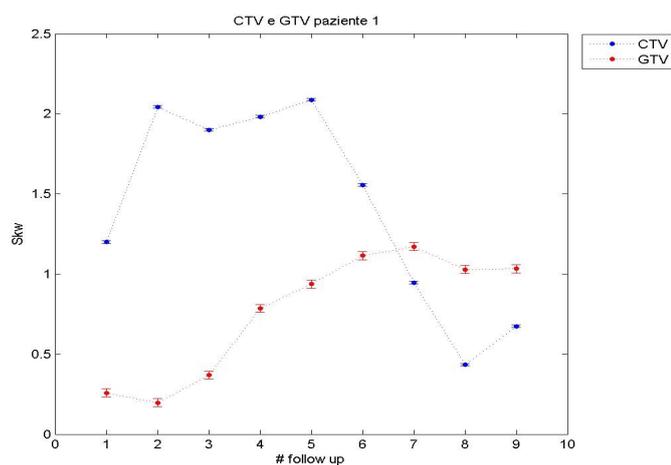


(b) Distribuzioni dei valori di ADC all'interno del GTV.

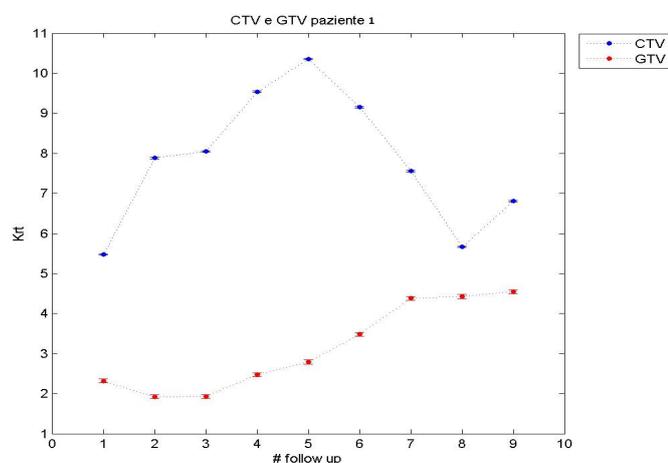
Figura 5.24: Evoluzione delle distribuzioni dei valori estratti dalle immagini T1 nel corso del *follow up*; il primo riquadro rappresenta la situazione pre-terapia, dal secondo in avanti è mostrato il decorso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2



(a) Rapporto deviazione standard-media.



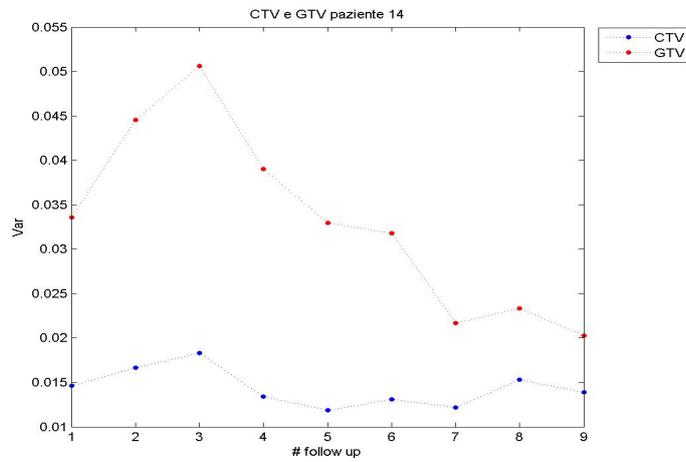
(b) Skewness.



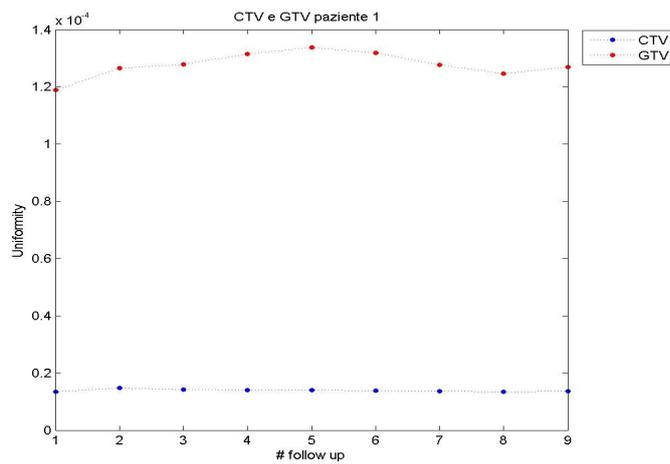
(c) Kurtosis.

Figura 5.25: Andamenti del rapporto tra deviazione standard e media e di skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori estratti dalle immagini T1 delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2

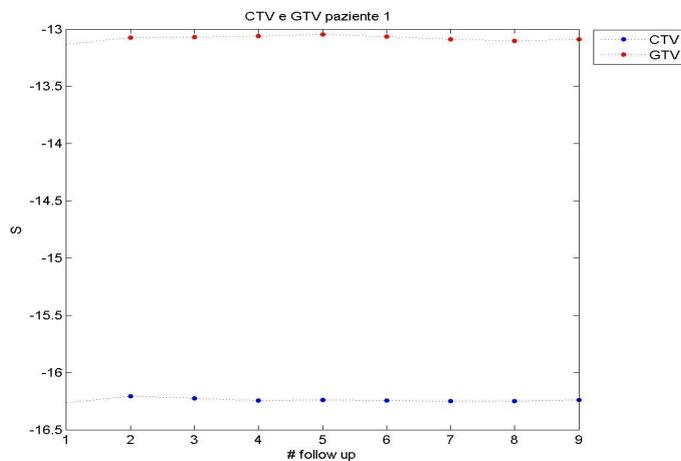
5.5. ANALISI DEI RISULTATI OTTENUTI DALLE IMMAGINI T1 113



(a) *Varianza.*



(b) *Uniformità.*



(c) *Entropia.*

Figura 5.26: Andamenti di varianza, uniformità ed entropia delle distribuzioni di valori estratti dalle immagini T1 delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2

gli stessi calcoli sui dati estratti dalle segmentazioni sulla base del contrasto avrebbe dato luogo a risultati più sensati. Nelle Figure 5.27 e 5.28 sono riportati i grafici ottenuti (si è deciso di non mostrare nuovamente le distribuzioni a causa della scarsa interpretabilità per mezzo dell'osservazione diretta).

Pur tenendo conto delle possibili imprecisioni incorse nel processo di segmentazione, è evidente come gli andamenti delle due nuove regioni siano molto più simili (benché non risultino significativamente correlate rispetto a nessun test statistico) e come il comportamento dei parametri del GTV non vari in maniera sostanziale tra le due tecniche (la correlazione è elevatissima, > 0.94 per tutti e tre i test, con $P \ll 0.05$).

Per concludere verranno mostrati a coppie, gli andamenti di skewness e kurtosis (scelti a titolo esemplificativo, perché durante le trattazioni precedenti si sono dimostrati tra i parametri più interessanti), a dimostrazione della non correlazione tra pazienti della stessa categoria.

Per quanto riguarda la skewness, sembra aumentare nel caso dei pazienti 3 e 5, liberi da malattia e diminuire nel caso del paziente 2 con recidiva, ma questo comportamento sembrerebbe essere smentito dal paziente 4 che tra l'acquisizione quarta e quinta, il momento di espansione della recidiva, aumenta il suo valore di skewness portandosi verso una distribuzione maggiormente simmetrica. Inoltre, ad eccezione del paziente 1, tutti gli altri pazienti di questo campione, seppur ridotto, hanno la tendenza a portarsi verso conformazioni simmetriche, sia in caso di peggioramento che miglioramento dello stato della patologia.

Anche la kurtosis non sembra dare informazioni particolarmente significative, almeno su un campione limitato.

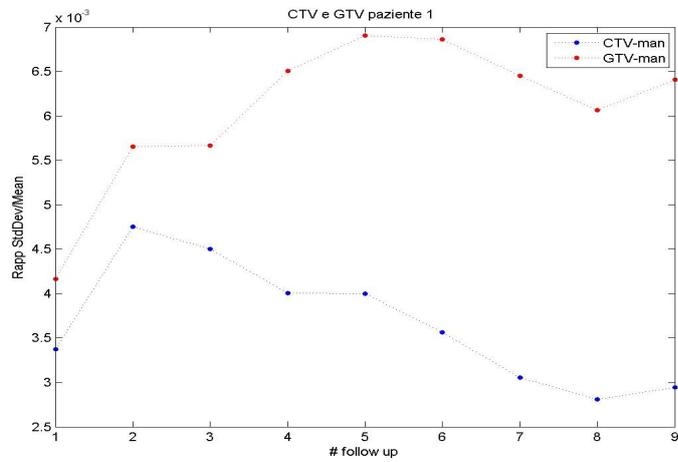
5.6 Confronto dei risultati ottenuti dalle modalità di imaging T1 e DW

Dall'analisi delle due modalità di imaging condotta sul campione di pazienti selezionato, è stata riscontrata una più evidente risposta, relativamente all'evoluzione della malattia, da parte dei valori di ADC forniti dalle immagini pesate in diffusione, visibile già dall'osservazione di un numero ridotto di pazienti.

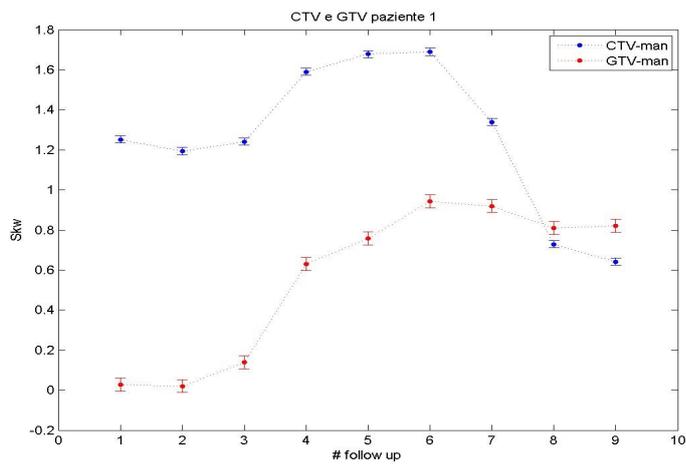
Per le DWI, i parametri statistici di skewness e kurtosis sono generalmente i più efficienti nel monitorare i cambiamenti nella forma della distribuzione nel corso del *follow up* e lasciano intendere anche un potenziale predittivo per quanto riguarda la prognosi della patologia, benché siano necessarie ulteriori indagini per confermare questa osservazione.

I dati forniti dalle immagini in T1 sono, invece, più dubbi e non chiaramente interpretabili. Saranno necessarie ulteriori indagini e soprattutto un campione più vasto di soggetti, al fine di verificare se realmente da

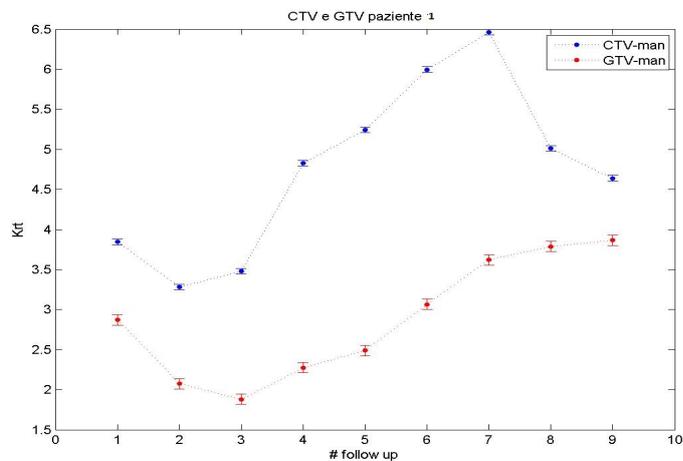
5.6. CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI DALLE MODALITÀ DI IMAGING T1 E DW115



(a) Rapporto deviazione standard-media.

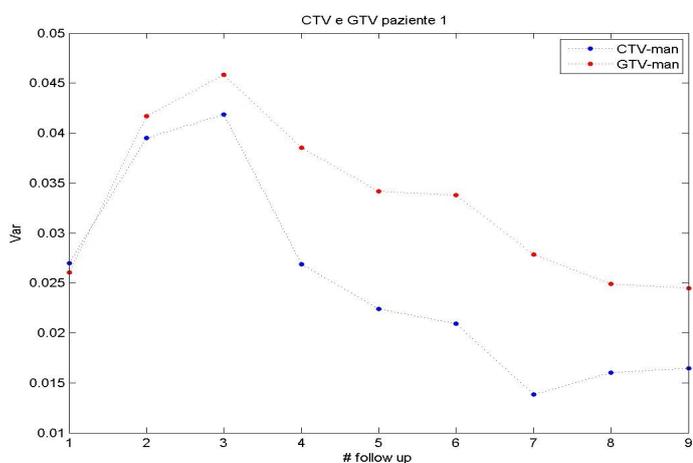


(b) Skewness.

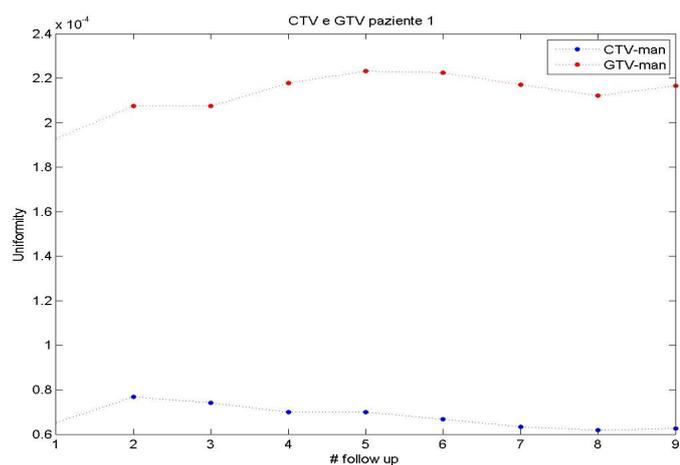


(c) Kurtosis.

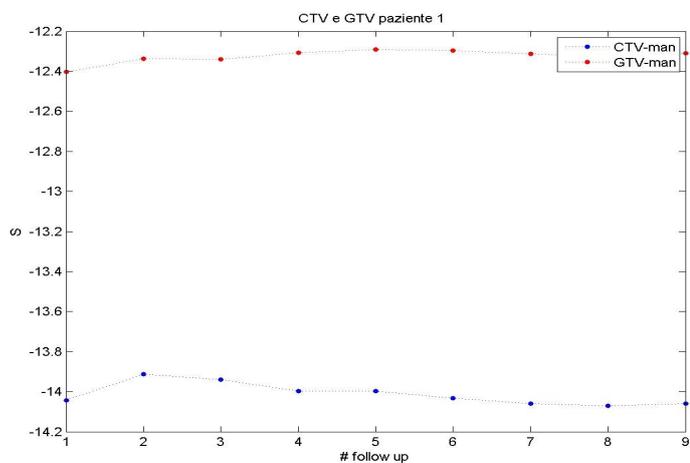
Figura 5.27: Andamenti del rapporto tra deviazione standard e media e di skewness e kurtosis delle distribuzioni di valori estratti dalle immagini T1 delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2



(a) *Varianza.*



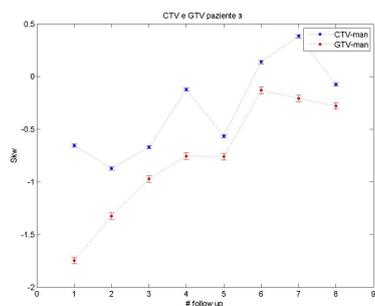
(b) *Uniformità.*



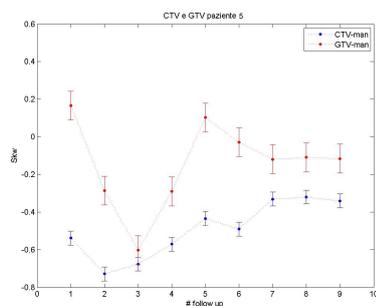
(c) *Entropia.*

Figura 5.28: Andamenti di varianza, uniformità ed entropia delle distribuzioni di valori estratti dalle immagini T1 delle regioni CTV e GTV nel corso del *follow up* del paziente 1 di Tabella 4.2

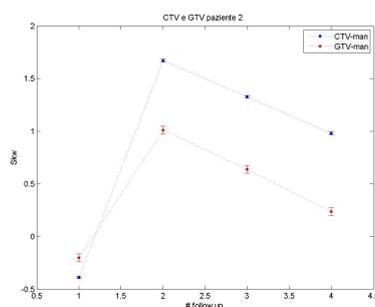
5.6. CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI DALLE MODALITÀ DI IMAGING T1 E DW117



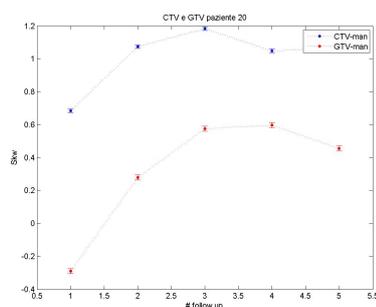
(a) *Skewness paziente 3.*



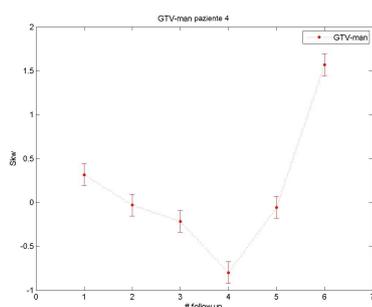
(b) *Skewness paziente 5.*



(c) *Skewness paziente 2.*

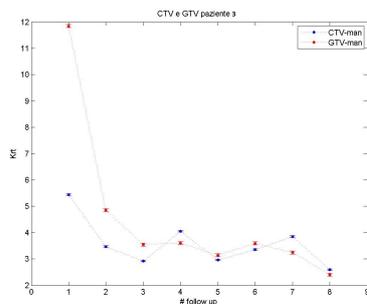


(d) *Skewness paziente 6.*

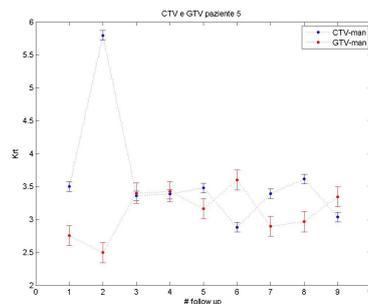


(e) *Skewness paziente 4.*

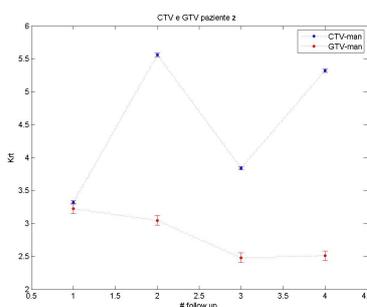
Figura 5.29: Confronto a coppie tra le skewness dei due pazienti liberi da malattia (riquadri *a* e *b*) e tra quelle dei pazienti con recidiva (*c* e *d*). Nel riquadro *e* è riportata la skewness del paziente recidivante su tempi lunghi



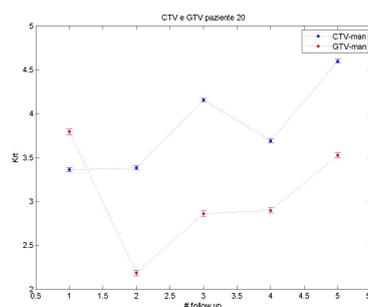
(a) Kurtosis paziente 3.



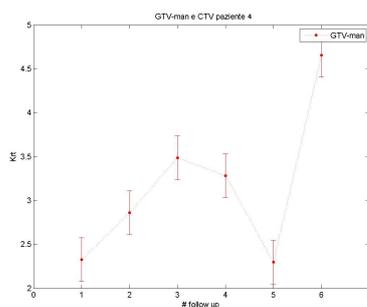
(b) Kurtosis paziente 5.



(c) Kurtosis paziente 2.



(d) Kurtosis paziente 6.



(e) Kurtosis paziente 4.

Figura 5.30: Confronto a coppie tra le skewness dei due pazienti liberi da malattia (riquadri *a* e *b*) e tra quelle dei pazienti con recidiva (*c* e *d*). Nel riquadro *e* è riportata la skewness del paziente recidivante su tempi lunghi

5.6. CONFRONTO DEI RISULTATI OTTENUTI DALLE MODALITÀ DI IMAGING T1 E DW119

tali immagini non siano estraibili ulteriori informazioni oltre a quelle di morfologiche.

Per quanto riguarda uniformità ed entropia, sia per le DWI che per le immagini pesate in T1, non è stato possibile, su un campione così limitato, verificare l'esistenza di reali correlazioni tra il valore relativo alla regione esaminata e il decorso della patologia.

Conclusioni

I gliomi di alto grado sono una tipologia di tumori cerebrali con prognosi particolarmente infausta, contro i quali la tradizionale pratica clinica ottiene scarsi successi.

La patologia, nonostante venga sottoposta all'applicazione combinata di resezione chirurgica, trattamento radioterapico e chemioterapia (secondo le norme definite dal protocollo Stupp), ha la tendenza a ripresentarsi, dopo un intervallo di tempo variabile da paziente a paziente, all'interno dei 2-3 cm dalla posizione originaria, dimostrando una sostanziale insufficienza della terapia somministrata.

Questo risultato è stato verificato anche su un campione di 18 pazienti in cura presso l'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia, tutti affetti da glioblastoma multiforme (glioma di IV grado secondo WHO). Ciascun paziente è dotato di un'acquisizione CT (*Computed Tomography*) sulla quale, nel corso della pianificazione radioterapica, sono stati delineati i volumi che delimitano la regione tumorale. Inoltre, associata ad ogni paziente si ha anche la mappa della distribuzione della dose erogata su tutto il volume cerebrale. Disponendo di questo materiale, è stato possibile realizzare un software in linguaggio Matlab, il DAS (*Dose Analyser Software*), che è in grado di realizzare automaticamente la registrazione dell'acquisizione CT di ogni paziente sulla relativa mappa di dose, calcolando in che modo la dose erogata si distribuisca sul volume della recidiva. Il programma fornisce in output gli istogrammi dei valori di dose all'interno della regione considerata, costruisce il *Dose-Volume Histogram* (DVH) e realizza un file di testo in cui registra, per ogni paziente, i dati delle curve di isodose, ovvero la frazione di volume colpita da una certa quantità dose.

Servendosi di questo strumento, è stato possibile verificare quale fosse la dose erogata alla regione su cui successivamente si è presentata una recidiva; nell'83% dei casi (15 su 18) più del 75% della zona aveva ricevuto una dose superiore al 95% di quella di prescrizione. Il dato ottenuto conferma, pertanto, quanto affermato dai dati di letteratura¹⁴.

Come conseguenza, si è deciso di monitorare l'evoluzione nel corso del tempo di un campione di 6 pazienti, sempre trattati presso l'ASMN, affetti da gliomi di alto grado (III e IV secondo la classificazione WHO) servendosi delle acquisizioni di risonanza magnetica pesate in T1 e in diffusione;

i soggetti sono stati selezionati in modo tale che disponessero di una serie di immagini di *follow up* sufficientemente estesa per entrambe le tipologie di imaging e, per ciascuna di esse, sono stati estratti i dati dai volumi che circoscrivono la regione tumorale (CTV e GTV). L'interesse è stato concentrato sull'osservazione delle modificazioni degli istogrammi di questi dati nel decorso della patologia, al fine di verificare se potessero essere correlate in qualche modo all'evoluzione della malattia nei vari pazienti.

I candidati selezionati si suddividono in tre categorie: pazienti breviventi, che dopo il trattamento manifestano immediatamente una recidiva della patologia e decedono in breve tempo; pazienti che dopo il trattamento manifestano una ricaduta, ma su tempi più lunghi e che, pertanto, hanno una sopravvivenza prolungata rispetto alla media; pazienti che in seguito alla terapia non hanno mostrato peggioramenti su tempi molto più lunghi della media di sopravvivenza e vengono considerati liberi da malattia. I cambiamenti nella conformazione degli istogrammi nel corso del tempo vengono monitorati attraverso il calcolo di otto parametri statistici (media, moda, varianza, rapporto deviazione standard-media, skewness, kurtosis, uniformità, entropia), scelti tra i momenti statistici di base e le grandezze maggiormente utilizzate in *texture analysis*.

Per realizzare queste misure è stato creato un secondo software dedicato, il ROISAT (*Region Of Interest Statistical Analysis Tool*), che estrae automaticamente dai volumi CTV e GVT, che circoscrivono la patologia (ma sarebbe possibile scegliere qualsiasi altra struttura contornata), i dati provenienti dall'imaging utilizzato. In output, ROISAT fornisce gli istogrammi delle distribuzioni di questi valori per tutte le acquisizioni disponibili (pre-terapia e successivo *follow up*) e, su ognuno di questi, calcola gli otto parametri statistici per ciascuna delle strutture esaminate. I risultati vengono salvati in opportuni fogli di calcolo Excel, divisi per paziente e struttura, per essere comodamente gestiti al termine dell'elaborazione del programma, mentre in output compaiono i grafici dell'andamento dei parametri nel corso del tempo.

Esiste anche un'altra versione del software, che è stata utilizzata in specifico per i dati prelevati dalle immagini T1, che consente di circoscrivere la regione tumorale per mezzo di segmentazione automatica sulla base del contrasto. Per la parte solida, corrispondente, in linea di principio, al GTV definito nel piano di trattamento, viene utilizzato il contrasto visibile nelle immagini T1, mentre per la regione analoga al CTV delineato dal medicoradiologo, si utilizza la regione edematica, ad alto contrasto nelle immagini FLAIR. I dati estratti da questi volumi vengono sottoposti alle medesime elaborazioni già elencate.

A causa dell'esiguità del campione a disposizione, non è stato possibile eseguire una statistica rigorosa che permettesse di discriminare, sulla base dei valori assunti dai parametri, le tre categorie in cui il set di pazienti è stato suddiviso. Perciò si è proceduto con l'osservazione diretta degli andamenti

dei parametri mettendo a confronto i valori assunti nel corso del *follow up* con lo stadio della malattia.

La tecnica di imaging che è sembrata più promettente, all'interno di questo studio preliminare, è la *Diffusion Weighted Imaging* (DWI), che interpreta bene i diversi stadi evolutivi della patologia; si è riscontrato che, in caso di presenza di tumore (sia in corrispondenza della diagnosi, sia in caso di ricomparsa della recidiva), la distribuzione dei valori di ADC nelle regioni CTV e GTV risulta stretta, piccata, spostata verso valori di diffusione apparente più bassi, ma con la coda verso i valori elevati di ADC maggiormente pronunciata. Al contrario, subito dopo la terapia (dove ci si aspetta che la neoplasia sia stata controllata se non pienamente distrutta) o in condizioni di paziente libero da malattia, la distribuzione tende ad assumere una conformazione più appiattita, simmetrica e spostata verso valori di ADC superiori.

Si è riscontrato che i parametri che meglio rappresentano queste variazioni nella *shape* della distribuzione sono la skewness e la kurtosis. Benché manchi un campione sufficientemente vasto per confermare in maniera rigorosa questo dato, si è constatato che il valore assunto da questi parametri in fase di pre-trattamento (quindi in presenza di tumore, indipendente dal decorso particolare intrapreso da ogni paziente) e quella immediatamente successiva è significativamente diverso: per il volume CTV si è ottenuto un valore medio di skewness pre-trattamento di 1.9 ± 0.4 e post-trattamento di 1.0 ± 0.5 , mentre la kurtosis nella fase precedente alla terapia si assesta su un valore di 9 ± 2 , mentre successivamente scende a 5 ± 2 . Per quanto riguarda il GTV skewness pre- e post-trattamento sono risultate 1.4 ± 0.6 e 0.4 ± 0.4 rispettivamente, mentre per la kurtosis si passa da 7 ± 3 a 3.1 ± 0.7 .

In generale, skewness e kurtosis sembrano essere indicatori convincenti dell'evoluzione della malattia, tendendo ad aumentare il loro valore in caso di peggioramento della malattia (distribuzioni che tendono a stringersi, piccarsi e a sviluppare code asimmetriche), mentre calano o rimangono stabili su valori più bassi (conformazione appiattita e sostanzialmente simmetrica) in caso di miglioramento o stabilità. Inoltre, per il tipo di comportamento che è stato evidenziato, sembra ci possano essere anche potenzialità predittive sulla possibile prognosi del paziente, dato che viene ipotizzato anche in alcuni lavori letteratura estremamente recenti¹²¹³¹⁷²⁰. Tuttavia questo aspetto necessita di una più ampia ed approfondita valutazione.

Media e moda, al contrario, non si sono rivelate significativamente diverse al variare delle condizioni del paziente, questo probabilmente a causa della conformazione bimodale spesso assunta dalle distribuzioni: infatti, la presenza di tessuti diversi all'interno della regione patologica considerata si esprime attraverso valori di ADC differenti, in maniera più o meno accentuata a seconda del paziente; uno dei fenomeni più evidenti che è stato riscontrato è la forma particolare che assume la distribuzione nelle fasi successive alla terapia, con l'abbattimento del picco iniziale, che contraddistingue la

fase patologica e l'incremento di un secondo picco spostato verso alti valori di ADC. Si suppone che il primo picco cali grazie alla diminuzione della cellularità nella regione tumorale in conseguenza al trattamento, mentre il secondo aumenta a causa della formazione di necrosi come effetto collaterale della radioterapia.

Tra i diversi parametri statistici analizzati, nessun altro si è dimostrato particolarmente significativo. L'unico andamento che potrebbe essere potenzialmente promettente riguarda il comportamento di uniformità ed entropia riscontrato in tutti i pazienti: per ognuno di essi, entrambe le grandezze assumono un valore costante, mantenuto per tutto il decorso della malattia indipendentemente dalla sua evoluzione e significativamente diverso per le due strutture considerate. Per il momento non sono state rilevate analogie significative tra pazienti con il medesimo decorso, ma sono in fase di realizzazione ulteriori accertamenti.

Per quanto riguarda le immagini pesate in T1, all'interno di questa analisi preliminare non sono stati riscontrati andamenti dei parametri particolarmente indicativi dell'evoluzione del tumore. L'aumento o la diminuzione dei parametri non sembra essere correlata ad un effettivo miglioramento o peggioramento della patologia, ma anche in questo caso non è possibile trarre conclusioni definitive non potendo disporre di una statistica più ampia.

Il dato interessante ottenuto da questa tipologia di imaging è stato la significativa differenza riscontrata tra gli andamenti dei parametri estratti dalle regioni CTV presenti nel piano di trattamento e quelle segmentate sulla base del contrasto, aspetto che non è stato riscontrato per il GTV e neanche per i dati forniti dalle immagini in diffusione. Mentre i grafici estratti dalle due strutture delineate manualmente dal medico radiologo sono spesso profondamente diverse e quello del CTV non sembra assumere andamenti interpretabili, se si considerano le regioni individuate dalla seconda versione del ROISAT, i valori assunti nel corso del *follow up* dai due volumi sono significativamente più simili.

Il confronto tra la somiglianza degli andamenti relativi alle diverse strutture di uno stesso paziente fa parte delle altre prerogative di ROISAT, che si serve di test di correlazione parametrica (Pearson) e non parametrica (Spearman e Kendall) per determinarle.

Sempre a causa dell'esiguità del campione e delle sue caratteristiche eterogenee (diverso numero di acquisizioni disponibili, separate da intervalli di tempo differenti) dovute al fatto che si tratta di un'indagine retrospettiva, si è deciso di quantificare le modificazioni dei valori assunti dai parametri, calcolandone la variazione percentuale sia rispetto alla acquisizione pre-terapia (assunta come *baseline*) sia di ogni esame rispetto al precedente.

In questo lavoro di tesi è stata impostata una metodica d'indagine per studiare l'evoluzione di patologie complesse e letali come i tumori cerebrali di alto grado, realizzando gli strumenti necessari per l'estrazione e l'analisi

dei dati. Tuttavia i risultati ottenuti sono solo preliminari, poiché il ridotto numero di pazienti disponibili non ha consentito di formulare considerazioni statisticamente significative. Ad ogni modo, a questo inconveniente si ovvierà in futuro quando si avrà a disposizione un numero sufficiente di soggetti con le caratteristiche richieste.

Naturalmente non è solo il campione l'unico aspetto che necessita perfezionamento: i prossimi obiettivi che ci si pone sono la completa automatizzazione di ROIS_TAT, in entrambe le versioni proposte e portare la *texture analysis* ad un livello più avanzato, introducendo l'uso delle matrici di co-occorrenza. Inoltre, un altro aspetto che risulta chiaro da questo studio, è che nessuno dei parametri statistici calcolati, neanche quelli più significativi, fornisce da solo un'informazione completa sulle modifiche nella conformazione dell'istogramma. Quello che ci si prefigge è, quindi, realizzare un classificatore che utilizzi il contributo di tutti questi parametri, selezionando i più significativi tramite un'operazione di *feature extraction*, per verificare se l'utilizzo combinato di queste grandezze consenta di discriminare fra i tre possibili decorsi riscontrati nei pazienti osservati.

Bibliografia

- [1] S. Balesaria et al. «Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas». In: *British Journal of Cancer* (1999).
- [2] KM Bennet et al. «Characterization of continuously distributed cortical water diffusion rates with a stretched-exponential model.» In: *Magnetic Resonance Imaging* (2003).
- [3] F. Berrino et al. «Survival of cancer patients in Europe: the EUROCORE-3 study.» In: *Annals of Oncology* (2003).
- [4] L. A. Brandao, M. S. Shiroishi e M. Law. «Brain Tumors: A Multimodality Approach with Diffusion-Weighted Imaging, Diffusion Tensor Imaging, Magnetic Resonance Spectroscopy, Dynamic Susceptibility Contrast and Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging». In: *Magnetic Resonance Imaging Clin N Am* (2013).
- [5] M. C. Chamberlain e P. A. Kormanik. «Practical guidelines for the treatment of malignant gliomas.» In: *West Journal of Medicine* (1998).
- [6] C. Clifton Ling et al. «Toward Multidimensional Radiotherapy (MD-CRT): Biological Imaging e Biological Conformality». In: *International Journal of Radiation Oncology* (2000).
- [7] P. De Bonis et al. «The influence of surgery on recurrence pattern of glioblastoma». In: *Clinical Neurology and Neurosurgery* (2012).
- [8] G. Gatta et al. *Astrocitoma anaplastico*. report. State of the Art Oncology in Europe, 2014.
- [9] R. C. Gonzales e R. E. Wood. *Digital Image Processing*. Pearson Education International.
- [10] R. H. Hashemi, W. G. Bradley e C. J. Lisanti. *MRI: the basics*. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2004.
- [11] G. Kantor e H. Loiseau. «Volumes-cibles anatomocliniques (GTV et CTV) des tumeurs gliales; Analysis of target volumes for gliomas.» In: *Cancer Radiothérapie* (2005).

- [12] S. Lee et al. «Evaluation of the microenvironmental heterogeneity in high grade gliomas with *IDH1/2* gene mutation using histogram analysis of diffusion-weighted imaging and dynamic-susceptibility contrast perfusion imaging». In: *Journal of Neurooncology* (2010).
- [13] K. Lutz et al. «Infiltrative Patterns of Glioblastoma: Identification of Tumor Progress Using Apparent Diffusion Coefficient Histograms». In: *Journal Of Magnetic Resonance Imaging* (2013).
- [14] Associazione Italiana di Neuro-Oncologia. *Le recidive dei gliomi maligni*. report. AINO, 2010.
- [15] G. Noel e R. Guillevin. «Delineation of glioblastoma, simplicity to complexity, the contribution of imaging». In: *Cancer Radiothérapie* (2011).
- [16] M. Nowosielski et al. «ADC histograms predict response to anti-angiogenic therapy in patients with recurrent high-grade glioma». In: *Neuroradiology* (2010).
- [17] W. B. Pope et al. «Apparent diffusion coefficient histogram analysis stratifies progression-free and overall survival in patients with recurrent GBM treated with bevacizumab: a multi-center study». In: *Journal of Neurooncology* (2012).
- [18] W. B. Pope et al. «Recurrent Glioblastoma Multiforme: ADC Histogram Analysis Predicts Response to Bevacizumab Treatment». In: *Radiology* (2009).
- [19] International Commission on Radiation Units e Measurements. *Prescribing, recording and reporting photon-beam intensity-modulated radiation therapy (IMRT)*. report. ICRU, 2010.
- [20] R. Rahman et al. «Histogram analysis of apparent diffusion coefficient within enhancing and nonenhancing tumor volumes in recurrent glioblastoma patients treated with bevacizumab». In: *Journal Of Neurooncology* (2014).
- [21] KD Rodland et al. «Multiple mechanisms are responsible for transactivation of the epidermal growth factor receptor in mammary epithelial cells.» In: *The Journal of Biological Chemistry* (2008).
- [22] R. N. Sener. «Diffusion MRI: apparent diffusion coefficient (ADC) values in the normal brain and a classification of brain disorders based on ADC values.» In: *Computerized Medical Imaging and Graphics* (2001).
- [23] R. Stupp et al. «Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma». In: *the New England Journal of Medicine* (2005).

- [24] Cancer Research UK. *Types of primary brain tumors*. 2013. URL: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/brain-tumour/about/types-of-primary-brain-tumours#astro>.
- [25] T. E. Yankeelov, D. R. Pickens e Price R. R. *Quantitative MRI in Cancer*. CRC Press, Taylor e Francis book, 2012.
- [26] F. Yoshii, H. Tomiyasu e Y. Shinohara. «Fluid attenuation inversion recovery (FLAIR) images of dentatorubro pallidolusian atrophy: case report». In: *Journal of Neurology* (1998).
- [27] B. L. Yun et al. «Intratumoral Heterogeneity of Breast Cancer Xenograft Models: Texture Analysis of Diffusion-Weighted MR Imaging.» In: *Korean Journal of Radiology* (2014).