

Politecnico di Milano
Facoltà di Ingegneria dei Sistemi
Corso di Laurea in Ingegneria Biomedica
Laurea specialistica

SVILUPPO DI METODI PER L'ANALISI
QUANTITATIVA DELLA FUNZIONALITÀ RENALE A
PARTIRE DA IMMAGINI DI RISONANZA
MAGNETICA IN PAZIENTI AFFETTI DA RENE
POLICISTICO AUTOSOMICO DOMINANTE (ADPKD)

Maria Chiara Carminati

mat. 724840



Relatore: Prof. Enrico G. Caiani

Correlatore: Ing. Cristiana Corsi

Anno Accademico 2009/2010

SOMMARIO

Il Rene Policistico Autosomico Dominante (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, ADPKD) è un disturbo genetico molto frequente con un'incidenza sulla popolazione di circa 1 individuo su 1000 nati vivi, senza distinzione di etnie o genere. La patologia viene causata dalla mutazione di diversi geni e dei relativi prodotti proteici codificati, che causano formazioni di cisti piene di fluido nel rene con relativa nefromegalia, diminuzione di parenchima renale sano e conseguente perdita di funzionalità renale. Si stima infatti che l'ADPKD sia una delle principali cause di insufficienza renale e dialisi in tutto il mondo. Il meccanismo tramite il quale l'ADPKD porta a insufficienza renale non è del tutto compreso, ma diversi studi hanno ipotizzato che la crescita di cisti renali causi l'insufficienza renale (*End Stage Renal Failure*, ESRF) per compressione del parenchima renale circostante. La dimensione dei reni è stata spesso messa in relazione con la gravità dell'insufficienza renale, associando le dimensioni dei reni alla funzionalità renale

La diagnosi si basa principalmente su sistemi di *imaging* come ultrasonografia, tomografia assiale computerizzata (CT) e risonanza magnetica (MRI). La diagnosi avviene tipicamente tramite la detezione di reni policistici allargati, per mezzo di *scanning* ultrasonografico addominale, una tecnica semplice, largamente disponibile, non invasiva e adatta in pazienti di ogni età. Sebbene l'ultrasonografia sia la modalità di *imaging standard* per questa applicazione clinica, essa si presenta inaccurata nella detezione di piccole cisti o in piccoli cambiamenti di volume renale durante *follow-up*. La MRI, privilegiata rispetto alla TAC per l'assenza di radiazioni ionizzanti, deve però essere utilizzata nei pazienti renali senza mezzo di contrasto (Gd), per evitare problemi legati alla possibile insorgenza di fibrosi sistemica nefrogenica. Sebbene siano stati sviluppati nuovi protocolli di MR *imaging*, per applicazioni in pazienti con ADPKD mancano degli strumenti quantitativi semi-automatici in grado di fornire delle informazioni sui volumi renali, sul volume delle cisti e sul loro contenuto, che siano in grado di dare informazioni sulla funzionalità renale.

Lo scopo della tesi consiste nello sviluppo di metodi per l'elaborazione di immagini MR, ottenute con differenti sequenze di acquisizione, per estrarre informazioni sia anatomiche che funzionali in pazienti affetti da ADPKD, con il fine di fornire nuovi parametri di potenziale utilizzo clinico sullo stato di funzionalità renale parallelamente ai classici parametri ematochimici.

Grazie alla collaborazione dell'Ospedale Infermi di Rimini, centro di riferimento per pazienti di ADPKD, sono state acquisite sequenze di immagini MR (1.5T) in 25 pazienti ADPKD (11 maschi), con età compresa tra 24 e 69 anni (età media 41 ± 10 anni). Per questi 25 pazienti è stato possibile avere a disposizione anche i valori biochimici di creatinina sierica, CG (stima del *Glomerular Filtration Rate* (GFR) tramite il metodo di Cockcroft-Gault) e MDRD (stima del GFR tramite la formula *Modification of Diet in Renal Disease*). La popolazione totale di 25 pazienti è stata divisa in tre sottopopolazioni caratterizzate rispettivamente da: 1) assenza di tessuto cistico; 2) presenza di tessuto cistico e valori ematochimici normali; 3) presenza di tessuto

cistico e valori ematochimici indicativi di insufficienza renale cronica.

Per la valutazione del volume renale sono state acquisite immagini MRI T_2 -*weighted*. I volumi sono stati calcolati moltiplicando l'area ottenuta per segmentazione dei reni in ogni *slice* per lo spessore tra *slices*. La segmentazione è stata realizzata tramite due tecniche messe a confronto: metodo stereologico e metodo *level set*. Il metodo stereologico è una tecnica di segmentazione, e più in generale elaborazione, manuale, veloce e semplice che si basa sul conteggio del numero di intersezioni di una griglia con dimensione arbitraria caratterizzata da orientamento *random* e sovrapposta alle immagini. Tale metodo è stato ampiamente usato in applicazioni medicali e in questo studio rappresenta il *gold standard* per il valore di volume renale.

Il metodo *level set* è un metodo semiautomatico appartenente alla famiglia degli *active contours* che si basa su metodi numerici di risoluzione di equazioni alle derivate parziali (EDP), i cui risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite stereologia. L'algoritmo utilizzato per la segmentazione delle immagini di risonanza anatomiche e funzionali si basa su una formulazione variazionale dei metodi *level set* tradizionali, il quale forza la funzione *level set* ad essere simile ad una funzione distanza eliminando la procedura di re-inizializzazione. La formulazione variazionale è caratterizzata da due termini di energia: un termine di energia interna, che penalizza la deviazione della funzione *level set* da una funzione distanza, e un termine di energia esterna, che guida il moto del *level set* zero verso le caratteristiche desiderate di un'immagine, ovvero verso i contorni delle regioni renali. A partire da un contorno iniziale definito manualmente, tale contorno evolve fino a definire le regioni renali in ogni *slice*. Per confrontare l'efficacia di questo metodo semiautomatico, sono stati calcolati i volumi renali a partire dalla segmentazione *level set*. I valori ottenuti sono stati confrontati tramite l'analisi di correlazione lineare e analisi di Bland-Altman con quelli stimati per mezzo del metodo stereologico.

Per studiare la relazione tra volume e funzionalità renale, i volumi calcolati per mezzo del metodo stereologico sono stati correlati con gli esami biochimici di creatinina sierica e GFR. Dopo circa due anni dalle prime acquisizioni sono state ripetute le acquisizioni MRI e le analisi ematochimiche. Il *follow up* è iniziato con l'analisi di cinque soggetti ADPKD con funzione renale normale; di questi pazienti è stato valutato il cambiamento percentuale di volume renale totale e il relativo cambiamento dei parametri ematochimici.

Parallelamente allo studio volumetrico sulle immagini T_2 , è stata sviluppata l'analisi su immagini pesate per diffusione (*diffusion weighted*, DW) e le relative mappe del coefficiente apparente di diffusione (*Apparent Diffusion Coefficient*, ADC). La Risonanza Magnetica pesata per diffusione combina i principi di *imaging* di NMR e la codifica di diffusione molecolare tramite l'utilizzo di campi gradienti impulsivi bipolari. La diffusione molecolare all'interno di tessuti biologici è un movimento *random* traslazionale risultato dell'energia termica delle singole molecole. La MRI è attualmente l'unico mezzo a disposizione per osservare la diffusione *in vivo* in modo non invasivo. In particolare, il fenomeno di diffusione molecolare dell'acqua nei tessuti biologici, dovuto al movimento termico *random*, detto moto Browniano, può essere utilizzato per caratterizzare diversi stati normali o patologici. Il rene, essendo un organo ampiamente perfuso e caratterizzato da trasporto di fluidi, è un organo particolarmente interessante da studiare tramite *imaging* pesato per diffusione.

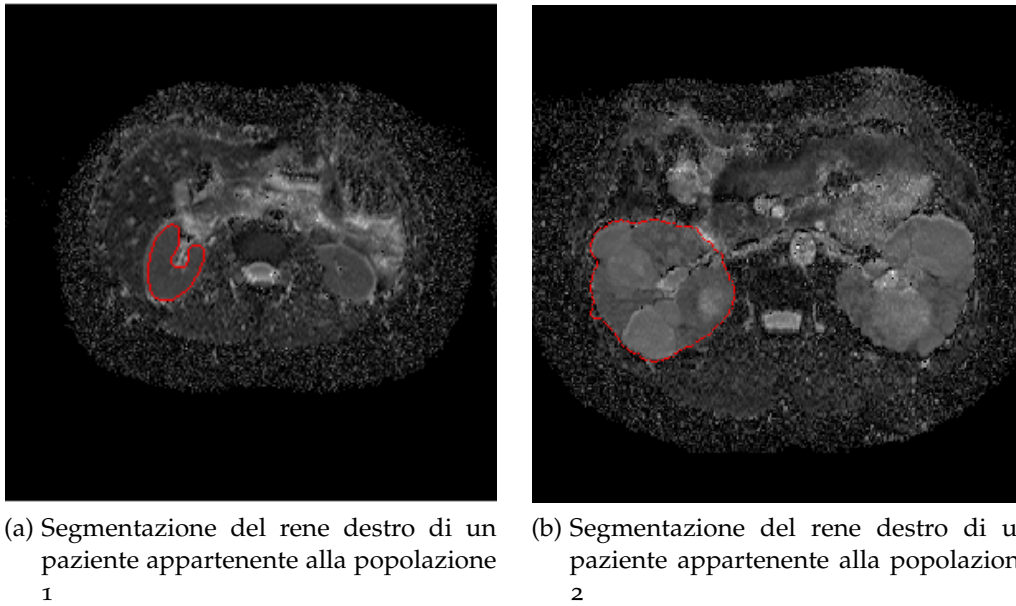


Figura 1: Mappe ADC

Le immagini pesate per diffusione sono caratterizzate da un parametro, indicato dalla lettera b , che dipende dai parametri della sequenza di acquisizione *pulse-gradient-spin-echo* (PGSE) utilizzata per l'acquisizione di un'immagine DW, e dunque rappresenta un indice caratteristico del tipo di immagine. Variando l'ampiezza di tale valore il segnale registrato sarà caratterizzato da un'attenuazione a causa dei fenomeni di diffusione e di perfusione. Valori tipici di b sono compresi tra $100 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$ e $1500 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$; all'aumentare di questo valore diminuisce l'effetto legato alla perfusione capillare e contemporaneamente diminuisce la risoluzione spaziale. Per l'analisi funzionale di pazienti ADPKD, al fine di minimizzare la perdita di risoluzione e garantire l'eliminazione del contributo di perfusione, si sono utilizzate immagini DW ottenute con $b = 500 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$. Il coefficiente apparente di diffusione si calcola a partire da due immagini corrispondenti S_0 e S_1 , ottenute con due diversi valori del parametro b della sequenza di acquisizione di immagini DW, tramite la seguente operazione *pixel a pixel*:

$$\text{ADC} = \frac{\log(S_0) - \log(S_1)}{b_1 - b_0}$$

con $b_0 = 0 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$ e $b_1 = 500 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$.

Le immagini DW sono state segmentate con il metodo *level set* semiautomatico, in modo da isolare il rene, e in tale regione di interesse si è proceduto ad uno studio statistico della distribuzione dei valori di ADC (figure 1 e 2).

L'analisi di correlazione e l'analisi di Bland-Altman hanno evidenziato che la stima stereologica e il metodo di segmentazione semiautomatica *level set* hanno fornito stime volumetriche comparabili e accurate, validando l'utilizzo del metodo *level set* semiautomatico per la segmentazione delle immagini T_2 . L'analisi di regressione lineare applicata ai due metodi di stima del volume renale totale è caratterizzata da un coefficiente di correlazione elevato e pendenza della retta di regressione

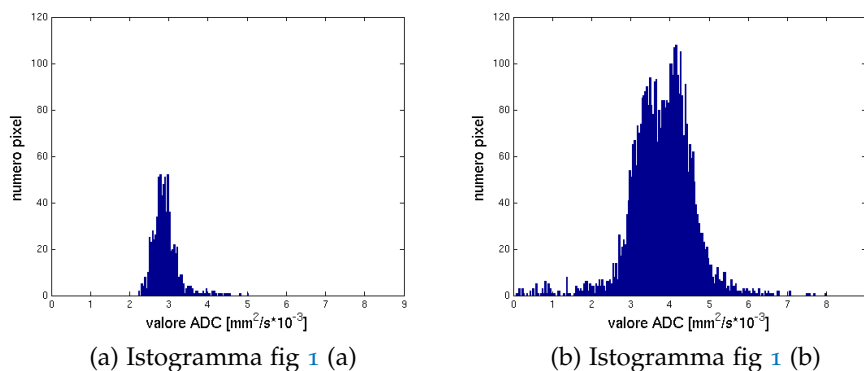


Figura 2: Istogrammi delle regioni renali

lineare molto vicino a 1 ($f(x) = 0.98x - 10.84$, $r^2 = 0.99$). L'analisi di Bland-Altman ha evidenziato *bias* molto ridotti (-17.8 ml) tra le misure derivanti da segmentazione automatica e la tecnica stereologica di riferimento per il calcolo del volume renale totale. Tale valore di *bias* corrisponde ad un errore sistematico medio di circa il $-2,6\%$. I limiti di concordanza dell'analisi di Bland-Altman presentano inoltre un intervallo relativamente stretto, caratterizzato da una deviazione standard pari a 34 ml, confermando ulteriormente l'intercambiabilità delle due tecniche. Il *follow up* per i primi cinque pazienti ha evidenziato un aumento medio di volume renale totale pari al 5%, corrispondente ad un peggioramento medio della funzionalità renale in termini di GFR stimato tramite la formula di Cockcroft-Gault del 9.12%.

L'analisi di correlazione lineare ha definito la relazione tra volume renale totale e la funzionalità renale espressa in termini di creatinina sierica ($f(x) = 13.55x + 3.74$, $r^2 = 0.78$). L'analisi di correlazione non lineare ha definito la relazione tra volume renale totale e rispettivamente la stima del GFR tramite la formula CG ($f(x) = -20.61\log(x) + 111.22$, $r^2 = 0.64$) e la stima del GFR tramite la formula MDRD ($f(x) = -22.65\log(x) + 116.95$, $r^2 = 0.72$).

Le mappe ADC calcolate a partire dalle immagini DW sono state elaborate per estrarre indici che potessero essere significativi dello stato di salute dei soggetti analizzati. La definizione delle regioni renali è stata realizzata tramite segmentazione con metodo *level set* sulle immagini caratterizzate dal valore b_0 e i contorni così definiti su ogni *slice* sono stati riportati sulle mappe ADC corrispondenti.

Per facilitare l'analisi delle mappe ADC è stata sviluppata una *Graphical User Interface* (GUI) in Matlab®, che permettesse la visualizzazione immediata dei parametri calcolati. L'analisi della distribuzione di valori delle mappe ADC nelle regioni renali si è focalizzata sul calcolo dei valori di media, deviazione standard, mediana e differenza interquartile. Le tre popolazioni considerate hanno dimostrato differenze statisticamente significative per i quattro indici considerati ($p < 0.01$), evidenziando valori di ADC superiori per le popolazioni 2 e 3 rispetto alla popolazione 1 sia in termini di valore medio e mediana che di deviazione standard e differenza interquartile, caratterizzando in questo modo la maggiore variabilità in presenza di tessuto cistico. L'analisi di regressione tra gli indici dell'ADC e i valori ematochimici caratteristici della funzionalità renale non ha evidenziato una correlazione per i 25 pazienti considerati.

I risultati ottenuti in questa tesi supportano l'ipotesi che il valore di volume renale aumentato a causa dell'espansione del tessuto cistico sia quantificabile e associato ai valori di funzionalità renale; inoltre, i dati parziali sul *follow up* dei pazienti analizzati confermano la possibilità che l'aumento del volume renale sia associato ad un più rapido declino delle funzioni renali. Tecniche di *imaging* di RM anatomiche sono dunque indispensabili per valutare piccole variazioni di volume renale e studiarne la relazione con le variazioni della funzionalità renale. L'analisi delle mappe ADC ha evidenziato il potenziale di questo parametro in applicazioni cliniche in termini di caratterizzazione e analisi funzionale dei tessuti.

ABSTRACT

Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is a very frequent genetic disorder, with an estimated prevalence of approximately 1 in 1000 live birth, with no ethnic or gender differentiation. This pathology is caused by the mutation of several genes and of relevant codified proteic products. It causes the development in the kidneys of cysts full with liquid, with relevant nephromegaly, diminished renal parenchyma and consequent loss of renal functionality. In fact, ADPKD is a common cause of end stage renal disease and accounts for a substantial number of dialysis and transplant patients worldwide. The way ADPKD is causing the loss of renal functionality has not been fully understood yet, but several authors suggest that the development of renal cysts is causing end stage renal failure by compression of surrounding renal parenchyma. The size of the kidneys is often put in relation with the stage of the kidney disease, comparing size and functionality of kidneys.

Diagnosis is mainly based on imaging systems like Ultrasounds (US), Computed Tomography (CT) and Magnetic Resonance (MR). The diagnosis is typically done by detection of enlarged polycystic kidneys by means of ultrasonic abdominal scanning, a simple technique easily available, noninvasive and suitable for patients of any age. Although ultrasound is the standard imaging technique for this clinical application, it is not accurate enough for detection of small cysts or small volume variation during follow up. MRI, preferred to CT because of the lack of radiations, should be used in renal patients without contrast medium (Gd), to avoid possible onset of systemic nephrogenic fibrosis. New protocols of MR imaging have been recently developed but quantitative semi-automatic tools capable of giving information about sizes of kidney, of relevant cysts, about their content and about overall renal functionality are still missing.

The aim of this thesis consists in the development of methods for elaboration of MR images, obtained in different ways, in order to get anatomical and functional information in patients affected by ADPKD, to be used together with classic blood parameters.

Working jointly with Ospedale Infermi in Rimini, reference centre for ADPKD patients, MR images (1.5T) of 25 patients (11 males) with diagnosis of ADPKD, aged between 24 e 69 (average 41 ± 10) have been acquired. For these 25 patients, biochemical values of serum creatinine, CG (estimated Glomerular Filtration Rate (GFR) according to Cockcroft-Gault method) and MDRD (estimated GFR according to the Modification of Diet in Renal Disease method) have been also obtained. The total population of 25 patients has been divided into three sub-groups: 1) lack of cystic tissue; 2) presence of cystic tissue and normal blood values; 3) cystic tissue and blood values indicative of chronic renal insufficiency.

In order to evaluate kidneys volume, MRI T₂-weighted images have been acquired. Volumes have been calculated multiplying areas obtained by kidney segmentation in any slices by the thickness of slices. Segmentation has been made comparing two different techniques: stereological and level set methods. Stereological method is a

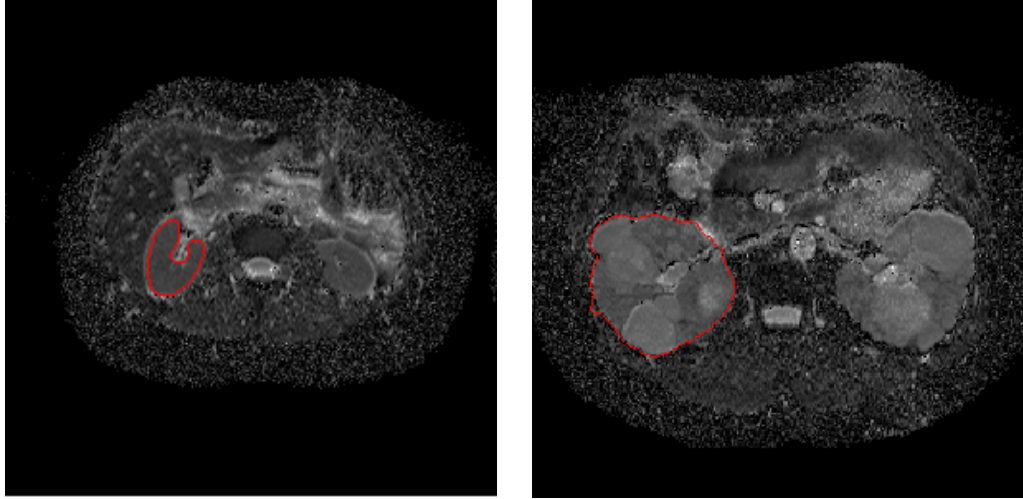
manual segmentation technique, based on the computing of intersections of a grid with arbitrary size, with random orientation, and superimposed on images. Such method has been largely used in medical applications and represents in this study the gold standard for the value of kidney volume computation.

Level set method is a semi-automatic method belonging to active contours family, based on numerical methods for the solution of partial differential equations (PDE), whose results have been compared with those obtained by stereology. The algorithm used for the segmentation of anatomical and functional MR images is based on a variational formulation of the traditional level set method, forcing the level set function to be similar to a distance function, eliminating the re-initialization procedure. The variational formulation is characterized by two energy terms: an internal energy term, that penalizes the deviation of the level set function from a signed distance function, and an external energy term that drives the motion of the zero level set toward the desired image features, such as kidney boundaries. Starting from an initial contour manually set, the contour evolves to define kidney's boundary in each slice. To compare the efficiency of this semi-automated method, kidney volumes were calculated starting from the boundaries defined by level set segmentation. The obtained values were compared to those estimated by the stereological method by linear correlation and the Bland-Altman analyses.

To study the relationship between volume and renal function, the volumes calculated using the stereological method were correlated with the biochemical tests of serum creatinina and GFR. After nearly two years after the first acquisitions, MRI acquisitions and blood analysis were repeated. Follow up began with the analysis of five ADPKD patients with normal renal function; of these patients the change in percentage of total renal volume and the relative change in blood parameters were evaluated.

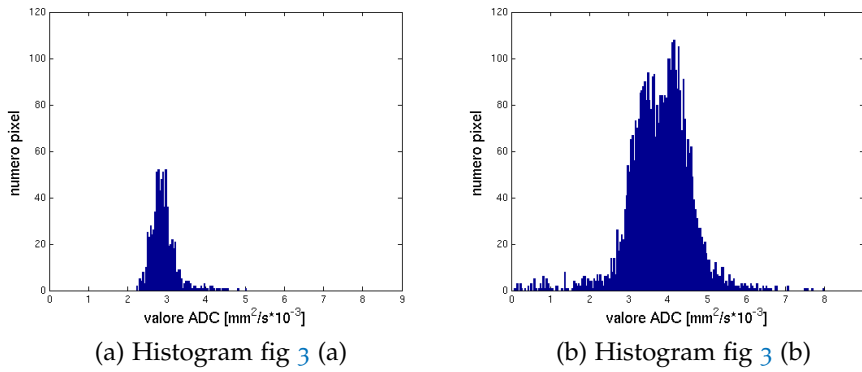
Parellel to the volumetric study on T_2 images, analysis on diffusion weighted imaging (DW) and the maps of apparent diffusion coefficient (ADC) were performed. Magnetic Resonance Diffusion Weighted imaging combines the principles of NMR imaging and the encoding of molecular diffusion through the use of bipolar pulsed field gradients. The phenomenon of molecular diffusion within biological tissue is a random translational motion result of the thermal energy of individual molecules. MRI is currently the only way to observe this phenomenon in vivo non-invasively. In particular, the phenomenon of molecular diffusion of water in biological tissues, due to random thermal motion, called Brownian motion, can be used to characterize various normal and pathological situations. The kidney is a broad-perfused organ characterized by fluid transport so it is particularly interesting to study using diffusion weighted imaging.

Diffusion weighted images are characterized by a value, indicated with the letter b , which depends on the parameters of the acquisition sequence pulse-gradient-spin-echo (PGSE) used for the acquisition of DW image, and thus represents a characteristic index of the type of image. By varying this value, the recorded signal will be characterized by attenuation due to diffusion and perfusion. Typical values of b are between $100 \frac{s}{m^2}$ and $1500 \frac{s}{m^2}$. This value increases with the decreasing effect linked to capillary perfusion and simultaneously decreases the spatial resolution. For functional analysis of ADPKD patients, in order to minimize loss of resolution



(a) Segmentation of the right kidney from a patient belonging to population 1 (b) Segmentation of the right kidney from a patient belonging to population 1

Figura 3: ADC maps



(a) Histogram fig 3 (a)

(b) Histogram fig 3 (b)

Figura 4: Histograms of the ROI of the kidneys

and ensure the elimination of the contribution of perfusion, DW images obtained with $b = 500 \frac{s}{mm^2}$ were used. The apparent diffusion coefficient is calculated from two images corresponding to S_0 and S_1 obtained with two different b-values of the acquisition sequence of the DW images, by the following operation pixel to pixel:

$$ADC = \frac{\log(S_0) - \log(S_1)}{b_1 - b_0}$$

where $b_0 = 0 \frac{s}{mm^2}$ and $b_1 = 500 \frac{s}{mm^2}$.

The DW images were segmented with the semiautomatic level set method in order to isolate the kidney, and in this region of interest the statistical distribution of ADC values was studied (figures 3 and 4).

The correlation and the Bland-Altman analyses showed that the segmentation by means of stereological method and semiautomatic level set method provided volumetric estimates comparable and accurate, validating the use of level set method for semiautomatic segmentation of the T_2 images. Linear regression analysis applied

to the two estimates of the total renal volume by means of the two methods is characterized by a high correlation coefficient and slope of linear regression close to 1 ($f(x) = 0.98x - 10.84$, $r^2 = 0.99$). The Bland-Altman analysis showed very little bias (-17.8 ml) between the measures resulting from automatic segmentation and stereological technique for the calculation of total renal volume. This value corresponds to an average bias of -2.6% . The limits of agreement of Bland-Altman analysis also have a relatively narrow range, characterized by a standard deviation equal to 34ml, confirming the interchangeability of the two techniques. The follow-up for the first five patients showed an average increase of total renal volume of 5%, corresponding to an average worsening in renal function in terms of estimated GFR by Cockcroft-Gault of 9.12%.

The correlation analysis has defined the relationship between total renal volume and renal function in terms of serum creatinine ($f(x) = 13.55x + 3.74$, $r^2 = 0.78$). The nonlinear correlation analysis has defined the relationship between total renal volume and respectively the estimated GFR using the CG formula ($f(x) = -20.6\log(x) + 111.22$, $r^2 = 0.64$) and the estimated GFR using the MDRD formula ($f(x) = -22.65\log(x) + 116.95$, $r^2 = 0.72$).

The ADC maps calculated from DW images were processed to extract indexes that could be significant in describing the health status of the analyzed subjects. The definition of kidney's boundaries was performed through segmentation with level set method on images with b_0 value, and the defined contours on each slice were reported on the corresponding ADC maps.

To facilitate the analysis of ADC maps a Graphical User Interface (GUI) in Matlab® was developed, which allows instant viewing of calculated parameters. The analysis of the distribution of values of ADC maps in the renal areas focused on the calculation of the following values: average, standard deviation, median and interquartile difference. The three considered populations have demonstrated statistically significant differences in the four considered indices ($p < 0.01$), highlighting higher ADC values for populations 2 and 3 compared with population 1 in terms of mean, median, standard deviation and interquartile difference, characterizing a higher variability in the presence of cystic tissue. However, regression analysis between the ADC indices and blood values characteristic of renal function did not show a correlation for the 25 patients treated.

The results obtained in this thesis support the hypothesis that the renal volume increased due to expansion of the cystic tissue can be quantified and associated with kidney function; in addition, partial data on the follow up of the analyzed patients confirm the possibility that the increase in renal volume is associated with a more rapid decline of renal function. MR anatomical imaging techniques are therefore very useful to assess small changes in volume and to study the relationship with changes in renal function. The analysis of ADC maps highlighted the potential of this parameter in clinical applications in terms of characterization of tissues and functional analysis.

RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Enrico Caiani per i preziosi insegnamenti e per il tempo dedicato alla mia tesi. Inoltre, ringrazio sentitamente l'Ing. Cristiana Corsi e il Prof. Stefano Severi dell'Università di Bologna, il Dr. E. Cavagna direttore dell'U.O. di Radiologia e il Dr. R. Mignani del dipartimento di Nefrologia e Dialisi dell'Ospedale Infermi di Rimini per avermi fornito testi e dati indispensabili per la realizzazione della tesi.

Desidero ringraziare con affetto tutta la mia famiglia e in particolare i miei genitori Renzo e Maria Pina, le mie sorelle Ida e Lucia e i miei zii Isa e Guido per il costante sostegno ed il grande aiuto.

Un ringraziamento particolare a Giovanni, per essermi stato vicino durante tutti questi anni, e alle mie amiche di sempre Laura e Martina.

INDICE

I STATO DELL'ARTE E MATERIALI	1
1 INTRODUZIONE	2
1.1 Anatomia e fisiologia del rene	2
1.1.1 Funzioni del rene nell'omeostasi	2
1.1.2 Anatomia funzionale del rene	4
1.1.3 Flusso ematico renale	7
1.1.4 Formazione dell'urina	8
1.2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD)	10
1.2.1 Patogenesi	10
1.2.2 Manifestazioni cliniche	16
1.2.3 Terapie	17
2 IMAGING	21
2.1 Metodi di imaging per la diagnosi di ADPKD	21
2.1.1 MRI	22
2.1.2 Diffusion Weighted MRI	31
3 MATERIALI	42
3.1 Scopo della tesi	42
3.2 Protocollo sperimentale	43
3.3 Stima del GFR tramite le formule CG e MDRD	45
3.3.1 Formula di Cockcroft-Gault	45
3.3.2 Formula Modification of Diet in Renal Disease	46
3.3.3 Range di normalità e criteri di diagnosi	46
II METODI	48
4 METODI LEVEL SET	49
4.1 Snakes	49
4.2 Introduzione al metodo level set	51
4.2.1 Funzioni implicite	52
4.2.2 Alcune considerazioni geometriche	53
4.2.3 Funzioni distanza	54
4.3 Un problema ai valori iniziali	55
4.3.1 Moto per curvatura	58
4.4 Applicazione all'elaborazione di immagini	60
4.5 Formulazione variazionale senza re-inizializzazione	64
4.5.1 Reinizializzazione	66
4.5.2 Formulazione variazionale generale con termine penalizzante di energia	66
4.5.3 Formulazione variazionale level set di contorni attivi senza re-inizializzazione	67
4.5.4 Implementazione	70
5 STEREOLOGIA	76

5.1	Volume: il metodo Cavalieri	76
5.1.1	Sezioni di Cavalieri con spessore nullo	77
5.1.2	Sezioni di Cavalieri con spessore arbitrario	79
5.2	ImageJ	80
6	ANALISI STATISTICA	83
6.1	Analisi dei dati anatomici e ematochimici	83
6.1.1	Validazione volumetrica e correlazione lineare	83
6.1.2	Analisi di Bland-Altman	84
6.1.3	Correlazione tra volumi e parametri ematochimici	86
6.1.4	Follow up	86
6.2	Analisi delle mappe ADC	86
6.2.1	Parametri calcolati per l'analisi delle mappe ADC	87
6.2.2	Range di normalità	88
6.2.3	Curve ROC	89
6.2.4	Analisi di correlazione	90
III RISULTATI		91
7	RISULTATI	92
7.1	Risultati dell'analisi volumetrica	92
7.1.1	Follow up	93
7.2	Risultati dell'analisi funzionale	95
7.2.1	Sviluppo GUI per l'analisi delle mappe ADC	95
7.2.2	Range di normalità	96
7.2.3	Analisi delle mappe ADC	96
7.2.4	Curve ROC	99
7.2.5	Analisi di correlazione tra parametri ADC e funzionalità renale	101
8	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	103
8.1	Analisi volumetrica	103
8.2	Analisi funzionale	104
BIBLIOGRAFIA		109

ELENCO DELLE FIGURE

Figure 1	Mappe ADC	v
Figure 2	Istogrammi delle regioni renali	vi
Figure 3	ADC maps	x
Figure 4	Histograms of the ROI of the kidneys	x
Figura 5	Interazione con i visceri adiacenti, superficie anteriore [Gray and Williams, 1989]	5
Figura 6	Interazioni con i visceri adiacenti, superficie posteriore [Gray and Williams, 1989]	5
Figura 7	Interazione con i visceri adiacenti, sezione assiale [Gray and Williams, 1989]	6
Figura 8	Nefrone, unità funzionale renale e il suo flusso ematico [Mader, 2004]	7
Figura 9	Rene policistico espantato che mostra massiccio allargamento a causa di cisti multiple [Boucher and Sandford, 2004]	11
Figura 10	Modello di funzionamento del cilium renale nella detezione di flusso e generazione di un segnale calcio-dipendente [Deane and D Ricardo, 2007]	14
Figura 11	Modello di cistogenesi del tipo "two hit" in ADPKD [Pei, 2001]	15
Figura 12	Magnetizzazione complessiva M_0 allineata secondo l'asse z in presenza di un campo esterno B_0 [Hornak, 2007]	24
Figura 13	Campo magnetico B_1 perpendicolare a B_0 [Hornak, 2007]	25
Figura 14	Segnale FID dopo un impulso a RF 90° [Hornak, 2007]	26
Figura 15	Andamenti dei vettori magnetizzazione longitudinale M_z e trasversale M_{xy} [Hornak, 2007]	27
Figura 16	Effetti delle differenti pesature T_1 e T_2	27
Figura 17	Sequenza di eccitazione <i>spin-echo</i> [Hornak, 2007]	28
Figura 18	Effetti delle differenti pesature T_1 e T_2 per un paziente ADPKD	29
Figura 19	Sequenza di eccitazione selettiva nello spazio	31
Figura 20	Sequenza di acquisizione PGSE [Hornak, 2007]	34
Figura 21	Movimento traslazionale incoerente in ogni <i>voxel</i> delle molecole d'acqua nei tessuti biologici causato da diffusione e perfusione [Le Bihan et al., 1988]	36
Figura 22	Modelli di perfusione, due casi limite [Le Bihan et al., 1988]	37
Figura 23	Immagini pesate per diffusione ottenute con differenti valori di b	40
Figura 24	Esempio mappa ADC	41
Figura 25	Funzione velocità $F=F(L,G,I)$ [Sethian et al., 1999]	51
Figura 26	La funzione implicita $\phi(x) = x^2 - 1$ definisce le due regioni Ω^+ , Ω^- e i contorni $\delta\Omega$ [Osher and Fedkiw, 2003]	53
Figura 27	Rappresentazione implicita della curva $x^2 + y^2 = 1$ [Osher and Fedkiw, 2003]	53

Figura 28	Regioni convesse hanno $K > 0$, regioni concave hanno $K < 0$ [Osher and Fedkiw, 2003] 54
Figura 29	Trasformazione del problema di moto del fronte in un problema ai valori iniziali [Sethian et al., 1999] 55
Figura 30	Cambiamenti topologici [Sethian, 1997] 57
Figura 31	Moto per curvatura di un oggetto con forma a spirale [Osher and Sethian, 1988] 59
Figura 32	Moto per curvatura di un oggetto con forma a stella [Osher and Sethian, 1988] 59
Figura 33	Curva isolivello $\{\phi = C\}$ a distanza C dal <i>level set</i> zero $\{\phi = 0\}$, principio di costruzione di Huygens [Malladi et al., 1995] 62
Figura 34	Estensione del termine di velocità <i>image-based</i> agli altri <i>level sets</i> [Malladi et al., 1995] 63
Figura 35	Evoluzione della funzione <i>level set</i> ϕ [Gui and Fox, 2005] 69
Figura 36	Passo iniziale dell'algoritmo di segmentazione <i>level set</i> $n=0$ 73
Figura 37	Evoluzione di ϕ dopo 100 iterazioni, $n=100$ 74
Figura 38	Passo finale dell'algoritmo di segmentazione, $n=300$ 75
Figura 39	Dimostrazione dell'applicazione del metodo delle sezioni di Cavalieri [Roberts et al., 2000]. 78
Figura 40	Principio di Cavalieri [Mandarim-de Lacerda, 2003] 78
Figura 41	Volumest <i>setup dialog</i> 80
Figura 42	Analisi stereologica 81
Figura 43	Diagramma di dispersione 85
Figura 44	Diagramma di Bland-Altman 85
Figura 45	Parametri calcolati sulle mappe ADC 88
Figura 46	Confronto delle due tecniche di segmentazione 92
Figura 47	Analisi di correlazione lineare tra i metodi stereologici e <i>level set</i> utilizzati per la stima del volume renale totale 93
Figura 48	Analisi di Bland-Altman dei due metodi di misurazione 93
Figura 49	Analisi di correlazione tra volume renale totale normalizzato per il peso corporeo e il valore di creatinina sierica 94
Figura 50	Analisi di correlazione tra volume renale totale normalizzato per il peso corporeo e stima del GFR tramite formula di CG 94
Figura 51	Analisi di correlazione tra volume renale totale normalizzato per il peso corporeo e stima del GFR tramite MDRD 94
Figura 52	GUI 97
Figura 53	Mappe ADC 98
Figura 54	Istogrammi delle regioni renali 99
Figura 55	<i>Box plots</i> dei valori delle mappe ADC 100
Figura 56	Curve ROC per il parametro differenza interquartile 101

Figura 57 Diagrammi di dispersione degli indici delle mappe ADC rispetto alla stima del GFR (eGFR) mediante la formula CG 102

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1	Meccanismi di contrasto pesati per T_1 , T_2 e densità di <i>spin</i> ρ a seconda dei valori di T_E e T_R [Liang and Lauterbur, 1999 , Hornak, 2007] 29
Tabella 2	Classificazione del danno renale secondo la <i>National Kidney Foundation</i> [Levey et al., 2003] 46
Tabella 3	Esempio: valori caratteristici ADC e volume renale per due soggetti 98
Tabella 4	Valori caratteristici di ADC per le tre popolazioni analizzate 99
Tabella 5	Studi sui valori ADC in diverse condizioni patologiche renali 105

Parte I

STATO DELL'ARTE E MATERIALI

INTRODUZIONE

Il Rene Policistico Autosomico Dominante (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, ADPKD) è un disturbo genetico molto frequente con un'incidenza sulla popolazione di circa 1 individuo su 1000 nati vivi senza distinzione di etnie o genere. La patologia viene causata dalla mutazione di diversi geni e dei relativi prodotti proteici codificati, che causano formazioni di cisti piene di fluido nel rene con relativa nefromegalia, diminuzione di parenchima renale sano e conseguente perdita di funzionalità renale, si stima infatti che l'ADPKD sia una delle principali cause di insufficienza renale e dialisi in tutto il mondo. Nel presente lavoro di tesi vengono analizzate immagini anatomiche e funzionali con lo scopo di determinare indici quantitativi che caratterizzino lo stato patologico e il progredire della patologia in pazienti con ADPKD.

Nei successivi paragrafi viene presentato lo stato dell'arte:

- nel primo paragrafo viene descritta l'anatomia e la fisiologia del rene: le funzioni del rene nel mantenimento dell'omeostasi, l'anatomia funzionale tramite la descrizione macroscopica dell'organo e l'organizzazione microscopica in termini di unità funzionali (nefroni), l'interazione con i visceri circostanti, il flusso ematico renale, i passaggi di formazione dell'urina e le funzioni regolatorie del rene,
- nel secondo paragrafo viene descritta l'ADPKD in termini di patogenesi, l'eziologia, le manifestazioni cliniche renali ed extrarenali e le attuali possibilità terapeutiche

1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL RENE

I reni sono organi escretori dei vertebrati ed insieme alle vie urinarie costituiscono l'apparato urinario, che filtra dal sangue i prodotti di scarto del metabolismo e li espelle tramite l'urina.

1.1.1 Funzioni del rene nell'omeostasi

Il rene assolve le sue principali funzioni mediante la filtrazione del plasma e l'eliminazione di diverse sostanze dal filtrato ad una velocità variabile secondo le necessità dell'organismo. Il rene "espelle" sostanze indesiderate dal filtrato (e quindi dal

sangue) mediante la loro escrezione nell'urina, riassorbendo allo stesso tempo nel sangue sostanze necessarie [Gray and Williams, 1989, Guyton and Hall, 2003, Mader, 2004].

Il rene svolge molteplici funzioni:

- escrezione dei prodotti di scarto del metabolismo e di sostanze estranee. I reni espellono rifiuti metabolici, in particolari rifiuti azotati; costituendo il principale strumento per l'eliminazione delle scorie non più necessarie all'organismo. I principali prodotti finali azotati del metabolismo dell'uomo sono urea, ammonio, creatinina e acido urico. Il rene elimina inoltre molte tossine ed altre sostanze estranee come pesticidi, farmaci e additivi alimentari.
- regolazione dell'equilibrio idrico ed elettrolitico; per il mantenimento dell'omeostasi la quantità di acqua e di elettroliti escreti deve corrispondere esattamente alla quantità ingerita. Il volume di sangue è strettamente associato con la concentrazione di sale nel corpo; i sali sono in grado di causare l'osmosi ovvero regolano la diffusione di acqua nel sangue: il rene contribuisce in modo fondamentale alla regolazione prolungata della pressione arteriosa mediante variazioni dell'escrezione di acqua e di sodio. Se una maggiore concentrazione di sali è presente nel sangue, si avrà un maggiore volume di sangue e di conseguenza una maggiore pressione arteriosa. Inoltre, i reni partecipano alla regolazione rapida della pressione arteriosa mediante la secrezione di fattori vasoattivi o di sostanze come la renina che portano alla formazione di fattori vasoattivi (ad esempio l'angiotensina II) e sono inoltre responsabili del corretto mantenimento delle concentrazioni di altri elettroliti nel sangue: gli ioni potassio, ioni bicarbonato (HCO_3^-) e gli ioni calcio.
- regolazione dell'equilibrio acido-base e della pressione arteriosa. I reni contribuiscono al mantenimento dell'equilibrio acido-base, insieme con i polmoni e con i sistemi tampone dei liquidi corporei, mediante l'escrezione di acidi e la regolazione delle riserve di tamponi chimici presenti nei liquidi corporei. Solo il rene è in grado di eliminare dal corpo alcuni tipi di acidi derivanti dal metabolismo proteico, quali l'acido solforico e l'acido fosforico.
- secrezione, metabolismo ed escrezione di ormoni. I reni sono coinvolti nella secrezione di ormoni del sistema endocrino; essi rilasciano la renina, una sostanza che porta alla secrezione dell'ormone aldosterone da parte della corteccia surrenale, la parte esterna della ghiandola surrenale che si appoggia sopra i reni, l'aldosterone promuove il riassorbimento di ioni sodio da parte dei reni. Ogni volta che la capacità del sangue di trasportare ossigeno risulta limitata i reni secernono l'ormone eritropoietina, che stimola la produzione di globuli rossi. I reni aiutano inoltre l'attivazione della vitamina D, precursore dell'ormone cal-

citriolo, che promuove l'assorbimento di ioni calcio da parte del tratto digestivo e svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del calcio e del fosforo.

- gliconeogenesi: il rene sintetizza glucosio dagli aminoacidi e da altri precursori in condizioni di digiuno prolungato. La capacità dei reni di aumentare il glucosio nel sangue durante il digiuno prolungato è paragonabile a quella del fegato.

Nell'insufficienza renale cronica o in caso di disturbi renali acuti, vengono compromesse le funzioni omeostatiche del rene, causando in breve tempo gravi alterazioni della composizione e del volume dei liquidi corporei. Quando la funzionalità del rene è completamente compromessa, si verifica un rapido accumulo di potassio, acidi ed altre sostanze tale da provocare la morte in pochi giorni se non si interviene clinicamente, ad esempio con l'emodialisi, per ripristinare almeno in parte l'equilibrio idrico ed elettrolitico del corpo [Mader, 2004, Guyton and Hall, 2003].

1.1.2 Anatomia funzionale del rene

I reni sono situati nella parte posteriore dell'addome ai lati della colonna vertebrale dietro il peritoneo e circondati da una massa di grasso e tessuto areolare sciolto (tessuto connettivo lasso). Le estremità superiori dei reni si trovano a livello del bordo superiore della dodicesima vertebra toracica mentre le estremità inferiori a livello con la terza vertebra lombare. Il rene destro si trova di solito leggermente più in basso del sinistro, probabilmente a causa della vicinanza con il fegato. Ogni rene è lungo circa 11.25 cm, largo dai 5 ai 7.5 cm, con spessore che raramente supera i 2.5 cm (valori corrispondenti ad un volume compreso tra i 100 e 210 ml circa). Il rene sinistro presenta caratteristiche leggermente diverse dal destro, essendo più lungo e più stretto. Il peso del rene nel maschio adulto può variare tra i 125 e i 170 gm (grammi massa); il peso di entrambi i reni in proporzione al peso corporeo è circa di 1/240 [Gray and Williams, 1989]. Le interazioni con i visceri adiacenti sono molto diversificate tra i due reni e sono schematicamente illustrate nelle figure 5 e 6.

Ciascun rene presenta nella parte mediana una rientranza detta ilo; in questa regione entrano o escono dal rene l'arteria e la vena renali, i vasi linfatici, i nervi e gli ureteri, che trasportano l'urina prodotta dal rene alla vescica dove viene accumulata fino a quando non viene espulsa grazie al riflesso della minzione.

Il rene e i suoi vasi sono incapsulati in una massa di tessuto grasso, detto capsula adiposa, che diventa più spessa ai margini del rene ed è prolungata attraverso l'ilo nel seno renale. Il rene e la capsula adiposa sono circondati dalla fascia subperitoneale e da una guaina continua di tessuto fibroso, detta fascia renale o lamella anteriore (figura 7).

Il rene è composto da circa un milione di unità funzionali detti nefroni, o tubuli renali, ciascuno dei quali in grado di formare urina. I nefroni costituiscono la maggior

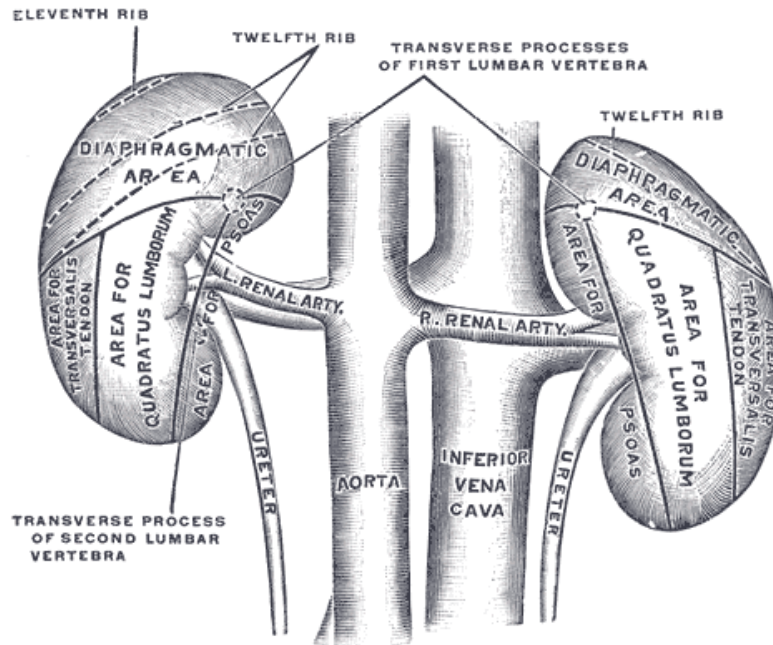


Figura 5: Interazione con i visceri adiacenti, superficie anteriore [Gray and Williams, 1989]

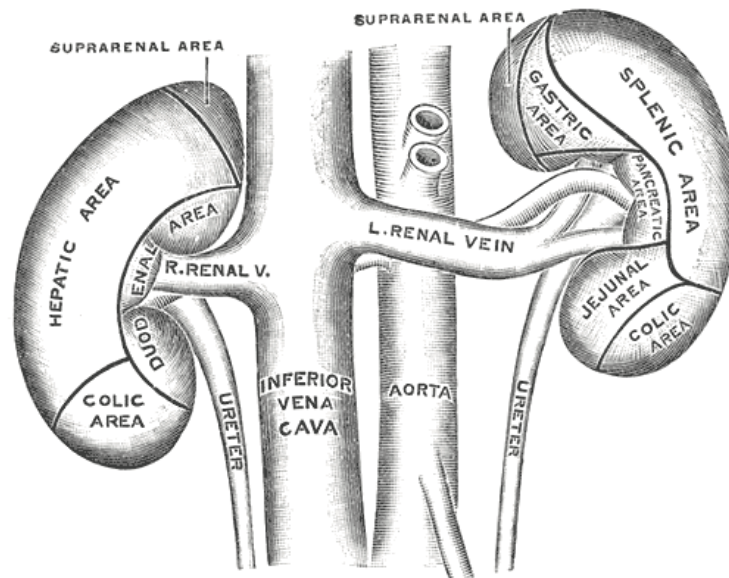


Figura 6: Interazioni con i visceri adiacenti, superficie posteriore [Gray and Williams, 1989]

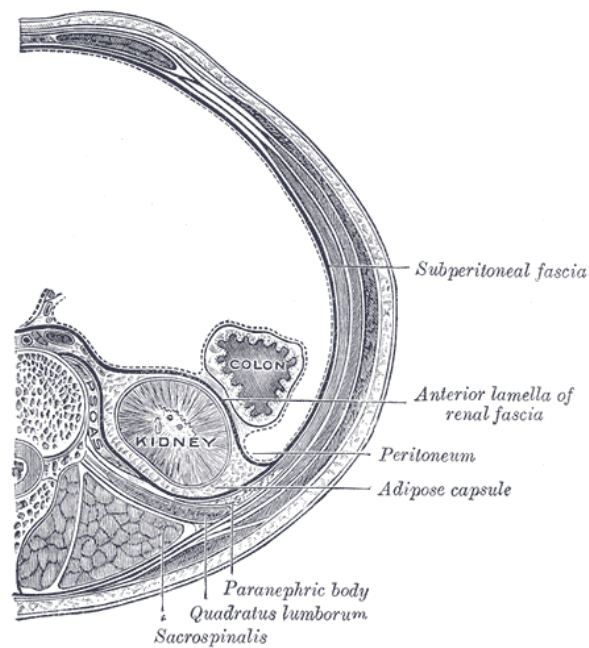


Figura 7: Interazione con i visceri adiacenti, sezione assiale [Gray and Williams, 1989]

parte del tessuto renale, originano nella sostanza corticale e dopo aver seguito un percorso molto tortuoso attraverso le sezioni corticali e midollari, giungono infine agli apici delle piramidi renali, in modo che possano svuotare il fluido di cui sono riempite attraverso i calici nella pelvi renale. Ogni nefrone è costituito da due componenti principali:

- un corpuscolo renale, formato da un ciuffo di capillari (il glomerulo) che filtra dal sangue grandi quantità di liquido
- un lungo tubulo renale, nel quale il liquido filtrato viene convogliato verso le pelvi e trasformato in urina.

Il glomerulo è formato da una rete di capillari che si ramificano e si fondono per anastomosi, caratterizzati da elevata pressione idrostatica (circa 60 mmHg) in confronto ad altre reti di capillari. I capillari glomerulari sono rivestiti da cellule epiteliali; tutto il glomerulo è circondato dalla capsula di Bowman. Il liquido filtrato dai capillari glomerulari fluisce nella capsula di Bowman e da lì nel tubulo prossimale, la porzione di tubulo più vicina al glomerulo, nella corteccia del rene (figura 8).

Il tubulo prossimale si suddivide in tubulo contorto prossimale ed in porzione rettilinea del tubulo prossimale, che si dirige verso la midollare, abbandonano la superficie dell'organo. Dal tubulo prossimale il liquido fluisce nell'ansa di Henle, che affonda nella midollare renale. Ogni ansa è formata dalla porzione rettilinea del tubulo prossimale e dalle branche ascendente e discendente. In seguito il liquido entra nel tubulo contorto distale, situato come il tubulo prossimale nella corteccia renale. I segmenti successivi, il tubulo di collegamento e il tubulo collettore corticale,

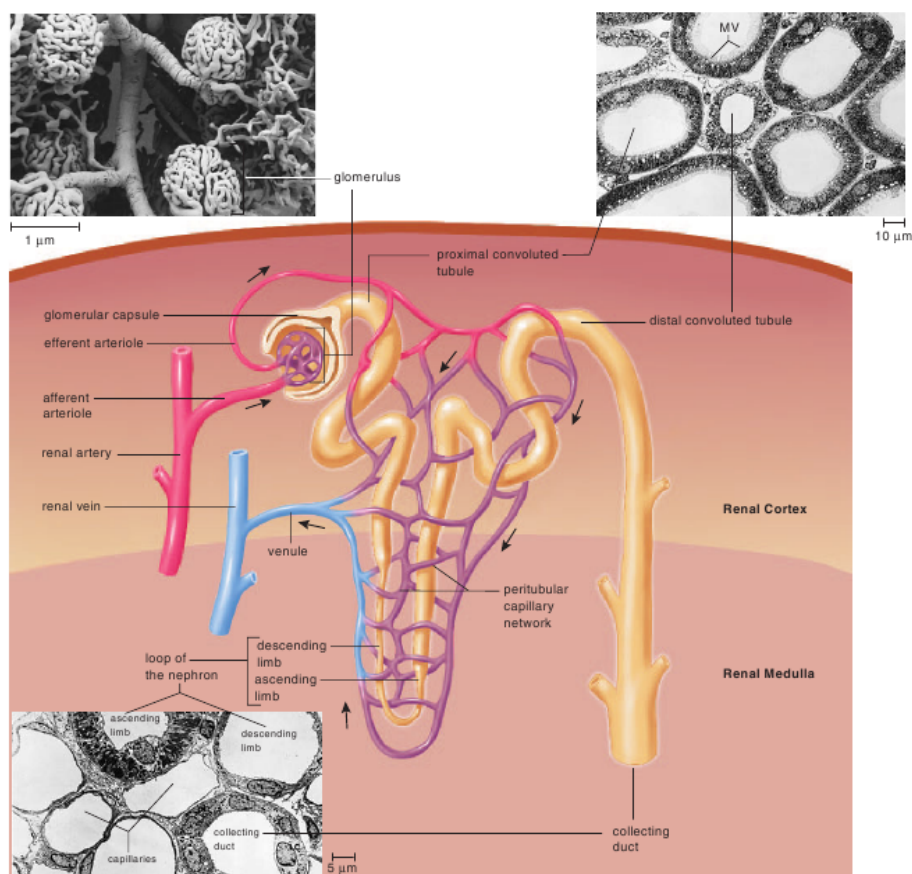


Figura 8: Nefrone, unità funzionale renale e il suo flusso ematico [Mader, 2004]

si connettono al dotto collettore corticale. I segmenti iniziali di 8 – 10 dotti collettori corticali confluiscono in un singolo grande dotto collettore che scende verso la midollare, dove diventa il dotto collettore midollare. I dotti collettori si fondono formando dotti più grandi, i dotti papillari, che si aprono nella pelvi renale attraverso la sommità delle papille renali. Ciascun rene contiene circa 250 dotti collettori grandi, ognuno dei quali raccoglie l'urina proveniente da circa 4000 nefroni [Guyton and Hall, 2003].

1.1.3 Flusso ematico renale

Il flusso ematico renale normalmente ammonta a circa 1200 ml/min e costituisce circa il 21% della gittata cardiaca. Poiché il peso dei due reni, come precedentemente descritto, costituisce solo circa lo 0,4% del peso corporeo, si può facilmente osservare che la perfusione dei reni supera quella di tutti gli altri organi. Ciascun rene riceve il sangue da una singola arteria renale, che entra nel rene attraverso l'ilo insieme all'uretere ed alla vena renale e poi si suddivide anteriormente e posteriormente in più rami dando origine a cinque arterie segmentali. Le arterie segmentali a loro volta si

diramano nelle arterie interlobari che si dirigono verso la corteccia passando tra i lobi. A livello della giunzione corticomidollare le arterie interlobari si suddividono per formare le arterie arcuate (arciformi). Queste ultime infine danno origine alle arterie interlobulari, o arterie radiali corticali, che attraversano la corteccia per dirigersi verso la superficie del rene. Dalle arterie interlobulari originano parecchie arteriole afferenti corte e di grosso calibro, ricche di fibrocellule muscolari lisce, ramificate in capillari glomerulari; ciascuna arteriola afferente dà origine ad un glomerulo, nel quale vengono filtrate grandi quantità di liquido e di soluti (ad eccezione delle proteine del plasma), dando inizio alla formazione dell'urina. Le terminazioni distali di ciascun glomerulo confluiscono nell'arteriola efferente, che si divide in un'altra rete capillare costituita dai capillari peritubulari, i quali circondano i tubuli renali (figura 8).

La circolazione renale è unica in quanto presenta due reti capillari: i capillari glomerulari e peritubulari, disposti in serie e separati dalle arteriole efferenti che contribuiscono a regolare la pressione idrostatica in entrambe le reti capillari. Un'elevata pressione idrostatica nei capillari glomerulari (circa 60 mmHg) provoca una rapida filtrazione di liquido, mentre una pressione idrostatica molto più bassa nei capillari peritubulari (circa 13 mmHg) permette un rapido assorbimento di liquido.

Regolando la resistenza delle arteriole afferenti ed efferenti, il rene può regolare la pressione idrostatica sia dei capillari glomerulari che dei capillari peritubulari, modificando di conseguenza la velocità di filtrazione glomerulare e/o di riassorbimento tubulare in risposta alle esigenze di omeostasi del corpo. I capillari peritubulari confluiscono nei vasi del sistema venoso, distribuiti parallelamente alle arteriole, che formano successivamente le vene interlobulari, le vene arcuate e la vena renale, la quale fuoriesce dal rene insieme all'arteria renale ed all'uretere [Guyton and Hall, 2003].

1.1.4 *Formazione dell'urina*

La velocità con cui sostanze diverse sono escrete nell'urina rappresenta la somma di tre processi renali:

- filtrazione glomerulare
- riassorbimento tubulare
- secrezione tubulare.

La filtrazione glomerulare si verifica quando il sangue passa dall'arteriola afferente al glomerulo. A causa della pressione del sangue glomerulare, acqua e piccole molecole si muovono dal glomerulo verso l'interno della capsula glomerulare. Si possono quindi distinguere le diverse componenti del sangue in base al processo di filtrazione:

- componenti filtrabili: acqua, rifiuti azotati, nutrienti, sali (ioni)
- componenti non filtrabili: elementi morfologici (globuli e piastrine), proteine plasmatiche.

Il filtrato glomerulare contiene piccole molecole dissolte circa alla stessa concentrazione del plasma; le piccole molecole che sfuggono alla filtrazione e i componenti non filtrabili lasciano il glomerulo per mezzo dell'arteriola efferente. I nefroni nel rene filtrano 180 litri di acqua al giorno, insieme ad un considerevole numero di piccole molecole (come il glucosio) e ioni (come il sodio). Se la composizione dell'urina fosse la stessa del filtrato glomerulare, il corpo perderebbe in continuazione acqua, sali e nutrienti; la composizione del filtrato viene modificata mentre il fluido passa attraverso i rimanenti tubuli.

Il riassorbimento tubulare si verifica quando le molecole e gli ioni vengono riassorbiti attivamente e passivamente dal nefrone nel sangue della rete di capillari peritubulari. L'osmolarità del sangue è mantenuta dalla presenza sia dei sali che delle proteine plasmatiche. Quando gli ioni Na^+ vengono attivamente riassorbiti, gli ioni cloro li seguono passivamente; il riassorbimento di sale NaCl aumenta l'osmolarità del sangue rispetto al filtrato e dunque l'acqua si muove passivamente dal tubulo verso il sangue. Circa il 67% del Na^+ è riassorbito a livello del tubulo contorto prossimale. Anche i nutrienti come il glucosio e gli amminoacidi tornano nel sangue a livello del tubulo contorto prossimale tramite un processo selettivo in cui solo le molecole riconosciute da molecole *carrier* sono attivamente riassorbite; il glucosio è un esempio di molecola che viene completamente riassorbita per l'abbondante presenza di molecole *carrier* dedicate. Tuttavia, ogni sostanza ha una velocità massima di trasporto e quando tutti i *carrier* sono occupati, qualsiasi eccesso presente nel filtrato appare nelle urine. Per esempio, quando i livelli di glucosio riassorbito arrivano a 1.8 – 2 mg/ml (di plasma) il rimanente appare nelle urine.

Nel diabete, livelli elevati di glucosio sono presenti nel sangue e quindi nel filtrato e nelle urine dal momento che il fegato e i muscoli non sono in grado di immagazzinare glucosio sottoforma di glicogeno e il rene non è in grado di riassorbirlo interamente. La presenza di glucosio nel filtrato incrementa la sua osmolarità rispetto a quella del sangue e dunque minore quantità di acqua è riassorbita nella rete di capillari peritubulari. La frequente minzione e crescente sensazione di sete sono sintomi del paziente diabetico non diagnosticato e sono causati dal fatto che l'acqua non viene riassorbita.

Dunque il filtrato che entra nel tubulo contorto prossimale è diviso in due parti: componenti che sono riassorbite nel sangue (acqua, nutrienti, ioni) e componenti che non vengono riassorbiti (piccole quantità di acqua, rifiuti metabolici azotati, sali in eccesso) che proseguono nel nefrone e che verranno quindi trasformati in urina. Le

sostanze che non vengono riassorbite diventano fluido tubulare ed entrano nell'ansa di Henle.

La secrezione tubulare è una via secondaria per mezzo della quale sostanze sono rimosse dal sangue e aggiunte al fluido tubulare. Ioni idrogeno, potassio, creatinina e farmaci come penicillina sono alcune delle sostanze che vengono spostate tramite trasporto attivo dal sangue nel tubulo contorto distale. Alla fine, l'urina contiene:

- sostanze ottenute per filtrazione glomerulare che non sono state riassorbite
- sostanze che sono state escrete per secrezione tubulare.

1.2 AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE (ADPKD)

L'ADPKD è una nefropatia ereditaria che colpisce più di 1 individuo su 1000 nella popolazione di tutto il mondo. È una condizione sistemica caratterizzata da frequenti manifestazioni epatiche e cardiovascolari parallelamente alla formazione di cisti renali che si traducono in perdita di funzionalità renale per la maggior parte dei pazienti. ADPKD è una nefropatia ereditaria caratterizzata dal manifestarsi di cisti renali multiple e bilaterali che portano a nefromegalia e insufficienza renale rappresentando una delle cause principali di dialisi e trapianti (figura 9). È tipicamente una patologia con tardo sviluppo che sfocia in insufficienza renale tra i 60 e gli 80 anni di età con variabilità notevole all'interno della stessa famiglia e tra famiglie diverse. Oltre alle cisti renali, possono essere presenti cisti nel fegato (nel 70% dei casi), nel pancreas (5%) e anche in altri organi come milza, tiroide, sistema aracnoideale, vescicole seminali e prostata. La prevalenza di manifestazioni cistiche di ogni tipo aumenta con l'età; il numero e la dimensione delle cisti epatiche sono inoltre correlati con il genere femminile, il tipo e la severità della patologia policistica [Boucher and Sandford, 2004].

L'ADPKD è una malattia monogenica e multisistemica caratterizzata dallo svilupparsi di cisti e diverse manifestazioni extrarenali. Anche se la patologia comincia in utero, possono passare anche diverse decadi prima che compaiano i primi sintomi. Essendo un disordine autosomico dominante, i figli hanno il 50% di possibilità di ereditare il gene mutato; tuttavia, solo circa la metà di questi casi sono diagnosticati in vita poiché la malattia può presentare un decorso asintomatico [Vijay et al., 2010, Pei, 2006, Schrier, 2006].

1.2.1 Patogenesi

Nella patogenesi dell'ADPKD sono stati identificati almeno 2 geni difettosi: PKD1 e PKD2. Alcuni pazienti con ADPKD non presentano nessuno di questi due geni, per



Figura 9: Rene policistico espantato che mostra massiccio allargamento a causa di cisti multiple [Boucher and Sandford, 2004]

questo motivo è stata ipotizzata l'esistenza di un altro gene, detto PKD₃, associato ad ADPKD, ancora da caratterizzare [Badani et al., 2010].

Il gene PKD₁ si trova sul cromosoma 16p e viene associato a circa l'85% di tutti i casi di ADPKD. La proteina prodotta dal PKD₁ è la policisteina-1 (PC₁), un recettore di membrana che si lega a proteine, carboidrati e lipidi per innescare una risposta intracellulare attraverso il cammino di fosforilazione. Il gene PKD₁ codifica dunque per la policisteina-1, proteina transmembrana formata da 4302 aa con una larga regione extracellulare e una coda corta citoplasmatica C-terminale [Badani et al., 2010], la quale gioca un ruolo vitale nelle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice: un difetto nella policisteina-1 porta ad un'alterazione nella differenziazione delle cellule epiteliali e ad un'espressione fenotipica anormale di ADPKD.

L'ADPKD di tipo 2 è causata dalla mutazione del gene PKD₂ ed è responsabile per il 10 – 15% dei casi, con il gene difettoso localizzato sul cromosoma 4. Il restante 5% dei casi non è caratterizzato da un difetto relativo ai due luoghi citati e per questo motivo è stato ipotizzata l'esistenza di un terzo gene PKD₃. Il gene PKD₂ codifica per la policisteina-2 (PC₂), proteina formata da 968 aa [Boucher and Sandford, 2004], coinvolta nella segnalazione del livello di concentrazione di calcio cellulare: si è ipotizzato un funzionamento del tipo canale proteico permeabile agli ioni Ca²⁺ regolato dalla policisteina-1. Entrambi questi prodotti proteici sono presenti nell'epitelio tubulare renale. Famiglie con difetti sul PKD₁ o PKD₂ presentano le stesse manifestazioni

sintomatiche; tuttavia pazienti PKD2 presentano esordi clinici più tardivi e più lenta progressione della malattia: l'ultimo stadio (ESRF, *End Stage Renal Failure*) si verifica in media all'età di 74 anni per pazienti PKD2 contro 54 anni per pazienti PKD1 [Vijay et al., 2010].

La malattia è caratterizzata da esordio e sviluppo di patologia renale variabile. La variabilità intrafamiliare (espressione fenotopica variabile della malattia all'interno di una stessa famiglia) è spesso legata alla presenza di mutazioni somatiche nell'allele intatto all'interno delle cellule tubulari epiteliali (*2nd hit hypothesis*, [Vijay et al., 2010, Deane and D Ricardo, 2007, Pei, 2001]). Il complesso policisteina-1 e -2 è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare e quindi porta con sé la chiave della patogenesi dell'ADPKD. Diversi studi suggeriscono che la PC1 sia coinvolta nel mantenimento delle interazioni tra cellula e cellula e tra cellula e matrice cellulare [Torres et al., 2007, Ong and Harris, 2005, Pazour, 2004, Igarashi and Somlo, 2002, Deane and D Ricardo, 2007]. Per questo motivo una policisteina difettosa potrebbe portare a differenziazione anormale delle cellule epiteliali e di conseguenza a varie espressioni fenotipiche di ADPKD.

Differenziazione anormale delle cellule, maturazione e apoptosi potrebbero essere responsabili per la formazione di cisti attraverso meccanismi biochimici che includono:

1. *funzione anormale delle ciglia*: dal momento che PC1 e PC2 si trovano sulle ciglia dell'epitelio renale, difetti nelle ciglia renali causati da mutazioni di entrambi i geni possono contribuire alla genesi delle cisti renali. Alterazioni delle funzioni delle ciglia nei reni policistici possono interferire direttamente con le loro proprietà meccanosensoriali: l'incapacità dell'epitelio renale di avvertire in modo corretto la velocità di flusso luminale porta ad una crescita smisurata di tessuto e cisti renali come conseguenza del tentativo del rene policistico di compensare alla percepita perdita di flusso di fluido. Il legame tra crescita anormale di cellule e funzione delle ciglia difettose può essere inoltre supportato osservando che le ciglia sono connesse alle strutture centrosomali, le quali al loro volta giocano un ruolo fondamentale nel controllo e progressione della regolazione del ciclo cellulare [Vijay et al., 2010, Deane and D Ricardo, 2007, Boucher and Sandford, 2004, Ong and Harris, 2005, Igarashi and Somlo, 2002, Pazour, 2004].
2. *cAMP (adenina monofosfato ciclico) activation*: gli antagonisti dei recettori per la vasopressina inibiscono o arrestano il progredire delle patologie renali cistiche in modelli sui topi di ADPKD2 umano suggerendo un possibile ruolo della cAMP nello sviluppo delle cisti.
3. *targeting difettoso di proteine cellulari*: in qualche soggetto con cisti PKD sono presenti pompe Na-K-ATPasi localizzate sulla membrana luminale, invece che limitate nella membrana basolaterale per cui viene promossa la secrezione di acqua e sodio all'interno delle cisti causandone la crescita.

4. *Anormale crescita delle cellule epiteliali*: Attivazione di proto-oncogeni e/o fattori di trascrizione, e conseguenti iperplasie tubolari possono svolgere un ruolo importante nella crescita delle cellule epiteliali.
5. *Angiogenesi*: Il ruolo dell'angiogenesi nella crescita e progressione delle cisti è supportata dal fatto che cisti epatiche e renali hanno livelli elevati del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) e di altre citochine. Il successo dell'embolizzazione arteriosa transcatetere renale (TAE), nella terapia di contrazione renale in pazienti ADPKD confermerebbe la teoria patogenica dell'angiogenesi.

Il principale elemento di patogenesi dell'ADPKD è la de-differenziazione di cellule epiteliali tubolari e la loro conseguente proliferazione. Le cisti nascono come dilatazione di tubuli intatti che sono in contatto col nefrone e sono piene di filtrazione glomerulare. Le cisti si manifestano principalmente sui tubuli distali e sui dotti collettori; durante la crescita delle cisti, il fluido cistico è formato principalmente da fluido di secrezione transepiteliale. Questo è tipicamente affiancato a infiammazione interstiziale, degradazione dei componenti matriciali e iperplasia dell'epitelio cistico. In particolare, la funzione anormale delle cilia è un meccanismo patologico comune anche ad altre patologie cistiche (*Polycystic Kidney Disease, PKD*) e viene considerata una causa principale della cistogenesi in pazienti PKD. Le cilia renali sono proiezioni basate su microtubuli, legate alla membrana e generate dalle cellule epiteliali che costituiscono il tubulo e il dotto renale. Ogni cellula epiteliale, con l'eccezione delle cellule intercalate, ha un singolo cilium apicale che si estende nel lumen riempito di fluido. Le cilia renali sono tipicamente lunghe 2 – 4 μm e sono costituite da una struttura di microtubuli. Come per le altre cilia, la crescita delle cilia renali si realizza a partire dal corpo di una struttura basale ancorata al di sotto della membrana plasmatica. Le cilia renali nell'uomo e in molti mammiferi sono prive delle braccia della dineina (proteina motrice che converte l'energia contenuta nell'ATP in energia meccanica di movimento) e della coppia centrale di microtubuli che le cilia motili usano per generare movimento pulsante e dunque non contribuiscono alla generazione del flusso di fluido attraverso il rene. Cilia immobili similari, spesso con funzione non immediatamente ovvia, sono presenti in numerosi altri organi e vengono definite "cilia primarie".

L'importanza del cilium renale nel mantenimento della normale architettura del rene sembra essere collegata all'abilità di questo organello di rilevare flusso di fluido attraverso il nefrone e il dotto collettore. Si pensa che sia la perdita di questa capacità sensoriale ad essere il principale fattore dello sviluppo di tutte le principali forme di PKD. Policisteina-1 e policisteina-2 sono grandi proteine di membrana che si colocalizzano sul cilium renale e sono sensibili al flusso mediato dal cilium nelle cellule epiteliali renali di coltura. Si pensa che la policisteina-1 funzioni come un meccanosensore che rileva flusso luminale per mezzo di cambiamenti conformazionali

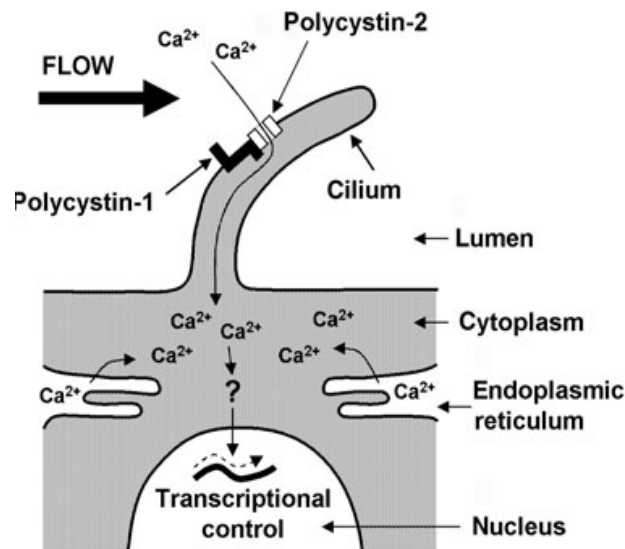


Figura 10: Modello di funzionamento del cilio renale nella detezione di flusso e generazione di un segnale calcio-dipendente: la flessione del cilio renale in presenza di flusso attraverso il lume dei tubuli renali è avvertita dalla policisteina-1 e causa un flusso di Ca^{2+} tramite la policisteina-2. La concentrazione di ioni Ca^{2+} aumenta inoltre per produzione intracellulare e regola il fenotipo epiteliale e la proliferazione cellulare, probabilmente influenzando la trascrizione dei geni [Deane and D Ricardo, 2007].

indotti da forze nel suo largo dominio extracellulare. La policisteina-2 fa parte della famiglia delle proteine di membrana tensione dipendenti; la PC2 forma un canale per gli ioni Ca^{2+} che interagisce e viene regolata dalla policisteina-1.

Risultati di esperimenti *in vitro* hanno portato alla definizione di un modello in cui il flusso di fluido attraverso il nefrone o il dotto renale viene rilevato dalla policisteina-1 e porta ad un flusso di ioni Ca^{2+} tramite l'apertura della policisteina-2 all'interno delle cellule renali epiteliali attraverso il loro cilio (figura 10). Il flusso entrante di Ca^{2+} è amplificato dal rilascio di riserve di Ca^{2+} intracellulare, un processo di cui si pensa sia coinvolto il reticolo endoplasmatico. Livelli elevati di Ca^{2+} all'interno delle cellule sono ritenuti responsabili dell'innescarsi di una serie di eventi il cui scopo è il mantenimento del fenotipo epiteliale. In assenza di questo segnale di *input* le cellule epiteliali si de-differenziano e subiscono variazioni che promuovono la formazione e l'allargamento di cisti. Anche se il meccanismo con cui il segnale di Ca^{2+} esercita i suoi effetti non è del tutto chiaro, la sua importanza è stata confermata da diversi studi sperimentali, che hanno dimostrato che un aumento di Ca^{2+} nell'ambiente esterno può modificare il normale fenotipo di cellule di cultura prelevate da reni policistici. Sensibilità al flusso e policisteine sono inoltre coinvolti nella regolazione di diversi altri percorsi di segnalazione che influenzano il fenotipo delle cellule epiteliali. Il terminale a C della policisteina-1 può staccarsi in modo dipendente dal flusso ed essere trasportata nel nucleo, dove può influenzare la trascrizione dei geni. La policisteina-1 regola inoltre il percorso m-TOR (una proteina chinasi a serina e

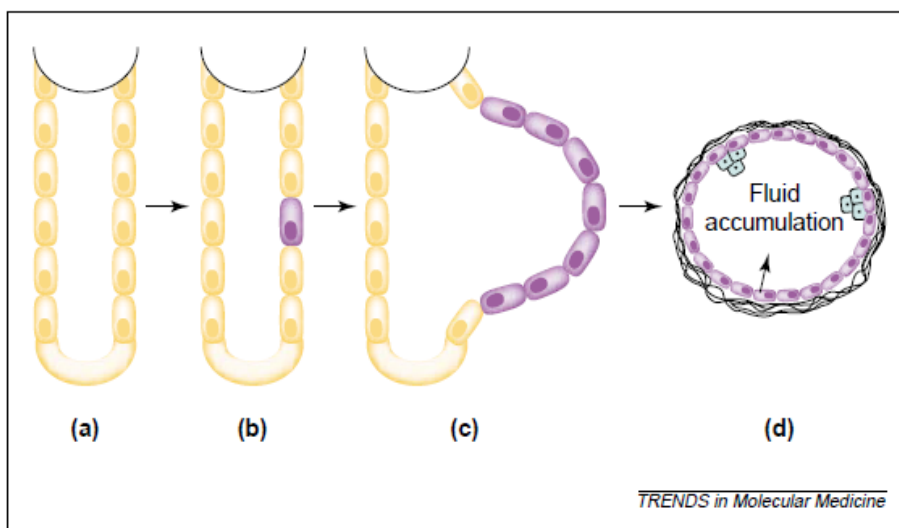


Figura 11: Modello di cistogenesi del tipo “two hit” in ADPKD. (a) tutte le cellule epiteliali nel tubulo renale contengono la stessa mutazione PKD. (b) si verifica mutazione somatica dell’allele PKD all’interno di una cellula epiteliale. (c,d) proliferazione di cloni di questa cellula epiteliale si traduce in dilatazione tubulare e formazione di cisti [Pei, 2001].

treonina che regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, la sintesi proteica e la trascrizione) che controlla la proliferazione cellulare ed è inappropriatamente attivata in PKD.

Un modello “two-hit” è stato proposto per spiegare lo sviluppo e la progressione di ADPKD umano ([Deane and D Ricardo, 2007, Pei, 2001, Vijay et al., 2010], figura 11). La possibilità che la formazione individuale di cisti in ADPKD possa coinvolgere un processo “two-hit” , analogo al modello classico di Knudson di carcinogenesi, è stato per la prima proposto da Stephen T. Reeders nel 1992. Secondo questo modello, ogni cisti rappresenta un tumore benigno, riempito di fluido. L’inattivazione di entrambe le coppie di un gene PKD per mutazione delle cellule germinale e genetica all’interno di una cellula epiteliale favorisce la crescita per proliferazione di cloni fino alla formazione della cisti. Questo modello sostiene che la mutazione somatica in individui eterozigoti disattivi il rimanente allele intatto che codifica per la policisteina-1 o -2 in una piccola popolazione di cellule epiteliali renali. Queste cellule che hanno perso eterozigosi non sono più soggette al processo mediato dalle policisteine che controlla il fenotipo epiteliale e si espandono formando escrescenze cistiche del nefrone o del dotto collettore. Il fatto che il processo di cistogenesi si basi sull’accumulazione di mutazioni somatiche rare viene utilizzata per spiegare l’esordio relativamente tardivo della patologia e la natura focale delle cisti. A supporto dell’ipotesi “two-hit”, analisi di mutazione hanno dimostrato che le cellule di cisti di individui con ADPKD sono caratterizzate dalla stessa perdita di mutazione eterozigote, causando la formazione di cisti per proliferazione di cloni [Deane and D Ricardo, 2007].

1.2.2 Manifestazioni cliniche

L'ADPKD è caratterizzata da diverse manifestazioni cliniche, renali ed extrarenali, vengono di seguito riportate le principali manifestazioni renali:

- *Ipertensione*: è un sintomo relativamente precoce con un esordio all'età media di 30 anni. L'aumento della pressione arteriosa è dovuta all'aumento dell'attività del sistema secondario renina-angiotensina locale intrarenale che porta a ischemia renale come conseguenza dell'espansione delle cisti. La funzione difettosa della policisteina nel sistema vascolare potrebbe inoltre accelerare il precoce manifestarsi dell'ipertensione come viene evidenziato dall'espressione delle policisteine nella muscolatura liscia vascolare e nell'endotelio.
- *Infezioni del tratto urinario*: sono un sintomo comunemente presente nei pazienti ADPKD ed è stato provato che coloro che presentano episodi ricorrenti di infezioni presentano anche un aumento del tasso di deterioramento delle funzioni renali. Spesso tali infezioni sono legate alla stasi urinaria causata dall'anatomia renale deformata del rene patologico.
- *Ematuria*: si verifica usualmente in seguito alla rottura di una cisti allargata nel sistema collettore ed è tipicamente preceduta da un evento scatenante come un'infezione del tratto urinario, esercizio intenso o lesioni al fianco. I pazienti non dovrebbero quindi esercitare sport in cui potrebbero incorrere in traumi addominali. L'ematuria è più frequente tra gli individui con reni allargati, ipertensione e elevata concentrazione di creatinina nel plasma e potrebbe essere un segnale di espansione accelerata delle cisti e rapida progressione della patologia renale in ADPKD.
- *Difetti di concentrazioni*: la maggior parte dei pazienti ADPKD presentano lievi difetti subclinici di concentrazioni che peggiorano con l'età e che potrebbero essere associati con architettura tubulare distorta o patologie precoci tubulointerstiziali.
- *Proteinuria*: è generalmente minima in pazienti ADPKD e si verifica in pazienti con disfunzioni renali avanzate.
- *Nefrolitiasi*: frequente nei pazienti ADPKD più che nel resto della popolazione, viene causata da stasi urinaria associata ad un'anatomia renale deformata, che provocano ritardi nel *washout* dei cristalli e aumenta il rischio di infezioni del tratto urinario.
- *Dolore*: al fianco o all'addome è tipicamente associato all'allargamento dei reni e si pensa che dipenda dallo *stretching* della capsula renale o dalla trazione del

peduncolo renale. Si possono inoltre manifestare dolori non legati ai reni come mal di testa, dolore al petto o alle gambe. Manifestarsi acuto di dolore potrebbe essere sintomo di complicazioni, come emorragia all'interno delle cisti, torsione o infezione di una cisti, o per la presenza di un calcolo renale.

- *Cancro renale*: non ha maggiore prevalenza rispetto al resto della popolazione, ma è spesso bilaterale multicentrico e sarcomatoide. Sintomi di proporzioni eccessive rispetto alla patologia renale, come rapida crescita di cisti complesse, segni sistemici, febbre, anoressia, fatica, perdita di peso in assenza di infezione renale sono segnali di possibile neoplasia renale.

Tra le manifestazioni extrarenali si distinguono:

- *Aneurisma cerebrale*: espressione e/o funzione alterata del gene PKD nelle cellule dei muscoli lisci delle arterie e miofibroblasti giocano un ruolo importante nella genesi di aneurismi cerebrali. La complicazione più grave da rene policistico consiste nella rottura di un aneurisma cerebrale, che si traduce in un'emorragia subaracnoidea o intracerebrale.
- *Manifestazioni cistiche extrarenali*: possono presentarsi in fegato, pancreas, polmoni, milza, esofago, ovaio, testicolo, epididimo, prostata, tiroide, vescica, utero, cervello. Le più comuni sono le cisti epatiche, le quali si sviluppano più tardi rispetto alle cisti renali e aumentano all'aumentare dell'età dei pazienti. Nelle donne le cisti epatiche si sviluppano maggiormente e in età più giovane a causa della sensibilità delle cisti agli ormoni steroidei femminili. Nella maggior parte dei casi la presenza di cisti nel fegato rimane asintomatica con funzioni epatiche preservate.
- *Effetti cardiovascolari*: anomalie valvolari associate a pazienti ADPKD includono prolasso della valvola mitrale, rigurgito aortico e meno frequentemente rigurgito mitrale o tricuspide. La maggior parte dei pazienti è asintomatico ed è necessaria una visita ultrasonografica di conferma. Tuttavia, queste lesioni possono peggiorare in alcuni casi nel tempo fino a richiedere una sostituzione valvolare.
- *Diverticoli e Ernia*.

1.2.3 Terapie

Anche se al momento non esistono trattamenti specifici per la cura dell'ADPKD, negli ultimi anni nuove terapie sono state ideate per rallentare o bloccare il progredire della patologia. In una malattia che presenta le principali complicazioni in tarda età, il rallentamento del naturale progredire fino all'ultimo stadio di insufficienza renale

anche solo di una decade può avere un impatto significativo sulla morbilità e sulla mortalità.

Vengono quindi di seguito riportare le nuove terapie per ADPKD raggruppate per effetti desiderati [Vijay et al., 2010].

Inibizione della secrezione di fluido delle cisti

Sono state pensate diverse strategie per rallentare la crescita e l'allargamento delle cisti in ADPKD; tra queste gli antagonisti del recettore per la vasopressina V₂ rappresentano la speranza migliore per una terapia efficace, tra cui:

- Amiloride: bloccando i canali per il sodio inibisce lo sviluppo delle cisti su modelli animali della patologia policistica. *In vitro* diminuisce il trasporto di sodio in cisti umane con bassa concentrazione di sodio.
- Somatostatina: riduce la secrezione di fluido dalle cisti mediato da trasporto di cloruro attivo e quindi diminuisce la progressione delle cisti in pazienti ADPKD.
- Diminuzione di caffeina: la caffeina aumenta i livelli di cAMP e favorisce la crescita di cisti in studi *in vitro*.

Inibizione della proliferazione delle cisti epiteliali

- Sirolimus: è un inibitore mTOR che inibisce la formazione di cisti e diminuisce la dimensione del rene policistico in diversi modelli animali, il farmaco è attualmente in fase di sperimentazione.
- Inibitori caspasi: riducono l'apoptosi e la proliferazione tubulare in modelli animali della patologia policistica.
- Statine: miglioramento delle funzionalità renali in modelli animali trattati con lovastatina, in pazienti ADPKD si registra un miglioramento delle funzionalità renali e delle disfunzioni endoteliali.
- Alcalinizzazione urinaria: una riduzione di genesi di ammoniaca riduce la severità della patologia cistica e l'infiammazione interstiziale su modelli animali.
- Metilprednisolone: diminuisce l'ingrandimento renale e la fibrosi interstiziale renale nel ratto con patologia policistica.

Controllo dell'ipertensione

Inibitori dell'ACE (enzima di conversione dell'angiotensina) possono effettivamente abbassare la pressione arteriosa nella maggior parte dei pazienti ADPKD [Magistroni et al., 2001]. Non sono stati registrati benefici riguardo la perdita di funzionalità renale

in caso di utilizzo di inibitori ACE in pazienti con ADPKD, tuttavia questi inibitori hanno un effetto protettivo sull'ipertrofia del ventricolo sinistro diminuendo il rischio di infarto del miocardio e dunque prevengono patologie e mortalità cardiovascolari.

Drenaggio di cisti

In caso di dolore e disagi persistenti causati dall'allargamento delle cisti il drenaggio di cisti viene realizzato tramite aspirazione percutanea, aspirazione con sclerosi e drenaggio chirurgico. Questi interventi tuttavia non sono legati al miglioramento della funzionalità renale o ad un ritardo nel progredire della patologia.

Denervazione renale

La denervazione renale laparoscopica rappresenta un'opzione promettente ed efficace in caso di dolore acuto causato da ADPKD in bambini e adolescenti, tuttavia l'efficacia a lungo termine non è ancora stata stabilita.

Embolizzazione arteriosa transcatetere (TAE)

Soluzione meno invasiva di quella chirurgica, la TAE rappresenta un'opzione terapeutica efficace per pazienti ADPKD con reni massicciamente allargati o con cisti emorragiche. L'embolizzazione può inoltre essere indicata in caso di ematoma retroperitoneale e capsulare che può portare a instabilità emodinamica. La TAE migliora la qualità della vita e lo stato nutrizionale di pazienti ADPKD.

Terapia sostitutiva

La terapia sostitutiva, sia in termini di emodialisi che di trapianto di rene, diventa necessaria in pazienti con patologia renale di ultimo stadio:

- Emodialisi: la sopravvivenza di pazienti con ADPKD di ultimo stadio sottoposti a emodialisi sembra essere maggiore di quella di pazienti di ultimo stadio con altre patologie renali. Questo potrebbe essere dovuto dal fatto che pazienti con ADPKD presentano più bassa incidenza di patologie delle arterie coronarie. Tuttavia pazienti con ADPKD che si sottopongono a emodialisi sono più soggetti a dolore, ematuria e infezioni renali.
- Dialisi peritoneale: rispetto a pazienti con altri tipi patologie renali i pazienti ADPKD sottoposti a dialisi peritoneali presentano benefici in termini di sopravvivenza. Tuttavia, dialisi peritoneale ripetuta è associata ad un maggiore rischio di peritonite. Questa forma di terapia richiede un adeguato spazio intra-addominale per consentire un efficace scambio peritoneale, dunque non è consigliabile per pazienti ADPKD con reni particolarmente allargati o ernie ricorrenti.

- Trapianto renale, con modalità e benefici simili ad altre tipologie di patologia renale; tuttavia, in pazienti ADPKD è a volte necessaria una nefrectomia
- Nefrectomia: la crescita di cisti fa aumentare la dimensione dei reni fino ad arrivare a dimensioni enormi nel tempo e possono portare a dolore cronico, ematuria cronica, infezioni ricorrenti del tratto urinario, ernie addominali, stanchezza marcata e anoressia, dovuti alla pressione su organi intra-addominali.

IMAGING

2.1 METODI DI IMAGING PER LA DIAGNOSI DI ADPKD

La diagnosi si basa principalmente su sistemi di *imaging* come ultrasonografia, CT e MRI; nell'adulto avviene tipicamente tramite la detezione di reni policistici allargati bilateralmente tramite *scanning* ultrasonografico transaddominale, tecnica semplice, largamente disponibile, non invasiva e adatta per pazienti di ogni età. L'ultrasonografia rimane dunque la modalità di *imaging* più utilizzata per questioni di costo e sicurezza, tuttavia si presenta inaccurata nella detezione di piccole cisti o in piccoli cambiamenti di volume renale e dunque spesso viene sostituita da CT o MRI. MRI viene privilegiata rispetto alla CT per evitare esposizione a radiazioni e mezzi di contrasto iodati. Ciò nonostante, fibrosi sistemica nefrogenica è stata associata all'utilizzo di mezzo di contrasto basati sul Gadolinio in MR in pazienti renali, dunque nuovi protocolli di acquisizione di immagini di risonanza senza mezzi di contrasto sono stati sviluppati per valutare l'ADPKD.

Lo *screening* è fortemente consigliato in persone adulte asintomatiche membri di famiglie a rischio di ereditare ADPKD, individui (adulti e bambini) con sintomi nel tratto renale come ematuria macroscopica, dolore, infezioni urinarie o coliche renali; inoltre in persone che presentano ipertensione in giovane età, presenza di un figlio con precoce manifestarsi di patologia, anamnesi personale o familiare di aneurismi cerebrali. Per individui che hanno il 50% di rischio di ereditare la patologia, cioè parenti di primo grado di individui affetti, si utilizza tipicamente il criterio diagnostico di Ravine in famiglie PKD₁ [Ravine et al., 1994]. Tale criterio prevede che la presenza di almeno due cisti renali (unilaterali o bilaterali) in individui più giovani dei 30 anni può essere sufficiente per stabilire una diagnosi, nel range di età tra i 30 e i 59 anni la presenza di almeno due cisti in entrambi i reni e infine dai 60 anni viene richiesta la presenza di almeno 4 cisti per ogni rene.

Esistono inoltre test genetici molecolari per ADPKD, i quali possono essere utili per valutare individui a rischio in caso di immagini equivoche, individui giovani a rischio in quanto potenziali donatori e individui con patologia renale cistica atipica. L'efficacia di questo tipo di *screening* è messa in dubbio dal fatto che solo circa il 70% delle mutazioni genetiche conosciute sono identificabili da un test genetico basato su un genotipo. I metodi correnti usati per eseguire test genetici sono il *linkage* o analisi di sequenze di DNA; tuttavia, un approccio combinato che utilizzi entrambe le modalità potrebbe essere più efficace.

Nel presente lavoro di tesi sono state usate immagini di Risonanza Magnetica per analizzare pazienti affetti da ADPKD; nei seguenti paragrafi vengono quindi descritti i principi fisici di formazione delle immagini su cui sono stati applicati metodi di elaborazione.

2.1.1 MRI

Il metodo di *imaging* MR è una tecnica tomografica che produce immagini di caratteristiche interne fisiche o chimiche di un oggetto a partire dalla misura esterna di segnali di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). Gli *scanners* MRI sono basati sul principio di NMR che fu scoperto da Bloch e Purcell nel 1946: essi scoprirono che nuclei atomici con numero dispari di protoni in un campo magnetico ruotano con una frequenza che dipende dall'intensità del campo magnetico e dalla natura dell'atomo. Se questo viene sottoposto ad un campo a radio frequenza (RF), che rappresenta la frequenza di risonanza, esso assorbe energia e quando il campo a RF viene rimosso tale energia viene emessa sotto forma di onda elettromagnetica alla frequenza di risonanza stessa. Per questa scoperta Bloch e Purcell vinsero il premio Nobel per la fisica nel 1952. Il fenomeno di MR fu inizialmente usato per studiare la struttura chimica delle sostanze; Lauterbur nel 1973 per primo ricostruì immagini bidimensionali di Risonanza Magnetica, introducendo gradienti di campo magnetico che resero possibile determinare l'origine dei segnali a RF emessi. Nello stesso anno, indipendentemente da Lauterbur, Mansfield e Grannel dimostrarono la relazione di Fourier tra la densità di *spin* e il segnale NMR acquisito in presenza di un gradiente di campo magnetico. Queste scoperte permisero l'applicazione in ambito biomedicale dei principi della Risonanza Magnetica.

Rispetto ad altri sistemi di *imaging* la MRI presenta molti vantaggi, in quanto è una tecnica non invasiva e permette di ottenere immagini con elevato contenuto informativo; infatti, il valore di ogni singolo *pixel* dipende da molti parametri:

- ρ = densità nucleare di *spin*
- T_1 = tempo di rilassamento *spin-lattice*
- T_2 =tempo di rilassamento *spin-spin*
- movimento nucleare (es. diffusione – perfusione)
- differenze di *chemical shift*.

Gli effetti di questi parametri possono essere cancellati o evidenziati da altri parametri:

- T_R = tempo di ripetizione
- T_E = tempo di eco

- $\alpha = \text{flip angle}$.

Un'immagine ottenuta dallo stesso sito anatomico può sembrare drasticamente diversa con diversi protocolli di acquisizione dei dati. In generale, un'immagine MR può essere una mappa spaziale di:

- densità di *spin* stazionari
- densità di *spin* in movimento
- densità di tempi di rilassamento
- coefficienti di diffusione dell'acqua,

da cui si comprende l'enorme potenziale della tecnica per la grande flessibilità di acquisizione dei dati e i ricchi meccanismi di contrasto che la caratterizzano.

In questa tesi sono state analizzate immagini ottenute con sequenze pesate per la costante di tempo T_2 ed immagini pesate per diffusione (DWI-MRI), metodo che permette di mappare il movimento delle molecole d'acqua all'interno dei tessuti. Nei seguenti paragrafi vengono presentati i principi fisici e le sequenze di acquisizioni utilizzate per acquisire le immagini utilizzate per l'analisi di pazienti ADPKD.

Principi fisici

In quasi tutte le applicazioni di MRI, il segnale ha origine dai nuclei degli atomi di idrogeno, formati dunque da un solo protone. La fondamentale proprietà di un singolo protone, e in generale di atomi che hanno peso atomico dispari o numero atomico dispari, è il momento angolare \vec{I} , detto anche *spin*, che descrive la rotazione fisica del nucleo attorno al proprio asse. In MRI un insieme di nuclei dello stesso tipo presenti in un oggetto viene definito come un sistema nucleare di *spin*; il magnetismo nucleare di un sistema di *spin* origina dal campo magnetico microscopico associato ad ogni *spin* nucleare. Infatti, dal momento che il nucleo ha carica elettrica e che ruota intorno al suo asse se ha *spin* diverso da 0, il nucleo stesso crea un campo magnetico analogo a quello di una barretta magnetica microscopica. Il nucleo è quindi una carica in movimento e può essere caratterizzata da una quantità vettoriale che rappresenta il campo magnetico creato dal nucleo, detta momento di dipolo nucleare magnetico o momento magnetico $\vec{\mu}$, la cui relazione con lo *spin* \vec{I} è la seguente:

$$\vec{\mu} = \gamma \cdot \vec{I} \tag{2.1}$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, una costante fisica nucleo-dipendente.

Ogni *spin* può assumere i valori $\pm 1/2$ e valori multipli di $\pm 1/2$ ($\pm 3/2, \pm 5/2, \dots$) e dal momento che gli *spin* in nuclei atomici con pari numero di protoni si annullerebbero l'uno con l'altro, solo atomi con numero dispari di protoni sono caratterizzati da

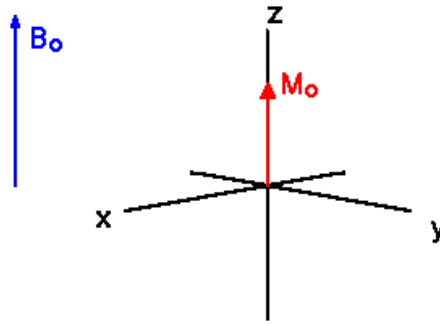


Figura 12: Magnetizzazione complessiva M_0 allineata secondo l'asse z in presenza di un campo esterno B_0 [Hornak, 2007]

spin non nullo necessario per generare segnale di NMR. Il nucleo più comunemente utilizzato in MRI è il nucleo dell'idrogeno (H), il cui *spin* può assumere valore $\pm 1/2$. Dal momento che il segnale di un singolo *spin* è impossibile da misurare, gli *spin* sono generalmente considerati come un insieme e sono descritti in termini di precessione intorno ad un vettore di magnetizzazione \vec{M} . Quando non viene applicato nessun campo magnetico esterno, il momento magnetico di ogni *spin* $\vec{\mu}$ è caratterizzato da ampiezza fissa, ma la sua direzione è completamente *random* e dunque all'equilibrio termico non esiste campo magnetico netto intorno ad un oggetto macroscopico.

In presenza di un campo magnetico esterno B_0 , detto campo di polarizzazione, il vettore di magnetizzazione \vec{M} si allinea con il campo B_0 e gli *spin* cominciano a precessare intorno a B_0 . La frequenza di precessione è la frequenza di risonanza naturale del sistema di *spin*, detta frequenza di Larmor:

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0 \quad (2.2)$$

Il vettore di magnetizzazione complessiva \vec{M} sarà dato dalla somma vettoriale di tutti i momenti magnetici microscopici μ appartenenti all'oggetto:

$$\vec{M} = \sum_{n=1}^N \mu_n \quad (2.3)$$

Il momento magnetico μ_n dell' n -esimo *spin* nucleare in presenza di B_0 si può trovare in due stati, *spin up* ($I = +1/2$ per l'atomo di H, stato a minore energia e dunque più stabile) e in *spin down* ($I = -1/2$ per H). Quando si considera un sistema di *spin*, si definisce un sistema di riferimento del *frame* di laboratorio in modo tale che \vec{M} risulti stazionario e allineato con B_0 ; B_0 agisce sull'asse longitudinale z e il piano ortogonale all'asse z è il piano trasversale xy . In presenza di B_0 , la componente trasversale di M , M_{xy} sarà nulla, mentre si avrà componente longitudinale non nulla M_z^0 (figura 12, [Liang and Lauterbur, 1999, Wright, 1997]).

Per ottenere un segnale misurabile, il sistema deve assorbire energia che può essere in seguito emessa e misurata; tale energia viene generata eccitando il sistema con un

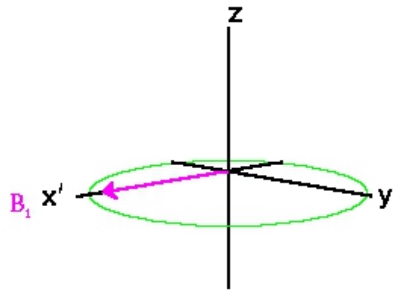


Figura 13: B_1 è perpendicolare a B_0 e dunque perpendicolare all'asse z , ruota alla frequenza di Larmor e viene rappresentato statico rispetto al frame rotante definito dagli assi x' e y' [Hornak, 2007]

secondo campo magnetico rotante tempo variante, un impulso a RF B_1 , che agisca perpendicolarmente a B_0 e che oscilli alla frequenza di Larmor ω_0 (figura 13). A causa dell'impulso a RF, \vec{M} si sposta dall'asse z e incomincia a precessare intorno al campo rotante B_1 . Il comportamento quantitativo di \vec{M} in presenza di un campo magnetico B_1 è descritto da una sola equazione detta equazione di Bloch [Liang and Lauterbur, 1999, Wright, 1997]:

$$\frac{\partial \vec{M}}{\partial t} = \gamma \cdot \vec{M} \times \vec{B} - \frac{M_x \cdot \vec{i} + M_y \cdot \vec{j}}{T_2} - \frac{(M_z - M_z^0) \cdot \vec{k}}{T_1} \quad (2.4)$$

L'angolo α che si viene a formare tra \vec{M} e l'asse z viene definito *flip angle* e dipende dalla durata dell'impulso a RF; per un certo tempo τ , sarà:

$$\alpha = \int_0^{\tau_p} \omega_1(t) dt = \int_0^{\tau_p} \gamma \cdot B_1(t) dt \quad (2.5)$$

che nel caso di impulso rettangolare diventa:

$$\alpha = \omega_1 \cdot \tau_p = \gamma \cdot B_1 \cdot \tau_p \quad (2.6)$$

I casi in cui $\alpha = 90^\circ$ e $\alpha = 180^\circ$ sono più comunemente usati e vengono chiamati rispettivamente impulso a 90° e impulso a 180° .

Quando l'impulso a RF viene rimosso, \vec{M} ritorna nella sua posizione iniziale allineato a B_0 seguendo un processo detto di rilassamento, durante il quale l'energia aggiunta al sistema dall'impulso a RF viene emessa producendo un segnale a RF, detto *Free Induction Decay* (FID, figura 14). Il segnale viene misurato da un'antenna o bobina ricevatrice e opportunamente elaborato da luogo all'immagine.

Il moto che seguono gli *spin* per ritornare allo stato iniziale è caratterizzato da due tipi di rilassamento:

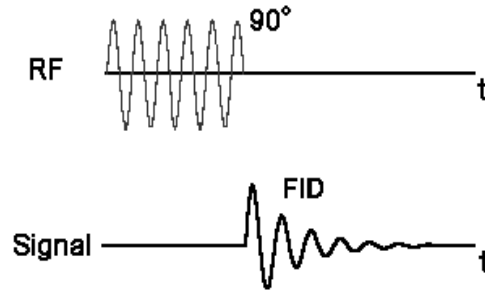


Figura 14: Segnale FID dopo un impulso a RF 90° [Hornak, 2007]

- rilassamento longitudinale, che causa il ripristino della magnetizzazione longitudinale M_z
- rilassamento trasversale, che causa la distruzione della magnetizzazione trasversale M_{xy}

Il rilassamento longitudinale, o rilassamento *spin-lattice*, implica lo scambio di energia tra il sistema di *spin* e l'ambiente circostante; lo stato di equilibrio si raggiunge quando il vettore di magnetizzazione \vec{M} si ritrova con allineato con B_0 lungo l'asse longitudinale e tale processo è caratterizzato da una costante di tempo detta T_1 . Il rilassamento trasversale o rilassamento *spin-spin* è il processo tramite cui viene ristabilito l'equilibrio termico tra gli *spin* ed è caratterizzato dalla costante di tempo T_2 . T_1 e T_2 dipendono dalla composizione, dalla struttura e dall'ambiente in cui si trova l'oggetto, ma in generale T_1 è sempre maggiore di T_2 (spesso si indica una terza costante di tempo $T_2^* < T_2$ tiene conto degli effetti della disomogeneità del campo magnetico B_0). Gli effetti del rilassamento degli *spin* sul contrasto dell'immagine finale dipende dallo schema di eccitazione usato per l'acquisizione dei dati: le differenze delle proprietà fisiche dei differenti tipi di tessuti viene evidenziata da queste costanti di rilassamento (figura 16). Gli effetti dei due tipi di rilassamento sono sintetizzate nelle seguenti formule:

$$\frac{\partial M_{xy}}{\partial t} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \rightarrow M_{xy}(t) = M_{xy}(0) \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \quad (2.7)$$

$$\frac{\partial M_z}{\partial t} = -\frac{M_z - M_z^0}{T_1} \rightarrow M_z(t) = M_z^0(1 - \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)) + M_z(0) \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \quad (2.8)$$

L'andamento di M_z e M_{xy} sarà dunque come indicato in figura 15.

Sequenze di eccitazione

Quando un treno di impulsi RF a 90° viene applicato ad un oggetto si forma uno specifico segnale di NMR: per via dell'impulso a RF il vettore di magnetizzazione complessiva \vec{M} viene portato sul piano trasversale xy dove incomincia a precessare

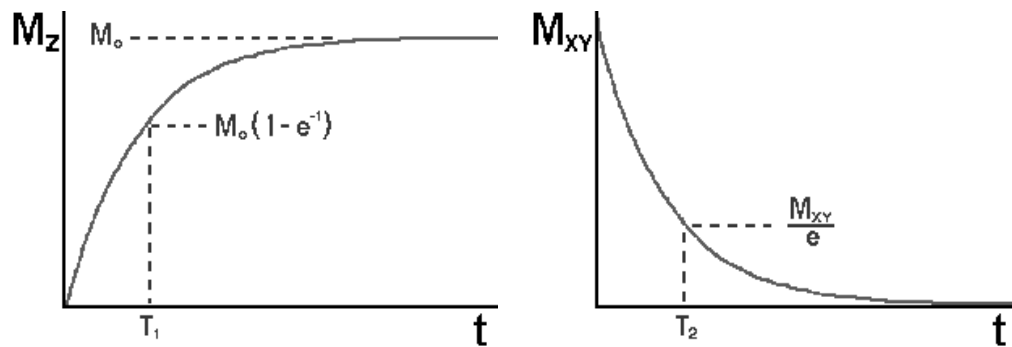
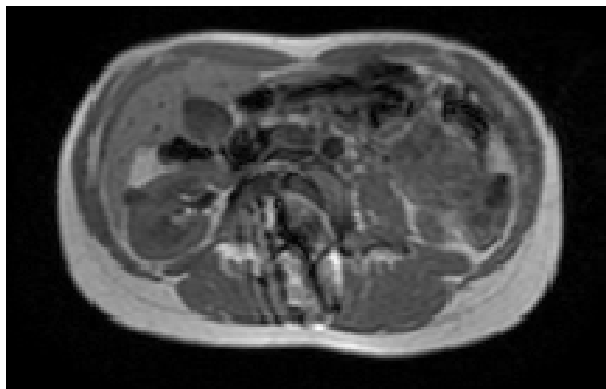
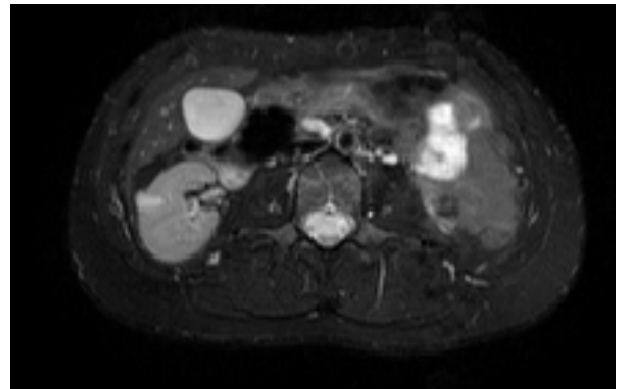


Figura 15: La magnetizzazione longitudinale M_z tende esponenzialmente a tornare al valore iniziale M_z^0 con costante di tempo T_1 , la magnetizzazione trasversale M_{xy} torna al valore iniziale nullo con costante di tempo T_2 [Hornak, 2007].



(a) pesatura T_1



(b) pesatura T_2

Figura 16: Effetti delle differenti pesature T_1 e T_2

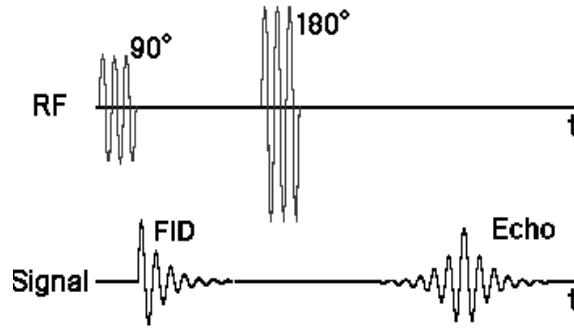


Figura 17: Sequenza di eccitazione *spin-echo* [Hornak, 2007]

intorno all'asse z , mentre la sua ampiezza decade nel tempo (segnale FID). Se la sequenza viene ripetuta, il segnale S risultante dipenderà da T_1 e dal tempo di ripetizione T_R , ovvero dal tempo tra un impulso a RF e il seguente:

$$S = k \cdot \rho \cdot (1 - \exp(-\frac{T_R}{T_1})) \quad (2.9)$$

dove k è una costante di proporzionalità e ρ è la densità di *spin*. Tale sequenza di eccitazione viene detta *Saturation Recovery*.

Un'altra sequenza di eccitazione molto utilizzata è la sequenza detta *Saturation Recovery Spin-Echo*: un impulso a 90° viene inizialmente applicato al sistema di *spin*, il vettore di magnetizzazione viene quindi spostato sul piano trasversale xy e gli *spin* incominciano a sfasarsi. Dopo un certo intervallo di tempo viene applicato un secondo impulso RF a 180° , che ruota il vettore magnetizzazione di 180° intorno all'asse x , causando il rifasamento almeno parziale della magnetizzazione e la generazione di un nuovo segnale detto eco (figura 17).

L'equazione del segnale per una sequenza di *spin-echo* ripetuti è funzione del tempo di ripetizione T_R e il tempo di eco T_E definito come il tempo tra l'impulso a 90° e l'istante in cui si ha il massimo segnale di eco:

$$S = k \cdot \rho \cdot (1 - \exp(-\frac{T_R}{T_1})) \cdot \exp(-\frac{T_E}{T_2}) \quad (2.10)$$

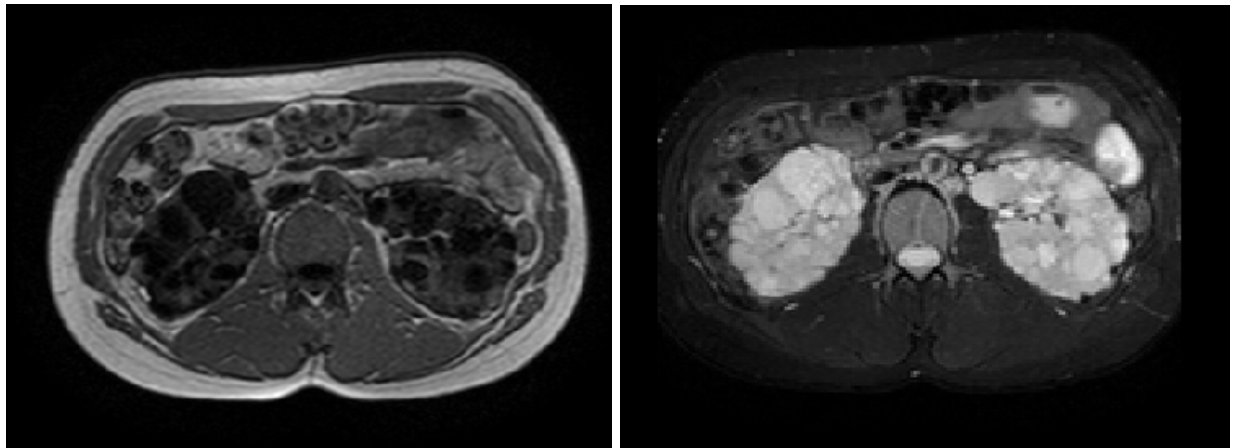
dove sarà $T_R \gg T_E$.

L'espressione di S indica che l'intensità dell'immagine ottenuta con sequenza di acquisizione *saturation-recovery spin-echo* dipende contemporaneamente dai tre fattori: densità di *spin* ρ , tempo di rilassamento T_1 e tempo di rilassamento T_2 . È possibile enfatizzare selettivamente un meccanismo di contrasto scegliendo in modo opportuno i parametri T_R e T_E , scegliendo infatti T_E breve il termine $\exp(-\frac{T_E}{T_2})$ tende a 1 e dunque la pesatura per T_2 può essere ignorata; gli effetti della scelta dei diversi parametri viene sintetizzata nella tabella 1 [Liang and Lauterbur, 1999].

Con un campo esterno applicato di 1.5 T i valori medi di T_2 e T_1 per il rene sono rispettivamente circa 61 ms e 709 ms [Stanisz et al., 2005].

contrasto	T_E	T_R
pesato per T_1	breve ($\ll T_2$)	opportuna ($\leq T_1$)
pesato per T_2	opportuna ($\geq T_2$)	breve ($\gg T_1$)
pesato per densità di <i>spin</i> ρ	breve ($\ll T_2$)	lunga ($\gg T_1$)

Tabella 1: Meccanismi di contrasto pesati per T_1 , T_2 e densità di *spin* ρ a seconda dei valori di T_E e T_R [Liang and Lauterbur, 1999, Hornak, 2007]



(a) pesatura T_1

(b) pesatura T_2

Figura 18: Effetti delle differenti pesature T_1 e T_2 per un paziente ADPKD

Gli effetti delle diverse pesature per T_1 e T_2 sono illustrati nella figura 18, dove viene evidenziato che nel caso di contrasto T_2 in MRI addominale la regione renale appare iperintensa rispetto ai tessuti circostanti, giustificando la scelta delle immagini pesate per T_2 per l'analisi anatomica volumetrica nei pazienti ADPKD considerati. Inoltre, cisti renali semplici appaiono come una massa rotondeggiante ipointensa nelle immagini pesate T_1 e viceversa iperintense nelle immagini pesate T_2 proporzionalmente al contenuto d'acqua [Verswijvel and Oyen, 2004], come osservabile in figura 18. Le immagini T_2 sono inoltre ideali per studiare patologie cistiche, in quanto il fluido all'interno delle cisti genera un segnale con maggiore intensità rispetto al parenchima circostante, permettendo di discriminarle dal tessuto sano circostante [Wallace et al., 2008].

Il segnale proveniente da una certa regione anatomica è la somma dei segnali dei dipoli di tutta la regione.

Formazione dell'immagine e k -spazio

Per formare un'immagine, i dipoli devono essere interpretati in modo spaziale, e questo viene realizzato tramite due *step*:

- eccitare la magnetizzazione nel piano trasversale xy per una regione ben definita nello spazio
- codificare la posizione spaziale del segnale durante l'acquisizione dei dati.

Per le applicazioni medicali, l'immagine deve riflettere dettagli anatomici e fisiologici clinicamente rilevanti; occorre dunque manipolare il contrasto dell'immagine sfruttando appropriati parametri dell'acquisizione dei dati.

Come descritto precedentemente, la frequenza di Larmor dipende dal campo esterno B_0 . Usando un gradiente di polarizzazione G_z linearmente variabile lungo l'asse z , ma costante nel tempo, le frequenze di Larmor dipenderanno dalla posizione degli *spin* lungo z . Grazie a questo effetto, è possibile ottenere una *slice selection* utilizzando B_1 oscillante a diverse frequenze a seconda della *slice* scelta da eccitare. Campi gradienti lineari lungo gli assi x e y , G_x e G_y , vengono dunque applicati per determinare la posizione nel piano trasversale xy . Generalmente G_y viene applicato per primo introducendo uno *shift* di fase del segnale FID dipendente dalla posizione lungo l'asse y ; lo *shift* di fase è dovuto alle differenze in frequenza che varia con la posizione e viene determinato relativamente alla fase introdotta da B_0 , $\gamma \cdot B_0 \cdot \delta$, ed è pari a:

$$\phi = \gamma \cdot \delta \cdot G_y \cdot y \quad (2.11)$$

dove γ è il rapporto giromagnetico, δ è l'intervallo di tempo in cui G_y è applicato e y è la posizione. Quando il campo gradiente viene rimosso, le frequenze ritornano al loro valore iniziale ma lo *shift* di fase tra i nuclei rimane alle diverse posizioni lungo l'asse y . Quando viene applicato il campo G_x cambiano nuovamente in relazione alla loro posizione lungo l'asse x ; tipicamente, durante l'applicazione del campo G_x viene acquisito il segnale (figura 19). Il segnale risultante dopo l'applicazione dei tre campi G_x , G_y e G_z corrisponde alla trasformata di Fourier della magnetizzazione trasversale M_{xy} .

Per evidenziare la relazione di Fourier tra la magnetizzazione e il segnale acquisito viene introdotto un campo di frequenze spaziali, detto spazio-k. Sfruttando diverse combinazioni di gradienti è possibile campionare lo spazio-k; una volta che lo spazio-k è stato campionato l'immagine di RM è ottenuta applicando la trasformata inversa di Fourier.

Su questi principi sono stati sviluppati protocolli di acquisizione che campionassero in modo ottimale lo spazio-k, minimizzando i tempi di acquisizione delle immagini con il fine di risparmiare tempo e risolvere il problema dell'*organ motion* (tipico degli organi addominali) durante l'acquisizione, la quale avviene infatti in *breath-holding* o *triggerando* il respiro del paziente durante l'acquisizione. Una delle tecniche di acquisizione che permettono di ridurre il tempo di *scan* è la "SENSITIVITY ENCODING FOR MRI" (SENSE), in cui la durata dell'acquisizione viene ridotta sottocampionando lo

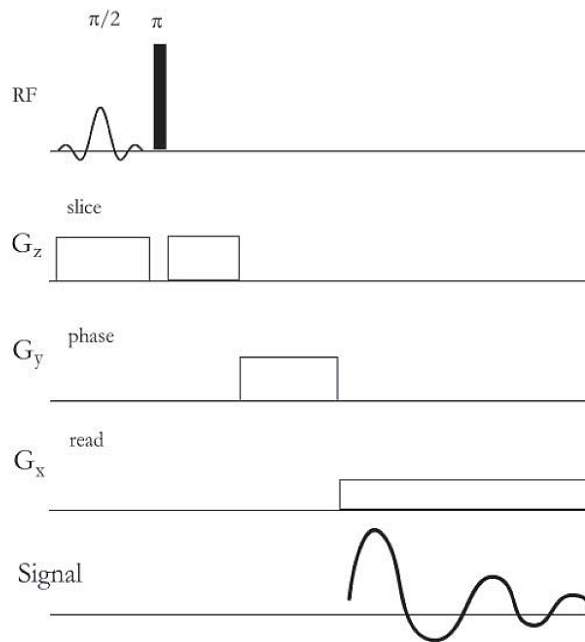


Figura 19: Sequenza di eccitazione selettiva nello spazio

spazio-k e acquisendo immagini simultaneamente da diversi *coils* [Pruessmann et al., 1999]. Il sottocampionamento riduce il tempo necessario all'acquisizione e l'utilizzo di *coils* multipli elimina i problemi di sovrapposizione dovuti al sottocampionamento stesso.

2.1.2 Diffusion Weighted MRI

La Risonanza Magnetica pesata per diffusione combina i principi di *imaging* di e la codifica di diffusione molecolare tramite l'utilizzo di campi gradienti impulsivi bipolari. La diffusione molecolare all'interno di tessuti biologici è un movimento *random* traslazionale risultato dell'energia termica delle singole molecole, e la MRI è attualmente l'unico mezzo per osservare la diffusione *in vivo* in modo non invasivo. In particolare, la diffusione molecolare dell'acqua nei tessuti biologici, dovuto al movimento termico *random*, detto moto Browniano, può essere utilizzata per caratterizzare diversi stati normali o patologici. La maggior parte degli studi di DW-MRI è stata realizzata sul cervello, principalmente per ragioni tecniche: immobilità dei tessuti e caratteristiche di MR favorevoli, ovvero costanti di rilassamento T_1 e T_2 lunghe (materia bianca T_1 circa 79 ms, T_2 circa 778 ms, materia grigia T_1 circa 95 ms, T_2 circa 1086 ms, con campo esterno applicato 1.5T, [Stanisz et al., 2005]). La diffusione è utile per distinguere le differenti componenti dei tumori cerebrali (regioni cistiche, edema, necrosi) dal "cuore" del tumore stesso. Studi più recenti hanno dimostrato che la diffusione nella materia bianca cerebrale è anisotropa, ovvero dipendente dall'orientamento delle fibre nello spazio e dunque *imaging* di diffusione *in vivo* permette di

studiare la microstruttura dei tessuti [Le Bihan et al., 1992].

Grazie all'utilizzo di sequenze di acquisizione ultraveloci, che permettono l'acquisizione di un'immagine in una sola apnea, l'*imaging* pesato per diffusione può essere utilizzato fuori dal CNS per esempio nell'occhio e nel rene. I problemi di applicazione nei distretti addominali sono infatti rappresentati dagli artefatti respiratori e dagli artefatti secondari (artefatti da movimento e da pulsazione cardiaca), che diminuiscono il rapporto segnale/rumore e rendono problematica l'analisi quantitativa. Tali sequenze ultraveloci sono rappresentate dalle sequenze eco-planari (*Echo-Planar Imaging*, EPI), che, grazie a tempi di acquisizione dell'ordine di 30 – 60 ms per immagine, riducono gli artefatti dovuti ai movimenti fisiologici macroscopici [Colagrande et al., 2005, Kreft et al., 1997, Grenier et al., 2003, Muller et al., 1994b]. Il rene, essendo un organo ampiamente perfuso e caratterizzato da trasporto di fluidi, è un organo particolarmente interessante da studiare tramite *imaging* pesato per diffusione.

Principi fisici di diffusione

Il fenomeno di diffusione molecolare all'interno di un mezzo fu descritto per la prima volta da Einstein nel 1905, come un moto *random* traslazionale, detto anche moto Browniano. Anche se è impossibile predire il movimento *random* di una singola particella, è possibile predire in modo statistico il comportamento macroscopico di un grande numero di molecole. La diffusione libera delle molecole in un mezzo privo di ostacoli è isotropa e il coefficiente di diffusione (D) dipende solo dalla massa molecolare, dalla temperatura, e dalla viscosità del mezzo; in presenza di strutture che ostacolano il movimento *random*, la diffusione non può più essere considerata Gaussiana. Dal momento che il segnale di NMR non è mai proveniente da un solo *spin*, ma da un grande numero di *spin*, è possibile ottenere una descrizione macroscopica del comportamento medio delle molecole, possiamo dunque calcolare la probabilità che una particella da una posizione iniziale r si trovi nella posizione r' dopo un dato tempo t :

$$P(\vec{r}', t) = \int \rho(\vec{r}) \cdot P_s(\vec{r}' | r, \vec{t}) \partial r \quad (2.12)$$

dove \vec{r} è il vettore posizione $[x, y, z]'$, $\rho(\vec{r})$ è la densità di particelle nella posizione e $P_s(\vec{r}' | \vec{r}, t)$ è la probabilità di *self-diffusion* (probabilità di diffusione in presenza di gradiente chimico nullo).

Il comportamento macroscopico di diffusione fu modellato da Adolf Fick nel 1855 per mezzo di due equazioni ora note come prima legge di Fick e seconda legge di Fick. La prima legge di Fick descrive la proporzionalità tra il flusso e il gradiente di concentrazione del fluido per mezzo di un coefficiente di diffusione D:

$$J = -D\nabla P_s \quad (2.13)$$

dove J è il flusso e D il coefficiente di diffusione. In un mezzo chiuso il numero di particelle si conserva; questo vincolo viene descritto dall'equazione di continuità che descrive la divergenza di flusso locale proporzionalmente al tasso di cambiamento di concentrazione di particelle in un punto dello spazio, in termini di P_s :

$$\nabla J = -\partial \frac{P_s}{\partial t} \quad (2.14)$$

Combinando la prima legge di Fick (2.13) con quest'ultima equazione (2.14) otteniamo la seconda legge di Fick:

$$\partial \frac{P_s}{\partial t} = D \nabla^2 P_s \quad (2.15)$$

che può essere risolta nel caso di diffusione libera ottenendo la seguente relazione:

$$P_s(\vec{r}'|\vec{r}, t) = \frac{1}{\sqrt{4 \cdot \pi \cdot D \cdot t}} \exp\left(\frac{-(\vec{r}' - \vec{r})^2}{4 \cdot D \cdot t}\right) \quad (2.16)$$

Ovvero, la distribuzione di probabilità della posizione relativa al punto iniziale $\vec{r}' = \vec{r}(t) - \vec{r}$ di un sistema di *spin* dopo un tempo di diffusione t è Gaussiana. Nel caso di diffusione isotropa, le probabilità degli spostamenti sui tre assi sono identiche e indipendenti: $P(x) \sim P(y) \sim P(z) \sim \text{Gauss}(0, 2Dt)$ e la distanza quadratica media percorsa è uguale a $\sqrt{\langle (\vec{r}')^2 \rangle} = \sqrt{(6 \cdot D \cdot t)}$, ovvero è proporzionale alla radice quadrata del tempo di diffusione.

Formazione dell'immagine

Per ottenere un'immagine pesata per diffusione (*diffusion-weighted*) è necessario relazionare il fenomeno di diffusione al segnale di NMR misurato. Nel 1950 Hahn notò che il movimento termico *random* degli *spin* in presenza di un campo magnetico disomogeneo causa un'attenuazione dell'eco degli *spin* [Hahn, 1950]. Per tenere conto degli artefatti causati dalla diffusione Torrey modificò l'equazione di Bloch 2.4, scrivendo una soluzione particolare dell'equazione differenziale della dinamica della magnetizzazione con un termine che tenesse conto della diffusione: tale soluzione particolare viene chiamata equazione di Bloch-Torrey. Il primo esperimento progettato per misurare la diffusione fu proposto nel 1965 da Stejskal e Tanner, oggi noto come *Pulse Gradient Spin Echo* (PGSE), e fornisce una misura quantitativa della diffusione in un campione [Stejskal and Tanner, 1965]. La sequenza di acquisizione PGSE si basa sul fatto che gli *spin* in movimento lungo la direzione di un dato gradiente saranno sottoposti a diversa intensità di campo magnetico e dunque avranno una diversa fase a seconda della loro posizione lungo l'asse del gradiente applicato. Se vengono applicati due impulsi con verso opposto la fase di uno *spin* che non si è mosso tornerà al valore di fase zero iniziale, invece gli *spin* che si sono mossi lungo la direzione del

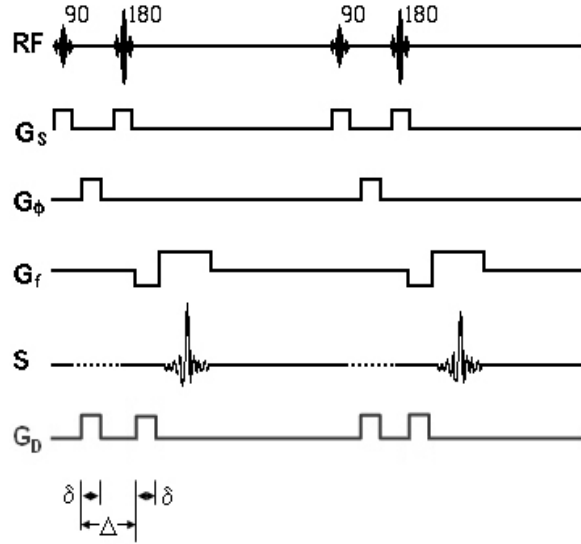


Figura 20: Sequenza di acquisizione PGSE [Hornak, 2007]

gradiente saranno caratterizzati da uno *shift* di fase: $\phi = 2 \cdot \pi \cdot \gamma \int \vec{r} \cdot \vec{G}_r dt$ (lungo la generica direzione di gradiente \vec{r}).

Le molecole che si muovono lungo altre direzioni non saranno sottoposte a nessun cambiamento di intensità di campo magnetico e dunque non saranno caratterizzate da *shift* di fase. Lo *shift* di fase del vettore di magnetizzazione causerà un'attenuazione della magnetizzazione complessiva misurata nel segnale NMR in modo direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione nel caso di diffusione libera.

In figura 20 è schematizzata la sequenza PGSE: il primo gradiente applicato dopo un impulso a RF di 90° introduce uno *shift* di fase $\phi = -\gamma \cdot \delta \cdot \vec{G} \cdot \vec{r}$, dove \vec{G} è il gradiente di diffusione applicato, \vec{r} il vettore posizione iniziale degli *spin* e δ è la durata del gradiente pulsato. Un secondo impulso RF a 180° viene applicato prima del secondo gradiente e porta ad un'inversione dello *shift* di fase: $\phi = \gamma \cdot \delta \cdot \vec{G} \cdot \vec{r}$; dopo un tempo Δ dal primo gradiente impulsivo viene applicato il secondo gradiente pulsato ottenendo lo sfasamento finale:

$$\phi = \gamma \cdot \delta \cdot \vec{G} \cdot \vec{r} - \gamma \cdot \delta \cdot \vec{G} \cdot (\vec{r}' - \vec{r}) = -\gamma \cdot \delta \vec{G} \cdot \vec{r}' \quad (2.17)$$

dove è $(\vec{r}' - \vec{r})$ lo spostamento durante il tempo Δ .

Lo *shift* di fase viene espresso relativamente al campo di magnetizzazione B_0 ; quando l'effetto di entrambi i gradienti è terminato gli *spin* ritornano nella loro posizione iniziale allineandosi a B_0 e un segnale a RF viene emesso. Lo *shift* di fase misurato è proporzionale allo spostamento degli *spin* e mappa la diffusione media all'interno di un *voxel*. Dal momento che la risoluzione dell'esperimento di NMR è millimetrica rispetto alla scala micrometrica della diffusione è ragionevole dal punto di vista biologico assumere che la diffusione tra *voxel* è molto piccola rispetto alla diffusione all'interno di un solo *voxel* e dunque è possibile ignorare gli effetti

inter-voxel. Lo sfasamento è quindi proporzionale allo spostamento di diffusione \vec{r}' e ha la medesima distribuzione statistica: $P(\phi) \sim \text{Gauss}(0, (\gamma \cdot \delta \cdot G)^2 \cdot D(\Delta - \frac{\delta}{3}))$, dove il tempo di diffusione è circa Δ corretto in rapporto alla breve durata del gradiente pulsato $t_D = \Delta - \frac{\delta}{3}$. Si può inoltre osservare che la dispersione delle fasi è legata ai parametri della sequenza in modo indipendente dalla posizione iniziale \vec{r} . In un mezzo non omogeneo, la dipendenza dalla posizione è legata solo al coefficiente di diffusione $D(\vec{r})$ che pertanto può essere mappato. La dispersione delle fasi e quindi l'entità di diffusione viene osservata indirettamente come attenuazione del segnale.

“b-value” e mappe ADC

In immagini di Risonanza pesate per diffusione si usa spesso il valore del termine b per descrivere la sequenza di diffusione che si è usata per l'acquisizione dell'immagine. Il termine b è definito come segue:

$$b = (\gamma \cdot \delta \cdot |\vec{G}|)^2 \cdot (\Delta - \frac{\delta}{3}) [\frac{s}{\text{mm}^2}] \quad (2.18)$$

e dipende dunque dai parametri della sequenza PGSE. Il movimento durante il gradiente pulsato è difficile da rilevare e dunque è desiderabile avere un δ molto breve per avere informazioni più dettagliate sul movimento.

Il segnale risultante sarà dunque attenuato dal termine: $B = \exp(-b \cdot D)$, con D coefficiente di diffusione. Questa attenuazione si sovrappone come coefficiente aggiuntivo alle altre pesature del segnale S ; la sequenza PGSE ha tipicamente una pesatura T_2 , perché il tempo di eco è lungo, essendo necessariamente $T_E > \Delta$:

$$S(t) = S(0) \cdot B \cdot \exp(-\frac{T_E}{T_2}) \quad (2.19)$$

Le pesature differenti possono essere eliminate come rapporto fra segnale e con gradiente $S(b)$ ($b > 0$) e senza gradiente $S(0)$, $B = S(b)/S(0)$, da cui $\ln(\frac{S(b)}{S(0)}) = -b \cdot D$. Da un punto di vista pratico, un'immagine DW può tranquillamente mantenere entrambe le pesature evidenziando quindi su un'immagine anatomica T_2 zone iperintense dove D è diminuito (ad esempio per via di un infarto cerebrale). In caso di diffusione isotropa è facile vedere che la distribuzione di probabilità di ϕ sarà identica per qualsiasi direzione del gradiente e quindi si avrà la medesima attenuazione in tutte le direzioni esplorate. Poiché questo non è vero nei tessuti cerebrali e nel tessuto parenchimale renale, per un'immagine DW occorre perlomeno esplorare le tre direzioni ortogonali mediandole (salvo calcoli più precisi fatti sul tensore, [Denis Le Bihan et al., 2001, Ries et al., 2001]).

Il coefficiente di diffusione D è legato alla mobilità molecolare; utilizzando un approccio statistico, il moto Browniano può essere descritto come una serie di “salti” molecolari. Definiti \bar{l} la lunghezza media di questi salti e \bar{v} la velocità molecolare media, il risultante coefficiente di diffusione può essere descritto come $D = \frac{\bar{l} \cdot \bar{v}}{6}$

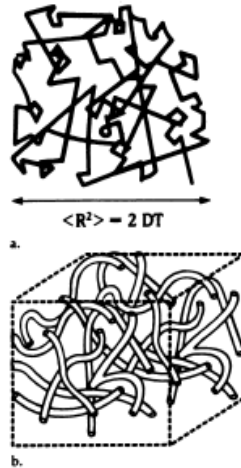


Figura 21: Il movimento traslazionale incoerente in ogni *voxel* delle molecole d'acqua nei tessuti biologici è causato da diffusione e perfusione. a) La diffusione molecolare è causata da moto termico *random*, detto moto Browniano, il coefficiente D caratterizza la mobilità delle molecole, cioè il loro spostamento quadratico medio $\langle R^2 \rangle$ in un dato intervallo di tempo T . Il coefficiente di diffusione dell'acqua pura a 40°C è $2.5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}\cdot\text{m}^2}{\text{s}}$, che corrisponde ad uno spostamento medio di $22\mu\text{m}$ in 100 ms. b) La perfusione è il risultato della microcircolazione sanguigna nella rete di capillari. La perfusione può essere considerata un moto incoerente a causa dell'orientamento pseudorandom dei capillari a livello del voxel [Le Bihan et al., 1988].

[Le Bihan et al., 1988]. Valori tipici di \bar{l} e \bar{v} sono rispettivamente circa 10^{-10} m e diverse centinaia di m/s. L'acqua pura a 40°C ha un coefficiente di diffusione pari a $2.5 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}\cdot\text{m}^2}{\text{s}}$. Nei tessuti biologici, i coefficienti di diffusione sono più bassi, a causa della viscosità e degli effetti minori di diffusione, permettendo la caratterizzazione dei tessuti. Nei tessuti biologici movimenti traslazionali *random* sono dovuti sia alla diffusione di molecole d'acqua sia alla microcircolazione del sangue nella rete di capillari (perfusione); infatti, anche la microcircolazione del sangue o perfusione può essere considerato un moto *random*, per via dell'organizzazione *pseudorandom* delle reti di capillari a livello del singolo *voxel* (figura 21).

Se consideriamo quindi la frazione di diffusione dell'acqua e il flusso nei capillari in un dato *voxel*, il fattore di attenuazione B in presenza di campi gradienti pulsati includerà un termine F che tiene conto della microcircolazione, il cui valore dipenderà dalla geometria dei capillari e dalla velocità del sangue:

$$B = \exp(-b \cdot D) \cdot F \quad (2.20)$$

con F minore o uguale a 1. Il valore di F può essere calcolato su base statistica per via della grande quantità di capillari in un *voxel*; assumendo che la rete di capillari possa essere modellizzata come una rete fatta di segmenti capillari rettilinei, l'espressione di F dipenderà dalla lunghezza media dei segmenti \bar{l} , la velocità media \bar{v} del sangue

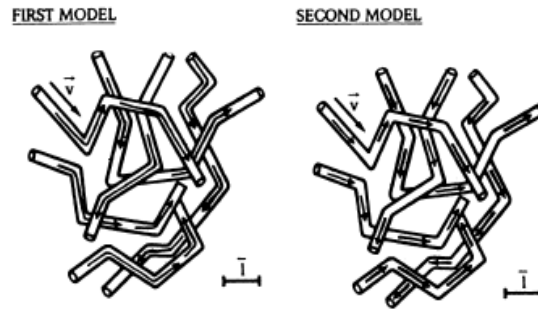


Figura 22: Modelli di perfusione, due casi limite [Le Bihan et al., 1988]

nei capillari e il tempo di misura T (che è approssimativamente pari al tempo di eco T_E).

Si possono distinguere due casi limite (figura 22). Nel primo modello quando il flusso di sangue cambia segmento dei capillari diverse volte nell'intervallo T , il movimento dell'acqua nella rete dei capillari mima il processo di diffusione, come nella "passeggiata aleatoria". L'espressione di F diventa:

$$F = \exp(-b \cdot \bar{D}) \quad (2.21)$$

dove \bar{D} è un coefficiente di pseudodiffusione il cui valore può essere approssimato dall'equazione di B. Valori indicati in letteratura per \bar{l} e \bar{v} sono rispettivamente $57 \mu\text{m}$ e $2.1 \frac{\text{m.m}}{\text{s}}$ nel cervello del gatto [Pavlik et al., 1981]. Possiamo quindi aspettarci un valore di \bar{D} di circa $2.0 \cdot 10^{-2} \frac{\text{m.m}^2}{\text{s}}$, un ordine di grandezza maggiore rispetto al coefficiente di diffusione D dell'acqua misurata nei tessuti biologici. L'attenuazione dell'eco risultante dalla perfusione dovrebbe quindi essere molto maggiore di quella causata dalla diffusione. Il secondo modello descrive la situazione in cui il flusso di sangue è lento, oppure i segmenti capillari sono lunghi, oppure il tempo di misura è più corto in modo che il flusso di sangue non cambi segmento durante il tempo T . In questo caso, ricordando le considerazioni fatte sulla diffusione e sugli *spin* in movimento, lo *shift* di fase medio della magnetizzazione trasversale rimane nullo e dunque non concorre ad un'attenuazione del segnale. Questo secondo modello si verifica quando T è di circa 140 ms.

I diversi effetti di diffusione e perfusione sull'ampiezza del segnale di RM ci permettono di separarli in modo quantitativo. In ogni caso, un tessuto biologico include una frazione di volume f (tipicamente pochi punti percentuali) di acqua che scorre nella rete di capillari, ed una frazione $(1-f)$ di pura diffusione, il segnale ottenuto può quindi essere scritto in modo semplificato:

$$S(T_E) = S(0) \cdot \exp\left(-\frac{T_E}{T_2}\right) \cdot \exp(-b \cdot D) \cdot [(1-f) + f \cdot F] \quad (2.22)$$

Le immagini pesate per diffusione sono ottenute da sequenze *spin-echo* "gemelle" [Le Bihan et al., 1986]. La prima acquisizione è realizzata tramite una sequenza

spin-echo classica in cui gli effetti di movimento degli *spin* sono trascurabili sul segnale risultante S_0 . La seconda sequenza contiene invece gradienti pulsati aggiuntivi che esaltano gli effetti del moto Browniano degli *spin* sul segnale S_1 . Dalle immagini ottenute si può calcolare il valore un parametro detto coefficiente di diffusione apparente (ADC, *Apparent Diffusion Coefficient*) a partire da ogni coppia di immagini corrispondenti S_0 e S_1 , per ogni *voxel* (o per ogni *pixel*), come segue:

$$\text{ADC} = \frac{\log\left(\frac{S_0}{S_1}\right)}{(b_1 - b_0)} \left[\frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \right] \quad (2.23)$$

dove b_1 e b_0 sono i parametri dei gradienti corrispondenti alle sequenze S_0 e S_1 . L'utilizzo del rapporto $\frac{S_0}{S_1}$ permette di eliminare gli effetti del contrasto dovuto alla densità di *spin* e alle costanti di rilassamento T_1 e T_2 , quando gli stessi valore di T_R e T_E sono utilizzati per ottenere S_0 e S_1 .

L'ADC è pari al coefficiente di diffusione D in un *voxel* se la diffusione è l'unico tipo di movimento presente in quel *voxel*; in presenza di microcircolazione l'ADC è maggiore di D , il contributo del fattore di perfusione f sull'ADC può essere calcolato combinando le equazioni 2.22 e 2.23. Si può tuttavia ottenere una semplice espressione sotto le seguenti due ipotesi: gli effetti di diffusione e perfusione nel segnale S_0 (derivante dalla sequenza *standard*) sono tali che $\exp(-b_0 \cdot D) \simeq 1$ e $F_0 \simeq 1$ [Le Bihan et al., 1986]. Perciò il segnale eco è

$$S(T_E)_0 \simeq S(0) \cdot \exp\left(-\frac{T_E}{T_2}\right) \quad (2.24)$$

Come seconda ipotesi, se gli impulsi pulsati nella sequenza S_1 sono lunghi e/o abbastanza intensi tali da soddisfare la relazione $f \cdot F_1 \ll (1 - f)$, allora il contributo delle componenti di flusso può essere trascurato ($F_1 \simeq 0$), mentre il contributo della diffusione attenua il segnale, che risulta:

$$S(T_E)_1 = S(0) \cdot \exp\left(-\frac{T_E}{T_2}\right) \cdot \exp(-b_1 \cdot D) \cdot (1 - f) \quad (2.25)$$

Dalle 2.23, 2.24, 2.25 si ottiene:

$$\text{ADC} = D + \log \frac{1}{(1 - f)} / b_1 \quad (2.26)$$

e dal momento che in molti casi $f \ll 1$, otteniamo infine:

$$\text{ADC} \simeq D + \left(\frac{f}{b_1}\right) \quad (2.27)$$

Abbiamo quindi ottenuto l'espressione che mette in relazione l'ADC sia con la diffusione che con la perfusione. Utilizzando tipici valori di f e b_1 , rispettivamente 5% e $100 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$ [Le Bihan et al., 1986], il contributo relativo del fattore di perfusione f sull'ADC è di circa il 25%; l'ADC dunque si dimostra essere un indice sensibile

alla perfusione. Come mostrato dall'ultima equazione, la sensitività dell'ADC alla perfusione diminuisce quando b_1 aumenta; il valore ottimale di b_1 dovrebbe essere il minimo valore compatibile con la seconda ipotesi (2.25) in modo che il contributo della perfusione sul segnale S_1 sia trascurabile. Infatti, a causa del lungo valore di T_E necessario per la presenza dei gradienti pulsati, l'immagine sarà fortemente dipendente da T_2 e per brevi valori di T_2 il rapporto segnale rumore dell'immagine può essere molto sfavorevole. Per migliorare la risoluzione dell'immagine si può diminuire la costante T_E utilizzando un gradiente pulsato di intensità minore, ricordando che il valore di b dipende dalla terza potenza della durata del gradiente e dalla seconda potenza dell'intensità del gradiente stesso, questo si traduce in una diminuzione del valore di b [Le Bihan et al., 1988].

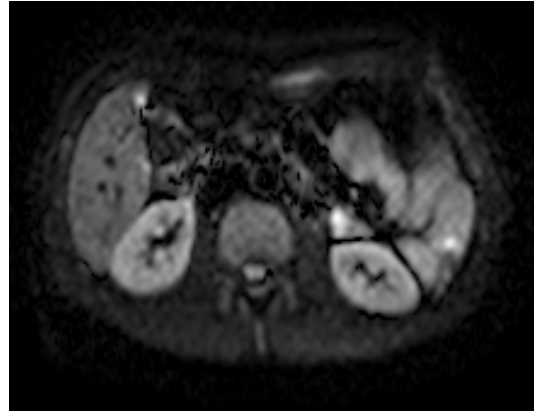
Nelle immagini seguenti sono riportati immagini con diversa pesatura e un esempio di mappa ADC (figura 23 e 24).

Applicazioni cliniche di DW-MRI offrono un grande potenziale in termini di caratterizzazione e analisi funzionale dei tessuti. In particolare nel rene i fattori di trasporto e concentrazione dell'urina potrebbero avere un'influenza importante sui valori dell'ADC nelle diverse regioni dell'organo; inoltre, variazioni di mobilità e di conseguenza variazioni dell'ADC sono tipiche di patologie renali [Namimoto et al., 1999].

L'ADC dei reni presentano valori molto più elevati di quello di altri organi, superando anche il valore ADC dell'acqua a temperatura corporea ($2.25 - 2.51 \cdot 10^{-3} \frac{\text{m}\cdot\text{m}^2}{\text{s}}$, [Muller et al., 1994b]); infatti il contenuto renale d'acqua è circa dell'83%, più elevato di qualsiasi altro organo. L'utilizzo di un modello di moto *random intravoxel* nel rene è reso difficoltoso dalla presenza di filtrazione glomerulare, riassorbimento tubulare e flusso di urina, che causano variabilità di segnale NMR, quando si utilizzano bassi fattori di b . Tuttavia, come spiegato precedentemente, l'utilizzo di valori di b più elevati, a partire da $500 \frac{\text{m}\cdot\text{m}^2}{\text{s}}$ permette di trascurare effetti che non siano di diffusione [Namimoto et al., 1999].



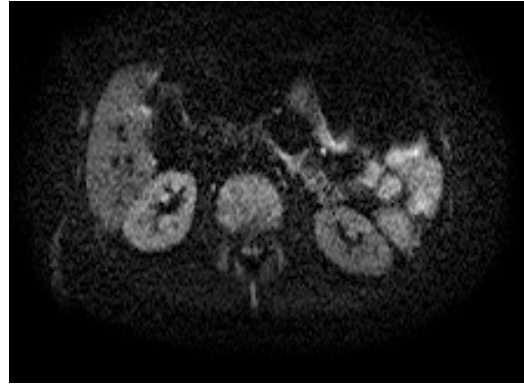
(a) $b = 0 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$



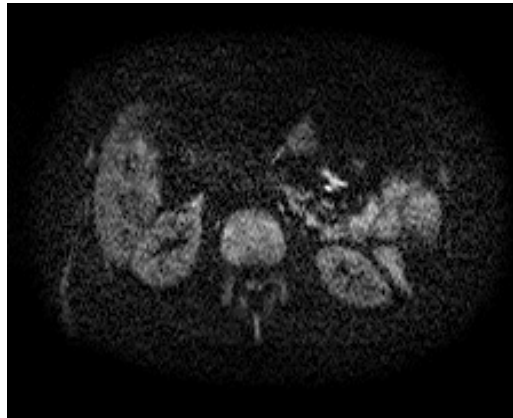
(b) $b = 300 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$



(c) $b = 500 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$

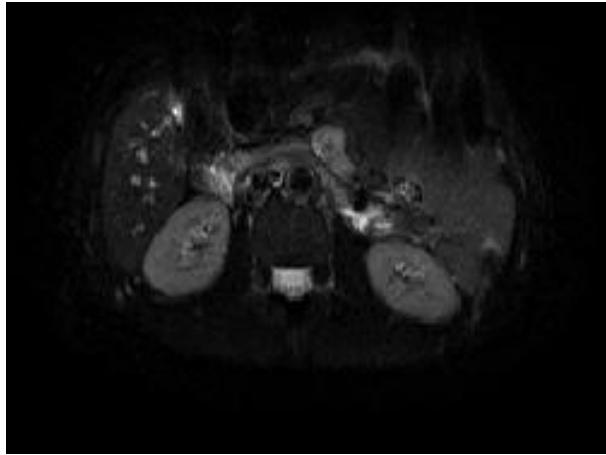


(d) $b = 700 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$



(e) $b = 900 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$

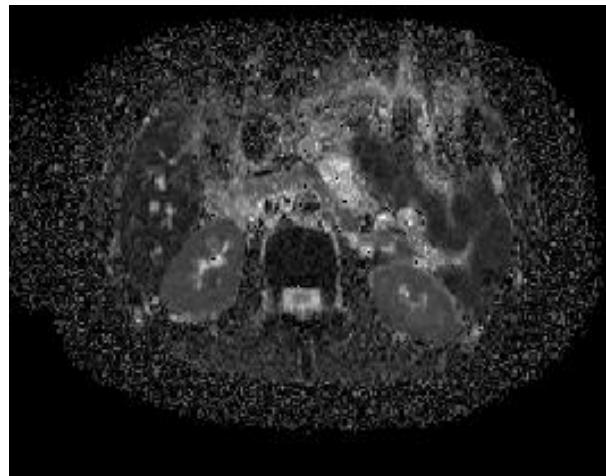
Figura 23: Immagini pesate per diffusione ottenute con differenti valori di b



(a) $b = 0 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$



(b) $b = 500 \frac{\text{s}}{\text{mm}^2}$



(c) ADC

Figura 24: Esempio mappa ADC

MATERIALI

3.1 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è l'elaborazione di immagini di Risonanza Magnetica per estrarre informazioni anatomiche e funzionali su pazienti affetti da Rene Policistico Autosomico Dominante. Come precedentemente descritto, l'ADPKD è un disturbo genetico comune caratterizzato dalla crescita di numerose cisti all'interno dei reni. All'aumentare del numero e delle dimensioni delle cisti il rene diventa sempre più voluminoso e gran parte del tessuto sano parenchimale viene sostituito da tessuto cistico. Il meccanismo tramite il quale l'ADPKD porta a insufficienza renale non è del tutto compreso, ma diversi studi hanno ipotizzato che la crescita di cisti renali causi l'insufficienza renale (ESRF) per compressione del parenchima renale circostante [Grantham, 1997, Torres et al., 2007, Vijay et al., 2010, Pei, 2006]. La dimensione dei reni è stata spesso messa in relazione con la gravità dell'insufficienza renale, associando la dimensioni dei reni alla funzionalità renale; tuttavia, la relazione tra volumetria renale e insufficienza renale di ultimo stadio non è ben definita, perché non sempre ADPKD causa insufficienza renale in pazienti che presentano reni policistici marcatamente allargati [Grantham, 1997, Gabow et al., 1993, Bae et al., 2000, Sise et al., 2000, Antiga et al., 2006, Grantham et al., 2006]. Inoltre, diversi studi supportano l'ipotesi che la dimensione renale possa essere un fattore di rischio per manifestazioni extrarenali come l'ipertensione oltre che per l'insufficienza renale [Gabow et al., 1993, Grantham, 1997, Grantham et al., 2006, Sise et al., 2000].

In questo studio sono state utilizzate immagini di Risonanza T_2 -weighted per valutare il volume renale di pazienti ADPKD. I volumi sono stati calcolati moltiplicando l'area ottenuta per segmentazione dei reni in ogni *slice* per lo spessore tra *slices*. La segmentazione è stata realizzata tramite due tecniche messe a confronto: metodo stereologico e metodo *level set*. Il metodo stereologico è una tecnica di segmentazione, e più in generale elaborazione, manuale, veloce e semplice che si basa sul conteggio del numero di intersezioni di una griglia con dimensione arbitraria caratterizzata da orientamento *random* e sovrapposta alle immagini. Tale metodo è stato ampiamente usato in applicazioni medicali e in questo studio rappresenta il *gold standard* per il valore di volume renale [Hyman et al., 1998, Ladekarl et al., 1996, Keshavan et al., 1995, Bolender, 2005, Roberts et al., 2000]. Il metodo *level set* è un metodo semiautomatico appartenente alla famiglia degli *active contours* che si basa su metodi numerici di risoluzione di equazioni alle derivate parziali (EDP), i cui risultati sono

stati confrontati con quelli ottenuti tramite stereologia. Per verificare la relazione tra volume e funzionalità renale, i volumi così calcolati sono stati correlati con esami biochimici di creatinina sierica e GFR (*Glomerular Filtration Rate*).

Parallelamente allo studio volumetrico sulle immagini T_2 , è stata sviluppata l'analisi su immagini DW e le relative mappe ADC. Il trasporto d'acqua è il fenomeno predominante all'interno dei reni tramite i fenomeni di filtrazione e riassorbimento e ha dunque importanti effetti sulla funzione renale. Diversi studi hanno dimostrato che le caratteristiche di diffusione del rene possono fornire informazioni sulla funzione renale e possono costituire un indice caratteristico di diversi tipi di anormalità renali [Xu et al., 2007, Muller et al., 1994b, Namimoto et al., 1999, Fukuda et al., 2000, Cova et al., 2004]. Come descritto nel capitolo 2, sono state scelte immagini DW ottenute con $b = 500 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}$ per minimizzare la perdita di risoluzione e garantire l'eliminazione del contributo di perfusione nel calcolo del coefficiente di diffusione apparente ADC. Le immagini DW sono state segmentate con un metodo *level set* semiautomatico e i valori ADC delle regioni renali estratte sono stati analizzati per studiarne la relazione con la funzionalità renale.

3.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Tra Aprile e Novembre del 2008 grazie alla collaborazione dell'Ospedale Infermi di Rimini sono state acquisite sequenze di immagini di Risonanza Magnetica di 25 pazienti che presentassero diagnosi pregressa di ADPKD, con età compresa tra 24 e 69 anni, età media 41 ± 10 anni, di cui 11 di sesso maschile. La diagnosi per 23 sui 25 pazienti totali è stata effettuata come da linee guida tramite esami ultrasonografici, applicando il criterio di Ravine (vedi capitolo 2) [Ravine et al., 1994]. I rimanenti due pazienti non hanno superato il criterio di Ravine e la diagnosi è stata realizzata tramite test genetici molecolari.

Le immagini sono state ottenute tramite scanner Philips con intensità di campo magnetico statico di 1.5 T.

Le immagini anatomiche nel piano assiale ottenute con pesatura T_2 presentano le seguenti caratteristiche:

- sequenza di acquisizione: T_2W /SPIR/RT
- sequenza di scansione: SE
- tempo di eco $T_E = 70$ ms
- tempo di ripetizione $T_R = 1200$ ms
- *flip angle* $\alpha = 90^\circ$

- *Field of view* (FOV) = 375 mm × 375 mm per 19 soggetti, 325 mm × 325 mm per un soggetto, 395 mm × 395 mm per tre soggetti e 405 mm × 405 mm per due soggetti
- dimensioni dell'immagine: 256 *pixel* × 256 *pixel*
- *Slice thickness* = 5 mm per 23 soggetti, 6 mm per un soggetto, 7 mm per un soggetto
- *Spacing between slices* = 5.5 mm per 23 soggetti, 6.6 mm per un soggetto, 7.7 mm per un soggetto
- *Pixel Spacing* = 1.46 mm × 1.46 mm per 19 soggetti, 1.27 mm × 1.27 mm per un soggetto, 1.54 mm × 1.54 mm per tre soggetti e 1.58 mm × 1.58 mm per due soggetti

Le immagini ottenute nel piano assiale con pesatura per diffusione presentano le seguenti caratteristiche:

- *b-value* = $500 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}$
- sequenza DWI_B500 SENSE
- sequenza di scansione SE-EPI
- tempo di eco $T_E = 81 \text{ ms}$
- tempo di ripetizione $T_R = 1780 \text{ ms}$
- *flip angle* $\alpha = 90^\circ$
- FOV = 350 mm × 350 mm per 19 soggetti, 370 mm × 370 mm per quattro soggetti e 380 mm × 380 mm per due soggetti
- dimensioni dell'immagine: 256 *pixel* × 256 *pixel*
- *Slice Thickness* = 8 mm
- *Spacing Between Slices* = 9 mm
- *Pixel Spacing* = 1.37 mm × 1.37 mm per 19 soggetti, 1.45 mm × 1.45 mm per quattro soggetti, 1.48 mm × 1.48 mm per due soggetti

Per questi 25 soggetti è stato possibile avere a disposizione valori biochimici di creatinina sierica, CG (stima del GFR tramite il metodo di Cockcroft-Gault) e MDRD (stima del GFR tramite la formula *Modification of Diet in Renal Disease*), che sono illustrate nel prossimo paragrafo.

3.3 STIMA DEL GFR TRAMITE LE FORMULE CG E MDRD

La valutazione rigorosa della funzione renale richiede la misura della velocità di filtrazione glomerulare (VFG o GFR) mediante la determinazione della *clearance* renale di particolari marcatori quali l'inulina e il ¹²⁵I-iotalamato; questo tipo di procedura è complessa, costosa e non proponibile in un contesto clinico routinario. Un'alternativa valida nella pratica quotidiana consiste nella valutazione della clearance della creatinina (CC) ma richiede la determinazione della diuresi nelle 24 ore, operazione relativamente fastidiosa per il paziente e potenziale fonte di errore nella determinazione del volume urinario. Per questo motivo è stato proposto di stimare la VFG mediante equazioni che correggono il valore della creatinemia tenendo conto dei dati antropometrici in modo da compensare l'effetto che una differente massa muscolare può determinare sulla produzione endogena della creatinina. Gli strumenti comunemente adoperati sono la formula di Cockcroft-Gault (CG) e la formula *Modification of Diet in Renal Disease* nella sua versione normale (MDRD) [Wieczorowska-Tobis et al., 2006, Smilde et al., 2006, Bostom et al., 2002, Lin et al., 2003, Stoves et al., 2002].

3.3.1 Formula di Cockcroft-Gault

La formula di Cockcroft-Gault per la stima del GFR al posto della clearance della creatinina deve il suo nome ai due scienziati che per primi la pubblicarono. Nell'uomo la formula di CG è definita dall'equazione:

$$CG(\text{ml}/\text{min}) = \frac{[(140 - \text{età}) \cdot \text{massa}]}{72 \cdot \text{creatinina}} \quad (3.1)$$

dove la massa si intende misurata in kg e la creatinina in mg/dl. Nella donna la formula precedente viene modificata moltiplicando per il termine 0.85:

$$CG(\text{ml}/\text{min}) = \frac{[(140 - \text{età}) \cdot \text{massa}] \cdot 0.85}{72 \cdot \text{creatinina}} \quad (3.2)$$

ovvero un paziente di sesso femminile avrà il 15% in meno di GFR rispetto ad un paziente di sesso maschile, a parità del valore di creatinina sierica.

Si può notare che la formula CG mostra una dipendenza diretta dall'età, per mezzo del termine $(140 - \text{età})$: ovvero, una persona di 20 anni $(140 - 20 = 120)$ presenterà una velocità di filtrazione glomerulare doppia di quella di una persona di 80 anni $(140 - 80 = 60)$ a parità del valore di creatinina sierica.

grado	descrizione	filtrato glomerulare
I	danno renale con funzione normale o aumentata	≥ 90 ml/min
II	danno renale con compromissione funzionale lieve	60 – 89 ml/min
III	danno renale con compromissione funzionale moderata	30 – 59 ml/min
IV	danno renale con compromissione funzionale grave	15 – 29ml/min
V	insufficienza renale di ultimo stadio	< 15ml/min

Tabella 2: Classificazione del danno renale secondo la *National Kidney Foundation* [Levey et al., 2003]

3.3.2 Formula Modification of Diet in Renal Disease

Una stima più accurata del GFR recentemente sviluppata dal *Modification of Diet in Renal Disease Study Group* prevede la seguente stima per la clearance della creatinina:

$$\text{MDRD}(\text{ml}/\text{min}) = 186 \cdot \text{creatinina}^{-1.154} \cdot \text{età}^{-0.203} \quad (3.3)$$

dove la creatinina è misurata in mg/dl, dove rispetto al caso della CG la relazione con l'età è di tipo non lineare. La dipendenza dal sesso e dall'etnia viene espressa come segue:

$$\begin{aligned} \text{MDRD}(\text{ml}/\text{min}) = & 186 \cdot \text{creatinina}^{-1.154} \cdot \text{età}^{-0.203} \cdot \dots \\ & \dots \cdot 0.742 [\text{se donna}] \cdot 1.210 [\text{se di colore}] \end{aligned} \quad (3.4)$$

[Levey et al., 1999].

3.3.3 Range di normalità e criteri di diagnosi

Valori di creatinina sierica vengono considerati normali se appartenenti al *range* 0.7 – 1.2 mg/dl. Pazienti con danno renale derivante da ADPKD presentano a seconda dello stato di avanzamento della patologia valori maggiori o uguali al *range* considerato normale. Vengono considerati valori normali di GFR se la stima tramite CG o MDRD è maggiore di 90 ml/min. In tabella 2 vengono riportati i criteri di classificazione del danno renale secondo la *National Kidney Foundation* in relazione al valore di GFR [Levey et al., 2003].

Diversi studi hanno dimostrato che, sebbene le formule CG e MDRD mostrino una buona concordanza media, a livello del singolo paziente è probabile che le stime che queste formule forniscono differiscano in maniera sostanziale a seconda dello stato di nutrizione e in presenza di livelli normali di creatinina sierica [Lin et al., 2003, Bostom et al., 2002].

Per questo motivo la diagnosi di funzionalità renale nei 25 pazienti considerati è stata definita a partire dai tre valori biochimici di:

1. creatinina sierica,
2. GFR stimato tramite la formula di CG,
3. GFR stimato tramite formula di MDRD.

Un paziente è stato definito in insufficienza renale cronica (IRC) se caratterizzato da almeno due dei tre valori biochimici valutati indicativi di uno stato patologico con compromissione funzionale almeno moderata (GFR < 60 ml/min)

Secondo questo criterio di classificazione, 7 sui 25 soggetti analizzati sono stati classificati in IRC, questi 7 pazienti sono sottoposti a terapia anti-ipertensiva (inibitori ACE). Dei rimanenti 18, due pazienti più un rene (per un totale di 5 reni) sono stati considerati "normali" in quando entrambi gli esami US e MRI hanno mostrato assenza di cisti e il valore di GFR ha mostrato una funzione renale normale o con compromissione lieve (GFR > 60 ml/min). I restanti 15 pazienti più un rene (per un totale di 31 reni) hanno mostrato presenza di tessuto cistico sia per l'esame US che MRI, ma con GFR > 60 ml/min.

Riassumendo, la popolazione totale costituita da 25 pazienti ADPKD è stata suddivisa in tre parti:

- popolazione 1, caratterizzata da assenza di tessuto cistico e funzione renale normale o compromissione lieve (GFR > 60 ml/min)
- popolazione 2, caratterizzata da presenza di tessuto cistico e funzione renale normale o compromissione lieve (GFR > 60 ml/min)
- popolazione 3, caratterizzata da presenza di tessuto cistico e IRC (GFR < 60 ml/min)

Le immagini ADC dei soggetti appartenenti alla sola popolazione 1 sono state utilizzate per il calcolo dei valori di ADC da considerare come appartenenti ad un "range di normalità", come verrà descritto nel capitolo 6.

Parte II

METODI

METODI LEVEL SET

I metodi *level set* si basano su una rappresentazione implicita di curve dinamiche sotto forma di equazioni differenziali parziali (EDP) che guidano l'evoluzione delle curve nel dominio dello spazio e del tempo. Il metodo *level set* fu introdotto per la prima volta da Osher e Sethian [Osher and Sethian, 1988, Sethian et al., 1999] e da allora è diventato un metodo teorico e numerico sempre più popolare nell'ambito di elaborazione di immagini, meccanica dei fluidi, grafica, *computer vision*, etc. Il metodo *level set* è utilizzato principalmente per seguire il movimento di fronti, considerando il fronte in movimento come la curva isolivello zero (*zero level set*) di una funzione di dimensioni superiori, detta funzione *level set*.

Diversi fenomeni fisici possono essere modellizzati come curve che si muovono quando sono sottoposte ad un campo vettoriale di velocità funzione della curvatura del fronte stesso: per esempio la crescita di cristalli, la propagazione di fiamme e onde [Sethian, 1997, Sethian et al., 1999]. Contorni meno ovvi ma ugualmente importanti includono la definizione di oggetti rispetto ad un *background*, il riconoscimento di caratteri scritti a mano e in generale di contorni isointensi all'interno di un'immagine. Esistono inoltre diverse applicazioni non comunemente pensate come problemi di interfacce in movimento che possono invece essere classificate come fronti dinamici come ad esempio la soluzione del problema di pianificazione di percorsi ottimali.

Nell'elaborazione di immagini i metodi *level set* rappresentano un *tool* di segmentazione ampiamente utilizzato; a seconda di come viene definita la velocità che guida il movimento del fronte, si possono caratterizzare all'interno di un'immagine diverse caratteristiche, come *edges*, caratteristiche statistiche di regioni, forme e qualsiasi tipo di dato multidimensionale.

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata una formulazione variazionale del metodo *level set* per segmentare in modo semiautomatico i contorni renali sia nelle immagini anatomiche T_2 -*weighted* che nelle immagini funzionali DW. Nei seguenti paragrafi vengono presentati i principi matematici su cui si basa il metodo *level set* e in particolare la sua applicazione al problema di segmentazione di immagini.

4.1 SNAKES

Nell'elaborazione delle immagini il problema di segmentazione ha lo scopo fondamentale di dividere l'immagine in un numero finito di regioni importanti dal punto di vista semantico. Il primo modello variazionale per la detezione di contorni all'interno

di immagini fu realizzato da Kass e Terzopoulos nel 1988 [Kass et al., 1988].

Per *formulazione variazionale* di un problema fisico stazionario si intende la trasformazione in forma integrale delle equazioni differenziali che lo regolano. Più precisamente, esiste un principio variazionale alla base di un fenomeno fisico quando la soluzione del problema matematico che lo descrive è riconducibile alla ricerca di un funzionale che renda estrema (ovvero minima) un'espressione integrale. Tale funzionale deve appartenere ad una classe di funzioni ammissibili, che soddisfano determinati requisiti di regolarità e determinate condizioni al contorno. Infatti, l'idea di base del modello di Kass è di trovare grandi variazioni di intensità all'interno di un'immagine minimizzando un funzionale di energia.

La principale caratteristica di innovazione nel metodo presentato rispetto ad altre tecniche è che il modello cerca dei contorni caratteristici di un oggetto di interesse all'interno di immagini in modo *attivo*: basandosi sulla minimizzazione di un funzionale di energia il modello è caratterizzato da un comportamento *dinamico*. A causa del modo in cui i contorni "strisciano" mentre si muovono verso la condizione di energia minima, tali contorni attivi furono chiamati *snakes*. Uno *snake* può essere definito come una *spline* a energia minima, guidata da forze vincolanti esterne e influenzata da forze interne che derivano dalle immagini, che lo spingono verso caratteristiche come linee e *edges*. Gli *snakes* sono modelli basati su *active contours*: si fermano vicino ai contorni localizzandoli precisamente.

Il modello di base di uno *snake* è una *spline* su cui vengono imposti vincoli di continuità e che viene influenzata da forze interne che dipendono dall'immagine e da forze vincolanti esterne. Le forze interne hanno lo scopo di garantire vincoli di continuità a tratti; in particolare le forze derivanti dall'immagine spingono lo *snake* verso caratteristiche salienti dell'immagine come linee, *edges* e contorni (teoria di Marr-Hildreth, [Marr and Hildreth, 1980]). Le forze vincolanti esterne portano lo *snake* vicino al minimo locale desiderato.

Il moto degli *snakes* viene descritto tramite una prospettiva *Lagrangiana*: la posizione del fronte $\gamma(t)$ è dato da un vettore posizione $\vec{v}(s)$ funzione del parametro s ; il fronte viene quindi descritto tramite un numero discreto di punti le cui posizioni sono aggiornate secondo un dato set di equazioni di evoluzione. Questi punti discreti che giacciono sul fronte sono aggiornati approssimando le derivate spaziali che compaiono nelle equazioni di moto e modificando ad ogni iterazione la loro posizione.

Due principali svantaggi caratterizzano questa tecnica [Sethian, 1994]:

1. all'aumentare della complessità della curva (o superficie nel caso tridimensionale) l'algoritmo necessita di continua riparametrizzazione
2. quando la topologia della curva dinamica cambia, si va incontro a grandi difficoltà dal punto di vista computazionale.

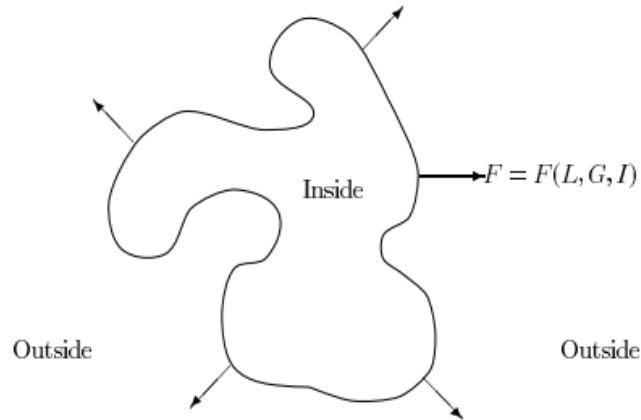


Figura 25: Funzione velocità $F=F(L,G,I)$ [Sethian et al., 1999]

L'utilizzo della formulazione Lagrangiana per il moto dell'interfaccia tramite tecniche numeriche di regolarizzazione appartiene ai metodi chiamati di *front tracking* [Unverdi and Tryggvason, 1992]. La formulazione *level set*, al contrario, offre una soluzione alternativa che supera i limiti delle curve parametrizzate, utilizzando invece *curve implicite*.

4.2 INTRODUZIONE AL METODO LEVEL SET

Consideriamo un contorno, una curva bidimensionale o una superficie in tre dimensioni, che separa una regione da un'altra. Immaginiamo che questa curva (o superficie) si muova in direzione normale (dove la direzione normale è orientata dall'interno verso l'esterno) con una funzione velocità nota F . Lo scopo è guidare il movimento di questa interfaccia mentre evolve. Come verrà spiegato più avanti, bisogna considerare solo il movimento dell'interfaccia nella sua direzione normale, e si possono quindi ignorare i movimenti nelle direzioni tangenziali.

La funzione velocità F può dipendere da diversi fattori e può essere espressa come:

$$F = F(L, G, I) \tag{4.1}$$

dove:

- L indica le proprietà locali, ovvero le proprietà determinate da informazioni geometriche come curvatura e direzione normale
- G indica le proprietà globali del fronte, ovvero quelle che dipendono dalla forma e dalla posizione del fronte.
- I indica le proprietà indipendenti, ovvero quelle che non dipendono dalla forma del fronte (figura 25).

Un aspetto fondamentale nei problemi sui contorni dinamici è la definizione di un modello appropriato per la funzione velocità F . Una volta definita F e nota la posizione iniziale dell'interfaccia, lo scopo dei metodi *level set* è guidare l'evoluzione di tale interfaccia. Il primo obiettivo del metodo è la formulazione del problema di evoluzione in un frame di lavoro Euleriano, caratterizzato cioè da un sistema di riferimento fisso. La formulazione Euleriana si distingue dall'approccio geometrico Lagrangiano caratteristico degli *snakes*, dove il moto della superficie (o ipersuperficie a seconda della dimensione del dominio) è scritta in funzione di uno o più parametri in uno spazio di dimensioni pari alle dimensioni dell'interfaccia in movimento.

4.2.1 Funzioni implicite

In una dimensione spaziale, supponiamo di dividere la linea dei numeri reali in aree distinte tramite i punti $x = -1$ e $x = 1$, cioè definiamo i tre sottodomini di interesse $(-\infty, -1)$, $(-1, 1)$ e $(+1, +\infty)$. Chiamiamo $\Omega^- = (-1, +1)$ la parte interna del dominio e $\Omega^+ = (-\infty, -1) \cup (1, +\infty)$ la parte esterna. I bordi tra la regione interna e esterna sono costituiti da due punti: $\delta\Omega = \{-1, +1\}$ e questa regione viene definita *interfaccia*. In una dimensione spaziale, le regioni interna e esterna sono oggetti unidimensionali, mentre l'interfaccia ha dimensione minore di 1; infatti i punti che costituiscono l'interfaccia sono zero-dimensionali. Più in generale, in \mathbb{R}^n i sottodomini hanno dimensione pari a n , mentre le interfacce hanno dimensione $n-1$ ovvero si dice che l'interfaccia ha *codimensione 1*.

Una rappresentazione esplicita dell'interfaccia consiste nello scrivere esplicitamente i punti che appartengono all'interfaccia come è stato fatto per la definizione $\delta\Omega = \{-1, +1\}$. Alternativamente, una rappresentazione *implicita* definisce l'interfaccia come l'isocontorno (o curva isolivello) di una qualche funzione: per esempio, l'isocontorno zero della funzione $\phi(x) = x^2 - 1$ è l'insieme di punti in cui $\phi(x) = 0$, ovvero esattamente $\delta\Omega = \{-1, +1\}$ (figura 26).

In uno spazio bidimensionale, l'interfaccia è una curva di dimensione minore di due che divide \mathbb{R}^2 in due sottodomini di area diversa da zero; è possibile limitare la trattazione considerando interfacce che siano curve chiuse, in modo che sia possibile definire chiaramente due regioni interna e esterna delimitate dall'interfaccia. Per esempio si consideri la funzione $\phi(\vec{x}) = x^2 + y^2 - 1$, dove l'interfaccia definita dall'isocontorno $\phi(\vec{x}) = 0$ è il cerchio di raggio unitario definito da $\delta\Omega = \{\vec{x} \text{ t.c. } |\vec{x}| = 1\}$; la regione interna sarà quindi $\Omega^- = \{\vec{x} \mid |\vec{x}| < 1\}$ e la regione esterna $\Omega^+ = \{\vec{x} \mid |\vec{x}| > 1\}$ (figura 27).

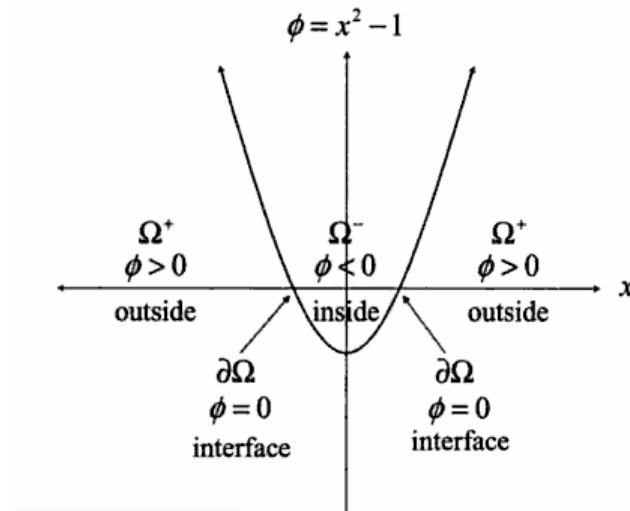


Figura 26: La funzione implicita $\phi(x) = x^2 - 1$ definisce le due regioni Ω^+ , Ω^- e i contorni $\partial\Omega$ [Osher and Fedkiw, 2003]

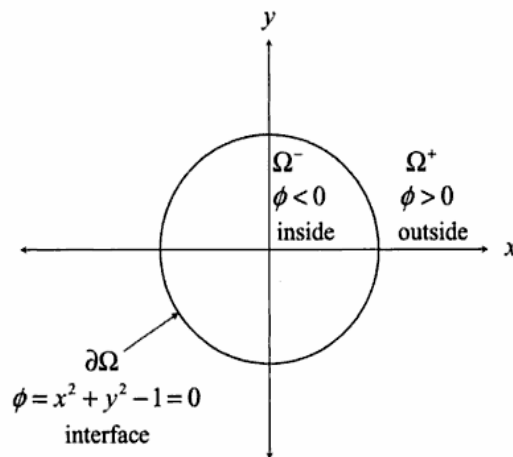


Figura 27: Rappresentazione implicita della curva $x^2 + y^2 = 1$ [Osher and Fedkiw, 2003]

4.2.2 Alcune considerazioni geometriche

La rappresentazione di interfacce implicite comprende strumenti geometrici molto utili. Per esempio, una volta che è stato costruito l'isocontorno $\phi(\vec{x}) = 0$ che descrive l'interfaccia, è possibile determinare a quale regione appartiene un certo punto solo valutando il segno locale di ϕ . Infatti, se \vec{x}_0 è all'interno dell'interfaccia avremo che $\phi(\vec{x}_0) < 0$, fuori dall'interfaccia avremo $\phi(\vec{x}_0) > 0$ e sull'interfaccia $\phi(\vec{x}_0) = 0$. Diversamente tramite una rappresentazione esplicita potrebbe essere difficile valutare la posizione di un punto rispetto all'interfaccia.

Si definisce gradiente di una funzione implicita:

$$\nabla\phi = \left(\frac{\delta\phi}{\delta x}, \frac{\delta\phi}{\delta y} \right) \quad (4.2)$$

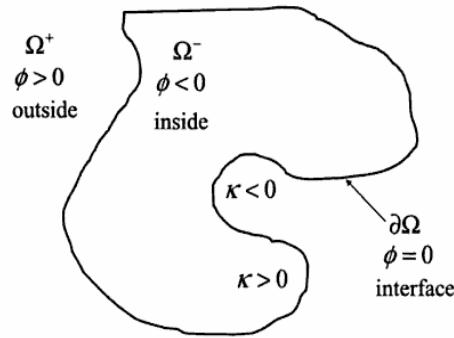


Figura 28: Regioni convesse hanno $K > 0$, regioni concave hanno $K < 0$ [Osher and Fedkiw, 2003]

$\nabla\phi$ è il vettore perpendicolare agli iso-contorni di ϕ in direzione della crescita di ϕ . Perciò, se \vec{x}_0 è un punto della curva isolivello zero di ϕ , cioè è un punto sull'interfaccia, allora $\nabla\phi$ valutato in \vec{x}_0 è un vettore diretto come il versore \vec{n} normale all'interfaccia; il versore normale sarà quindi definito da:

$$\vec{n} = \frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|} \quad (4.3)$$

per i punti che giacciono sull'interfaccia.

La curvatura media dell'interfaccia è definita come la divergenza del versore normale $\vec{n} = (n_1, n_2)$:

$$K = \nabla \cdot \vec{n} = \frac{\partial n_1}{\partial x} + \frac{\partial n_2}{\partial y} \quad (4.4)$$

$K > 0$ se la regione è convessa, mentre $K < 0$ se la regione è concava infine $K = 0$ in regioni piatte (figura 28). Sostituendo la 4.3 nella 4.4 si può scrivere la curvatura come:

$$K = \nabla \cdot \left(\frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|} \right) = \frac{\phi_{xx}\phi_y^2 - 2\phi_x\phi_y\phi_{xy} + \phi_{yy}\phi_x^2}{(\phi_x^2 + \phi_y^2)^{3/2}} \quad (4.5)$$

funzione della derivata prima e seconda di ϕ .

4.2.3 Funzioni distanza

Nella formulazione Euleriana del problema *level set* viene utilizzato il concetto di funzione distanza $d(\vec{x})$, definita come segue:

$$d(\vec{x}) = \min(|\vec{x} - \vec{x}_I|), \quad \forall \vec{x}_I \in \delta\Omega \quad (4.6)$$

e $d(\vec{x}) = 0$ sul contorno, ovvero dove $\vec{x} \in \delta\Omega$.

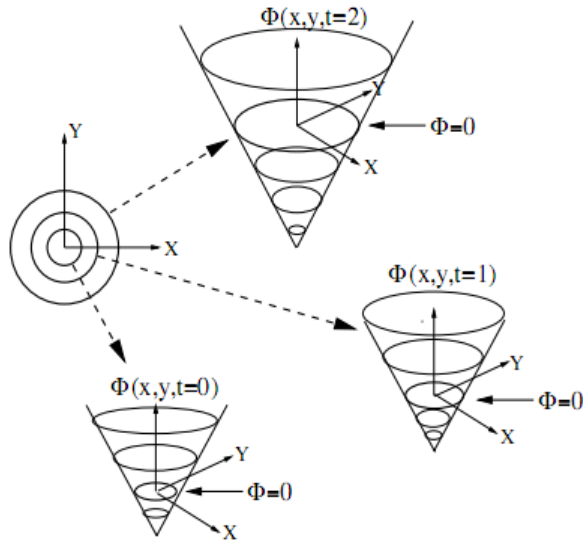


Figura 29: Trasformazione del problema di moto del fronte in un problema ai valori iniziali [Sethian et al., 1999]

Una funzione distanza dotata di segno è una funzione implicita ϕ con $|\phi(\vec{x})| = d(\vec{x}) \forall \vec{x}$:

$$\phi(\vec{x}) = \begin{cases} -d(\vec{x}), & \forall \vec{x} \in \Omega^- \\ 0 & \forall \vec{x} \in \delta\Omega \\ +d(\vec{x}) & \forall \vec{x} \in \Omega^+ \end{cases} \quad (4.7)$$

4.3 UN PROBLEMA AI VALORI INIZIALI

Supponiamo che il fronte si muova con una velocità F che non sia né strettamente positiva, né negativa: il fronte si può muovere verso l'interno e verso l'esterno e può passare per il generico punto (x,y) diverse volte. L'idea fondamentale dei metodi *level set* consiste nel considerare la posizione iniziale del fronte come la curva di livello zero (curva isolivello con valore nullo) di una funzione di una dimensione superiore ϕ . È possibile quindi legare l'evoluzione di questa funzione ϕ all'evoluzione del fronte di propagazione attraverso un problema ai valori iniziali tempo dipendente: in qualsiasi istante, il fronte è dato dalla curva di livello zero (*zero level set*) della funzione *level set* tempo dipendente ϕ (figura 29).

Per poter ottenere un'equazione di moto per questa funzione *level set* ϕ e fare in modo che la funzione di livello zero di ϕ coincida con il fronte, è necessario innanzitutto imporre che il valore *level set* di una parte di questo fronte con percorso $\vec{x}(t)$ sia sempre uguale a zero, cioè

$$\phi(\vec{x}(t), t) = 0 \quad (4.8)$$

Derivando si ottiene:

$$\phi_t + \nabla\phi(\vec{x}(t), t) \cdot \frac{\partial\vec{x}(t)}{\partial t} = 0 \quad (4.9)$$

Dal momento che F è la velocità in direzione normale esterna rispetto al fronte in evoluzione, allora

$$\frac{\partial\vec{x}(t)}{\partial t} \cdot \vec{n} = F, \quad (4.10)$$

dove

$$\vec{n} = \frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|} \quad (4.11)$$

è il versore che indica la direzione del gradiente di ϕ . Si ottiene quindi l'equazione di moto per ϕ :

$$\begin{aligned} \phi_t + F \cdot |\nabla\phi| &= 0 \\ \text{nota } \phi(\vec{x}, t=0) & \end{aligned} \quad (4.12)$$

dove $\phi(\vec{x}, t=0) = \pm d(x)$ è la funzione distanza definita nel paragrafo 4.2.3.

La 4.12 è l'equazione *level set* proposta da Osher e Sethian nel 1988 [Osher and Sethian, 1988]. Per alcune forme della funzione di velocità F si ottiene un'equazione standard di Hamilton-Jacobi. L'equazione 4.12 descrive l'evoluzione nel tempo della funzione *level set* ϕ in modo che il *level set* zero di questa funzione sia sempre identificato con l'interfaccia in movimento (figura 29). Come già detto, questa formulazione è di tipo Euleriano, perché il sistema di coordinate rimane fisso.

Possiamo quindi riassumere la formulazione del problema: sia Γ una curva nel piano che si propaga secondo la sua direzione normale con velocità F tale che $\Gamma(t)$ descriva la posizione del fronte al tempo t ; vogliamo allora risolvere il seguente problema alle derivate parziali ai valori iniziali:

$$\left\{ \begin{array}{l} \phi_t + F \cdot |\nabla\phi| = 0 \\ \text{fronte} = \Gamma(t) = \{(x, y) \mid \phi(x, y, t) = 0\} \\ F \text{ arbitraria} \end{array} \right. \quad (4.13)$$

Si distinguono diversi vantaggi associati alla formulazione del problema a *level set*:

- rispetto alla formulazione Lagrangiana su cui si basano gli *snakes*, evita problemi di instabilità numerica tipici delle tecniche di approssimazione basate su approccio parametrico,
- la formulazione non cambia all'aumentare delle dimensioni del problema (ad esempio per ipersuperfici che si propagano in spazi tridimensionali),

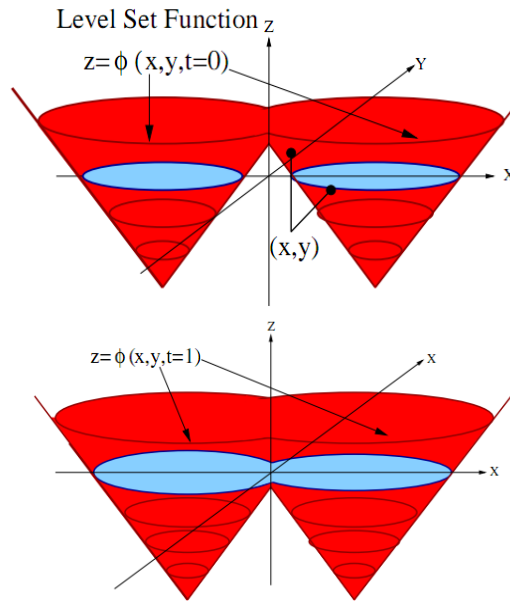


Figura 30: Cambiamenti topologici [Sethian, 1997]

- cambiamenti topologici nel fronte in evoluzione Γ sono gestiti in modo naturale: la posizione del fronte al tempo t è dato dalla curva isolivello $\phi(x, y, t) = 0$ della funzione di evoluzione *single-valued* ϕ . Nella prima immagine della figura 30 la funzione *level set* ϕ separa due fronti iniziali, nella seconda immagine viene mostrata la situazione al tempo $t = 1$: la topologia dell'interfaccia è cambiata mostrando una solo fronte per lo zero *level set*,
- si basa sulla soluzione di viscosità delle equazioni alle derivate parziali per garantire l'unicità della soluzione debole¹ che soddisfa la condizione di entropia. Dal momento che l'equazione di evoluzione ammette soluzioni non-differenziabili (cioè, ammette punti singolari nel fronte di propagazione), bisogna scegliere in modo opportuno un gradiente che produca uno schema conservativo che soddisfi la condizione di entropia,
- il problema alle derivate parziali può essere accuratamente approssimato da schemi computazionali che sfruttano tecniche derivanti dalle soluzioni numeriche di leggi di conservazioni iperbolica, approssimando in modo opportuno le derivate nello spazio e nel tempo campionando il dominio (x, y) su una griglia opportuna. Ad esempio, usando una *mesh* con spaziatura uniforme h , utilizzando la notazione (i, j) per i nodi della griglia e indicando con ϕ_{ij}^n l'approssimazione

¹ Una soluzione viene definita "soluzione debole" di un'equazione differenziale se soddisfa la formulazione integrale dell'equazione. Il vantaggio di questa formulazione è che non richiede lo stesso livello di differenziabilità di una soluzione potenziale e perciò permette di descrivere soluzioni più generali. Ad esempio si consideri la funzione delle onde nel caso unidimensionale $u_t = u_x$. Una soluzione per questa equazione deve essere differenziabile sia in x che in t . Tuttavia, se integriamo entrambi i membri dell'equazione rispetto a x sull'intervallo $[a, b]$, otteniamo $\frac{d}{dt} \int u dx = u(b) - u(a)$ che non richiede la differenziabilità nello spazio.

della soluzione $\phi(ih, jh, n\Delta t)$, dove Δt è l'intervallo di tempo si può scrivere:

$$\frac{\phi_{ij}^{n+1} - \phi_{ij}^n}{\Delta t} + F|\nabla_{ij}\phi_{ij}^n| = 0 \quad (4.14)$$

dove è stata utilizzando la formula delle differenze finite in avanti per l'approssimazione della derivata temporale,

- proprietà intrinseche geometriche del fronte possono essere facilmente formulate; in ogni punto il versore normale è dato da:

$$\vec{n} = \frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|} \quad (4.15)$$

e la curvatura del fronte in ogni punto è facilmente ottenibile dalla divergenza del versore normale al fronte, cioè:

$$k = \nabla \cdot \frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|} = \frac{\phi_{xx}\phi_y^2 - 2\phi_x\phi_y\phi_{xy} + \phi_{yy}\phi_x^2}{(\phi_x^2 + \phi_y^2)^{3/2}} \quad (4.16)$$

4.3.1 Moto per curvatura

Consideriamo il caso in cui il campo di velocità F dipende direttamente dalla funzione *level set* ϕ . In particolare consideriamo il moto detto per curvatura media in cui l'interfaccia si muove in direzione normale con velocità proporzionale alla sua curvatura (data dall'equazione 4.4), cioè $F = -b \cdot K \cdot \vec{n}$, dove $b > 0$ è una costante, K è la curvatura e \vec{n} è il versore normale. Se $b > 0$, l'interfaccia si muove nella direzione della concavità, cioè un cerchio in due dimensioni si ridurrebbe fino a collassare in un punto e a scomparire; se invece fosse $b < 0$, l'interfaccia si muoverebbe in direzione della convessità, in questo caso un cerchio tenderebbe ad espandersi. Quindi l'effetto di $b < 0$ porta alla crescita di piccole perturbazioni sul fronte tendendo ad amplificare agli errori di arrotondamento: il caso $b < 0$ è mal condizionato e viene sempre imposto $b > 0$. Questo giustifica la scrittura generale con cui si indica il moto per curvatura media: $F(K) = -K$. In figura 31 è rappresentato il moto di una spirale per effetto della curvatura: le estremità della spirale sono caratterizzate da curvatura molto più elevata e dunque si muovono più velocemente rispetto alla parte allungata della spirale caratterizzata da curvatura minore.

In figura 32 viene mostrato l'evoluzione di un'interfaccia a forma di stella per mezzo di un campo vettoriale di velocità proporzionale alla curvatura: le punte della stella si muovono verso l'interno mentre le zone tra una punta e l'altra si muovono verso l'esterno.

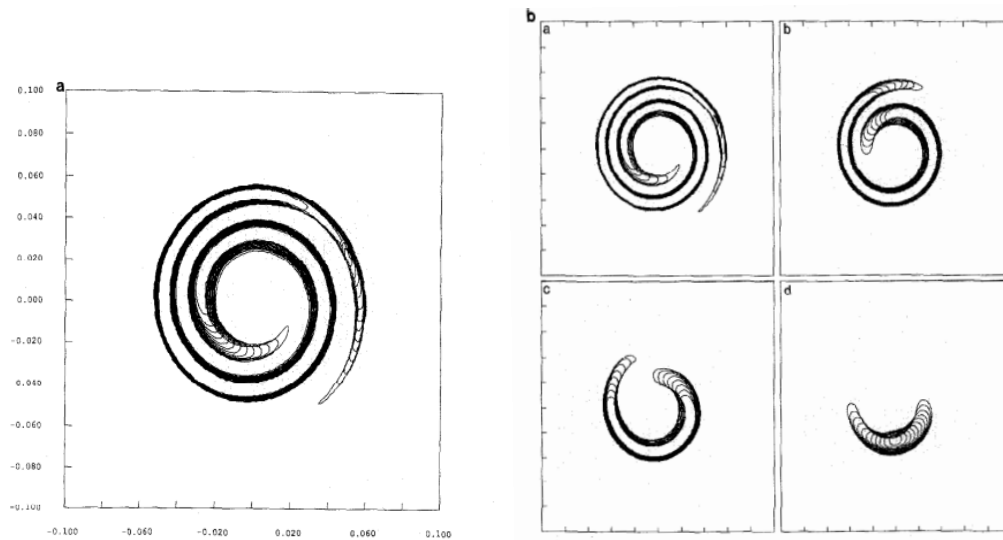


Figura 31: Moto per curvatura di un oggetto con forma a spirale [Osher and Sethian, 1988]

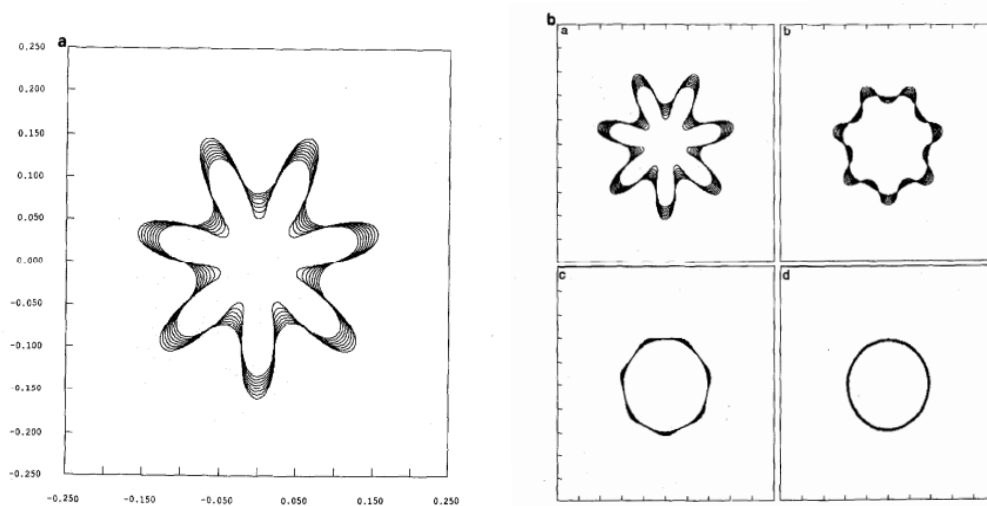


Figura 32: Moto per curvatura di un oggetto con forma a stella [Osher and Sethian, 1988]

Il campo vettoriale di velocità nel moto per curvatura consiste solo di una componente normale, essendo la componente tangenziale identicamente nulla. In generale quindi non occorre specificare componenti tangenziali quando si progetta un campo di velocità. Infatti, dal momento che \vec{n} e $\nabla\phi$ puntano nella stessa direzione, $\vec{t} \cdot \nabla\phi = 0$ per qualsiasi vettore tangente \vec{t} , ovvero le componenti di velocità tangenziale scompaiono nelle equazioni *level set* 4.13.

4.4 APPLICAZIONE ALL'ELABORAZIONE DI IMMAGINI

L'applicazione dei metodi *level set* al problema della segmentazione di immagini è stata introdotta da [Malladi et al.](#) nel 1995 e si basa su un'equazione alle derivate parziali che descrive il moto di un fronte iniziale guidato da un campo vettoriale di velocità F funzione della curvatura del fronte iniziale stesso e da un termine di trasporto [[Malladi and Sethian, 1995](#), [Malladi et al., 1995](#)]. L'applicazione dei metodi *level set* alla segmentazione di immagini deriva dall'approccio basato sugli *snakes*/contorni attivi per *shape recovery* formulato da Kass e descritto nel paragrafo 4.1.

Per isolare un oggetto dal suo *background*, si considera come prima cosa una curva iniziale chiusa e non intersecante che si trova all'interno o all'esterno dell'oggetto di interesse stesso. Questa curva è quindi fatta muovere secondo il suo campo gradiente con una velocità $F = F(K)$, dove K è la curvatura dell'interfaccia stessa. La segmentazione di oggetti la cui forma non è nota a priori è possibile grazie ad un termine di velocità che dipende dai dati dell'immagine e che rappresenta il *criterio di arresto* dell'evoluzione del fronte. Data la funzione $F(K)$ vogliamo aggiornare la posizione del fronte; definiamo quindi $F(K)$ come la somma di due termini:

$$F(K) = F_A + F_G(K) \quad (4.17)$$

Il termine costante F_A di avvezione è indipendente dalla geometria del fronte in movimento; il fronte si espande uniformemente o si contrae con velocità F_A a seconda del suo segno ed è analogo ad una forza di inflazione (definita da [[Cohen, 1991](#)]). Il secondo termine $F_G(K)$ dipende dalla geometria del fronte, in particolare dalla sua curvatura locale; rappresenta un termine di diffusione che regolarizza le regioni del fronte con elevata curvatura ed ha lo stesso effetto di regolarizzazione di un termine di energia di deformazione interna di un modello di membrana basato su *splines* [[Kass et al., 1988](#)]. Possiamo quindi riscrivere l'equazione *level set* dividendo il contributo dei due termini costituenti la F :

$$\phi_t + F_A \cdot |\nabla\phi| + F_B(K) \cdot |\nabla\phi| = 0 \quad (4.18)$$

Consideriamo per primo il caso in cui il fronte si muova con velocità costante: $F_B(K) = 0 \Rightarrow F = F_A$. Definiamo una velocità negativa F_l :

$$F_l(x, y) = \frac{-F_A}{(M_1 - M_2)} \{ |\nabla G_\sigma * I(x, y)| - M_2 \} \quad (4.19)$$

dove M_1 e M_2 sono i valori massimo e minimo rispettivamente del modulo del gradiente dell'immagine $|\nabla G_\sigma * I(x, y)|$, $(x, y) \in \Omega$. L'espressione $G_\sigma * I$ indica la convoluzione dell'immagine con un filtro passa basso Gaussiano con ampiezza σ .

$$G_\sigma(x, y) = \frac{1}{\sigma\sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{|(x, y)|}{\sigma^2}\right) \quad (4.20)$$

Il valore di F_l è compreso nell'intervallo $[-F_A, 0]$ perché il valore del gradiente dell'immagine è compreso tra M_1 e M_2 . Segue quindi che se $|\nabla G_\sigma * I(x, y)|$ raggiunge il valore massimo M_1 in corrispondenza dei contorni degli oggetti e la velocità si avvicina allo zero mano mano che il fronte si avvicina ai contorni fino a che non si ferma.

Se $F_G \neq 0$ non è possibile trovare un termine additivo a partire dall'immagine in modo che la velocità netta del fronte si avvicini allo zero nell'intorno della forma desiderata. Infatti, si moltiplica la funzione velocità $F = F_A + F_G(K)$ con una quantità g definita come:

$$g(x, y) = \frac{1}{1 + |\nabla G_\sigma * I(x, y)|} \quad (4.21)$$

che ha valori vicini allo zero nelle regioni in cui l'immagine ha un gradiente elevato e valori vicini all'unità nelle regioni che hanno intensità relativa costante, questa funzione g viene quindi chiamata *edge-indicator*. Se si desidera una funzione velocità che vada a zero in modo più veloce rispetto alla funzione reciproca si può alternativamente utilizzare la seguente definizione:

$$g(x, y) = \exp(-|\nabla G_\sigma * I(x, y)|) \quad (4.22)$$

Il termine di velocità F_G dipendente dalle caratteristiche dell'immagine ha significato solo sul contorno $\Gamma(t)$ ovvero sul *level set* zero $\{\phi(x, y, t) = 0\}$. Questo è conseguenza del fatto che i termini di velocità sono progettati per guidare il propagarsi del *level set* $\{\phi = 0\}$ fino a fermarsi completamente nell'intorno dei contorni dell'oggetto. Tuttavia, l'equazione di moto *level set* è scritta per la funzione ϕ definita per l'intero dominio. Di conseguenza, è necessario imporre che l'equazione di evoluzione abbia significato fisico consistente per tutti i *level sets*, cioè per ogni punto $(x, y) \in \Omega$. La funzione di velocità F_l deriva non dalla geometria di ϕ ma dalla configurazione del *level set* $\{\phi = 0\}$ nel piano dell'immagine. Perciò, occorre costruire una funzione velocità \hat{F}_l che sia globalmente definita. Definiamo questa funzione come un'estensione di F_l fuori dal *level set* zero $\{\phi = 0\}$ perché estende il significato di F_l agli altri isocontorni [Sethian and Straint, 1992]. Si noti che il *level set* zero $\{\phi = 0\}$ giace nel piano dell'immagine e

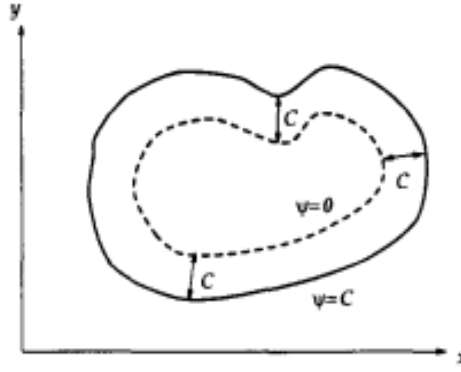


Figura 33: Curva isolivello $\{\phi = C\}$ a distanza C dal *level set* zero $\{\phi = 0\}$, principio di costruzione di Huygens [Malladi et al., 1995]

dunque \hat{F}_l dovrà essere uguale a F_l in $\{\phi = 0\}$ e analogamente per l'*edge-indicator* g . L'equazione di moto per $F = F_A$ è data da

$$\phi_t + (F_A + \hat{F}_l)|\nabla\phi| = 0 \quad (4.23)$$

e

$$\phi_t + \hat{g}_l(F_A + F_G)|\nabla\phi| = 0 \quad (4.24)$$

con $F = F_A + F_G$.

Se le curve isolivello si muovono con velocità costante, cioè $F_G = 0$ per ogni tempo t , una tipica funzione *level set* $\{\phi = C\}$, $C \in \mathbb{R}$ corrisponde alla distanza C dal *level set* zero $\{\phi = 0\}$ (figura 33). Quanto appena detto è una riformulazione del principio di Huygens che, da un punto di vista geometrico, definisce che la posizione di un fronte che si propaga con velocità unitaria ad un dato tempo t dovrebbe essere formato solo dai punti che si trovano a distanza t dal fronte iniziale [Malladi and Sethian, 1996, 1995, Malladi et al.]. Però quando $F_G \neq 0$ le curve isolivello non rimangono a distanza costante, esistono quindi diversi modi di estendere la funzione velocità nei *level set* vicini.

Nel caso più generale viene richiesto che il termine esterno della funzione di velocità (basato sull'immagine) sia tale che i *level set* che si muovono sotto l'azione di questa funzione velocità non collidano.

Su questa estensione è possibile costruire una funzione velocità *image-based* imponendo che il valore $\hat{F}_l(\hat{g}_l)$ al punto P appartenente al *level set* $\{\phi = C\}$ sia il valore di $\hat{F}_l(\hat{g}_l)$ al punto Q , tale che Q sia il punto più vicino a P e giaccia nel *level set* $\{\phi = 0\}$, perciò $\hat{F}_l(\hat{g}_l)$ si riduce a $F_l(g_l)$ su $\{\phi = 0\}$ (figura 34). Aggiornando la funzione *level set* su una griglia, possiamo muovere i *level set* senza costruirli esplicitamente.

L'algoritmo generico che consiste nell'avanzamento diretto per ogni iterazione temporale consiste dei seguenti passi:

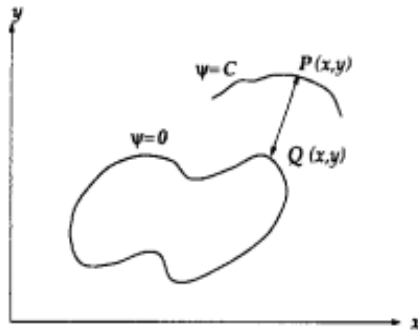


Figura 34: Estensione del termine di velocità *image-based* agli altri *level sets* [Malladi et al., 1995]

1. In ogni punto della griglia $(i\Delta x, j\Delta y)$ dove Δx e Δy sono le dimensioni della griglia nelle due dimensioni, si calcola l'estensione del termine di velocità in entrambe le coordinate spaziali. Questo è realizzato secondo quanto descritto precedentemente, ovvero cercando un punto q che si trovi nel *level set* zero $\{\phi = 0\}$ e che sia il più vicino al punto $(i\Delta x, j\Delta y)$. Il valore del termine di velocità *image-based* nel punto corrente è semplicemente il suo valore al punto q .
2. Con il valore del termine esteso di velocità (\hat{k}_i^n) e $\phi_{i,j}^n$, si calcola $\phi_{i,j}^{n+1}$ usando schemi alle differenze finite *upwind* [Sethian and Straint, 1992].
3. Si costruisce un'approssimazione del *level set* zero $\{\phi = 0\}$ a partire da $\phi_{i,j}^{n+1}$, questo è necessario per visualizzare la posizione corretta del fronte nel piano dell'immagine. Un'approssimazione lineare a tratti del fronte $\gamma(t)$ è costruita come segue: data una cella $C(i, j)$, se

$$\max(\phi_{i,j}, \phi_{i+1,j}, \phi_{i,j+1}, \phi_{i+1,j+1}) < 0$$

oppure

$$\min(\phi_{i,j}, \phi_{i+1,j}, \phi_{i,j+1}, \phi_{i+1,j+1}) > 0$$

allora $C(i, j)$ non appartiene a $\Gamma(t)$ e dunque viene ignorato, altrimenti il primo e l'ultimo punto in cui $\phi = 0$ vengono trovati per interpolazione lineare. Questo fornisce due nodi su $\Gamma(t)$ e dunque uno dei segmenti lineari che costituiscono l'approssimazione di $\Gamma(t)$. L'insieme di tutti questi segmenti costituiscono l'approssimazione del *level set* zero $\{\phi = 0\}$, che viene utilizzato per l'evoluzione successiva del termine di velocità *image-based* nell'equazione aggiornata.

4. $n = n+1$ e si ritorna al punto 1.

Questa costruzione può creare estensioni di velocità discontinue lontano dal *level set* zero, dal momento che la funzione distanza non è differenziabile. Una soluzione è

quella di reinizializzare la funzione *level set* dopo un certo numero fissato di iterazioni Δt per mantenere i *level set* spazati in modo corretto nell'intorno del fronte. Tuttavia, questa è un'operazione che richiede un numero di operazioni $\mathcal{O}(n^3)$ dove n sono i punti in ogni coordinata spaziale oltre a circa $\mathcal{O}(n)$ operazioni sull'interfaccia.

Si distinguono diversi vantaggi nell'utilizzo di un approccio *level set* per la segmentazione di immagini:

- il fronte iniziale può essere costituito da diversi fronti; grazie alle capacità topologiche del metodo *level set*; questi fronti potranno unirsi in un fronte unico durante l'evoluzione nella formazione di una particolare forma di interesse,
- il fronte può seguire torsioni e forme complesse dei contorni desiderati,
- la tecnica può essere usata per estrarre forme tridimensionali in modo analogo,
- regioni caratterizzate da rumore isolato, dove il gradiente presenta ampie variazioni vengono sostanzialmente ignorate: il fronte si propaga intorno a questi punti, li racchiude ed infine scompare.

4.5 FORMULAZIONE VARIAZIONALE SENZA RE-INIZIALIZZAZIONE

L'algoritmo utilizzato per la segmentazione delle immagini di risonanza anatomiche e funzionali si basa su una formulazione variazionale dei metodi *level set* che forza la funzione *level set* ad essere simile ad una funzione distanza eliminando la procedura di re-inizializzazione; questo algoritmo è stato proposto da Gui e Fox nel 2005 ed è implementato in ambiente Matlab® [Gui and Fox, 2005].

La seguente formulazione variazionale è caratterizzata da due termini di energia:

- un termine di energia interna che penalizza la deviazione della funzione *level set* da una funzione distanza
- un termine di energia esterna che guida il moto del *level set* zero verso le caratteristiche desiderate di un'immagine, ad esempio verso i contorni di un oggetto di interesse

La formulazione variazionale proposta ha tre principali vantaggi rispetto alla formulazione *level set* standard:

1. è possibile utilizzare un intervallo di tempo più lungo per la risoluzione numerica delle equazioni alle derivate parziali, dunque aumenta la velocità dell'evoluzione della curva
2. la funzione *level set* può essere inizializzata con una funzione generale più efficiente da costruire e più facile da gestire nella pratica rispetto alla funzione distanza che viene solitamente utilizzata

3. l'evoluzione della funzione *level set* può essere facilmente implementata con uno schema alle differenze finite semplice e computazionalmente più efficiente

I primi modelli geometrici di *active contours* si basano su una formulazione Lagrangiana che porta ad una certa evoluzione EDP di una curva parametrica come illustrato nella sezione 4.1 [Caselles et al., 1993, 1997, Malladi and Sethian, 1995]. Nei metodi *level set* questa EDP è convertita in un'equazione alle derivate parziali di evoluzione per una funzione *level set* tramite una formulazione Euleriana.

Nell'alternativa utilizzata, l'EDP che descrive l'evoluzione della funzione *level set* viene direttamente ricavata da un problema di minimizzazione di un certo funzionale di energia definito a livello della funzione *level set* stessa, questo approccio è noto con il nome metodo *level set* variazionale [Chan and Vese, 2001, Vemuri and Chen, 2003, Zhao et al., 1996].

Ricordando l'equazione 4.13, la formulazione *level set* di fronti in movimento (o contorni attivi), indicati dalla lettera Γ , sono rappresentati dallo zero *level set* $\Gamma(t) = \{(x, y) | \phi(x, y, t) = 0\}$, della funzione *level set* $\phi(x, y, t)$ la cui equazione generale viene scritta nella forma:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + F \cdot |\nabla \phi| = 0 \quad (4.25)$$

dove F è la funzione velocità, che nella segmentazione di immagini dipende dalla funzione *level set* ϕ e dai dati dell'immagine stessa.

Nei metodi *level set* standard la funzione ϕ durante l'evoluzione può sviluppare forme che variano rapidamente o valli piatte, che può rendere l'elaborazione successiva altamente inaccurata. Per evitare questi problemi, un algoritmo numerico comune consiste nell'inizializzare la funzione ϕ come una funzione distanza e quindi "riformulare" o "reinizializzare" periodicamente ϕ in modo che mantenga le caratteristiche della funzione distanza durante l'evoluzione. Infatti, il processo di reinizializzazione è un punto cruciale e non può essere evitato utilizzando i metodi *level set* tradizionali [Sethian et al., 1999, Caselles et al., 1993, 1997, Malladi et al., 1995]. La formulazione variazionale forza la funzione *level set* ad essere simile ad una funzione distanza e dunque elimina completamente la necessità e il costo computazionale della procedura di re-inizializzazione. A questo scopo viene formulato un funzionale variazionale di energia costituito da un termine di energia interna e un termine di energia esterna; il primo termine penalizza la deviazione della funzione *level set* dalla funzione distanza, mentre il secondo guida il moto del *level set* zero verso le caratteristiche desiderate delle immagini, come nel nostro caso i contorni di un oggetto. L'evoluzione risultante della funzione *level set* è il flusso gradiente che minimizza il funzionale energia complessivo; per la presenza del termine di energia interno la funzione *level set* diventa un'approssimazione della funzione distanza durante l'evoluzione della curva stessa, in questo modo la procedura di reinizializzazione viene completamente eliminata.

4.5.1 Reinizializzazione

La reinizializzazione è ampiamente usata per garantire la stabilità dell'algoritmo nei metodi *level set* tradizionali. Il metodo di reinizializzazione standard consiste nella risoluzione della seguente equazione di reinizializzazione:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = \text{sign}(\phi_0) \cdot (1 - |\nabla \phi|) \quad (4.26)$$

dove ϕ_0 è la funzione da reinizializzare e $\text{sign}(\phi)$ è la funzione segno. In letteratura vengono riportati diversi metodi di reinizializzazione, e la maggior parte di questi sono varianti del metodo riportato nella 4.26 basato sulle EDP [Peng et al., 1999, Sussman and Fatemi, 1999]. Tuttavia, se ϕ_0 non è smooth oppure è troppo ripida da una parte dell'interfaccia rispetto ad un'altra il *level set* zero della funzione risultante ϕ si muove in modo scorretto rispetto alla funzione originale [Sethian et al., 1999, Peng et al., 1999, Osher and Fedkiw, 2003]. Inoltre, quando la funzione *level set* è molto lontana dalla funzione distanza, questi metodi possono non essere in grado di effettuare l'operazione di re-inizializzazione; in pratica la funzione mentre evolve può deviare in modo significativo rispetto al valore desiderato in pochi passi dell'iterazione se non si sceglie un intervallo di tempo sufficientemente piccolo.

Fino ad ora, la reinizializzazione è stata ampiamente usata come rimedio numerico per mantenere stabile l'evoluzione della curva e garantire i risultati desiderati. Da un punto di vista pratico, il processo di reinizializzazione può essere complicato e pesante in termini di costo computazionale. Inoltre, nei metodi *level set* si presentano anche altre problematiche che riguardano quando e come reinizializzare la funzione *level set* imponendo che sia uguale alla funzione distanza [Gomes and Faugeras, 1999].

La formulazione variazionale proposta da Gui e Fox elimina la necessità di reinizializzazione e può essere implementata tramite un semplice schema alle differenze finite [Gui and Fox, 2005].

4.5.2 Formulazione variazionale generale con termine penalizzante di energia

Come discusso precedentemente, è cruciale mantenere l'evoluzione della funzione *level set* nella forma di una funzione distanza, in particolare in un intorno dello zero *level set*. È ben noto che una funzione distanza dovrebbe soddisfare la proprietà $|\nabla \phi| = 1$ e viceversa qualsiasi funzione ϕ che soddisfi $|\nabla \phi| = 1$ è uguale alla funzione distanza a meno di una costante [Arnold and Levi, 1988]. Si definisce quindi una metrica che caratterizzi quanto la funzione ϕ è vicina ad una funzione distanza in $\Omega \in \mathbb{R}^2$:

$$P(\phi) = \int_{\Omega} \frac{1}{2} \cdot (|\nabla \phi| - 1)^2 dx dy \quad (4.27)$$

che svolge un ruolo fondamentale nella formulazione variazionale *level set*.

Avendo definito il funzionale $P(\phi)$, si propone la seguente formulazione variazionale:

$$E(\phi) = \mu P(\phi) + E_m(\phi) \quad (4.28)$$

dove $\mu > 0$ è un parametro che controlla l'effetto penalizzante della differenza di ϕ da una funzione distanza e $E_m(\phi)$ è un valore di energia che guida il moto della curva di livello zero di ϕ . $E(\phi)$ è dunque il funzionale totale di energia, il flusso gradiente che minimizza tale funzionale E è dato dalla seguente equazione di evoluzione:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = -\frac{\partial E}{\partial \phi} \quad (4.29)$$

dove compare la derivata prima del funzionale E . Se E può essere espresso esplicitamente in funzione di ϕ , la sua derivata prima può essere calcolata e espressa in funzione di ϕ e delle sue derivate [Evans, 2009].

Dal momento che lo scopo della formulazione variazionale 4.28 è l'applicazione nella segmentazione di immagini tramite *active contours*, vogliamo che la minimizzazione del funzionale porti l'evoluzione della curva di livello zero di ϕ verso le caratteristiche desiderate nell'immagine. A questo scopo bisogna imporre che il termine di energia E_m sia dipendente dai dati dell'immagine e possiamo quindi definirlo "termine di *energia esterna*", e con ragionamento analogo definiamo $P(\phi)$ "termine di *energia interna*", dal momento che è funzione della sola ϕ .

Durante l'evoluzione di ϕ per effetto del flusso gradiente definito nella 4.29 che minimizza il funzionale (equazione 4.28), la curva di livello zero si muoverà per effetto dell'energia esterna E_m . Intanto, a causa dell'effetto di penalizzazione dell'energia interna, la funzione ϕ sarà automaticamente mantenuta come una appropriata funzione distanza durante l'evoluzione secondo l'equazione 4.29. In questa formulazione la procedura di reinizializzazione viene quindi completamente eliminata.

4.5.3 Formulazione variazionale level set di contorni attivi senza re-inizializzazione

Nella segmentazione di immagini, i contorni attivi (*active contours*) sono curve dinamiche che si muovono verso i contorni degli oggetti. Per raggiungere questo scopo, definiamo esplicitamente un termine di energia esterna che guidi il movimento della funzione zero *level set* verso i contorni dell'oggetto desiderato. Sia I l'immagine e g la funzione indicatore di edges, definita da:

$$g = \frac{1}{1 + |\nabla G_\sigma * I|^2} \quad (4.30)$$

dove G_σ è un *kernel* Gaussiano con deviazione standard σ . Definiamo quindi l'energia esterna per la funzione $\phi(x,y)$ come segue

$$E_{g,\lambda,\nu}(\phi) = \lambda L_g(\phi) + \nu A_g(\phi) \quad (4.31)$$

dove $\lambda > 0$ e ν sono costanti e i termini $L_g(\phi)$ e $A_g(\phi)$ sono dati da

$$L_g(\phi) = \int_{\Omega} g \cdot \delta(\phi) \cdot |\nabla\phi| \cdot dx dy \quad (4.32)$$

e

$$A_g(\phi) = \int_{\Omega} g \cdot H(-\phi) \cdot dx dy \quad (4.33)$$

dove δ e H sono rispettivamente la funzione di Dirac e la funzione di Heaviside.

Definiamo quindi il seguente funzionale totale di energia:

$$E(\phi) = \mu P(\phi) + E_{g,\lambda,\nu}(\phi) \quad (4.34)$$

L'energia esterna $E_{g,\lambda,\nu}$ guida il *level set* zero verso i contorni dell'oggetto, mentre il termine di energia interna $\mu P(\phi)$ penalizza la differenza di ϕ rispetto alla funzione distanza durante l'evoluzione.

Per comprendere il significato geometrico dell'energia $L_g(\phi)$, possiamo supporre che il *level set* zero di ϕ possa essere rappresentato da una curva parametrica differenziabile $C(p)$, $p \in [0, 1]$. $L_g(\phi)$ nell'equazione 4.32 computa la lunghezza della curva di livello zero di ϕ nella metrica conforme $ds = g(C(p))|C'(p)|dp$, mentre il funzionale energia $A_g(\phi)$ nell'equazione 4.33 viene introdotto per aumentare la velocità di evoluzione delle curva [Vemuri and Chen, 2003]. Si noti che quando la funzione g ha valore costante pari a 1, il funzionale di energia nella 4.32 corrisponde all'area della regione $\Omega_{\phi}^- = \{(x, y) | \phi(x, y) < 0\}$ e dunque A_g può essere interpretato come l'area pesata di Ω_{ϕ}^- [Osher and Fedkiw, 2003].

Il coefficiente ν di A_g può essere sia positivo che negativo a seconda della posizione relativa del contorno iniziale dell'oggetto di interesse; per esempio, se i contorni iniziali sono posti all'esterno dell'oggetto il coefficiente ν del termine dell'area pesata dovrebbe assumere valore positivo in modo che i contorni si possano contrarre più velocemente. Viceversa se invece i contorni iniziali sono posti all'interno dell'oggetto di interesse, il coefficiente ν deve avere valore negativo per rendere più veloce l'espansione dei contorni.

La derivata prima del funzionale E può quindi essere espressa come:

$$\frac{\partial E}{\partial \phi} = -\mu[\Delta\phi - \operatorname{div}\left(\frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|}\right)] - \lambda \cdot \delta(\phi) \cdot \operatorname{div}\left(g\frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|}\right) - \nu \cdot g \cdot \delta(\phi) \quad (4.35)$$

dove Δ è l'operatore Laplaciano. Perciò, la funzione ϕ che minimizza questo funzionale soddisfa l'equazione di Eulero-Lagrange $\frac{\partial E}{\partial \phi} = 0$. Il processo di discesa più ripida per la minimizzazione del funzionale E è il seguente flusso gradiente:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = -\frac{\partial E}{\partial \phi} = \mu[\Delta\phi - \operatorname{div}\left(\frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|}\right)] + \lambda \cdot \delta(\phi) \cdot \operatorname{div}\left(g\frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|}\right) + \nu \cdot g \cdot \delta(\phi) \quad (4.36)$$

Questo flusso gradiente rappresenta l'equazione di evoluzione della funzione *level set* nel metodo utilizzato. Il secondo e il terzo termine della 4.36 corrispondono ai

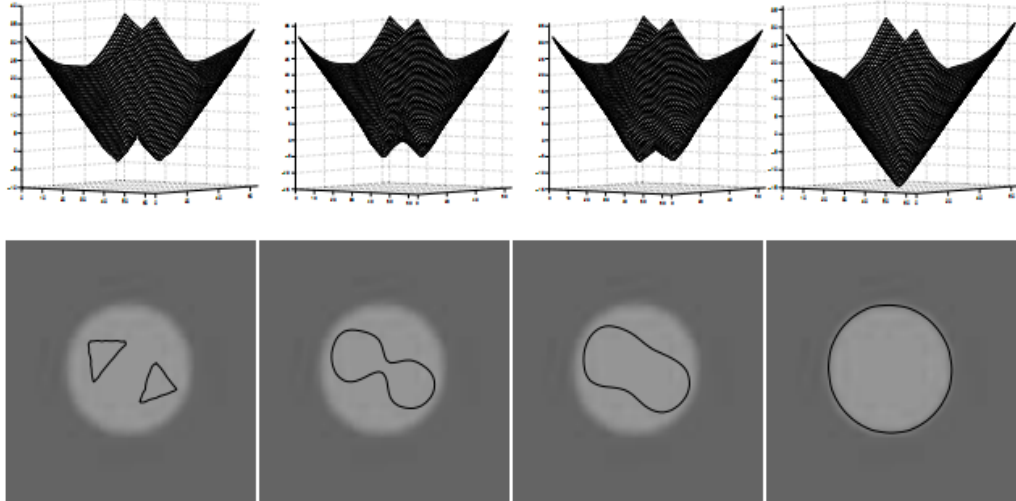


Figura 35: Evoluzione della funzione *level set* ϕ . Riga 1: evoluzione di ϕ . Riga 2: evoluzione della curva isolivello zero corrispondente alla ϕ in riga 1 [Gui and Fox, 2005].

flussi gradiente dei funzionali di energia rispettivamente $\gamma \cdot L_g(\phi)$ e $\nu \cdot A_g(\phi)$ e il loro effetto è quello di guidare la curva di livello zero verso i contorni dell'immagine. Per spiegare l'effetto del primo termine, che è associato all'energia interna $\mu \cdot P(\phi)$ si può notare che il flusso gradiente:

$$\Delta\phi - \operatorname{div}\left(\frac{\nabla\phi}{|\nabla\phi|}\right) = \operatorname{div}\left[\left(1 - \frac{1}{|\nabla\phi|}\right)\nabla\phi\right]$$

presenta un termine di diffusione nella forma $\left(1 - \frac{1}{|\nabla\phi|}\right)$. Se $|\nabla\phi| > 1$ il tasso di diffusione è positivo e l'effetto di questo termine è la classica diffusione, cioè rende ϕ più uniforme e riduce il gradiente $|\nabla\phi|$, invece se $|\nabla\phi| < 1$ il termine ha effetto di invertire la diffusione e quindi aumenta il gradiente.

Se consideriamo un'immagine di un oggetto circolare, come mostrato in figura 35, si può osservare l'evoluzione di ϕ secondo l'equazione 4.36: nella prima figura della prima riga viene rappresentata la funzione *level set* iniziale e la corrispondente curva di livello zero viene rappresentata nella prima figura della seconda riga. La prima riga mostra l'evoluzione della funzione *level set* ϕ , mentre la seconda riga mostra le corrispondenti curve di livello zero. La quarta colonna rappresenta il risultato a cui converge l'evoluzione; da questa figura si può notare che durante l'evoluzione la funzione ϕ viene mantenuta molto simile ad una funzione distanza.

4.5.4 Implementazione

Schema numerico

La funzione di Dirac nell'equazione 4.36 viene resa leggermente più *smooth* e viene definita da:

$$\delta_\epsilon(x) = \begin{cases} 0, & |x| > \epsilon \\ \frac{1}{2\epsilon}[1 + \cos(\frac{\pi x}{\epsilon})], & |x| \leq \epsilon \end{cases} \quad (4.37)$$

con ϵ fisso e pari a 1.5. Per la presenza del termine di diffusione introdotto dal termine di energia penalizzante, non c'è bisogno di aggiornare lo schema come nei metodi *level set* tradizionali [Sethian et al., 1999]. Inoltre, tutte le derivate spaziali $\frac{\partial \phi}{\partial x}$ e $\frac{\partial \phi}{\partial y}$ vengono approssimate da una differenza centrata, e la derivata temporale parziale $\frac{\partial \phi}{\partial t}$ viene approssimata da una differenza in avanti.

L'approssimazione delle derivate spaziali con approssimazione alle differenze finite centrate sarà quindi:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \phi}{\partial x} &\approx \frac{\phi_{i+1} - \phi_{i-1}}{2\Delta x} \\ \frac{\partial \phi}{\partial y} &\approx \frac{\phi_{i+1} - \phi_{i-1}}{2\Delta y} \end{aligned} \quad (4.38)$$

e l'approssimazione della derivata temporale:

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} \approx \frac{\phi_{i,j}^{k+1} - \phi_{i,j}^k}{\Delta t} \quad (4.39)$$

L'approssimazione della 4.36 può essere semplicemente scritto come:

$$\frac{\phi_{i,j}^{k+1} - \phi_{i,j}^k}{\tau} = L(\phi_{i,j}^k) \quad (4.40)$$

dove $L(\phi_{i,j}^k)$ è l'approssimazione numerica del termine a destra dell'uguale nell'equazione 4.36 e dove l'intervallo di tempo Δt è stato chiamato τ . L'equazione 4.40 si traduce quindi nell'algoritmo iterativo:

$$\phi_{i,j}^{k+1} = \phi_{i,j}^k + \tau L(\phi_{i,j}^k) \quad (4.41)$$

Scelta dell'intervallo di tempo

Il tempo τ può essere scelto significativamente più lungo rispetto ai metodi *level set* standard. Gui e Fox hanno indicato che affinché le iterazioni della 4.41 sia stabile l'intervallo di tempo τ il coefficiente μ debbano soddisfare la condizione:

$$\tau \cdot \mu < \frac{1}{4} \quad (4.42)$$

per garantire la stabilità dell'evoluzione *level set* [Gui and Fox, 2005].

Usando un intervallo di tempo maggiore si può velocizzare l'evoluzione, ma si potrebbero causare errori nella localizzazione dei contorni, occorre scegliere un compromesso tra la scelta dell'intervallo di tempo e l'accuratezza di localizzazione dei contorni, tipicamente si consiglia di usare $\tau \leq 10.0$ per la maggior parte delle immagini.

Inizializzazione della funzione level set

Nei metodi *level set* tradizionali è necessario inizializzare la funzione *level set* ϕ come una funzione distanza ϕ_0 . Se la funzione *level set* iniziale è significativamente diversa da una funzione distanza allora gli schemi di reinizializzazione non funzionano correttamente. In questa formulazione, viene completamente eliminata la procedura di reinizializzazione e inoltre non occorre inizializzare la funzione ϕ a funzione distanza alla prima iterazione.

Sia quindi Ω_0 un sottoinsieme del dominio dell'immagine Ω e $\delta\Omega_0$ tutti i punti del contorno di Ω_0 , i quali possono essere efficientemente identificati da alcune semplici operazioni morfologiche. Allora, la funzione iniziale ϕ_0 è definita come:

$$\phi_0 = \begin{cases} -\rho & (x, y) \in \Omega_0 - \delta\Omega_0 \\ 0 & (x, y) \in \delta\Omega_0 \\ \rho & (x, y) \in \Omega - \Omega_0 \end{cases} \quad (4.43)$$

con $\rho > 0$ costante. Una scelta opportuna di ρ è tale da soddisfare la condizione $\rho > 2\epsilon$, dove ϵ è lo spessore nella definizione di funzione di Dirac regolarizzata δ_ϵ nella 4.37 [Gui and Fox, 2005].

Diversamente dalla funzione segno, che viene computata a partire da un contorno, le funzioni *level set* iniziali proposte sono calcolate a partire da una regione Ω_0 arbitraria nel dominio dell'immagine Ω . Per dimostrare il funzionamento dello schema proposto mostriamo quindi l'applicazione al caso delle immagini b_0 DW-MR di un paziente ADPKD. Il valore iniziale della funzione *level set* ϕ_0 viene costruita secondo la definizione della 4.43 con $\rho = 4$ e Ω_0 contenente due regioni separate; allora per definizione, questa funzione iniziale ϕ_0 può assumere solo tre valori distinti: -4, 0 e 4. I parametri scelti per la segmentazione seguendo le indicazioni dei precedenti paragrafi sono pari a:

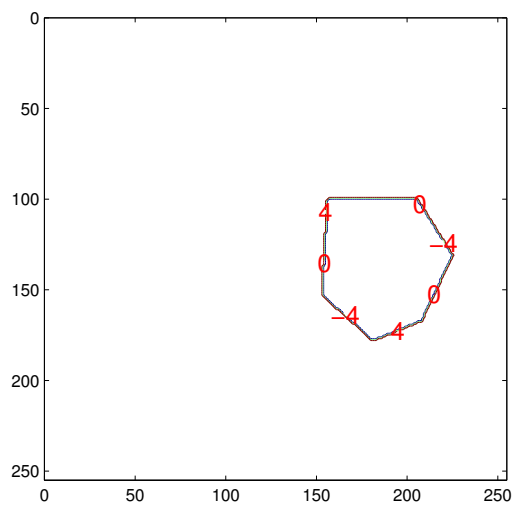
- $\tau = 1,$
- $\mu = 0.2,$
- $\lambda = 5,$
- $\nu = 3.$

Il contorno iniziale viene definito manualmente tramite la funzione Matlab® *roipoly* e viene così generata la funzione *level set* iniziale ϕ_0 (figura 36).

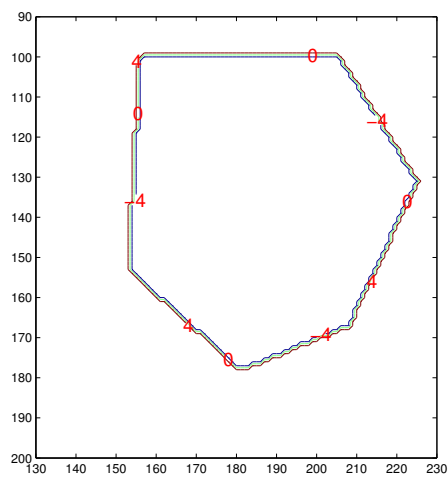
L'evoluzione di ϕ a partire dal suo valore iniziale ϕ_0 è mostrata nelle figure 37 e 38, dove vengono rappresentati i contorni ai passi di iterazione $n=100$ e $n=300$ e le relative curve di livello, si può chiaramente osservare che la funzione *level set* diventa alla fine molto simile ad una funzione distanza, i cui isocontorni nell'intorno dell'isocontorno zero sono quasi ugualmente spazati. Si noti che questo tipo di funzione iniziale ϕ_0 è significativamente diversa da una funzione distanza e durante l'evoluzione ϕ può anche non essere un'approssimazione della funzione distanza in tutto il dominio dell'immagine: l'evoluzione basata sul termine penalizzante di diffusione forza la funzione *level set* ad essere un'approssimazione di una funzione distanza nell'intorno del *level set* zero.



(a) Contorno iniziale



(b) Funzione *level set* iniziale ϕ_0

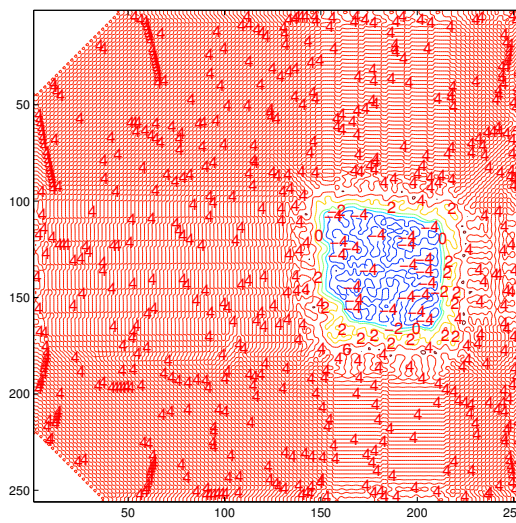


(c) ZOOM funzione *level set* iniziale ϕ_0

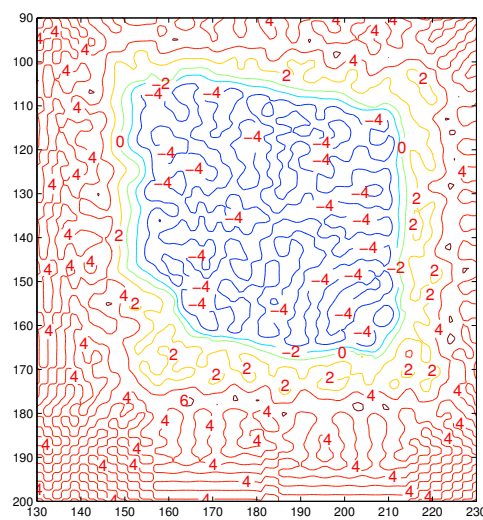
Figura 36: Passo iniziale dell'algoritmo di segmentazione *level set* $n=0$



(a) Contorno dopo 100 iterazioni



(b) Funzione *level set* ϕ dopo 100 iterazioni

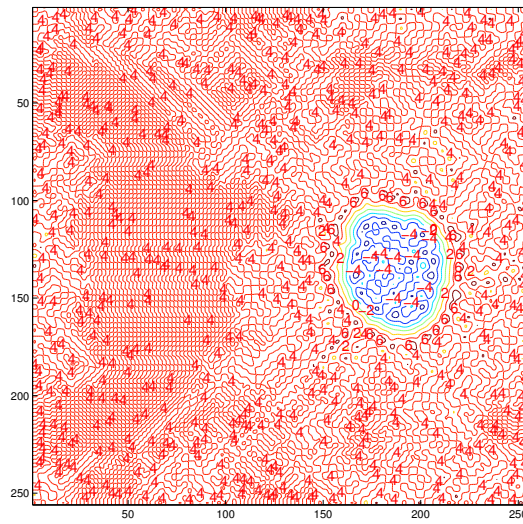


(c) ZOOM funzione *level set* ϕ dopo 100 iterazioni

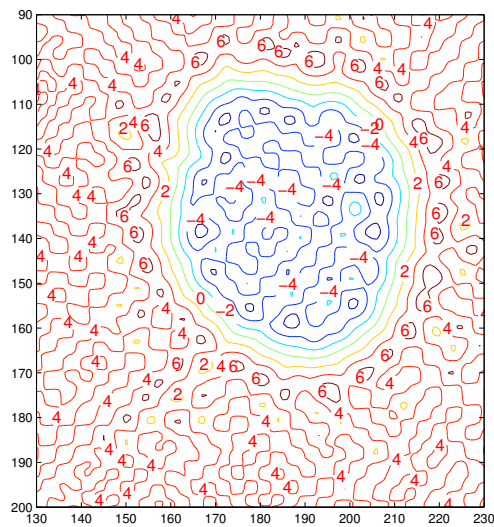
Figura 37: Evoluzione di ϕ dopo 100 iterazioni, $n=100$



(a) Contorno dopo 300 iterazioni



(b) funzione *level set* ϕ dopo 300 iterazioni



(c) ZOOM funzione *level set* ϕ dopo 300 iterazioni

Figura 38: Passo finale dell' algoritmo di segmentazione, $n=300$

STEREOLOGIA

Gli studi stereologici sono sempre più frequenti in letteratura, in particolare nell'analisi dello sviluppo e dell'evoluzione di una condizione patologica e nell'area delle neuroscienze [Cruz-Orive, 1985, 2003, Roberts et al., 2000]. L'ambizione dei metodi stereologici è di comprendere la struttura tridimensionale di una regione di interesse sulla base dell'analisi delle informazioni bidimensionali contenute in *slices* 2D.

L'utilizzo di metodi stereologici consente di effettuare una stima priva di errori sistematici (ad esempio *bias*) di volumi [Cruz-Orive, 1985, 2003, Roberts et al., 2000], dell'area di superfici [Gundersen, 1984, Baddeley et al., 1986] e della lunghezza di curve senza la necessità di formulare ipotesi a priori riguardo la forma della struttura di interesse. Se il processo di misura viene ripetuto, la media di tutti i risultati sarà il vero valore della quantità di interesse. I metodi stereologici si caratterizzano per il fatto di essere metodi molto efficienti, anche se applicati in modo manuale.

Nel presente lavoro di tesi un metodo stereologico è stato utilizzato per stimare il volume renale totale, indice caratteristico dei pazienti affetti da ADPKD, a partire dalle aree parziali di ogni immagine assiale anatomica T_2 -*weighted*. I risultati di tale stima sono stati utilizzati come *gold standard* per confrontare i valori di volumi renale totali ottenuti in seguito alla segmentazione tramite metodo *level set* semiautomatico.

Nei seguenti paragrafi vengono presentati i principi matematici su cui si basa la stima del volume di una struttura di interesse per mezzo di un metodo stereologico e viene brevemente descritto il software utilizzato per tale analisi.

5.1 VOLUME: IL METODO CAVALIERI

Il metodo Cavalieri prende il nome da Bonaventura Cavalieri (1598-1647), che, studente di Galileo nel XVII secolo, fece significativi progressi nel campo matematico dell'integrazione numerica e fu il primo a considerare l'ipotesi di stimare un volume attraverso l'analisi di sezioni di un oggetto solido tridimensionale. Usando il metodo Cavalieri è possibile ottenere una stima priva di *bias* del volume di una struttura caratterizzata da forma e dimensione arbitraria con precisione nota. Nella prima formulazione del metodo di Cavalieri, chiamato in origine "Metodo degli indivisibili", a partire da un punto di partenza casuale all'interno dell'oggetto, la struttura di interesse viene sezionata in una serie di piani paralleli a distanza costante. Le aree delle sezioni passanti per la struttura sono stimate tramite un'operazione di conteggio di punti.

Una variante del metodo di Cavalieri è descritta nel caso in cui le *slices* costituenti il volume abbiano uno spessore finito, questa variante tiene conto di tale spessore durante l'analisi del volume dell'organo o tessuto di interesse [Arнау and Cruz-Orive, 1998].

5.1.1 Sezioni di Cavalieri con spessore nullo

Il metodo delle sezioni di Cavalieri richiede che, partendo da una posizione di partenza random all'interno del volume, la struttura di interesse sia sezionata in modo esaustivo tramite una serie di piani paralleli a distanza costante. In seguito a questa operazione una stima priva di *bias* del volume V è ottenuta moltiplicando l'area totale di tutte le sezioni che passano per la struttura per la distanza tra le sezioni T , ovvero

$$\text{est}_1 V = T \cdot (A_1 + A_2 + \dots + A_n) \quad (5.1)$$

dove A_1, A_2, \dots, A_n sono le aree delle n sezioni che hanno campionato la struttura di interesse e T è la distanza tra le n sezioni consecutive, oppure il valore medio delle distanze tra le sezioni \bar{T} se l'intervallo tra le sezioni non dovesse essere costante.

Il metodo di conteggio dei punti consiste nel sovrapporre ad ogni immagine di RM una griglia regolare i cui nodi identificano i punti di test. In seguito ad ogni sovrapposizione, viene contato il numero di punti test che si trovano all'interno della struttura di interesse in ogni sezione definita per segmentazione manuale, e lo stimatore di volume diventa:

$$\text{est}_2 V = T \cdot \left(\frac{a}{p} \right) \cdot (P_1 + P_2 + \dots + P_n) \quad (5.2)$$

dove P_1, P_2, \dots, P_n rappresentano il numero di punti contati per ogni sezione e il termine $\left(\frac{a}{p} \right)$ rappresenta l'area associata ad ogni punto di test, ovvero il rapporto tra l'area totale dell'immagine e il numero di nodi costituenti la griglia. L'area di ogni sezione A_i viene quindi stimata dal termine $\left(\frac{a}{p} \right) \cdot P_i$ (figura 39). Il pedice 2 nell'espressione $\text{est}_2 V$ indica che il volume è stato stimato tramite un processo a due stadi: prima l'oggetto di interesse è stato sezionato e poi sono stati contati i punti della griglia contenuti in ogni sezione dell'oggetto (figura 40).

Per evitare la presenza di *bias*, la posizione del sistema di test dovrebbe essere uniformemente *random* rispetto alla posizione della sezione. L'orientamento del sistema di test non influisce sulla presenza di errori della stima, anche se alcuni orientamenti possono migliorare la precisione della stima. Tuttavia, se si vuole stimare con quale precisione il metodo Cavalieri misura il volume ottenuto in seguito a sezionamento e conteggio di punti, è necessario che il sistema di test abbia comportamento isotropo e orientamento *random* diverso per ogni *slice* analizzata.

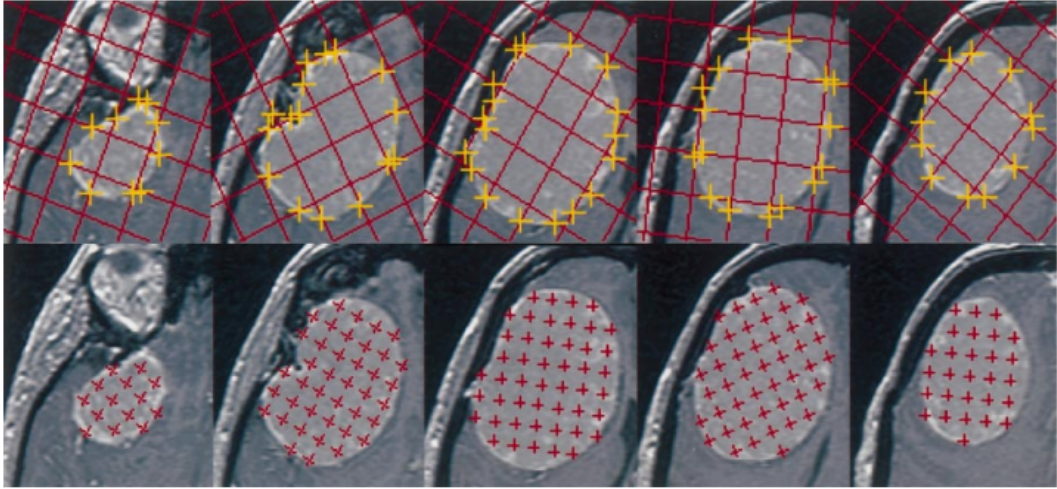


Figura 39: Dimostrazione dell'applicazione del metodo delle sezioni di Cavalieri [Roberts et al., 2000].

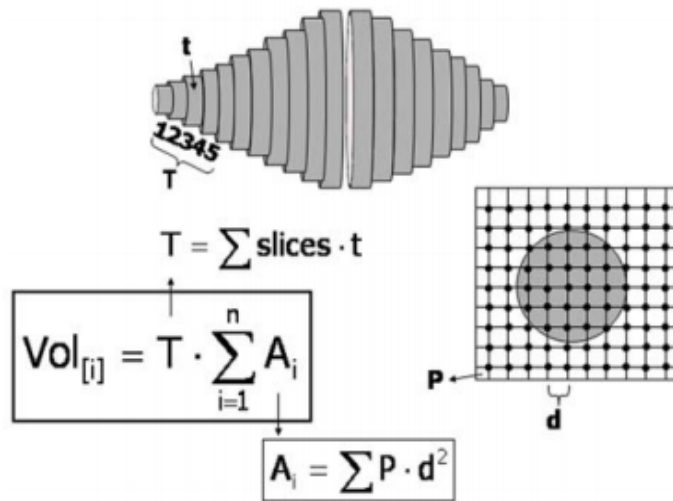


Figura 40: Principio di Cavalieri: l'oggetto di interesse viene sezionato e l'area di ogni sezione viene stimata contando i nodi della griglia sovrapposta che si trovano in corrispondenza dell'oggetto in ogni sezione [Mandarim-de Lacerda, 2003].

5.1.2 Sezioni di Cavalieri con spessore arbitrario

Il metodo delle sezioni di Cavalieri per la stima del volume di una struttura di interesse tramite l'utilizzo di *slices* caratterizzate da spessore finito richiede che l'oggetto che si vuole analizzare sia sezionato dall'inizio alla fine tramite una serie sistematica di fette con spessore t con distanza costante $T > t$. La stima del volume priva di bias si ottiene da:

$$V = \frac{T}{t} \sum_{i=1}^n V_i \quad (5.3)$$

dove V_i è il volume totale del tessuto contenuto nella i -esima fetta.

La precisione della stima di volume ottenuta usando il metodo delle sezioni di Cavalieri può essere misurata tramite il suo coefficiente di errore (CE), detto anche "errore standard relativo". Tuttavia, la stima del CE per sezioni regolari non è semplice. Dal momento che le aree di sezioni consecutive non sono quantità indipendenti, formule convenzionali statistiche non possono essere applicate per determinare la loro varianza. Una formula di stima delle errore ragionevole per il metodo delle sezioni di Cavalieri fu sviluppata da [Gundersen and Jensen, 1987](#) basata sul lavoro teorico di Matheron [[Matheron, 1971, 1965](#)]: il grafico dell'area delle sezioni rispetto alla posizione lungo l'asse di campionamento è definita funzione di misura della struttura di interesse. La varianza della stima ottenuta tramite campionamento uniforme corrisponde alla differenza tra l'integrale del covariogramma¹ della funzione di misura vera e l'approssimazione discreta di questo integrale ottenuto dalle misure delle aree delle sezioni [[Cruz-Orive, 1989, Moran, 2008](#)]. Dal momento che la funzione di misura vera non è nota deve essere modellata; è stato dimostrato che la differenza può essere valutata dalle misure delle aree delle sezioni usando una formula di Eulero-MacLaurin per modellizzare il covariogramma nell'intorno dell'origine [[Matheron, 1965, 1971](#)].

Le formule di predizione dell'errore di stima del volume CE, rispettivamente per oggetti di forma arbitraria e oggetti con forma ellissoidale, sono:

$$CE(est_1 V) = \left(\sum_{i=1}^n V_i \right)^{-1} \cdot \left\{ \frac{1}{6} \left[\frac{(1-t/T)^2}{(2-t/T)} \right] \cdot \left(3 \sum_{i=1}^n V_i^2 + \sum_{i=1}^n V_i V_{i+2} - 4 \sum_{i=1}^{n-1} V_i V_{i+1} \right) \right\}^{1/2} \quad (5.4)$$

$$CE(est_1 V) = \left(\sum_{i=1}^n V_i \right)^{-1} \cdot \left[\frac{1}{6} \left\{ \frac{[1+2t/T-2(t/T)^2](1-t/T)^2}{40-10(t/T)^2+3(t/T)^3} \right\} \cdot \left(3 \sum_{i=1}^n V_i^2 + \sum_{i=1}^n V_i V_{i+2} - 4 \sum_{i=1}^{n-1} V_i V_{i+1} \right) \right]^{1/2} \quad (5.5)$$

¹ Il variogramma o covariogramma è uno strumento tipicamente utilizzato in geostatistica per valutare l'autocorrelazione spaziale dei dati. L'obiettivo dell'analisi è valutare l'effetto della posizione del punto di misura sulla variabilità del dato osservato. Lo studio del covariogramma permette di valutare il grado di variabilità rispetto ad osservazioni effettuate tra punti distanti e permette di calcolare stime dell'errore commesso durante la misurazione.

[Arнау and Cruz-Orive, 1998].

Nel caso di elaborazione di immagini di Risonanza Magnetica, ogni immagine si riferisce di fatto a *slice* di tessuto di spessore finito; si può dunque assumere che queste fette si riferiscano a sezioni di spessore infinitesimo posizionate al centro della *slice*. È possibile applicare il metodo delle sezioni di Cavalieri appena esposto quando la *slice thickness*, ovvero lo spessore delle fette, è piccola rispetto alla dimensione e alla complessità dell'oggetto che si vuole analizzare, nel nostro caso rispetto alla dimensione e dunque al volume renale.

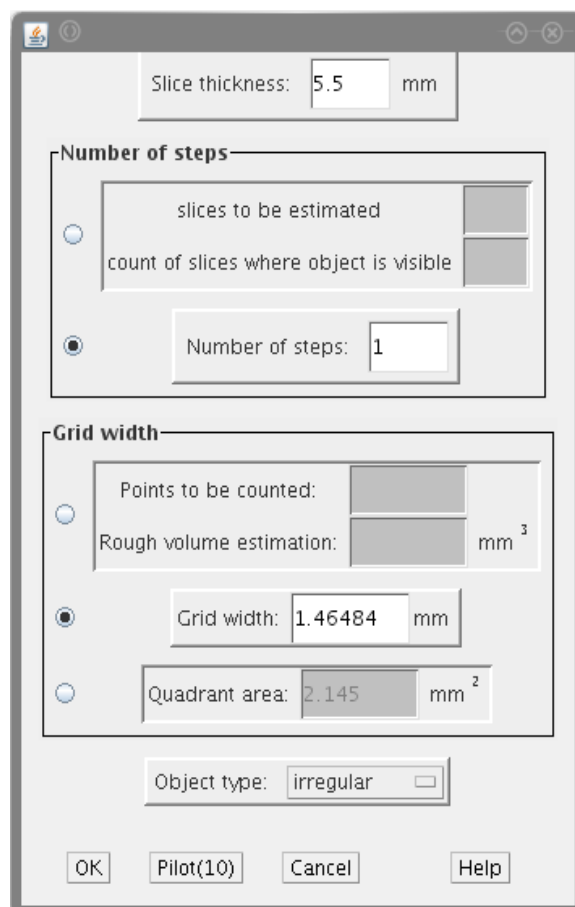


Figura 41: Volumest setup dialog

5.2 IMAGEJ

Per la stima volumetrica tramite metodo stereologico nei 25 soggetti analizzati è stato utilizzato il plugin di ImageJ *Volumest (VOLUME ESTimation)*, software libero rilasciato sotto licenza GPL e scaricabile all'indirizzo <http://lepo.it.da.ut.ee/~markkom/volumest/>.

Il programma permette di definire alcuni parametri per l'analisi volumetrica come la distanza tra *slices* consecutive (*slice thickness*), la dimensione della griglia che verrà sovrapposta all'immagine e il numero di immagini che verranno elaborate; la finestra di dialogo che permette la definizione di tali parametri è riportata in figura 41.

Nell'applicazione all'elaborazione di immagini RM T_2 -weighted per la stima del volume renale totale il parametro di *grid width* è stato impostato pari al valore della dimensione fisica del *pixel*, per ottenere una stima più accurata possibile, e la forma dell'oggetto è stata impostata come irregolare (invece di ellissoidale) affinché si potesse seguire in modo più preciso la forma anatomica irregolare tipica del rene patologico.



Figura 42: Analisi stereologica

Per ogni *slice* analizzata vengono definiti il numero di punti della griglia che

vengono selezionati come appartenenti all'oggetto di interesse, l'area della *slice* corrente, la stima del volume parziale calcolato fino alla *slice* corrente e il coefficiente di errore CE (figura 42).

ANALISI STATISTICA

6.1 ANALISI DEI DATI ANATOMICI E EMATOCHIMICI

La segmentazione delle immagini anatomiche pesate per la costante di rilassamento T_2 è stata realizzata con lo scopo di valutare il volume renale totale di tutta la popolazione a disposizione. Il valore di volume renale totale, infatti, può rappresentare secondo diversi studi presenti in letteratura un indice caratteristico dello stato di avanzamento della patologia e dunque può fornire un valido contributo alla diagnosi dello stato patologico [Vijay et al., 2010, Fick-Brosnahan et al., 2002, Grantham et al., 2006, Grantham, 1997, Antiga et al., 2006, Bae et al., 2000, Sise et al., 2000].

Metodi di segmentazione automatici o semiautomatici sono desiderabili in quanto rispetto alla segmentazione manuale superano i problemi di soggettività dell'operatore e eliminano la variabilità inter-operatore. Per validare il corretto funzionamento di un metodo di segmentazione semiautomatico (come il caso dei metodi *level set*) è necessario valutarne l'effetto rispetto ad un metodo standard di riferimento.

In questa tesi è stato analizzato il corretto funzionamento dei metodi *level set* nella segmentazione semiautomatica delle regioni renali confrontando il valore di volume renale totale ottenuto in seguito al processo di segmentazione con il valore ottenuto tramite il metodo stereologico, che, come già spiegato nei capitoli precedenti, costituisce in questo lavoro il valore *gold standard*.

La validazione del funzionamento del metodo *level set* è stata realizzata tramite analisi di correlazione lineare e analisi di Bland-Altman tra il volume calcolato con metodo stereologico di riferimento e volume calcolato in seguito alla segmentazione semiautomatica. L'analisi di correlazione è stata inoltre applicata tra i valori di volume renale e i parametri ematochimici di creatinina sierica, stima di GFR tramite CG e MDRD per valutare la relazione tra l'indice volumetrico e la funzionalità renale dei soggetti analizzati.

Nei seguenti paragrafi verranno illustrati tali metodi di analisi.

6.1.1 Validazione volumetrica e correlazione lineare

Il metodo di correlazione lineare permette di analizzare la relazione tra due variabili quantitative e, nel caso della validazione volumetrica del metodo di segmentazione semiautomatico, tali variabili sono i volumi calcolati per mezzo dei due differenti metodi. Lo scopo del metodo di correlazione lineare è la definizione di una curva che

meglio rappresenti la relazione tra le variabili; in particolare il metodo di regressione permette di stimare la relazione numerica tra le variabili.

La retta che approssima la relazione tra i dati è detta retta dei minimi quadrati, in quanto è ottenuta minimizzando la somma dei quadrati delle deviazioni dalla retta, ovvero tramite l'approccio noto come metodo dei minimi quadrati.

Il metodo di regressione fornisce informazioni in merito alla natura della relazione tra due variabili, su come cambia una al variare dell'altra, ma non dice nulla sulla forza di tale relazione; viene dunque introdotto un indice detto coefficiente di correlazione. Il coefficiente di correlazione è basato sulla somma dei prodotti degli scarti intorno alla media delle due variabili, pertanto rappresenta un buon indicatore della forza della relazione tra le variabili. Si definisce una correlazione positiva tra variabili quando al crescere dell'una cresce anche l'altra e viceversa nel caso di correlazione negativa. Il coefficiente di correlazione è un indice adimensionale, indicato dalla lettera r ed è definito dalla seguente espressione:

$$\begin{aligned}
 r &= \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2) \cdot (\sum (y_i - \bar{y})^2)}} \\
 &= \frac{\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}}{\sqrt{(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n})(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n})}} \\
 &= \frac{\text{somma dei prodotti degli scarti dalla media di X e Y}}{\sqrt{\text{somma degli scarti quadratici di X} \times \text{somma degli scarti quadratici di Y}}} \quad (6.1)
 \end{aligned}$$

dove con (x_i, y_i) vengono indicate le n coppie di osservazioni.

Il termine al denominatore ha l'effetto di normalizzare il valore del coefficiente di correlazione in modo che abbia sempre un valore compreso tra -1 e +1. Spesso viene utilizzato il valore di r^2 invece di r per valutare la correlazione, ottenendo un valore compreso tra 0 e 1. Il coefficiente di correlazione misura quanto i punti sono vicini ad essere allineati, ovvero qual'è la bontà di descrizione della retta di regressione lineare [Bland, 2009].

6.1.2 *Analisi di Bland-Altman*

L'analisi di Bland-Altman permette la quantificazione dell'errore di misura che si commette utilizzando diversi metodi di misurazione clinica.

Il primo passo dell'analisi consiste nel grafico dei dati sotto forma di diagramma di dispersione; se si traccia la retta di uguaglianza, lungo la quale due misurazioni dovrebbero essere perfettamente uguali, si può avere un'idea del tipo di concordanza che sussiste tra i metodi (figura 43).

Un approccio migliore di analisi dei dati è quello di costruire il diagramma di dispersione delle differenze tra i metodi contro la somma o la media delle osservazioni,

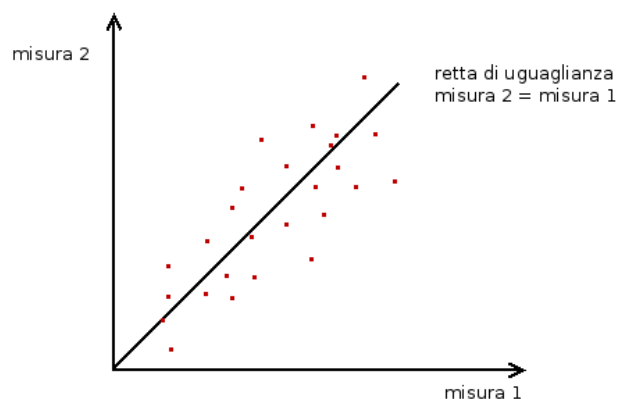


Figura 43: Diagramma di dispersione

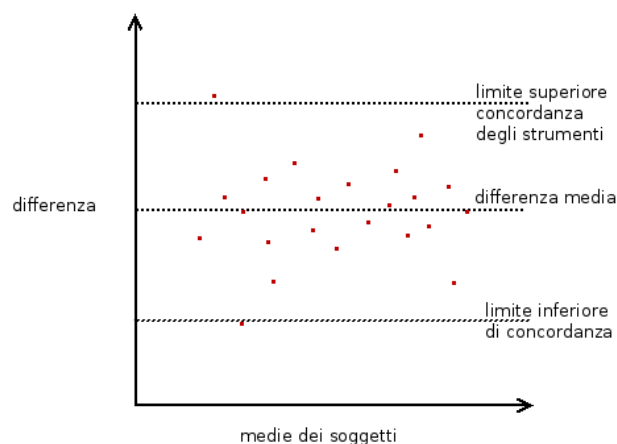


Figura 44: Diagramma di Bland-Altman

questo tipo di grafico è detto diagramma di Bland-Altman. Il segno della differenza è importante dal momento che c'è la possibilità che un metodo dia risultati più alti dell'altro e questo potrebbe essere collegato con il vero valore che si sta cercando di misurare (figura 44).

Le due misurazioni di volume renale totale saranno in accordo se la differenza tra le osservazioni effettuate sul medesimo soggetto usando entrambi i metodi di misura risulterà sufficientemente piccola da far ritenere i metodi interscambiabili.

La differenza tra i metodi viene quantificata tramite la stima del *bias*, ovvero la stima della differenza media, e la stima dei limiti all'interno dei quali la maggior parte delle differenze si colloca. Tale stima dei limiti si ottiene a partire dalla media e dalla deviazione standard delle differenze. La deviazione standard delle differenze tra le misurazioni prodotte dai due sistemi di misura rappresenta un buon indice di confrontabilità dei due metodi; i limiti per le differenze sono calcolati come $\bar{d} \pm 2s$, dove \bar{d} è il valore medio delle differenze e s è la deviazione standard delle differenze, e sono chiamati limiti di concordanza al 95%. In conclusione con tale analisi, si potrà affermare che la differenza tra i metodi si trova al massimo a due deviazioni standard

di distanza dalla media per il 95% delle osservazioni [Altman and Bland, 1983, Bland and Altman, 1986, Bland, 2009].

6.1.3 Correlazione tra volumi e parametri ematochimici

L'analisi di correlazione tra indice volumetrico e funzionalità renale è stata applicata per verificare l'ipotesi che il valore di volume renale totale fosse un indicatore caratteristico dell'avanzamento dello stato patologico in pazienti ADPKD. L'analisi di correlazione è dunque stata applicata tra il volume renale e i tre indici ematochimici a disposizione: creatinina sierica, stima del GFR tramite formula di CG e stima del GFR tramite MDRD.

La relazione tra volume renale totale e creatinina sierica è stata espressa in termini di correlazione lineare, definendo cioè la retta di regressione che interpretasse la relazione tra i dati. Invece, nell'analisi di correlazione tra indice volumetrico e le due stime del GFR è stata utilizzata una funzione non lineare logaritmica della forma: $f(x) = a \cdot \ln(x) + b$.

Nei tre casi la forza delle relazioni ottenute è stata valutata tramite l'indice di correlazione r^2 .

6.1.4 Follow up

Tra Febbraio e Aprile 2010, dopo circa due anni dalle prime acquisizioni sono state ripetute le acquisizioni MRI e le analisi ematochimiche. Il *follow up* è iniziato con l'analisi di cinque soggetti ADPKD con funzione renale normale; di questi pazienti è stato valutato il cambiamento percentuale di volume renale totale e il relativo cambiamento dei parametri ematochimici.

6.2 ANALISI DELLE MAPPE ADC

Le mappe ADC calcolate a partire dalle immagini DW sono state elaborate per estrarre indici che potessero essere significativi dello stato di salute dei soggetti analizzati.

La definizione delle regioni renali è stata realizzata tramite segmentazione con metodo *level set* sulle immagini caratterizzate dal valore b_0 e i contorni così definiti su ogni slice sono stati riportati sulle mappe ADC corrispondenti.

Per facilitare l'analisi è stata sviluppata una *Graphical User Interface* (GUI) in Matlab®, che permettesse la visualizzazione immediata dei parametri calcolati.

Nei seguenti paragrafi viene descritta l'analisi sulle mappe ADC.

6.2.1 Parametri calcolati per l'analisi delle mappe ADC

L'analisi della distribuzione di valori delle mappe ADC nelle regioni renali si è focalizzata sul calcolo dei valori di media, deviazione standard, mediana e differenza interquartile. A titolo esemplificativo, in figura 45 vengono indicati tali parametri calcolati per un'immagine di dimensione 100×100 pixels caratterizzata da distribuzione gaussiana dei valori di videointensità dei pixels.

MEDIA Il valore medio di ADC all'interno dei tessuti renali è stato utilizzato da molti studi in letteratura per comprendere come il fenomeno di diffusione delle molecole d'acqua vari all'interno dei tessuti biologici nel caso di condizioni patologiche [Xu et al., 2007, Namimoto et al., 1999, Muller et al., 1994b, Carbone et al., 2007].

Il valore medio si ottiene sommando tutti i valori di videointensità dei pixel appartenenti alle regioni renali in ogni slice delle mappe ADC per ogni soggetto considerato e dividendo per il numero totale di pixel costituenti il volume renale:

$$\text{media}_{\text{ADC}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \text{ADC}(i,j) \quad (6.2)$$

DEVIAZIONE STANDARD La deviazione standard e la varianza indicano quanto una distribuzione sia sparsa, ovvero quantificano la variabilità o più propriamente la dispersione dei valori intorno al valore medio.

La stima della variabilità è detta varianza ed è definita come

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (6.3)$$

dove la quantità $\sum (x_i - \bar{x})^2$ è il quadrato delle somme delle distanze di ogni punto x_i dal valore medio \bar{x} e viene chiamata somma di quadrati, mentre la quantità al denominatore $(n-1)$ prende il nome di gradi di libertà della varianza stimata.

Si può osservare che dal momento che la varianza viene calcolata a partire dai quadrati delle osservazioni questo significa che non è espressa con la stessa unità di misura delle osservazioni, fatto che ne limita l'utilizzo in statistica descrittiva. Si preferisce quindi considerare la radice quadrata della varianza, la quale tornerà ad avere la stessa unità di misura delle osservazioni.

La radice quadrata della varianza è detta deviazione standard ed è data dalla seguente espressione:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (6.4)$$

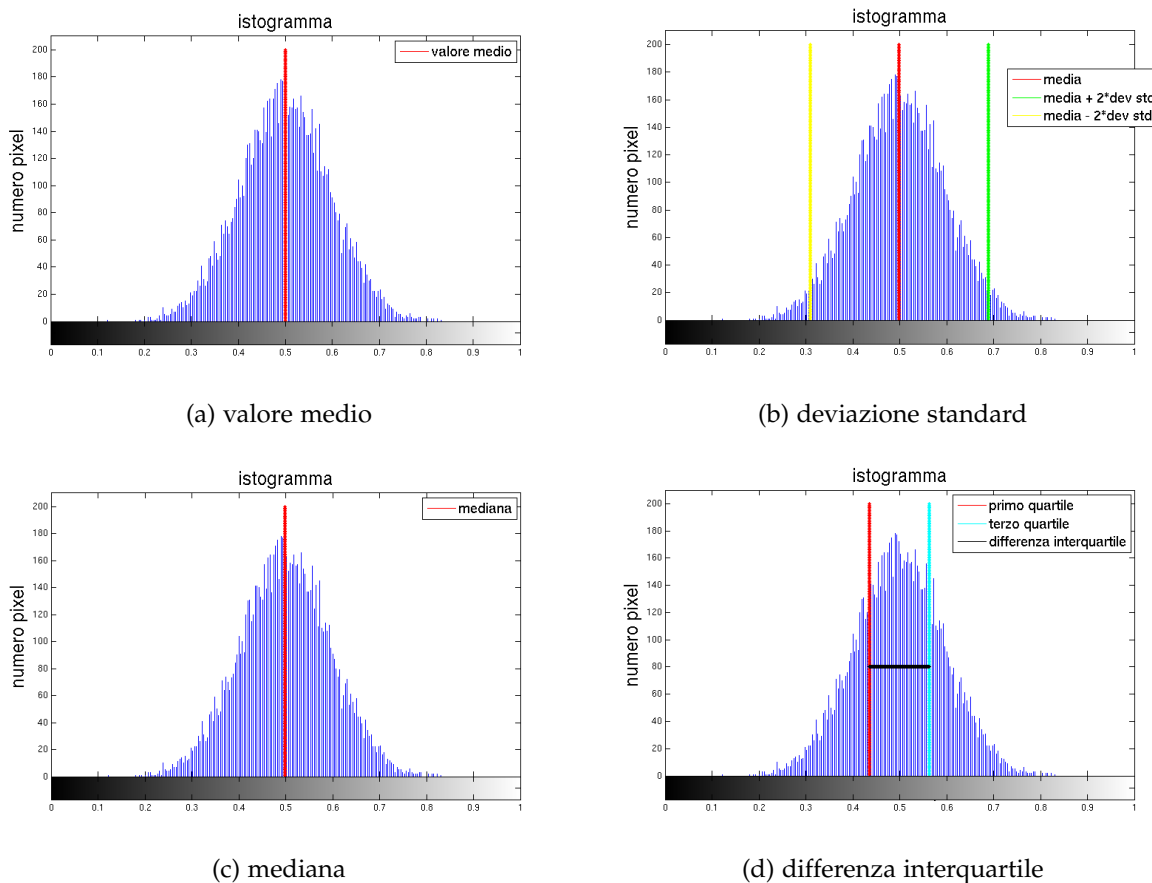


Figura 45: Parametri calcolati sulle mappe ADC

MEDIANA La mediana è il valore centrale della distribuzione delle osservazioni, ovvero quel valore sotto il quale si collocano metà delle osservazioni, mentre l'altra metà risulta maggiore o uguale ad essa. La mediana è quindi un quantile, ovvero un valore che suddivide la distribuzione in modo da lasciare una proporzione assegnata di osservazioni al di sotto di se, e in particolare è il secondo quartile.

DIFFERENZA INTERQUARTILE Il *range* interquartile o differenza interquartile è la differenza tra il primo e il terzo quartile ed è una misura della dispersione dei dati alternativa alla varianza e alla deviazione standard. Questo valore rappresenta un pratico strumento descrittivo, anche se una misura di dispersione piuttosto variabile da campione a campione.

6.2.2 Range di normalità

Il *range* di normalità o intervallo di riferimento del valore di ADC è calcolato sui soli soggetti appartenenti alla popolazione 1 per definire un valore di riferimento al di fuori del quale si possa ipotizzare uno stato patologico. Questo intervallo di

normalità è definito come quell'insieme di valori all'interno del quale si ritrova il 95% delle misurazioni a disposizione su soggetti considerati normali. Di conseguenza, il 5% dei valori normali restano al di fuori da questo intervallo.

Il *range* di normalità si calcola a partire dai valori dei percentili 2.5 e 97.5, che si calcolano rispettivamente:

$$\begin{aligned} i_{2.5} &= 0.025 \cdot (n + 1) \\ i_{97.5} &= 0.975 \cdot (n + 1) \end{aligned} \tag{6.5}$$

dove n è il numero totale di osservazioni e dunque nel nostro caso il numero totale di *pixel* appartenenti alle regioni renali in tutti i soggetti sani considerati. Per fare ciò, sono stati presi in considerazione i valori di ADC di tutti i *pixel* di ogni fetta dei soggetti appartenenti alla popolazione 1 (vedi capitolo 3) definita tramite la segmentazione *level set* delle immagini DW. A partire da tale distribuzione di valori si sono calcolati i valori di $i_{2.5}$ e $i_{97.5}$. Il calcolo di questi due valori viene fatto a prescindere da ogni ipotesi sulla distribuzione [Bland, 2009].

A partire dai due valori $i_{2.5}$ e $i_{97.5}$ si definisce *range* di normalità:

$$\text{range di normalità} = \Delta i = i_{97.5} - i_{2.5} \tag{6.6}$$

6.2.3 Curve ROC

Una delle principali ragioni per effettuare misurazioni cliniche è fornire uno strumento di supporto alle diagnosi. Nell'ambito dello studio della distribuzione dei valori di ADC all'interno delle regioni renali si è interessati a comprendere se gli indici calcolati (media, mediana, varianza e differenza interquartile) possono avere rilevanza clinica nella diagnosi di ADPKD.

In particolare, lo studio delle curve ROC (*Receiver Operating Characteristic*) si è focalizzato sull'eventuale capacità degli indici di distinguere reni caratterizzati dalla presenza di cisti e reni caratterizzati dall'assenza di tessuto cistico, indipendentemente dai valori ematochimici e dunque dalla funzionalità renale associata.

Le curve ROC rappresentano l'andamento di sensibilità, specificità e accuratezza al variare di un valore di soglia che classifica la condizione patologica dei soggetti considerati. Come già spiegato, in questo caso si è indicato come soggetto "sano" ogni soggetto caratterizzato da assenza di cisti e viceversa come "patologico" ogni soggetto caratterizzato dalla presenza di cisti.

Sensibilità, specificità e accuratezza sono definite rispettivamente da:

$$\text{sensibilità} = \frac{VP}{VP + FN} \tag{6.7}$$

$$\text{specificità} = \frac{VN}{VP + FN} \tag{6.8}$$

$$\text{accuratezza} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN} \quad (6.9)$$

dove:

- VP = veri positivi, ovvero numero di soggetti patologici che risultano positivi al test
- VN = veri negativi, numero di soggetti sani che risultano negativi al test
- FP = falsi positivi, numero di soggetti sani che risultano positivi al test
- FN = falsi negativi, numero di soggetti patologici che risultano negativi al test.

In altre parole, la sensibilità è il tasso di individui malati che risultano positivi al test, mentre la specificità è il tasso di individui sani che risultano negativi e descrivono quindi la bontà del test di definire rispettivamente stato patologico o normale. L'accuratezza rappresenta il rapporto delle stime corrette (veri positivi + veri negativi) rispetto a tutta la popolazione considerata ed indica quindi qual'è la capacità del test di fornire una classificazione corretta della popolazione.

L'andamento di sensibilità, specificità e accuratezza per mezzo delle curve ROC ha il fine di definire una soglia sui parametri calcolati che sia in grado di classificare correttamente la popolazione analizzata; a tale scopo è necessario scegliere un valore per la soglia che stiamo cercando che rappresenti un buon compromesso tra i valori di sensibilità, specificità e accuratezza.

6.2.4 *Analisi di correlazione*

L'analisi di correlazione lineare e non lineare è stata applicata anche agli indici statistici di ADC per studiare una possibile relazione con gli indici volumetrici e i parametri ematochimici.

Parte III

RISULTATI

RISULTATI

7.1 RISULTATI DELL'ANALISI VOLUMETRICA

I volumi renali calcolati tramite il metodo *gold standard* di segmentazione manuale (stima stereologica) e metodo di segmentazione semiautomatica *level set* hanno fornito stime volumetriche comparabili e accurate, come osservabile dalla segmentazione di una fetta centrale di uno dei pazienti analizzati (figura 46).

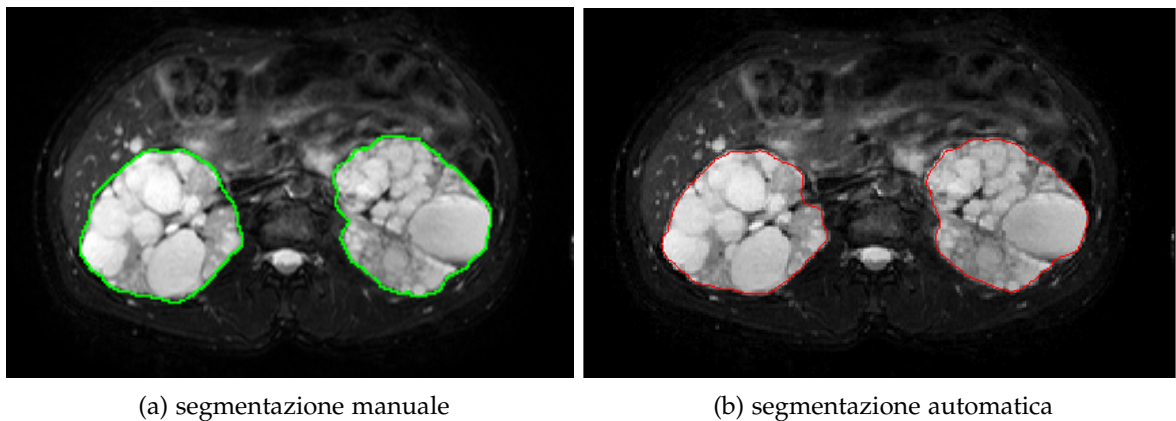


Figura 46: Confronto delle due tecniche di segmentazione

L'analisi di regressione lineare applicata ai due metodi di stima del volume renale totale è caratterizzata da un coefficiente di correlazione elevato e pendenza della retta di regressione lineare molto vicino a 1 ($f(x) = 0.98x - 10.84$, $r^2 = 0.99$) come riportato in figura 47.

L'analisi di Bland-Altman (figura 48) mostra *bias* molto ridotti (-17.8 ml) tra le misure derivanti da segmentazione automatica e la tecnica stereologica di riferimento per il calcolo del volume renale totale. Tale valore di *bias* corrisponde ad un errore sistematico medio di circa il $-2,6\%$. I limiti di concordanza dell'analisi di Bland-Altman presentano inoltre un intervallo relativamente stretto, caratterizzato da una deviazione standard pari a 34 ml, confermando ulteriormente l'intercambiabilità delle due tecniche.

L'analisi di correlazione è stata quindi applicata ai valori di volume renale totale (ottenuto come somma di volumi dei reni destro e sinistro a partire dai valori sti-

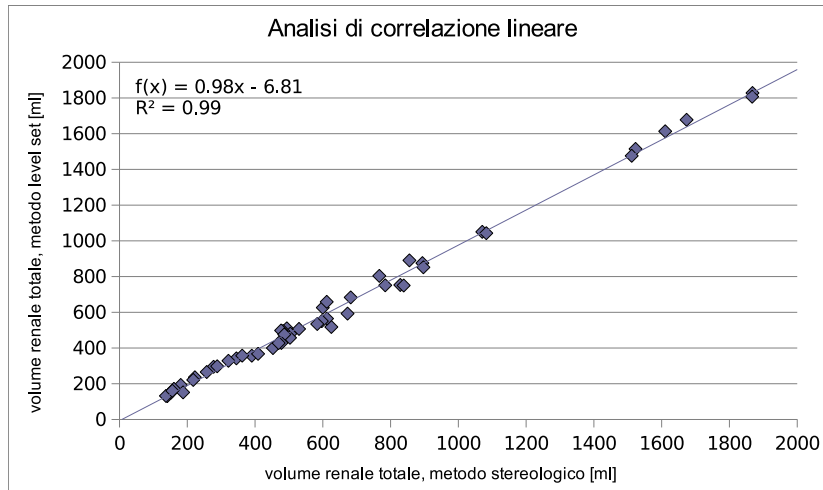


Figura 47: Analisi di correlazione lineare tra i metodi stereologico e level set utilizzati per la stima del volume renale totale

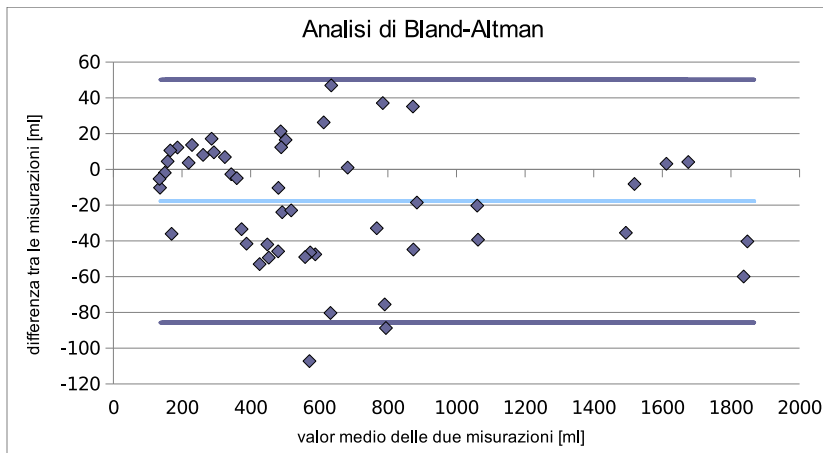


Figura 48: Analisi di Bland-Altman dei due metodi di misurazione

mati tramite il metodo stereologico e normalizzato per il peso corporeo) rispetto ai parametri ematochimici indicatori della funzionalità renale. La correlazione tra volume renale e creatinina sierica ha dato risultati migliori per il caso lineare, ovvero approssimando la relazione tra volume e creatinina tramite una retta di regressione (figura 49). La correlazione tra volume renale e le stime di GFR (CG e MDRD) ha dato risultati migliori utilizzando una funzione non lineare logaritmica per l'approssimazione della relazione tra i dati (figura 50 e 51). I coefficienti di correlazione presentano valori elevati rispettivamente pari a $r^2 = 0.78$, $r^2 = 0.64$ e $r^2 = 0.72$.

7.1.1 Follow up

Il *follow up* è stato realizzato per cinque pazienti appartenenti alla popolazione costituito da soggetti caratterizzati da tessuto cistico ma con funzionalità renale

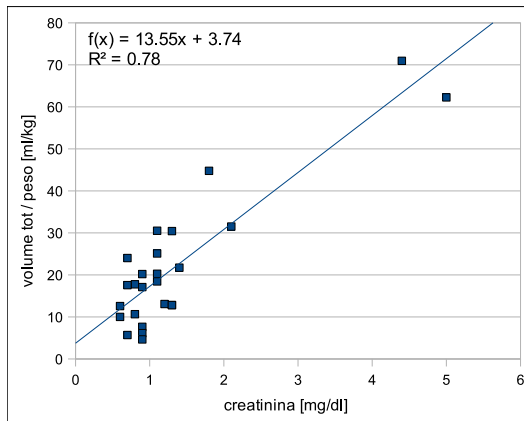


Figura 49: Analisi di correlazione tra volume renale totale (somma del volume del rene destro e sinistro) normalizzato per il peso corporeo e il valore di creatinina sierica

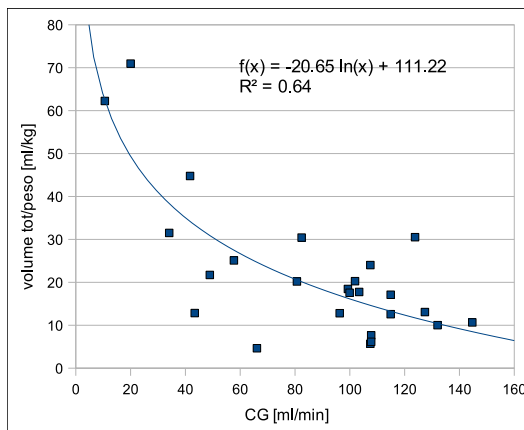


Figura 50: Analisi di correlazione tra volume renale totale normalizzato per il peso corporeo e stima del GFR tramite formula di CG

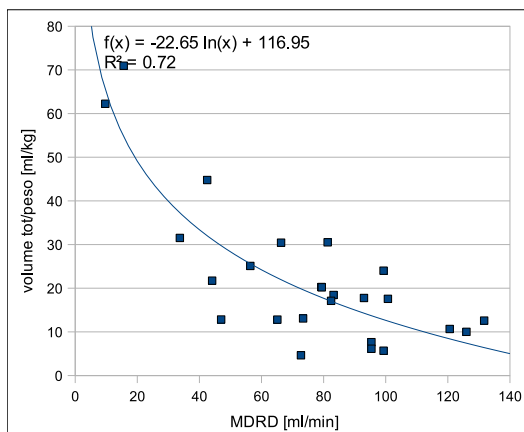


Figura 51: Analisi di correlazione tra volume renale totale normalizzato per il peso corporeo e stima del GFR tramite MDRD

ancora normale. L'aumento medio di volume renale totale per questi primi pazienti è pari al 5%, corrispondente ad un peggioramento medio della funzionalità renale in termini di GFR stimato tramite la formula di Cockcroft-Gault del 9,12%. Considerato il limitato numero di pazienti studiati ulteriori studi saranno necessari per confermare la relazione tra aumento del volume renale e peggioramento delle funzionalità renali.

7.2 RISULTATI DELL'ANALISI FUNZIONALE

7.2.1 Sviluppo GUI per l'analisi delle mappe ADC

Lo sviluppo di un'interfaccia grafica per la visualizzazione dell'analisi sulle mappe ADC nasce dalla necessità di unire tutte le funzioni utilizzate nell'analisi in un unico strumento consentendo veloce applicazione dell'analisi e salvataggio dei risultati alla fine dell'elaborazione per ogni paziente analizzato [Gonzalez et al., 2004].

Come si può osservare in figura 52 l'analisi comincia con il caricamento delle *slices* relative ad ogni soggetto per mezzo del pulsante "carica immagini" e con la visualizzazione dei dati principali del soggetto considerato: numero identificativo del paziente, sigla della descrizione della serie di immagini, *pixel spacing* e *spacing between slices*.

I primi due *frames* contengono le immagini caratterizzate dal parametro b_0 e nel terzo *frame* viene visualizzata la mappa dell'ADC corrispondente alla *slice* corrente. I pulsanti di navigazione "back" e "next" permettono di scorrere le *slices* costituenti il volume e dunque consentono la navigazione verso l'immagine che si intende analizzare; quando si è arrivati all'immagine desiderata schiacciando il pulsante "go" si attiva la segmentazione per mezzo del metodo *level set* descritto nel paragrafo 4.5. L'utilizzo di questi pulsanti all'interno della GUI elimina la necessità di un ciclo *for* altrimenti necessario per l'esplorazione del volume di interesse e permette di muoversi in entrambi i sensi ed eventualmente ripetere l'analisi in caso di segmentazione della regione renale insoddisfacente.

La segmentazione con metodo *level set* inizia con la definizione di un contorno iniziale nel primo *frame* e la definizione del numero di iterazioni che si vuole utilizzare per l'evoluzione del contorno, se questo campo rimane vuoto viene assegnato il valore di *default* di 300 iterazioni. Nel primo *frame* viene dunque visualizzata l'evoluzione del contorno ogni 20 iterazioni e, a processo terminato, nel secondo *frame* viene visualizzata la regione renale segmentata ingrandita con il corrispondente contorno evidenziato in rosso. Nel terzo *frame* il contorno così trovato viene sovrapposto alla mappa ADC corrispondente, passaggio necessario per l'analisi successiva della distribuzione dei valori di ADC all'interno delle regioni renali; per mezzo dei pulsanti "zoom +" e "zoom -" si può ingrandire o rimpicciolire la mappa ADC.

Per ogni *slice* segmentata viene riportato l'istogramma della ROI (*region of interest*)

renale e vengono calcolati e presentati i seguenti valori: valore medio, deviazione standard, mediana, valore minimo, valore massimo, primo quartile e terzo quartile; inoltre, per ogni *slice* viene calcolata l'area in numero di *pixel* definita dalla regione renale evidenziata e viene aggiornato il valore di volume parziale ottenuto come somma di tutti i *pixel* interni alla regione segmentata nella sequenza che si sta analizzando.

Al termine dell'analisi è possibile salvare i dati calcolati, sia i contorni definiti per segmentazione che i parametri statistici calcolati, tramite il pulsante "salva risultati".

7.2.2 Range di normalità

Il range di normalità dei valori di ADC è stato calcolato come definito nel paragrafo 6.2.1 sulla sola popolazione caratterizzata da assenza di tessuto cistico (popolazione 1). Si è ottenuto il valore:

$$\Delta i = i_{97.5} - i_{2.5} = (0.004596 - 0.001972048) \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} = 0.00262439 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \quad (7.1)$$

7.2.3 Analisi delle mappe ADC

L'analisi della distribuzione dei valori di ADC all'interno delle regioni renali ha permesso di evidenziare alcune differenze tra le tre popolazioni di pazienti considerati (definite nel capitolo 3). I valori di ADC nei tessuti renali sono stati studiati in termini di valore medio, deviazione standard, mediana e differenza interquartile.

In figura 53 sono presentate due fette centrali rispettivamente di un soggetto sano, ovvero in assenza di tessuto cistico, e di un soggetto patologico, ovvero in presenza di tessuto cistico, ma con funzioni renali normali (entrambe segmentate con metodo semiautomatico basato su *level set*). In figura 54 sono presentati gli istogrammi relativi alle regioni renali segmentate, corrispondenti in entrambi i casi al rene destro.

Si può immediatamente osservare che le due regioni evidenziate si distinguono sia per dimensioni che per distribuzione di valori. Il soggetto patologico presenta un'area della sezione renale maggiore, caratteristica del rene policistico di pazienti ADPKD, dove il proliferare di cisti renali piene di fluido causa l'aumento del volume renale totale. La presenza di cisti inoltre modifica la distribuzione di valori di ADC all'interno della sezione renale stessa, come si può osservare nei grafici che riportano gli istogrammi della sezione; non solo la curva dell'istogramma sottende un'area relativa molto maggiore, ma il *range* di valori di ADC all'interno del rene risulta essere molto più variabile, come si può notare osservando i valori lungo l'asse x di entrambi gli istogrammi. Per i due soggetti riportati nelle figure 53 e 54 gli indici calcolati (media, deviazione standard, mediana e differenza interquartile delle mappe ADC delle regioni renali) sono presentati in tabella 3.

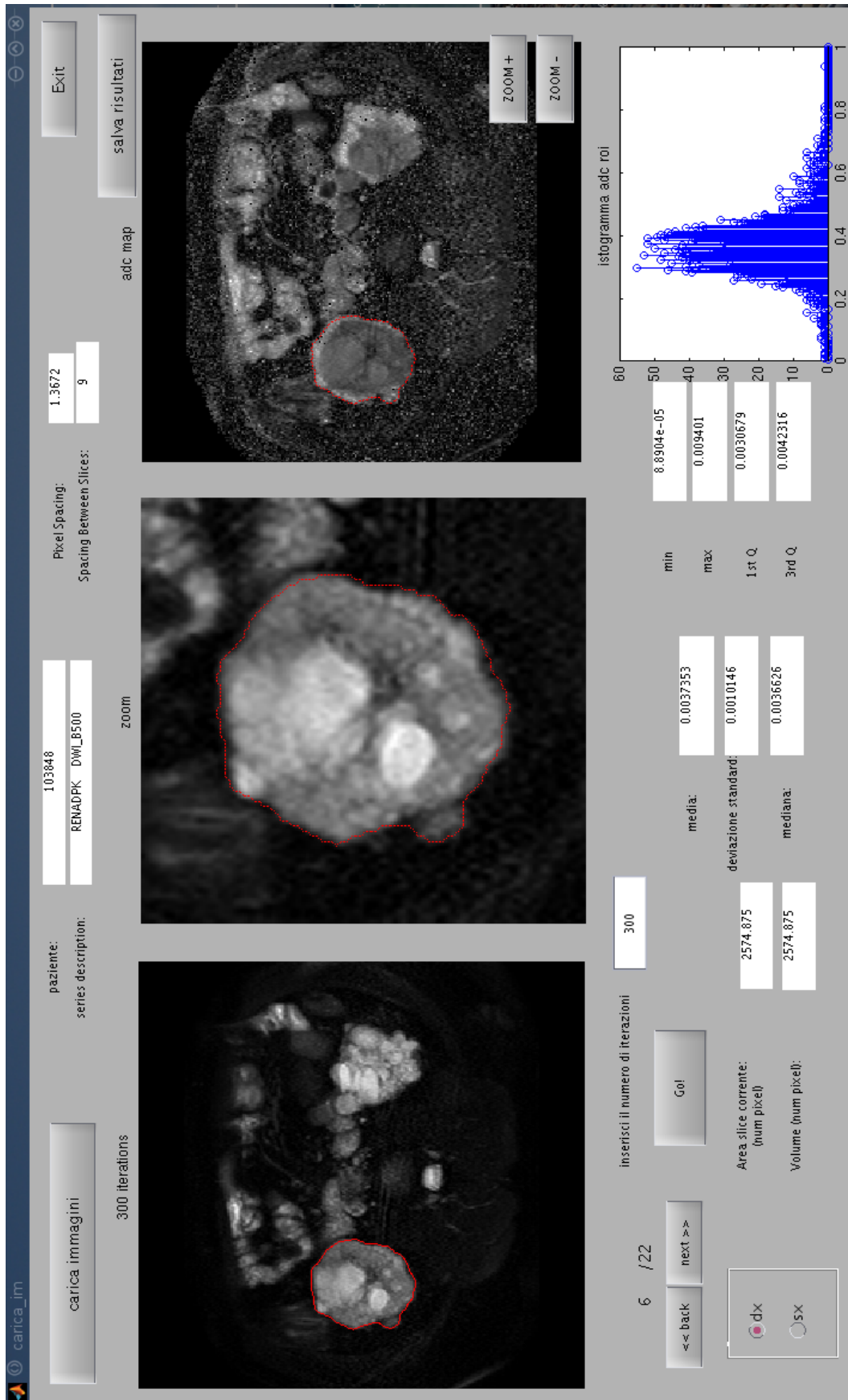
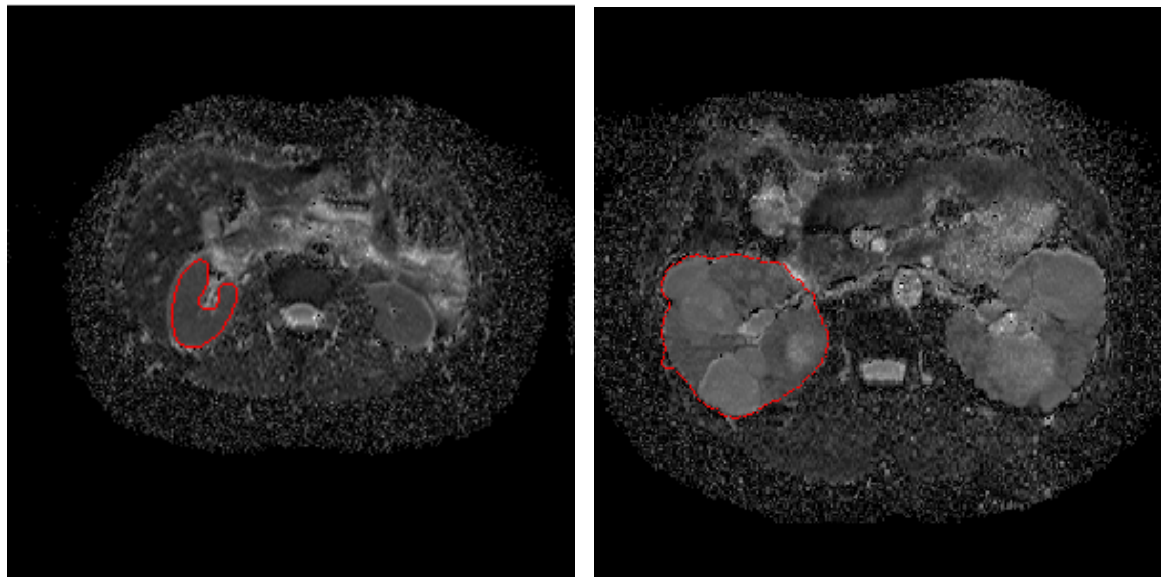


Figura 52: GUI

paziente	vol [ml]	media [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]	dev. std [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]	mediana [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]	diff. interquartile [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]
sano	141.14	2.88728	0.45939	2.83609	0.38905
patologico	855.35	3.86299	0.75939	3.93954	0.89729

Tabella 3: Esempio: valori caratteristici ADC e volume renale per due soggetti



(a) Mappa ADC di un soggetto sano (ovvero in assenza di tessuto cistico), con regione renale destra evidenziata
 (b) Mappa ADC di un soggetto patologico (ovvero caratterizzato da presenza di tessuto cistico), con regione renale destra evidenziata

Figura 53: Mappe ADC

I valori medi degli indici ADC calcolati per le tre popolazioni di pazienti sono presentati in tabella 4.

La distribuzione di questi valori viene rappresentata dai *box plots* in figura 55, dove con popolazione 1 si indicano i pazienti caratterizzati da assenza di tessuto cistico, con popolazione 2 i pazienti caratterizzati da tessuto cistico ma funzione renale normale e infine con popolazione 3 i pazienti caratterizzati da tessuto cistico e IRC (come spiegato nel capitolo 3). Per i quattro indici considerati si possono notare differenze nei valori in particolare tra la popolazione 1 e le rimanenti popolazioni 2 e 3, confermando l'ipotesi che l'ADC sia caratterizzato da diversi valori a seconda della struttura normale o anormale dei tessuti e che dunque possa essere un vettore di informazioni sullo stato patologico di pazienti renali. In particolare, analizzando sia i valori in tabella 4 che i grafici in figura 55, si può notare che gli indici di ADC per la popolazione 1 presentano sempre valori minori rispetto ai valori delle popolazioni 2 e 3.

L'analisi di varianza ad una via (*one way ANOVA*) dei quattro indici considerati per le tre popolazioni ha dimostrato la significatività della differenze tra le popolazioni;

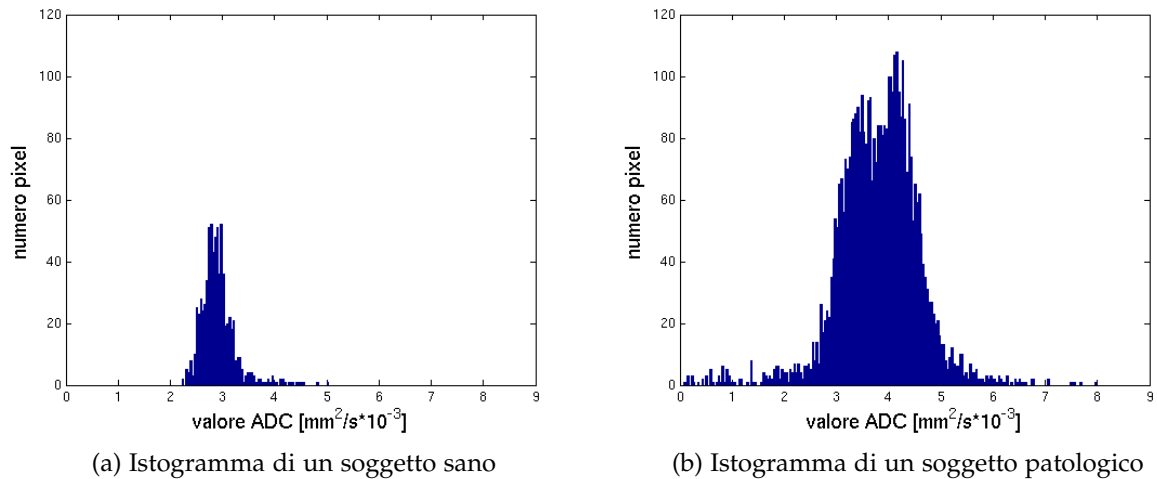


Figura 54: Istogrammi delle regioni renali

popolazione	media [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]	dev. std [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]	mediana [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]	diff. interquartile [$10^{-3} \cdot \frac{m \cdot m^2}{s}$]
1	2.92757 ± 0.05570	0.62057 ± 0.17638	2.84902 ± 0.08024	0.43424 ± 0.07772
2	3.40662 ± 0.34845	0.83354 ± 0.15734	3.34152 ± 0.39279	0.86369 ± 0.21384
3	3.3969 ± 0.4604	0.7707 ± 0.1103	3.4088 ± 0.4839	0.7397 ± 0.1907

Tabella 4: Valori caratteristici di ADC per le tre popolazioni analizzate

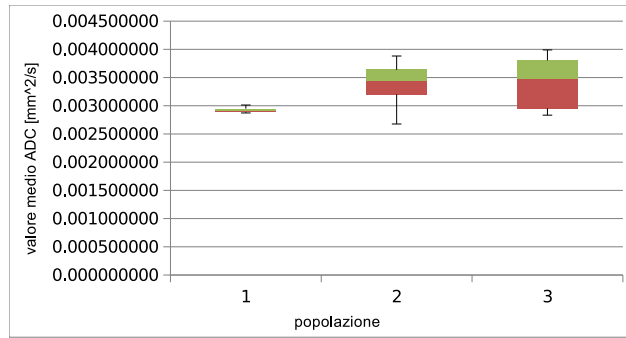
ottenendo i seguenti risultati per gli indici:

- valore medio, $F = 3.74$, $p = 0.031098$
- deviazione standard, $F = 4.73$, $p = 0.013440$
- mediana, $F = 3.75$, $p = 0.030831$
- differenza interquartile, $F = 10.51$, $p = 0.000169$.

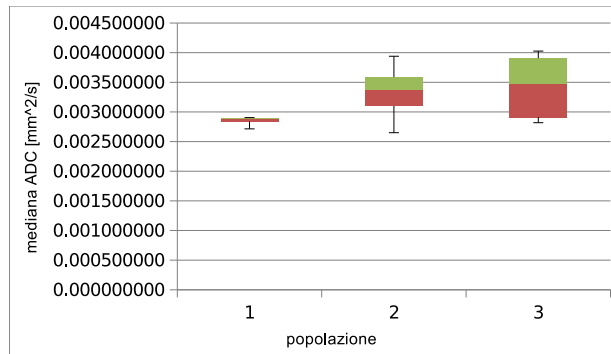
Per ogni parametro, il risultato dell'analisi statistica per $p < 0.05$ (ANOVA per misure indipendenti e Tukey HSD test) ha mostrato differenze significative tra i tre gruppi ($p < 0.01$).

7.2.4 Curve ROC

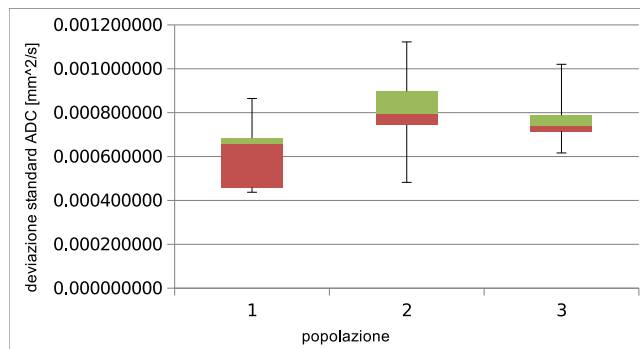
Alla luce dei risultati dell'ANOVA sugli indici calcolati, lo studio delle curve ROC (illustrato nel paragrafo 6.2.3) si è focalizzato sul parametro differenza interquartile, indice di variabilità della distribuzione dei valori i ADC all'interno delle regioni renali, per cui si è ottenuta una significatività maggiore ($p = 0.000169$).



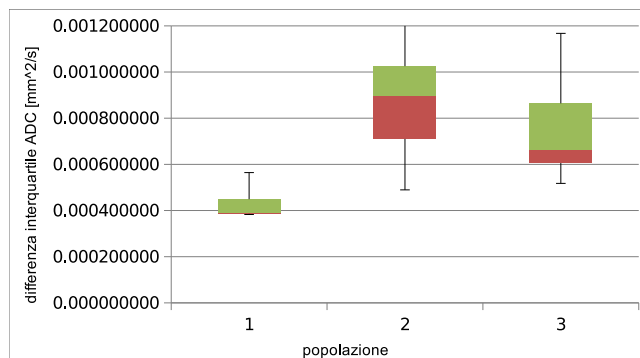
(a) valore medio ADC



(b) mediana ADC



(c) deviazione standard ADC



(d) differenza interquartile ADC

Figura 55: *Box plots* dei valori delle mappe ADC

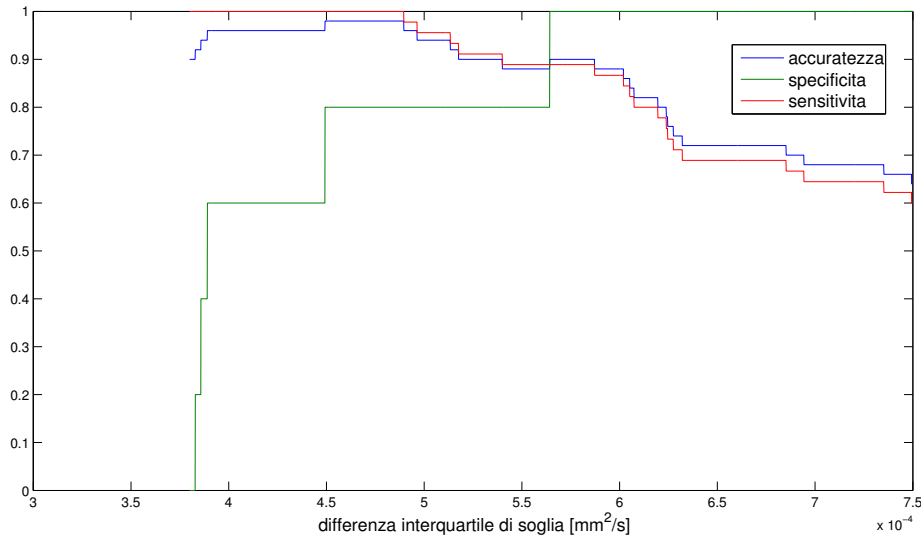
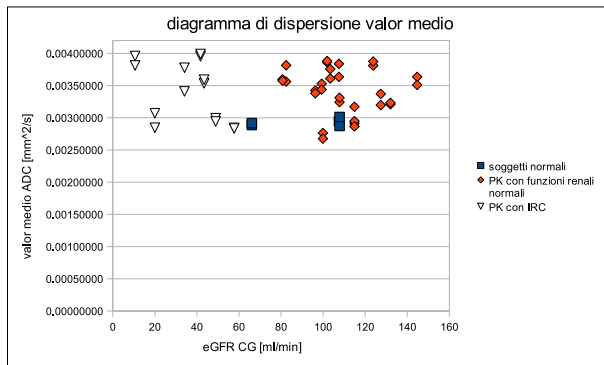


Figura 56: Curve ROC per il parametro differenza interquartile

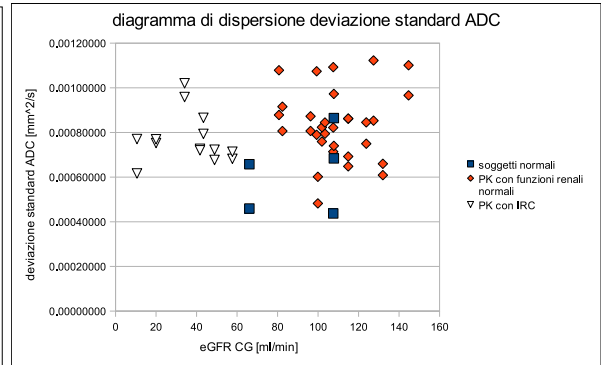
Le curve ROC hanno testato la capacità di tale indice di discriminare la presenza o l'assenza di tessuto cistico nelle regioni renali, dunque si è divisa la popolazione totale in due parti: la prima costituita dai soli soggetti della popolazione 1 (caratterizzati da assenza di tessuto cistico) e la seconda costituita dalle popolazioni 2 e 3 (caratterizzate da presenza di tessuto cistico e funzione renale rispettivamente normale e IRC). I risultati dell'analisi sono riportati in figura 56. Un valore di soglia del valore differenza interquartile deve essere scelto a seconda delle caratteristiche desiderate del *test*; se si vuole prediligere più elevata accuratezza e sensibilità si sceglieranno valori di soglia del parametro differenza interquartile compresi tra 4.5 e $5.6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}$ per i quali si hanno accuratezza e sensibilità comprese tra il 100% e l'85%, mentre specificità pari all'80%. Se si preferisce invece caratterizzare il *test* secondo un valore più elevato di specificità, si dovrà indicare come soglia del parametro un valore compreso tra 5.7 e $6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}$ per il quale si ha specificità massima pari al 100% e valori di sensibilità e accuratezza compresi tra l'85% e il 95%.

7.2.5 Analisi di correlazione tra parametri ADC e funzionalità renale

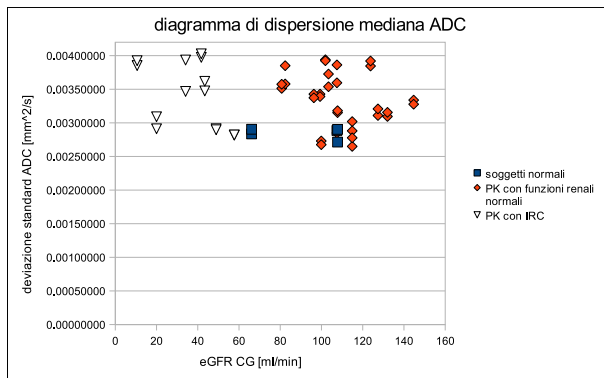
L'analisi degli indici dell'ADC si è conclusa con l'analisi di correlazione tra gli indici dell'ADC e i parametri ematochimici di funzionalità renale. Come mostrato in figura 57 i valori degli indici ADC non risultano correlati con i parametri ematochimici, in particolare in figura vengono riportati i diagrammi di dispersione degli indici dell'ADC contro la stima CG del GFR (*estimated* GFR, eGFR), mostrando valori molto variabili indipendentemente dalla relativa funzionalità renale.



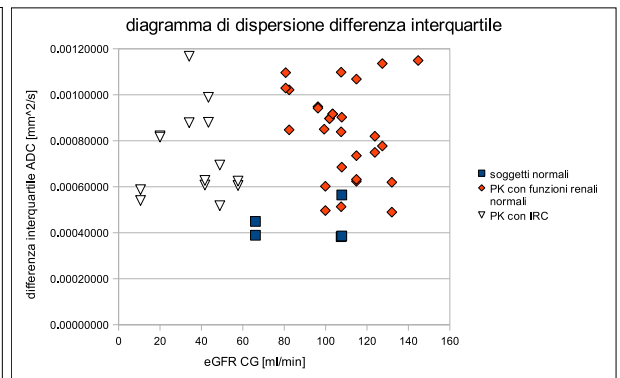
(a) valore medio



(b) deviazione standard



(c) mediana



(d) differenza interquartile

Figura 57: Diagrammi di dispersione degli indici delle mappe ADC rispetto alla stima del GFR (eGFR) mediante la formula CG

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

8.1 ANALISI VOLUMETRICA

Il valore di volume renale rappresenta per i pazienti ADPKD l'indice più caratteristico dello stato anatomico di avanzamento della patologia. La stessa diagnosi dello stato patologico viene definita tramite la detezione di reni policistici allargati bilateralmente per mezzo di diversi sistemi di *imaging*, tra cui la Risonanza Magnetica viene privilegiata per le migliori caratteristiche di risoluzione spaziale e l'assenza di radiazioni ionizzanti o mezzi di contrasto, potenzialmente nefrotossici.

Il volume renale totale aumenta nei pazienti ADPKD a causa del proliferare di tessuto cistico. Infatti, il principale elemento di patogenesi dell'ADPKD è la de-differenziazione di cellule epiteliali tubolari e la loro conseguente proliferazione. Le cisti si manifestano principalmente dai nefroni distali e dai dotti collettori; nascono come dilatazione di tubuli intatti che sono in contatto col nefrone e sono piene di filtrazione glomerulare. Durante la crescita delle cisti, il fluido cistico è formato principalmente da fluido di secrezione transepiteliale, che viene tipicamente affiancato da infiammazione interstiziale, degradazione dei componenti matriciali e iperplasia dell'epitelio cistico. Di conseguenza, in molti studi è stata ipotizzata una relazione tra le dimensioni degli organi e la relativa funzionalità renale [Grantham et al., 2006, Schrier, 2006, Fick-Brosnahan et al., 2002, Chapman et al., 2003, Lee and Lee, 2006]. Alcuni studi hanno inoltre sottolineato il fatto che la relazione tra volumetria renale e insufficienza renale di ultimo stadio non è ben definita, perché non sempre ADPKD causa insufficienza renale in pazienti che presentano reni policistici marcatamente allargati [Grantham, 1997, Gabow et al., 1993, Bae et al., 2000, Sise et al., 2000, Antiga et al., 2006, Grantham et al., 2006].

In questa tesi l'analisi dei dati ha confermato la correlazione tra il volume renale totale, stimato tramite il metodo stereologico, e i parametri ematochimici di funzionalità renale di creatinina sierica, stima di CG del GFR e stima MDRD del GFR (riportati nel paragrafo 7.1). In particolare, l'analisi ha dimostrato una forte correlazione lineare per la relazione tra volume e creatinina sierica, mentre una più forte correlazione non lineare per lo studio della relazione con le stime della velocità di filtrazione glomerulare. Quest'ultimo aspetto è facilmente interpretabile ricordando che le formule di Cockcroft-Gault e *Modification of Diet in Renal Disease* forniscono una stima del GFR e la loro espressione dipende, oltre che dai dati antropometrici, dai valori di creatinina sierica in modo non lineare, come illustrato nel capitolo 3. Questi risultati supportano

l'ipotesi che il valore di volume renale aumentato a causa dell'espansione del tessuto cistico sia quantificabile e associato ai valori di funzionalità renale; inoltre, i dati parziali sul *follow up* dei pazienti analizzati confermano la possibilità che l'aumento del volume renale sia associato con un più rapido declino delle funzioni renali. Tecniche di *imaging* di RM anatomiche sono dunque indispensabili per valutare piccole variazioni di volume renale e studiarne la relazione con variazioni della funzionalità renale. Ulteriori studi sono necessari per determinare se in pazienti ADPKD il volume renale totale o il tasso di espansione del volume possano essere un *marker* predittivo dello sviluppo di insufficienza renale.

L'analisi volumetrica sulle immagini RM anatomiche T_2 -*weighted* ha inoltre permesso di validare, per mezzo dell'analisi di correlazione e l'analisi di Bland-Altman, un metodo di segmentazione semiautomatico basato su una formulazione variazionale di un metodo *level set*, utilizzato per la segmentazione delle immagini DW e per la conseguente analisi funzionale per i 25 pazienti ADPKD. L'applicazione di tale metodica può velocizzare l'analisi delle immagini di RM e ridurre la variabilità insita nel tracciamento manuale.

8.2 ANALISI FUNZIONALE

I metodi di *imaging* di Risonanza Magnetica pesata per diffusione sono attualmente l'unico mezzo disponibile per studiare la diffusione delle molecole d'acqua nei tessuti *in vivo*; a causa del ruolo fondamentale nella filtrazione e nel riassorbimento d'acqua, il rene si presenta come un organo particolarmente interessante da studiare in termini di diffusione.

Il fenomeno di diffusione è legato non solo al moto Browniano delle molecole d'acqua all'interno dei tessuti, ma anche ad ulteriori aspetti come il fenomeno di perfusione nella rete di capillari. Secondo alcuni autori il rene presenta valori di ADC maggiori rispetto ad altri organi a causa dell'elevato flusso di sangue e della funzione di trasporto di fluidi [Muller et al., 1994b]. In generale, i valori di ADC del rene riflettono entrambi i fenomeni di diffusione e perfusione. Quando vengono applicati elevati valori del parametro b (caratteristica della sequenza di acquisizione PGSE dell'immagine DW), l'influenza della perfusione viene ampiamente soppressa e i valori di ADC approssimano la diffusione pura. Viceversa, bassi valori di b portano alla formazione di immagini influenzate sia dalla diffusione che dalla perfusione. È dunque importante scegliere il valore opportuno di questo parametro. In questo studio dunque, i valori di b (0 e $500 \frac{\text{mm}^2}{\text{ss}}$) sono stati scelti in modo da eliminare il contributo di perfusione, stimando opportunamente il coefficiente di diffusione, e in modo da garantire un sufficiente rapporto segnale rumore [Xu et al., 2007, Cova et al., 2004].

La segmentazione delle immagini DW è stata realizzata con lo scopo di definire

valori caratteristici del Coefficiente Apparente di Diffusione per i pazienti ADPKD; infatti, lo studio dell'ADC sembra essere molto promettente per la definizione di condizioni patologiche renali.

In letteratura diversi autori hanno studiato il valore di ADC nelle regioni renali in diverse condizioni patologiche, i cui principali risultati sono riassunti in tabella 5.

autori	num. soggetti	b-value ($\frac{s}{m \cdot m^2}$)	principali risultati sui valori di ADC delle regioni renali
[Muller et al., 1994a]	23	0-400	soggetti sani $3.54 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Namimoto et al., 1999]	34	0, 300	soggetti sani: $2.55 - 2.84 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, IR cronica, acuta e stenosi: $1.8 - 1.5 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Fukuda et al., 2000]	51	1.91-932	soggetti sani: $1.50 - 1.53 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$ anisotropia del rene
[Ries et al., 2001]	10	0, 195, 390	soggetti sani: $2.18 - 2.89 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Cova et al., 2004]	39	0, 500	parenchima sano: $1.72 - 2.65 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, tessuto cistico $2.87 - 4.00 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Thoeny et al., 2005]	33	0-1000	soggetti sani: $2.00 - 1.89 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, pazienti parenchimali $1.82 - 1.71 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Yoshikawa et al., 2006]	200	0, 600	soggetti sani: $2.60 - 2.67 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, IR: $2.11 - 2.15 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Thoeny et al., 2006]	30	0-900	soggetti sani: $2.5 - 2.2 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, trapiantati: $2.4 - 1.9 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Xu et al., 2007]	55	0, 500	soggetti sani: $2.87 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, pazienti con stenosi: $2.55, 2.29, 2.20 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Carbone et al., 2007]	14	0, 600	soggetti sani e stadio I: $2.44 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, stadio II-IV: $2.05 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Manganaro et al., 2009]	88	0, 200, 700	feti sani: $0.99 - 1.62 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$
[Taouli et al., 2009]	64	0, 400, 800	lesioni benigne: $2.23 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$, lesioni maligne $1.41 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$

Tabella 5: Studi sui valori ADC in diverse condizioni patologiche renali

In reni normali, appartenenti cioè alla popolazione 1, sono stati calcolati valori medi di ADC di $2.92 \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \frac{m \cdot m^2}{s}$ ed è inoltre stato definito un *range* di normalità pari a $\Delta i = 0.00262439 \frac{m \cdot m^2}{s}$.

In letteratura vengono riportati ampi *range* di dati riguardo i valori ADC nel rene umano. Come riportato in tabella 5, per primi Muller e altri hanno riportato nel 1994

valori di ADC medi pari a $3.54 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Muller et al., 1994a]; gli stessi autori hanno poi valutato l'ADC in pazienti disidratati e conseguentemente reidratati ottenendo valori di ADC rispettivamente pari a 2.88 e $3.56 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Muller et al., 1994b]. Questi valori sono consistenti con quelli trovati nel 1999 da Nanimoto e altri che hanno riportato minori valori nel tessuto corticale rispetto al tessuto midollare ($2.55 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ rispetto a $2.84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$) [Nanimoto et al., 1999]. Successivamente altri autori hanno riportato valori più bassi per l'ADC in soggetti sani: $1.50 - 1.53 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Fukuda et al., 2000], $2.00 - 1.89 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Thoeny et al., 2005], $2.60 - 2,67 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Yoshikawa et al., 2006], $2.5 - 2.2 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Thoeny et al., 2006], $2.87 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Xu et al., 2007], $2.44 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Carbone et al., 2007], $2.23 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$ [Taouli et al., 2009]. Si noti che questi dati sono relativi ad articoli pubblicati negli ultimi 15 anni utilizzando diverse unità MR (alcune disponibili in commercio e altre sperimentali) e differenti tecniche di acquisizione (diversi valori di b); tali differenze possono spiegare la variabilità dei risultati trovati. Tuttavia, i risultati ottenuti in questa tesi si collocano all'interno del *range* di valori riportati da altri autori e, in particolare, i valori sono molto simili a quelli riportati da Xu [Xu et al., 2007] e Cova [Cova et al., 2004], i quali utilizzano lo stesso valore di $b = 500 \frac{\text{mm}^2}{\text{sec}}$.

Inoltre, gli studi presentati in tabella 5 riportano diversi valori di ADC per diverse condizioni patologiche; in particolare vengono riportati valori di ADC marcatamente minori rispetto ai soggetti sani in pazienti con danno renale causato da insufficienza renale cronica o acuta.

In questo studio gli indici di ADC calcolati per le tre popolazioni considerate hanno mostrato differenze significative tra le diverse popolazioni. In particolare, i quattro indici considerati ovvero media, deviazione standard, mediana e differenza interquartile hanno mostrato valori più elevati per le popolazioni 2 e 3, dunque in presenza di tessuto cistico, rispetto ai valori calcolati per la popolazione 1. Questi risultati concordano con lo studio di Cova del 2004 in cui vengono indicati valori di ADC più elevati nel tessuto cistico rispetto ai valori di tessuto parenchimale sano [Cova et al., 2004]. Inoltre, i valori più elevati degli indici di deviazione standard e differenza interquartile sottolineano la maggiore variabilità dei valori di ADC del tessuto renale in presenza di cisti rispetto al tessuto parenchimale renale sano. In particolare per l'indice differenza interquartile, caratterizzato da maggiore significatività statistica, l'analisi delle curve ROC ha dimostrato la capacità di discriminare la condizione patologica tipica dei pazienti ADPKD.

Alcuni studi hanno inoltre analizzato la correlazione tra i valori di ADC delle regioni renali e la funzionalità renale, il cui indice più caratteristico è il GFR (o una sua stima), dimostrando la relazione tra valore di ADC e danno renale [Xu et al., 2007, Carbone et al., 2007]. Questi risultati non sono stati confermati nel presente lavoro di tesi, in cui, nonostante gli indici dell'ADC siano risultati significativamente diversi tra una popolazione e l'altra, non risultano correlati ai valori ematochimici di

creatinina sierica e GFR.

Questo lavoro si apre a numerosi sviluppi futuri. Per prima cosa, per meglio analizzare la relazione tra valori ADC e funzionalità renale in pazienti ADPKD sarebbe opportuno ampliare il numero di pazienti e la varietà di abnormalità renali associate alla patologia, così come il numero di soggetti sani per definire valori di normalità. Il *follow up* di tutti pazienti deve ancora essere completato, sia in termini di studio volumetrico che della variazione degli indici di ADC nel tempo, con lo scopo di valutare la progressione della patologia nel tempo e l'effetto di eventuali farmaci.

Inoltre, per via della limitata risoluzione spaziale delle immagini pesate per diffusione, questo studio si è limitato al calcolo del valore di ADC globale dell'intero volume renale, possibili sviluppi potrebbero studiare i valori di ADC separatamente nelle regioni corticali e midollari, per avere un'analisi più dettagliata della realtà anatomopatologica dei pazienti ADPKD. Ulteriori approfondimenti dell'argomento potrebbero derivare dallo studio della struttura tridimensionale renale per mezzo del tensore di diffusione (DTI-MR), fino ad ora principalmente usato in *fiber tracking neuro-imaging*.

Infine, anche se i valori di creatinina e di GFR sono gli indici più significativi della funzionalità renale, parametri aggiuntivi come proteinuria, riassorbimento tubulare, pressione arteriosa rappresentano aspetti della funzionalità renale che potrebbero essere indagati in relazione ai valori di volumetria e degli indici ADC.

BIBLIOGRAFIA

- DG Altman and JM Bland. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. *The statistician*, 32(3):307–317, 1983. (Citato a pagina 86.)
- L. Antiga, M. Piccinelli, G. Fasolini, B. Ene-Iordache, P. Ondei, S. Bruno, G. Remuzzi, and A. Remuzzi. Computed tomography evaluation of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: a progress report. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1(4):754, 2006. (Citato alle pagine 42, 83, e 103.)
- X.G. Arnau and L.M. Cruz-Orive. Variance prediction under systematic sampling with geometric probes. *Advances in Applied Probability*, 30(4):889–903, 1998. (Citato alle pagine 77 e 80.)
- V.I. Arnold and M. Levi. *Geometrical methods in the theory of ordinary differential equations*. Springer, 1988. (Citato a pagina 66.)
- KK Badani, AK Hemal, and M. Menon. Autosomal dominant polycystic kidney disease and pain-A review of the disease from aetiology, evaluation, past surgical treatment options to current practice. *Journal of postgraduate medicine*, 50(3):222, 2010. (Citato a pagina 11.)
- AJ Baddeley, HJ Gundersen, and LM Cruz-Orive. Estimation of surface area from vertical sections. *Journal of Microscopy*, 142(Pt 3):259, 1986. (Citato a pagina 76.)
- K.T. Bae, P.K. Commean, and J. Lee. Volumetric measurement of renal cysts and parenchyma using MRI: phantoms and patients with polycystic kidney disease. *Journal of computer assisted tomography*, 24(4):614, 2000. (Citato alle pagine 42, 83, e 103.)
- M. Bland. *Statistica medica*. Apogeo Editore, 2009. (Citato alle pagine 84, 86, e 89.)
- M. J. Bland and D.G. Altman. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 327(8476):307–310, 1986. (Citato a pagina 86.)
- R.P. Bolender. Quantitative morphology for biologists and computer scientists: I. Computer-aided tutorial for biological stereology (Version 1.0). *Microscopy Research and Technique*, 21(4):338–346, 2005. (Citato a pagina 42.)
- A.G. Bostom, F. Kronenberg, and E. Ritz. Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(8):2140, 2002. (Citato alle pagine 45 e 46.)
- C. Boucher and R. Sandford. Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD, MIM 173900, PKD1 and PKD2 genes, protein products known as polycystin-1 and polycystin-2). *European Journal of Human Genetics*, 12(5):347–354, 2004. (Citato alle pagine xv, 10, 11, e 12.)

- S.F. Carbone, E. Gaggioli, V. Ricci, F. Mazzei, M.A. Mazzei, and L. Volterrani. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the evaluation of renal function: a preliminary study. *La Radiologia Medica*, 112(8):1201–1210, 2007. (Citato alle pagine [87](#), [105](#), e [106](#).)
- V. Caselles, F. Catté, T. Coll, and F. Dibos. A geometric model for active contours in image processing. *Numerische Mathematik*, 66(1):1–31, 1993. (Citato a pagina [65](#).)
- V. Caselles, R. Kimmel, and G. Sapiro. Geodesic active contours. *International journal of computer vision*, 22(1):61–79, 1997. (Citato a pagina [65](#).)
- T.F. Chan and L.A. Vese. Active contours without edges. *IEEE Transactions on image processing*, 10(2):266–277, 2001. (Citato a pagina [65](#).)
- A.B. Chapman, L.M. Guay-Woodford, J.J. Grantham, V.E. Torres, K.T. Bae, D.A. Baumgarten, P.J. Kenney, B.F. King, J.F. Glockner, L.H. Wetzel, et al. Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort1. *Kidney international*, 64(3):1035–1045, 2003. (Citato a pagina [103](#).)
- L.D. Cohen. On active contour models and balloons. *CVGIP: Image understanding*, 53(2):211–218, 1991. (Citato a pagina [60](#).)
- S. Colagrande, S. Pallotta, A. Vanzulli, M. Napolitano, and N. Villari. The diffusion parameter in magnetic resonance: physics, techniques, and semeiotics. *La Radiologia Medica*, 109(1-2):1, 2005. (Citato a pagina [32](#).)
- M. Cova, E. Squillaci, F. Stacul, G. Manenti, S. Gava, G. Simonetti, and R. Pozzi-Mucelli. Diffusion-weighted MRI in the evaluation of renal lesions: preliminary results. *British Journal of Radiology*, 77(922):851, 2004. (Citato alle pagine [43](#), [104](#), [105](#), e [106](#).)
- L.M. Cruz-Orive. Estimating volumes from systematic hyperplane sections. *Journal of Applied Probability*, pages 518–530, 1985. (Citato a pagina [76](#).)
- LM Cruz-Orive. On the precision of systematic sampling: a review of Matheron's transitive methods. *Journal of Microscopy*, 153(3):315–333, 1989. (Citato a pagina [79](#).)
- LM Cruz-Orive. Stereology of single objects. *Journal of Microscopy*, 186(2):93–107, 2003. (Citato a pagina [76](#).)
- J.A. Deane and S. D Ricardo. Polycystic kidney disease and the renal cilium (Review Article). *Nephrology*, 12(6):559–564, 2007. (Citato alle pagine [xv](#), [12](#), [14](#), e [15](#).)
- MD Denis Le Bihan, J.F. Mangin, C. Poupon, C.A. Clark, S. Pappata, N. Molko, and MD Hughes Chabriat. Diffusion tensor imaging: concepts and applications. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 13:534–546, 2001. (Citato a pagina [35](#).)
- L.C. Evans. Partial Differential Equations (Graduate Studies in Mathematics, Vol. 19). *Instructor*, 2009. (Citato a pagina [67](#).)
- G.M. Fick-Brosnahan, M.M. Belz, K.K. McFann, A.M. Johnson, and R.W. Schrier. Relationship between renal volume growth and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: A longitudinal study* 1. *American Journal of Kidney Diseases*, 39(6):1127–1134, 2002. (Citato alle pagine [83](#) e [103](#).)

- Y. Fukuda, I. Ohashi, K. Hanafusa, T. Nakagawa, S. Ohtani, Y. An-naka, T. Hayashi, and H. Shibuya. Anisotropic diffusion in kidney: apparent diffusion coefficient measurements for clinical use. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 11(2):156–160, 2000. (Citato alle pagine 43, 105, e 106.)
- P.A. Gabow, A.M. Johnson, W.D. Kaehny, W.J. Kimberling, D.C. Lezotte, I.T. Duley, and R.H. Jones. Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, 7(2):198–198, 1993. (Citato alle pagine 42 e 103.)
- J. Gomes and O. Faugeras. Reconciling distance functions and level sets. *Scale-Space Theories in Computer Vision*, pages 70–81, 1999. (Citato a pagina 66.)
- R.C. Gonzalez, R.E. Woods, and S.L. Eddins. *Digital image processing using MATLAB*. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 2004. (Citato a pagina 95.)
- JJ Grantham. Mechanisms of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney international. Supplement*, 63:S93, 1997. (Citato alle pagine 42, 83, e 103.)
- J.J. Grantham, V.E. Torres, A.B. Chapman, L.M. Guay-Woodford, K.T. Bae, B.F. King Jr, L.H. Wetzel, D.A. Baumgarten, P.J. Kenney, P.C. Harris, et al. Volume progression in polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine*, 354(20):2122, 2006. (Citato alle pagine 42, 83, e 103.)
- H. Gray and P.L. Williams. *Anatomia del Gray*. Zanichelli, 1989. (Citato alle pagine xv, 3, 4, 5, e 6.)
- N. Grenier, F. Basseau, M. Ries, B. Tyndal, R. Jones, and C. Moonen. Functional MRI of the kidney. *Abdominal imaging*, 28(2):164–175, 2003. (Citato a pagina 32.)
- C.L.C.X.C. Gui and MD Fox. Level set evolution without re-initialization: A new variational formulation. In *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2005. CVPR 2005*, volume 1, 2005. (Citato alle pagine xvi, 64, 66, 69, 70, e 71.)
- HJ Gundersen and EB Jensen. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, 147(Pt 3):229, 1987. (Citato a pagina 79.)
- HJG Gundersen. Stereology and sampling of biological surfaces. *Analysis of Organic and Biological Surfaces*, pages 477–506, 1984. (Citato a pagina 76.)
- AC Guyton and JE Hall. *Fisiologia medica*. 2003. (Citato alle pagine 3, 4, 7, e 8.)
- EL Hahn. Spin echoes. *Phys. Rev Phys Rev*, 80:580, 1950. (Citato a pagina 33.)
- J.P. Hornak. The basics of MRI. *Web book available at < http://www. cis. rit. edu/htbooks/mri >*, 17, 2007. (Citato alle pagine xv, xvii, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 34.)
- B.T. Hyman, T. Gomez-Isla, and M.C. Irizarry. Stereology: a practical primer for neuropathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57(4):305, 1998. (Citato a pagina 42.)
- P. Igarashi and S. Somlo. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(9):2384, 2002. (Citato a pagina 12.)

- M. Kass, A. Witkin, and D. Terzopoulos. Snakes: Active contour models. *International journal of computer vision*, 1(4):321–331, 1988. (Citato alle pagine 50 e 60.)
- M.S. Keshavan, S. Anderson, C. Beckwith, K. Nash, J.W. Pettegrew, and K.R.R. Krishnan. A comparison of stereology and segmentation techniques for volumetric measurements of lateral ventricles in magnetic resonance imaging. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 61(1):53–60, 1995. (Citato a pagina 42.)
- BP Kreft, H. Muller-Miny, T. Sommer, A. Steudel, M. Vahlensieck, D. Novak, BG Muller, and HH Schild. Diagnostic value of MR imaging in comparison to CT in the detection and differential diagnosis of renal masses: ROC analysis. *European Radiology*, 7(4):542–547, 1997. (Citato a pagina 32.)
- M. Ladekarl, V. Jensen, and B. Nielsen. Stereologic estimation of breast tumor size. *Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, 18(2):151, 1996. (Citato a pagina 42.)
- D. Le Bihan, E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis, and M. Laval-Jeantet. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*, 161(2):401, 1986. (Citato alle pagine 37 e 38.)
- D. Le Bihan, E. Breton, D. Lallemand, ML Aubin, J. Vignaud, and M. Laval-Jeantet. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*, 168(2):497, 1988. (Citato alle pagine xv, 36, 37, e 39.)
- D. Le Bihan, R. Turner, P. Douek, and N. Patronas. Diffusion MR imaging: clinical applications. *American Journal of Roentgenology*, 159(3):591, 1992. (Citato a pagina 32.)
- YR Lee and K.B. Lee. Reliability of magnetic resonance imaging for measuring the volumetric indices in autosomal-dominant polycystic kidney disease: Correlation with hypertension and renal function. *Nephron Clinical Practice*, 103(4):c173–c180, 2006. (Citato a pagina 103.)
- A.S. Levey, J.P. Bosch, J.B. Lewis, T. Greene, N. Rogers, and D. Roth. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Annals of internal medicine*, 130(6):461, 1999. (Citato a pagina 46.)
- A.S. Levey, J. Coresh, E. Balk, A.T. Kausz, A. Levin, M.W. Steffes, R.J. Hogg, R.D. Perrone, J. Lau, and G. Eknoyan. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*, 139(2):137, 2003. (Citato alle pagine xvii e 46.)
- Z.P. Liang and P.C. Lauterbur. *Principles of magnetic resonance imaging: a signal processing perspective*. SPIE Optical Engineering Press, 1999. (Citato alle pagine xvii, 24, 25, 28, e 29.)
- J. Lin, E.L. Knight, M.L. Hogan, and A.K. Singh. A comparison of prediction equations for estimating glomerular filtration rate in adults without kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(10):2573, 2003. (Citato alle pagine 45 e 46.)
- S.S. Mader. *Understanding human anatomy & physiology*. The McGraw-Hill Companies, 2004. (Citato alle pagine xv, 3, 4, e 7.)

- R. Magistrone, L. Furci, M. Leonelli, M. Ballestri, G. Ligabue, C. Martino, C. Scapoli, and A. Albertazzi. I polimorfismi del gene dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) nel rene policistico autosomico dominante (ADPKD). *Giornale Italiano di Nefrologia*, 18:677–682, 2001. (Citato a pagina 18.)
- R. Malladi and JA Sethian. Image processing via level set curvature flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15):7046, 1995. (Citato alle pagine 60, 62, e 65.)
- R. Malladi and JA Sethian. A unified approach to noise removal, image enhancement, and shaperecovery. *IEEE Transactions on Image Processing*, 5(11):1554–1568, 1996. (Citato a pagina 62.)
- R. Malladi, J. Sethian, and B. Vemuri. Evolutionary fronts for topology-independent shape modeling and recovery. *Computer Vision–ECCV'94*, pages 1–13. (Citato a pagina 62.)
- R. Malladi, J.A. Sethian, and B.C. Vemuri. Shape Modeling with Front Propagation: A Level Set Approach. *IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE*, 17(2), 1995. (Citato alle pagine xvi, 60, 62, 63, e 65.)
- C.A. Mandarim-de Lacerda. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75:469–486, 2003. (Citato alle pagine xvi e 78.)
- L. Manganaro, A. Francioso, S. Savelli, A. Tomei, F. Fierro, M. Di Maurizio, F. Coratella, A. Perrone, L. Ballesio, A. Giancotti, et al. Fetal MRI with diffusion-weighted imaging (DWI) and apparent diffusion coefficient (ADC) assessment in the evaluation of renal development: preliminary experience in normal kidneys. *La Radiologia Medica*, 114(3):403–413, 2009. (Citato a pagina 105.)
- D. Marr and E. Hildreth. Theory of edge detection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 207(1167):187–217, 1980. (Citato a pagina 50.)
- G. Matheron. *Les variables régionalisées et leur estimation*. Masson et Cie, 1965. (Citato a pagina 79.)
- G. Matheron. *The theory of regionalized variables and its applications*. École nationale supérieure des mines, 1971. (Citato a pagina 79.)
- PAP Moran. Numerical integration by systematic sampling. In *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, volume 46, pages 111–115. Cambridge Univ Press, 2008. (Citato a pagina 79.)
- MF Muller, P. Prasad, B. Siewert, MA Nissenbaum, V. Raptopoulos, and RR Edelman. Abdominal diffusion mapping with use of a whole-body echo-planar system. *Radiology*, 190(2):475, 1994a. (Citato alle pagine 105 e 106.)
- MF Muller, PV Prasad, D. Bimmler, A. Kaiser, and RR Edelman. Functional imaging of the kidney by means of measurement of the apparent diffusion coefficient. *Radiology*, 193(3):711, 1994b. (Citato alle pagine 32, 39, 43, 87, 104, e 106.)
- T. Namimoto, Y. Yamashita, K. Mitsuzaki, Y. Nakayama, Y. Tang, and M. Takahashi. Measurement of the apparent diffusion coefficient in diffuse renal disease by diffusion-weighted echo-planar MR imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 9(6):832–837, 1999. (Citato alle pagine 39, 43, 87, 105, e 106.)

- A.C.M. Ong and P.C. Harris. Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex. *Kidney international*, 67(4):1234–1247, 2005. (Citato a pagina 12.)
- S. Osher and R.P. Fedkiw. *Level set methods and dynamic implicit surfaces*. Springer Verlag, 2003. (Citato alle pagine xv, xvi, 53, 54, 66, e 68.)
- S. Osher and J.A. Sethian. Fronts propagating with curvature-dependent speed: algorithms based on Hamilton-Jacobi formulations. *Journal of computational physics*, 79(1):12–49, 1988. (Citato alle pagine xvi, 49, 56, e 59.)
- G. Pavlik, A. Rackl, and R.J. Bing. Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in-vivo microscopic study. *Brain Res*, 208:35–38, 1981. (Citato a pagina 37.)
- G.J. Pazour. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(10):2528, 2004. (Citato a pagina 12.)
- Y. Pei. A ‘two-hit’ model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease? *Trends in Molecular Medicine*, 7(4):151–156, 2001. (Citato alle pagine xv, 12, e 15.)
- Y. Pei. Diagnostic approach in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 1(5):1108, 2006. (Citato alle pagine 10 e 42.)
- D. Peng, B. Merriman, S. Osher, H. Zhao, and M. Kang. A PDE-based fast local level set method. *Journal of Computational Physics*, 155(2):410–438, 1999. (Citato a pagina 66.)
- K.P. Pruessmann, M. Weiger, M.B. Scheidegger, and P. Boesiger. SENSE: sensitivity encoding for fast MRI. *Magnetic Resonance in Medicine*, 42(5):952–962, 1999. (Citato a pagina 31.)
- D. Ravine, L. Sheffield, DM Danks, RN Gibson, RG Walker, and P. Kincaid-Smith. Evaluation of ultrasonographic diagnostic criteria for autosomal dominant polycystic kidney disease 1. *The Lancet*, 343(8901):824–827, 1994. (Citato alle pagine 21 e 43.)
- M. Ries, R.A. Jones, F. Basseau, C.T.W. Moonen, and N. Grenier. Diffusion tensor MRI of the human kidney. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 14(1):42–49, 2001. (Citato alle pagine 35 e 105.)
- N. Roberts, MJ Puddephat, and V. McNulty. The benefit of stereology for quantitative radiology. *British Journal of Radiology*, 73(871):679, 2000. (Citato alle pagine xvi, 42, 76, e 78.)
- R.W. Schrier. Optimal care of autosomal dominant polycystic kidney disease patients (Review Article). *Nephrology*, 11(2):124–130, 2006. (Citato alle pagine 10 e 103.)
- JA Sethian. Curvature flow and entropy conditions applied to grid generation. *J. Comp. Phys*, 1994. (Citato a pagina 50.)

- JA Sethian. Level set methods: An act of violence. *American Scientist*, 85(3):12–35, 1997. (Citato alle pagine [xvi](#), [49](#), e [57](#).)
- J.A. Sethian and J. Straint. Crystal growth and dendritic solidification* 1. *Journal of Computational Physics*, 98(2):231–253, 1992. (Citato alle pagine [61](#) e [63](#).)
- J.A. Sethian et al. *Level set methods and fast marching methods*. Cambridge university press Cambridge, 1999. (Citato alle pagine [xv](#), [xvi](#), [49](#), [51](#), [55](#), [65](#), [66](#), e [70](#).)
- C. Sise, M. Kusaka, L.H. Wetzel, F. Winklhofer, B.D. Cowley, L.T. Cook, M. Gordon, and J.J. Grantham. Volumetric determination of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease by computed tomography. *Kidney international*, 58(6):2492–2501, 2000. (Citato alle pagine [42](#), [83](#), e [103](#).)
- T.D.J. Smilde, D.J. van Veldhuisen, G. Navis, A.A. Voors, and H.L. Hillege. Drawbacks and prognostic value of formulas estimating renal function in patients with chronic heart failure and systolic dysfunction. *Circulation*, 114(15):1572, 2006. (Citato a pagina [45](#).)
- G.J. Stanisz, E.E. Odobina, J. Pun, M. Escaravage, S.J. Graham, M.J. Bronskill, and R.M. Henkelman. T₁, T₂ relaxation and magnetization transfer in tissue at 3T. *Magnetic Resonance in Medicine*, 54(3):507–512, 2005. (Citato alle pagine [28](#) e [31](#).)
- EO Stejskal and JE Tanner. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The Journal of Chemical Physics*, 42(1):288, 1965. (Citato a pagina [33](#).)
- J. Stoves, E.J. Lindley, M.C. Barnfield, M.T. Burniston, and C.G. Newstead. MDRD equation estimates of glomerular filtration rate in potential living kidney donors and renal transplant recipients with impaired graft function. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(11):2036, 2002. (Citato a pagina [45](#).)
- M. Sussman and E. Fatemi. An efficient, interface-preserving level set redistancing algorithm and its application to interfacial incompressible fluid flow. *SIAM Journal on Scientific Computing*, 20(4):1165–1191, 1999. (Citato a pagina [66](#).)
- B. Taouli, R.K. Thakur, L. Mannelli, J.S. Babb, S. Kim, E.M. Hecht, V.S. Lee, and G.M. Israel. Renal Lesions: Characterization with Diffusion-weighted Imaging versus Contrast-enhanced MR Imaging¹. *Radiology*, 251(2):398, 2009. (Citato alle pagine [105](#) e [106](#).)
- H.C. Thoeny, F. De Keyzer, R.H. Oyen, and R.R. Peeters. Diffusion-weighted MR Imaging of Kidneys in Healthy Volunteers and Patients with Parenchymal Diseases: Initial Experience¹. *Radiology*, 235(3):911, 2005. (Citato alle pagine [105](#) e [106](#).)
- H.C. Thoeny, D. Zumstein, S. Simon-Zoula, U. Eisenberger, F. De Keyzer, L. Hofmann, P. Vock, C. Boesch, F.J. Frey, and P. Vermathen. Functional Evaluation of Transplanted Kidneys with Diffusion-weighted and BOLD MR Imaging: Initial Experience¹. *Radiology*, 241(3):812, 2006. (Citato alle pagine [105](#) e [106](#).)
- V.E. Torres, P.C. Harris, and Y. Pirson. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Lancet*, 369(9569):1287–1301, 2007. (Citato alle pagine [12](#) e [42](#).)

- S.O. Unverdi and G. Tryggvason. A front-tracking method for viscous, incompressible, multi-fluid flows. *Journal of Computational Physics*, 100(1):25–37, 1992. (Citato a pagina [51](#).)
- B. Vemuri and Y. Chen. Joint image registration and segmentation. *Geometric level set methods in imaging, vision, and graphics*, pages 251–269, 2003. (Citato alle pagine [65](#) e [68](#).)
- G. Verswijvel and R. Oyen. Magnetic resonance imaging in the detection and characterization of renal diseases. *Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation*, 15(3): 283–299, 2004. (Citato a pagina [29](#).)
- A. Vijay, A. Vijay, and P. Pankaj. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Comprehensive Review. *Int J Nephrol Urol*, 2(1):172–192, 2010. (Citato alle pagine [10](#), [12](#), [15](#), [18](#), [42](#), e [83](#).)
- DP Wallace, YP Hou, ZL Huang, E. Nivens, L. Savinkova, T. Yamaguchi, and M. Bilgen. Tracking kidney volume in mice with polycystic kidney disease by magnetic resonance imaging. *Kidney international*, 73(6):778–781, 2008. (Citato a pagina [29](#).)
- K. Wieczorowska-Tobis, Z.I. Niemir, P. Guzik, A. Breborowicz, and D.G. Oreopoulos. Difference in estimated GFR with two different formulas in elderly individuals. *International urology and nephrology*, 38(2):381–385, 2006. (Citato a pagina [45](#).)
- GA Wright. Magnetic Resonance Imaging, from basic principles to imaging principles. *IEEE Signal Processing Magazine*, 14(1):56–66, 1997. (Citato alle pagine [24](#) e [25](#).)
- Y. Xu, X. Wang, and X. Jiang. Relationship between the renal apparent diffusion coefficient and glomerular filtration rate: preliminary experience. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 26(3):678–681, 2007. (Citato alle pagine [43](#), [87](#), [104](#), [105](#), e [106](#).)
- T. Yoshikawa, H. Kawamitsu, D.G. Mitchell, Y. Ohno, Y. Ku, Y. Seo, M. Fujii, and K. Sugimura. ADC measurement of abdominal organs and lesions using parallel imaging technique. *American Journal of Roentgenology*, 187(6):1521, 2006. (Citato alle pagine [105](#) e [106](#).)
- H.K. Zhao, T. Chan, B. Merriman, and S. Osher. A variational level set approach to multiphase motion. *Journal of computational physics*, 127(1):179–195, 1996. (Citato a pagina [65](#).)