

UNIVERSITÀ DI PADOVA



FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Attività formativa: elaborato

**ECOGRAFIA CON MEZZO DI  
CONTRASTO DELLE PICCOLE  
ARTICOLAZIONI: ANALISI CINETICA**

Laureando: Matteo Tonietto

Relatore: Prof. Enrico Grisan

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

12 febbraio 2010

Anno Accademico 2009-2010



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1. ALTERAZIONI VASCOLARI NELL'ARTRITE.....	2
1.1.1. Neoangiogenesi e flusso.....	5
1.2. ECOGRAFIA.....	6
1.2.1. Mezzi di contrasto ecografici.....	7
1.2.2. L'ecografia nello studio dell'artrite.....	9
<b>2. ACQUISIZIONE DATI.....</b>	<b>13</b>
<b>3. SCOPO.....</b>	<b>17</b>
<b>4. MODELLO.....</b>	<b>19</b>
4.1. DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA DEL MODELLO.....	20
4.1.1. Funzione Gamma-variata.....	20
4.1.2. Descrizione dell'errore nei dati.....	21
4.2. STIMA DEI PARAMETRI.....	22
<b>5. PRE-PROCESSING.....</b>	<b>25</b>
5.1. DATA REDUCTION.....	25
5.1.1. Riduzione dell'intervallo temporale di osservazione.....	26
5.1.2. Riduzione dell'intervallo spaziale di osservazione.....	27
5.1.3. Resize dei frame.....	28
5.1.4. Decimazione temporale.....	30
5.2. COMPENSAZIONE ERRORI.....	33
5.2.1. Registrazione di ogni frame rispetto al frame iniziale.....	34
5.2.2. Registrazione dell'anatomica con il primo frame del filmato.....	36
5.2.3. Normalizzazione dei dati rispetto all'osso.....	37
<b>6. STIMA DEI PARAMETRI.....</b>	<b>39</b>
6.1. CRITERI DI RICONOSCIMENTO DEL RUMORE.....	40
6.2. ALGORITMO DI FITTING.....	41
<b>7. DISCUSSIONE.....</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>47</b>



## **1. INTRODUZIONE**

Le articolazioni della mano possono essere sede di diversi processi patologici che vanno dall'osteoartrosi fino alle varie forme di artriti, con conseguenze variabili da semplici artralgie a deformazioni anche gravi, causa di invalidità.

La possibilità di identificare precocemente una artrite e di definirne il tipo e il grado di attività, può permettere di impostare una terapia adeguata, di monitorarla nel tempo e quindi di prevenire i danni causati dalla malattia bloccandone l'evoluzione.

Il miglioramento degli interventi terapeutici e l'utilizzo di nuovi e potenti farmaci nella terapia dell'artrite reumatoide (RA), fanno sentire l'esigenza di un migliore approccio clinico all'artrite, in particolare per quanto riguarda la diagnosi, l'attività di malattia e il monitoraggio della terapia.

La RA è una malattia cronica autoimmune caratterizzata da infiammazione sistemica e danno articolare, che colpisce circa l'1% della popolazione [1]. Le articolazioni più precocemente e frequentemente colpite sono le metacarpofalangee (MCF) e le interfalangee prossimali (IFP). Il riscontro di alterazioni in queste articolazioni può essere considerato indice di danno articolare diffuso.

La radiologia tradizionale riveste un ruolo centrale nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia, essa infatti consente di valutare la morfologia e la struttura dei capi ossei ed è ancora utilizzata come criterio classificativo ACR della RA dal 1987.

Negli ultimi anni, tuttavia, è stato dimostrato che nelle fasi precoci il primo segno ad apparire è la sinovite e solo successivamente si consolida il danno osseo.

Un evento cruciale nella patogenesi del danno articolare nella RA consiste nella formazione del panno e la neoangiogenesi è una condizione molto precoce che accompagna l'iperplasia sinoviale, con conseguente distruzione di cartilagine e osso. La vascolarizzazione sinoviale sembra correlare con l'attività e l'aggressività del panno reumatoide. Da qui la necessità di avere tecniche di imaging sensibili, capaci di valutare il grado e l'estensione della neovascolarizzazione intraarticolare, non visualizzabile attraverso la radiografia tradizionale.

I primi tentativi di rilevare l'infiammazione e la proliferazione sinoviale attuati attraverso indagini di risonanza magnetica (MRI) hanno dimostrato che alcune alterazioni della sinovia correlano con l'evoluzione del danno articolare. Successivamente l'uso di mezzo di contrasto ha permesso di ottenere maggiori informazioni sulla presenza di vasi nello spazio sinoviale. La MRI è però un esame lungo, costoso, e presenta controindicazioni nel caso di impianti metallici, elettronici e nel caso di pazienti disabili o claustrofobici.

Tra le nuove strategie diagnostiche, l'ecografia appare una tecnica molto promettente, che tuttavia non ha ancora raggiunto un grado di validazione e standardizzazione adeguato.

### **1.1. ALTERAZIONI VASCOLARI NELL'ARTRITE**

Nella RA c'è un incremento elevato della quota del turnover vascolare. La flogosi e l'ipossia localizzata può stimolare l'angiogenesi e una vascolarizzazione immatura. A sua volta la vascolarizzazione può favorire e consolidare la flogosi ed il danno articolare. La densità media dei vasi aumenta e il lining sinoviale diviene iperplastico. La redistribuzione vascolare potrebbe spiegare la riduzione nel numero di vasi vicino allo strato del lining sinoviale.

L'angiogenesi nella RA è controllata da una varietà di fattori e molti di questi sono stati trovati anche nella sinovia e nel panno sinoviale. La modulazione di tali fattori può influenzare la vascolarizzazione e la crescita del panno stesso. Uno sbilanciamento tra fattori angiogenetici ed inibitori dell'angiogenesi porta all'attivazione delle cellule endoteliali, con conseguente secrezione di proteasi e degradazione della membrana basale e della matrice tessutale. Le cellule endoteliali proliferano dando origine a nuovi vasi che crescono perpendicolarmente dal capillare di origine ("sprout capillare") e si fondono tra di loro o con un altro vaso. A questo punto il processo si ripete con una seconda generazione di sprouts dei capillari, fino alla cessazione dello stimolo (Fig. 1.1). I vasi neo formati permettono un maggiore scambio di metaboliti e nutrienti; le cellule endoteliali esprimono molecole di adesione e molecole MHC di classe II che sono in grado di produrre ed interagire con i mediatori dell'infiammazione, di modulare l'attivazione piastrinica e la coagulazione e

di produrre radicali liberi dell'OZ(Fig. 1.2). Tutto questo avvalora l'ipotesi che la neoangiogenesi sia fondamentale nel favorire il mantenimento e la crescita del panno, nel mantenimento dell'infiammazione e nell'attivazione del sistema immunitario, contribuendo direttamente al danno cartilagineo ed articolare.

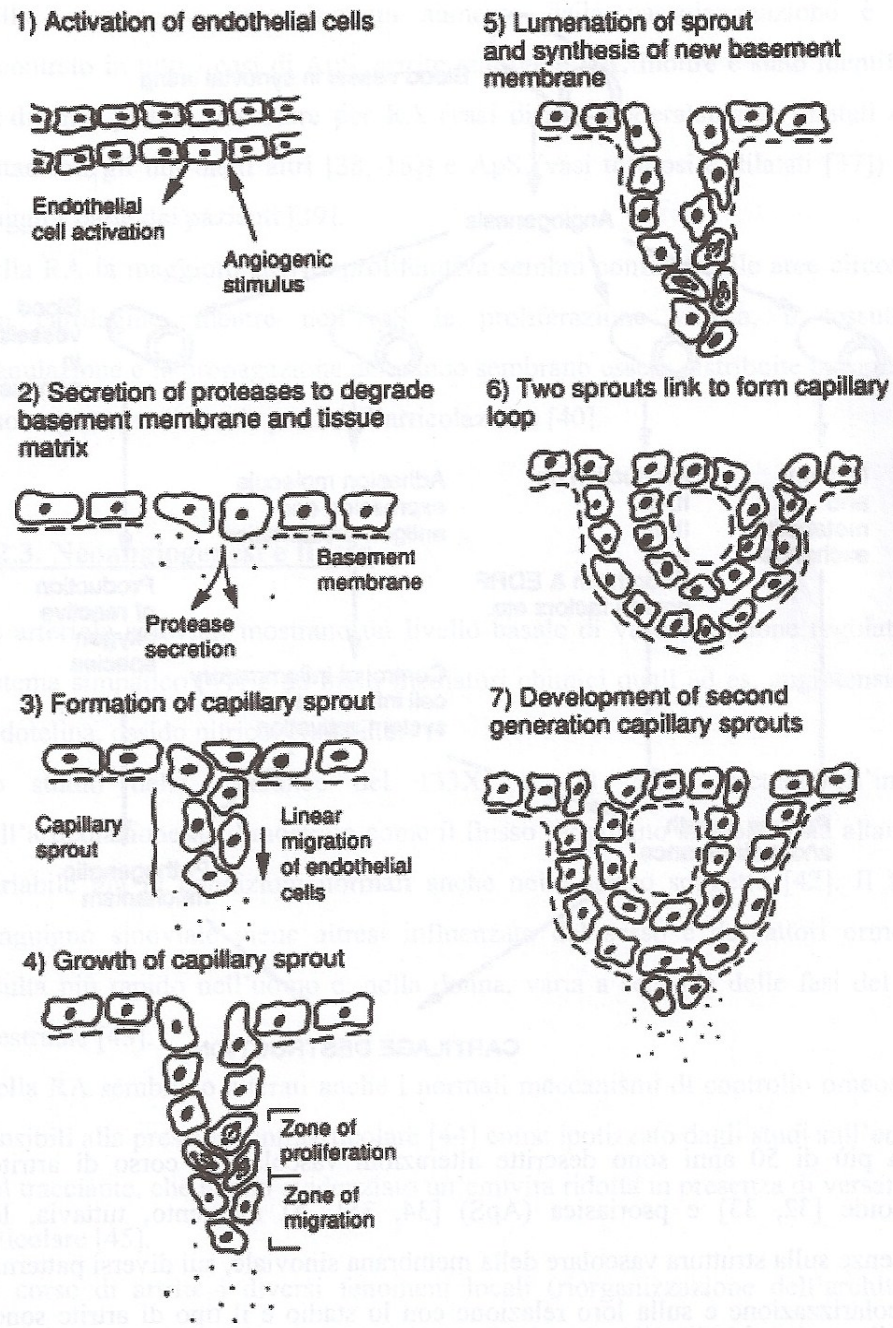
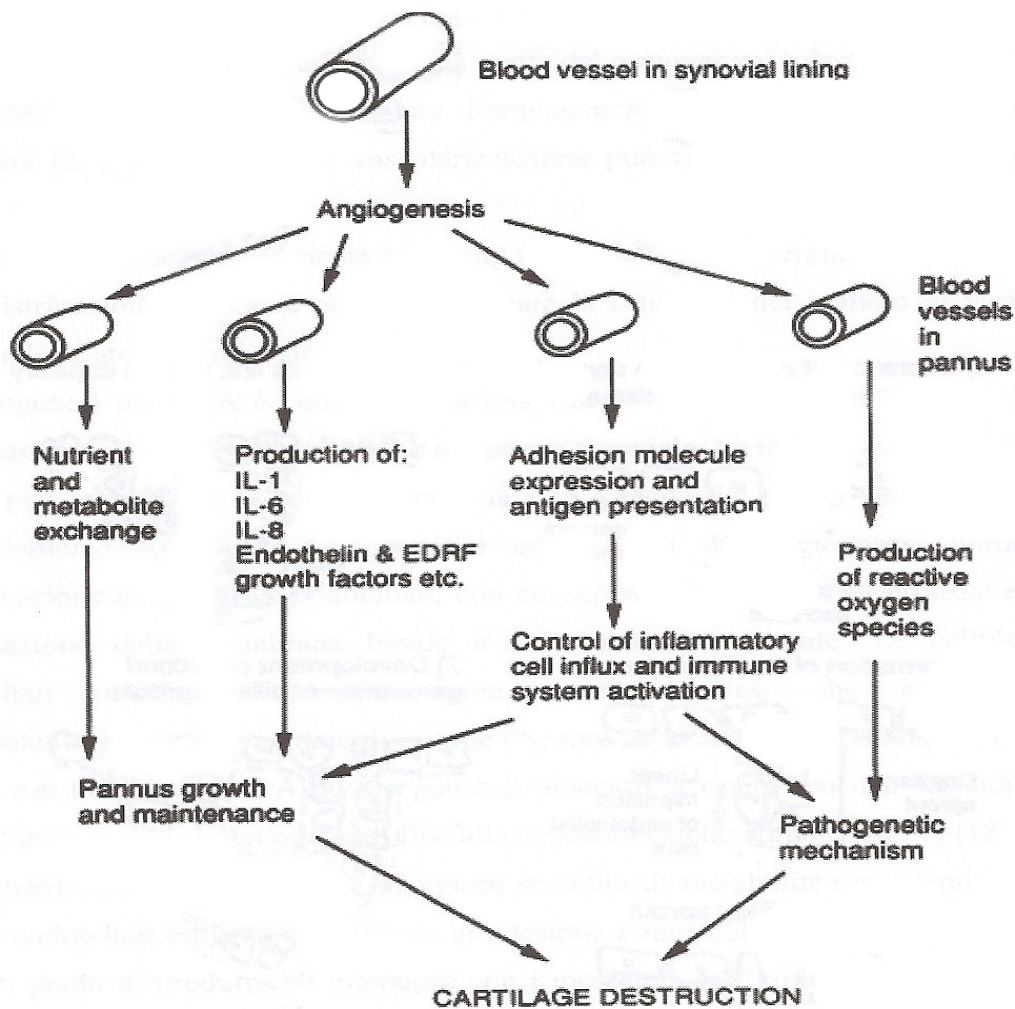


Figura 1.1: sprout capillare e neoangiogenesi [7]



*Figura 1.2: neoangiogenesi e danno cartilagineo [7]*

Già da più di 50 anni sono descritte alterazioni vascolari in corso di artrite reumatoide e psoriasica (ApS). Al momento, tuttavia, le conoscenze sulla struttura vascolare della membrana sinoviale, sui diversi patterns di vascolarizzazione e sulla loro relazione con lo stadio e il tipo di artrite sono molto scarse. Tutte le informazioni derivano da esami micro e macroscopici ottenuti con procedure invasive (biopsia, artroscopia, operazioni a cielo aperto) soprattutto dalle grandi articolazioni, più facilmente accessibili per questa tipologia di esami.

Nella sinovite del ginocchio un aumento della vascolarizzazione è stato riscontrato in tutti i casi di ApS, artrite reattiva e RA, Inoltre è stato identificato un distinto pattern vascolare per RA (vasi diritti, moderatamente dilatati e più distanziati gli uni dagli altri) e ApS (vasi



tortuosi e dilatati) nella maggior parte dei pazienti. Nella RA la maggiore attività proliferativa sembra confinata alle aree circostanti alla cartilagine, mentre nell'ApS la proliferazione villosa, il tessuto di granulazione e la propagazione del panno sembrano essere distribuite in modo più disomogeneo nelle varie parti dell'articolazione.

### **1.1.1. Neoangiogenesi e flusso**

Le arteriole sinoviali mostrano un livello basale di vasocostrizione regolato dal sistema simpatico e da molti mediatori chimici quali ad es. angiotensina II, endotelina, ossido nitrico, citochine.

Lo studio della clearance del  $^{133}\text{Xe}$  e del  $^{24}\text{Na}$  iniettati all'interno dell'articolazione ha dimostrato come il flusso sanguigno articolare sia altamente variabile già in condizioni normali anche nello stesso soggetto. Il flusso sanguigno sinoviale viene inoltre influenzato dal sesso e da fattori ormonali: risulta più rapido nell'uomo e, nella donna, varia a seconda delle fasi del ciclo mestruale.

Nella RA sembrano alterati anche i normali meccanismi di controllo omeostatici sensibili alla pressione intraarticolare come ipotizzato dagli studi sull'emivita del tracciante, che hanno evidenziato un'emivita ridotta in presenza di versamento articolare.

In corso di artrite i diversi fenomeni locali (riorganizzazione dell'architettura vascolare, aumento della pressione intraarticolare, mediatori chimici) modificano il flusso sanguigno articolare; per tale motivo la misurazione del flusso sanguigno articolare è stata proposta da alcuni autori come indicatore per definire la malattia e la severità della sinovite.

Il flusso sanguigno nell'articolazione, può essere misurato attraverso tecniche diverse, ognuna delle quali presenta dei vantaggi e delle limitazioni, ad esempio il doppler permette di studiare il flusso del macrocircolo in una piccola area, mentre la scintigrafia dà informazione su più articolazioni, ma non può essere focalizzata su una regione particolare di un tessuto. La RMN con Gadolinio permette una migliore visione del microcircolo in più sedi contemporaneamente, ma ha una definizione dei particolari minore rispetto all'ecografia.

## 1.2. ECOGRAFIA

L'ecografia o ecotomografia è un sistema di indagine diagnostica medica non invasivo che si basa sull'emissione di eco e sulle proprietà della trasmissione delle onde ultrasonore nei tessuti. L'ecografia è, in ogni caso, operatore-dipendente, poiché vengono richieste particolari doti di manualità e spirito di osservazione, oltre a cultura dell'immagine ed esperienza clinica.

Gli ultrasuoni utilizzati sono compresi tra i 2 e i 20 MHz. La frequenza è scelta tenendo in considerazione che frequenze maggiori hanno maggiore potere risolutivo dell'immagine, ma penetrano meno in profondità.

Le onde sono generate da un cristallo piezoceramico inserito in una sonda mantenuta a diretto contatto con la pelle del paziente con l'interposizione di un apposito gel (che elimina l'aria interposta tra sonda e cute del paziente, permettendo agli ultrasuoni di penetrare nel segmento anatomico esaminato); la stessa sonda è in grado di raccogliere il segnale di ritorno, che viene opportunamente elaborato da un computer e presentato su un monitor.

Quando l'onda raggiunge un punto di variazione dell'impedenza acustica, può essere riflessa, rifratta, diffusa, attenuata. La percentuale riflessa porta informazioni sulla differenza di impedenza tra i due tessuti ed è pari a:

$$R = \frac{(Z_1 - Z_2)^2}{(Z_1 + Z_2)^2}$$

Vista la grande differenza di impedenza tra un osso ed un tessuto, con l'ecografia non è possibile vedere dietro di esso. Anche zone di aria o gas ( $Z$  piccolo) fanno "ombra", per via di una riflessione totale.

Il tempo impiegato dall'onda per percorrere il percorso di andata, riflessione e ritorno viene fornito al computer, che calcola la profondità da cui è giunta l'eco; questo punto si riferisce ad una superficie di suddivisione tra tessuti.

Sostanzialmente un ecografo è costituito da tre parti:

- 1) una sonda che trasmette e riceve il segnale
- 2) un sistema elettronico che:
  - a) pilota il trasduttore
  - b) genera l'impulso di trasmissione
  - c) riceve l'eco di ritorno alla sonda
  - d) tratta il segnale ricevuto
- 3) un sistema di visualizzazione

Si possono ottenere diverse rappresentazioni delle strutture oggetto di esame a seconda delle elaborazioni effettuate sul segnale in output dalla sonda

Modo A (modulazione di ampiezza): ogni eco viene presentata come un picco la cui ampiezza corrisponde all'intensità dell'eco stessa.

Modo B (modulazione di luminosità): ogni eco viene presentata come un punto luminoso la cui tonalità di grigio è proporzionale all'intensità dell'eco.

Modo real-time: le onde sono emesse e raccolte in direzioni diverse in sequenza, in modo da poter associare ad ogni istante una direzione. In questo modo è possibile avere un'immagine contemporaneamente su tutto il campo di osservazione. La maggior parte degli ecografi attuali opera in questo modo.

Modo M (motion scan): È una rappresentazione in modo B, ma con la caratteristica aggiuntiva di essere cadenzata; viene utilizzata allo scopo di visualizzare sullo schermo in tempo reale la posizione variabile di un ostacolo attraverso l'eco da esso prodotta.

### **1.2.1. Mezzi di contrasto ecografici**

I mezzi di contrasto sono sostanze esogene che possono essere somministrate sia per via endovenosa sia in cavità, per aumentare il segnale ultrasonografico. Se introdotte per via endovenosa, si distribuiscono con il sangue a tutti gli organi e possono generare variazioni delle caratteristiche tessutali in termini di riflettività e assorbimento del fascio di ultrasuoni.

La farmacocinetica dei mdc ultrasonografici è differente da quella degli altri mdc per radiologia o RM, perché non si distribuiscono nei liquidi tissutali ma rimangono nei vasi ("blood pool") o nelle cavità.

Vengono usati sono per valutare meglio cavità o strutture vascolari e per incrementare la rivelabilità dei flussi all'analisi Doppler o color-Doppler. Gli apparecchi di nuova generazione, permettono la rilevazione del mezzo di contrasto anche senza l'effetto Doppler, utilizzando metodiche digitali (es. C- cube®, Pulse Inversion®, Phase Inversion®).

Generalmente l'attività che si prefigge il mezzo di contrasto è principalmente quella di incrementare proprio la riflettività, immettendo minute particelle che, agendo da riflettori, aumentano il numero c/o l'intensità delle interfacce.

In base alle caratteristiche fisiche distinguiamo quattro principali gruppi di mezzi di contrasto per ecografia: microbolle di gas libere, microbolle di gas stabilizzate, sospensioni colloidali, emulsioni e soluzioni acquose. I vari mezzi di contrasto (altrimenti detti eco amplificatori) hanno poi caratteristiche diverse di persistenza nell'organismo e diverse vie di eliminazione.

I primi mezzi di contrasto erano soluzioni agitate a mano o bolle di gas libero composte da perossido di idrogeno. Queste microbolle erano instabili nel sangue e non superavano il letto capillare polmonare.

Una prima generazione di mezzi di contrasto (Levovist®) utilizzava delle microbolle che, quando venivano colpite dall'onda emessa dalla sonda, si rompevano generando un'onda di ritorno amplificata.

I mezzi di contrasto di seconda generazione sono invece costituiti da gas con basso coefficiente di diffusione e bassa solubilità in acqua e sangue, circondati da involucri di lipidi, albumina o galattosio per prolungare la loro vita in circolo, che aumentano il segnale proveniente dal circolo ematico. L'interfaccia gas/sangue della microbolla agisce da riflettore del fascio di ultrasuoni incidente, contribuendo ad intensificare il segnale ultrasonoro di ritorno alla sonda. La riflettività aumenta linearmente con il numero di microbolle presenti in circolo e interagenti con il fascio di ultrasuoni incidente. Una volta iniettati in circolo, per via

endovenosa, non vengono metabolizzati, ma vengono eliminati completamente per via polmonare. Queste microbolle hanno un diametro uguale o poco inferiore a quello degli eritrociti e rimangono confinate nel microcircolo senza passare nello spazio extravascolare o all'interno delle cellule, e per questo sono anche detti "Blood pool".

La durata dell'enhancement è in funzione della stabilità e dell'elasticità delle microbolle ed è di alcuni minuti, tempo sufficiente per un completo studio del letto vascolare di un parenchima sia utilizzando un'iniezione a bolo che in infusione lenta.

### **1.2.2. L'ecografia nello studio dell'artrite**

L'ecografia è una metodica non invasiva, ripetibile, senza utilizzo di radiazioni ionizzanti, dai costi contenuti e ben tollerata dal paziente, in grado di visualizzare organi e tessuti in modo tomografico e multiplanare.

Pur richiedendo un certo impegno (ecografista esperto, ecografo adeguato), si è dimostrata una tecnica di rapida esecuzione, in continua evoluzione e dotata di ottima sensibilità e buona specificità. Essa viene comunemente usata nella pratica reumatologica come completamento all'esame clinico articolare e potrebbe risultare utile anche nel valutare l'efficacia di trattamenti convenzionali o sperimentali.

Alla notevole sensibilità dell'ecografia tradizionale nell'individuare piccoli versamenti articolari o minimi ispessimenti sinoviali, non corrisponde però un'adeguata capacità nel differenziare i pazienti con malattia in fase attiva dai pazienti in remissione. Essa inoltre non è in grado di fornire informazioni utili per la diagnosi differenziale tra le varie forme di artrite o sull'attività di malattia.

L'ecografia è stata proposta come mezzo per studiare le erosioni articolari dell'artrite reumatoide già nel 1993. Studi successivi hanno dimostrato una sensibilità superiore alla radiologia tradizionale nell'individuare le erosioni marginali nelle piccole articolazioni. L'ecografia è inoltre risultata comparabile e a volte superiore alla RM e alla TAC nel rilevare piccole erosioni ossee.

Già da tempo è nota l'importanza della vascolarizzazione nell'artrite, anche se non sono ben chiari i meccanismi patogenetici.

Lo sviluppo delle tecnologie Doppler ha reso possibile lo studio della vascolarizzazione articolare. Diversi studi hanno dimostrato l'utilità dell'ecografia con color-doppler (CDUS) e power-doppler (PDUS) anche nello studio della sinovite. Tali tecniche hanno però una limitata capacità nel rilevare il flusso lento nei piccoli vasi del panno sinoviale.

Una migliore sensibilità è stata ottenuta con la prima generazione di mezzi di contrasto (mdc) ecografici ad elevato indice meccanico utilizzati in associazione al color o power Doppler (rispettivamente CE-CDUS e CE-PDUS): attraverso tale tecnica è stato possibile rilevare e quantificare in modo più preciso il grado di infiammazione e differenziare tra sinovite attiva e fibrosi del panno.

Un notevole passo avanti è stato fatto con l'uso dei mezzi di contrasto di ultima generazione che hanno permesso di valutare la perfusione tissutale anche a livello microvascolare (gray scale Contrast Enhancement UltraSound: CEUS).

Lo studio IACUS (International Arthritis Contrast Ultrasound), basato sulla collaborazione di 5 centri europei, ha potuto dimostrare la superiorità del CEUS rispetto al PDUS nel discriminare tra RA attiva e non attiva attraverso il rilevamento della vascolarizzazione sinoviale (97.3% di veri positivi della CEUS rispetto al 60.1% della PDUS).

Il mdc può essere iniettato in bolo o in infusione lenta, a seconda dei dati che si vogliono raccogliere. In infusione lenta permette di valutare più articolazioni nel corso di un unico esame. In bolo lo studio si limita ad una singola articolazione, ma offre un maggior numero di parametri, quali ad esempio la velocità di perfusione, il tempo di picco e la clearance.

L'analisi di strutture superficiali come le articolazioni delle dita, pone alcuni problemi tecnici e di interpretazione. In B-mode il trasduttore ha una capacità molto limitata nel focalizzare le strutture vicine all'interfaccia, per le quali sarebbe necessaria un'elevata risoluzione. Le superfici articolari irregolari e significativamente deformate (tipiche

dell'artrite) rendono difficile l'acquisizione dei filmati quando si utilizza il gel come interfaccia sonda-cute: durante la registrazione del filmato sarebbe infatti utile ridurre al minimo gli artefatti dovuti al movimento.

La soluzione potrebbe ritrovarsi in una vecchia tecnica che recentemente è stata riportata in vita: posizionare la mano del paziente in una vasca d'acqua che sostituisce il gel come interfaccia sonda-cute e permette di non dover tenere la sonda a contatto con la cute stessa.





## 2. ACQUISIZIONE DATI

Lo studio è stato condotto su 139 articolazioni di 132 pazienti arruolati consecutivamente tra il 2006 e il 2008 dal reparto di Reumatologia, dal PS, dal Day Hospital, dall'ambulatorio integrato dell'ospedale di Padova e dai vari reumatologi ambulatoriali sparsi nel territorio del veneto.

Ogni paziente è stato sottoposto ad una visita reumatologica preventiva durante la quale sono stati raccolti dati anagrafici e clinici: esami bioumorali, impegno articolare, GH pz (Global Health come avvertito dal paziente), eventuale presenza di erosioni articolari evidenziate da tecniche di imaging, terapia in atto. È stato inoltre calcolato il DAS28 basato sulla PCR, riconosciuto un parametro affidabile nel valutare l'attività di malattia. Per ogni paziente è stata verificata la diagnosi clinica in base ai criteri classificativi ACR dell'artrite reumatoide o a specifici criteri diagnostici o classificativi riconosciuti validi per le altre forme di artrite. La diagnosi veniva comunque confermata prima di conoscere l'esito della CEUS ad immersione.

Sono stati esclusi dallo studio i pazienti in cui la diagnosi clinica era dubbia, i pazienti con artrite reumatoide che non soddisfacevano i criteri classificativi ACR e i pazienti con artrite in remissione ( $DAS28 \leq 2,6$ ). Sono stati infine esclusi i filmati che, per vari motivi (errore tecnico, esami utilizzati per la calibrazione della macchina, movimento della mano durante la registrazione, ecc.) non risultavano conformi alle specifiche tecniche utilizzate per standardizzare l'acquisizione delle immagini. Sono risultati utili allo studio 40 esami, 23 dei quali ottenuti da pazienti affetti da artrite reumatoide e 17 da pazienti con altre forme di impegno articolare.

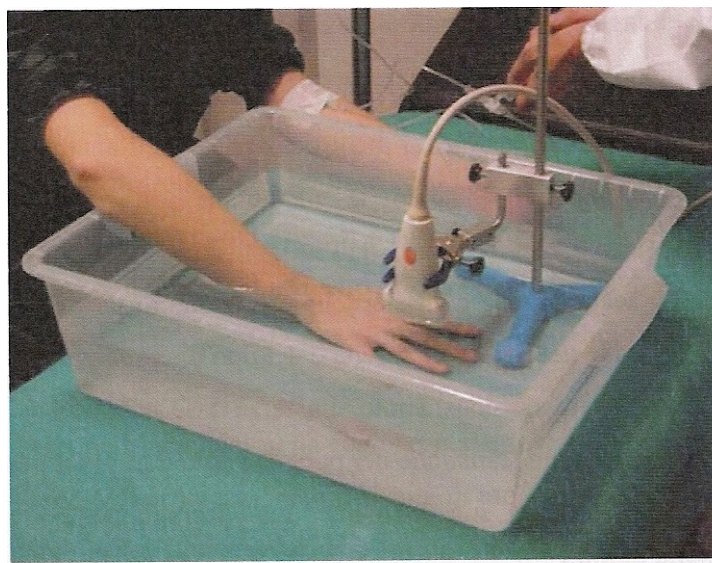
Nel caso fosse clinicamente evidente l'interessamento di una specifica articolazione della mano, veniva proposta al radiologo come sede per eseguire l'osservazione. La scelta dell'articolazione più impegnata dal processo flogistico veniva comunque decisa in base a diversi parametri clinici e radiologici: maggiore attività clinica, maggiore proliferazione sinoviale in eco, maggiore versamento, positività al CDUS. Per tale motivo venivano preventivamente analizzate tutte le articolazioni MCF e IF con l'ecografia B-mode

tradizionale a scala di grigi.

E' stato utilizzato un ecografo (My Lab25, Esaote, Genova, Italy) con una sonda ad alta frequenza. Le articolazioni MCF e IF sono state studiate dorsalmente sul piano sagittale con la mano in posizione neutra.

La valutazione con mdc è stata eseguita con la mano immersa in acqua a 28 °C. La sonda è stata posizionata nell'acqua 10 mm sopra l'articolazione in esame (Fig. 2.1). Previa accettazione del consenso informato alla somministrazione del mdc, è stato iniettato in una vena periferica del braccio controlaterale un bolo di 4,8 ml di esafluoruro di zolfo (SonoVue, Bracco International) seguito da un'iniezione di 10 ml di soluzione salina.

L'articolazione selezionata è stata valutata mediante tecnica Contrast Tune Imaging (CnTi, Esatune, Esaote), utilizzando un basso indice meccanico (MI) (0.06) ed un frame rate di 15 frames/s. Il fuoco è stato posizionato a livello del tessuto sinoviale da esaminare, il guadagno (beam gain) settato al livello minimo e la pressione acustica a 30 kPa.



*Figura 2.1: sistema di posizionamento della sonda ecografica*

Durante la trasmissione il basso indice meccanico (0,06) e la pressione acustica permettono di mandare in risonanza le micro bolle del mdc, senza che esse vengano distrutte (facendole oscillare alla massima intensità). Il segnale emesso dalle microbolle viene ricevuto

selettivamente dalla sonda, eliminando le interferenze prodotte dagli altri echi.

Questa tecnica contrasto-specifica sfrutta la trasmissione della frequenza di risonanza specifica delle micro bolle di esafluoruro di zolfo e la registrazione selettiva di tali frequenze armoniche, riducendo significativamente la potenza *dell'insonation* ed il comportamento dell'armonica non lineare dei tessuti.

Le immagini ottenute sono state salvate in formato digitale. La registrazione della fase dinamica veniva iniziata immediatamente dopo la somministrazione del bolo e proseguita per due minuti.

Una volta eseguito l'esame, il filmato veniva visionato da un secondo radiologo che non era a conoscenza della diagnosi, né degli altri dati rilevati alla visita reumatologica. Il radiologo compilava un referto in base alla proliferazione della membrana sinoviale e alle caratteristiche dell'enhancement del mdc (tempo, intensità, distribuzione e sede). Il referto ecografico non influenzava la diagnosi, permettendo di fatto uno studio in doppio cieco.



### **3. SCOPO**

L'esame delle articolazioni attraverso eco-contrasto sembra essere una promettente, facile ed efficace metodica per la diagnosi e la valutazione delle patologie artritiche. Pochissimi lavori sono stati fatti per studiare come l'analisi dinamica della perfusione possa caratterizzare l'attività sinoviale e quindi permettere la diagnosi precoce dell'artrite, la sua differenziazione e la valutazione del follow-up.

Questo progetto si propone di ideare e costruire un robusto ed efficiente algoritmo per ottenere un'immagine vettoriale da una sequenza di immagini CEUS. In particolare si vuole creare una mappa parametrica che contenga le informazioni cinetiche dell'agente di contrasto ricavate da una modellazione matematica del suo comportamento.

Le caratteristiche desiderabili per tale algoritmo sono la robustezza, ovvero la capacità di restituire risultati coerenti pur avendo come ingresso segnali molto diversi e soggetti a varie fonti di disturbo, e l'efficienza, ovvero la possibilità di essere eseguito su hardware comune in tempi ragionevoli.

La costruzione di una mappa parametrica è potenzialmente in grado di semplificare l'esplorazione e l'individuazione di pattern rilevanti per la diagnosi. Questo studio si colloca quindi su un più ampio progetto che si propone di ottenere degli strumenti di supporto alla diagnosi mediante un'analisi automatica dei video ottenuti dall'eco-contrasto ad immersione.



## 4. MODELLO

L'uso di traccianti nello studio dei sistemi metabolici è una pratica ormai ricorrente nell'ambito della ricerca biomedica. Essi sono utilizzati come mezzo per ottenere le informazioni cinetiche del sistema, cioè la distribuzione temporale e spaziale dei vari componenti che lo formano. In generale, lo studio della cinetica dei traccianti sottende la comprensione della fisiologia e della fisiopatologia del metabolismo di sostanze che già sono presenti nell'organismo. Nel nostro caso le microbolle utilizzate come agente di contrasto si comportano approssimativamente come eritrociti, permettendo di studiare la vascolarizzazione dello spazio sinoviale nelle piccole articolazioni.

Allo scopo di interpretare i dati cinetici dall'esperimento, è necessario un modello matematico del sistema sotto studio. Un modello è un costrutto inventato dal ricercatore per riassumere quello che è noto e ciò che si ipotizza riguardo al sistema sotto studio. Un modello matematico è semplicemente un modello che può essere descritto da una serie di equazioni matematiche. Esso è necessario in quanto in grado di fornire al ricercatore delle informazioni quantitative sul sistema sotto analisi. Al fine di costruire un modello sono fondamentalmente necessari due passaggi: la **determinazione della struttura del modello** e la **stima dei parametri**. Il primo passaggio consiste, come sopra menzionato, nel formalizzare le conoscenze e le assunzioni riguardo il sistema in modo matematico. In questa prima fase è spesso necessario introdurre delle ipotesi e delle semplificazioni in quanto non sempre sono note tutte le caratteristiche del sistema. Per quanto riguarda la stima dei parametri, essa consiste nell'adattare i parametri che caratterizzano il modello in modo da ottenere il miglior fit dei dati disponibili.

Una sequenza di immagini CEUS è una funzione dello spazio (locazione del pixel) e del tempo. Essa può essere rappresentata da una funzione  $f(x, y, t)$ , dove  $(x, y)$  identificano le coordinate spaziali e  $t$  rappresenta il tempo.

Per una locazione di un pixel  $(x, y)$  fissata,  $f(x, y, t)$  è una funzione del solo tempo e tipicamente assomiglia ad un impulso rumoroso (Fig. 4.1). La fase iniziale di salita corrisponde all'arrivo del tracciante nella locazione spaziale, mentre il decadimento successivo corrisponde con la graduale scomparsa delle microbolle.

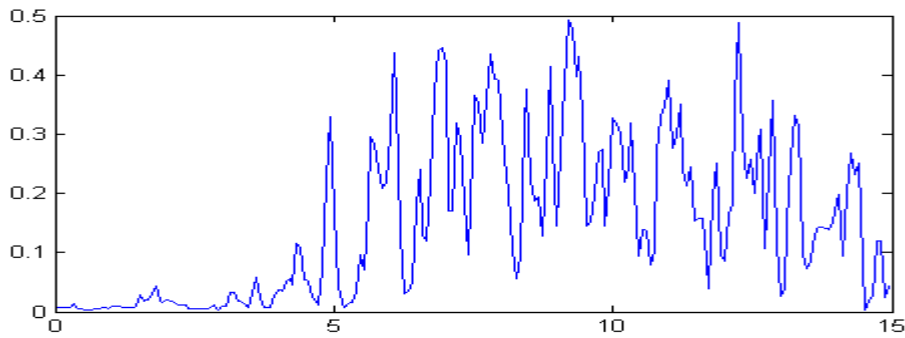


Figura 4.1: andamento tipico del tracciante

## 4.1. DETERMINAZIONE DELLA STRUTTURA DEL MODELLO

Il modello matematico che si è scelto di utilizzare per descrivere l'andamento temporale di ogni locazione spaziale è una funzione gamma-variata. Il motivo di tale scelta risiede nel fatto che in precedenti studi essa si è rivelata adatta allo scopo, producendo i fit migliori rispetto ad altre funzioni con le quali è stata confrontata[11][12][15].

Essa è infatti caratterizzata da una fase iniziale di salita dominata dal termine polinomiale, seguita da una fase di discesa dominata dall'esponenziale negativo, il che è in accordo con le valutazioni visive effettuate nel paragrafo precedente. Un altro motivo che rende questa funzione adatta allo scopo è che è non negativa per ogni valore di  $t$ . Questo è importante in quanto valori negativi corrisponderebbero a concentrazioni di tracciante negative, che sono del tutto prive di significato.

### 4.1.1. Funzione Gamma-variata

$$\Gamma(t) = \begin{cases} base + A(t-t_0)^\alpha e^{-(t-t_0)/\beta} & t \geq t_0 \\ base & t < t_0 \end{cases}$$

con  $base$ ,  $A$ ,  $t_0$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  parametri da stimare.

- $base$  rappresenta il segnale acquisito in assenza dell'agente di contrasto;
- $A$  è un fattore di proporzionalità indicativo dell'ampiezza del segnale;
- $t_0$  è l'istante nel quale il tracciante entra nella locazione spaziale;
- $\alpha$  è la costante di tempo di salita;
- $\beta$  è la costante di tempo di discesa.



Il modello utilizzato deriva dai principi della cinetica dei traccianti non diffusibili e si basa sulle seguenti assunzioni:

- ◆ l'agente di contrasto è totalmente non diffusibile;
- ◆ non c'è ricircolo dell'agente di contrasto;
- ◆ l'agente di contrasto è confinato nello spazio intravascolare. In altre parole le pareti vascolari sono assunte intatte, altrimenti ci sarebbero perdite di tracciante;
- ◆ durante l'esperimento il sistema è stazionario, cioè il flusso ematico è assunto costante;
- ◆ l'agente di contrasto non perturba in modo apprezzabile il sistema.

Queste assunzioni sono ben approssimate nella realtà, tranne per il problema del ricircolo che verrà discusso nel capitolo 5.

#### 4.1.2. Descrizione dell'errore nei dati

Supponiamo d'ora in avanti che  $y(t) = \Gamma(t)$  sia il modello corretto per i dati considerati e supponiamo di lavorare, per comodità, su una singola locazione spaziale (le conclusioni ricavate saranno chiaramente valide per ciascuna locazione).

Per ogni dato  $y_{obs}(t_i)$  all'istante  $t_i$ , c'è un termine  $e(t_i)$  definito "errore di misura". È ragionevole assumere che questo termine sia additivo in modo da poter scrivere:

$$y_{obs}(t_i) = y(t_i) + e(t_i)$$

In generale non si conosce molto di  $e(t_i)$  e quindi è necessario fare alcune assunzioni. In particolare assumiamo che gli errori  $e(t_i)$  siano indipendenti, a media nulla e con varianza nota eccetto un fattore di proporzionalità. Espresso in linguaggio matematico questo corrisponde a scrivere:

- ◆  $E(e(t_i)) = 0$  media nulla
- ◆  $Cov(e(t_i), e(t_j)) = 0 \quad \text{per } t_i \neq t_j$  indipendenti
- ◆  $Var(e(t_i)) = v(t_i)\sigma^2$  varianza nota eccetto  $\sigma^2$ , fattore di proporzionalità

*N.B Un'ulteriore assunzione utile è quella di considerare l'errore indipendente anche nello spazio.*

## 4.2. STIMA DEI PARAMETRI

Una volta descritto il modello dei dati, compreso il modello dell'errore si può procedere con la stima dei parametri, ovvero con la determinazione dei parametri che producono il miglior fit dei dati disponibili.

La definizione “miglior fit” non è però univoca: serve infatti definire una misura della bontà di un fit. In questo studio si è scelto di utilizzare la somma dei quadrati dei residui (Residual Sum of Squares: RSS). Essa può essere calcolata attraverso la seguente espressione:

$$RSS = \sum_{i=1}^N (y_{obs}(t_i) - y(t_i))^2 \quad \text{con } N \text{ numero di osservazioni}$$

Il valore  $y_{obs}(t_i) - y(t_i)$  può essere considerato come l'errore tra il valore osservato e quello predetto dal modello per ogni campione. Per valori differenti dei parametri del modello si otterranno differenti RSS, perciò determinare i parametri che producono il miglior fit equivale a determinare i parametri che minimizzano RSS. Questo processo prende il nome di regressione attraverso il metodo dei minimi quadrati (Least Squares: LS).

Come discusso nel paragrafo precedente, ad ogni misura è associato un errore. Questo in pratica significa che consideriamo alcuni dati più attendibili rispetto ad altri. Bisogna quindi trovare un metodo per tener conto di queste considerazioni nel processo di fitting. Il sistema utilizzato consiste nell'assegnare un peso ad ogni dato, in modo tale da dare maggiore importanza ai dati più attendibili rispetto agli altri.

Si definisce quindi la somma pesata dei quadrati dei residui (WRSS) come:

$$WRSS = \sum_{i=1}^N w_i (y_{obs}(t_i) - y(t_i))^2$$

con  $w_i$  peso assegnato a ciascun dato. Il problema si sposta quindi nel minimizzare  $WRSS$ .

La determinazione dei pesi  $w_i$  deriva dal modello dell'errore dei dati. La scelta più naturale consiste nel pesare ciascun dato con l'inverso della sua varianza, quindi possiamo scrivere:

$$w_i = \frac{1}{v(t_i)\sigma^2}$$

$v(t_i)$  è assunta nota, mentre per quanto riguarda  $\sigma^2$ , si può dimostrare, con semplici passaggi matematici, che essa rappresenta una costante di proporzionalità anche per  $WRSS$  (non dipendendo da  $i$  può essere portata fuori dal simbolo di sommatoria). Dato che il nostro obiettivo è di minimizzare  $WRSS$ , possiamo allora ignorare  $\sigma^2$  e scrivere:

$$w_i = \frac{1}{v(t_i)}$$

Un peso  $w_i$  siffatto prende il nome di peso relativo.

Il problema si sposta quindi ora nella determinazione del valore  $v(t_i)$ . La varianza può essere stimata a partire dai dati nel caso in cui si abbiano a disposizione molte repliche indipendenti del processo di misura. Non essendo in questo fortunato caso la procedura più rigorosa prevede di inserire la varianza come ulteriore parametro del modello da stimare, introducendo quella che prende il nome di somma pesata estesa dei quadrati dei residui (Extended Weighted Residual Sum of Squares: EWRSS) :

$$EWRSS = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{1}{\sigma^2(t_i)} (y_{obs}(t_i) - y(t_i))^2 + \ln(\sigma^2(t_i)) \right] \text{ con}$$

$$\sigma^2(t_i) = v(t_i)\sigma^2$$

Benché, visti i dati a disposizione, questa rappresenti probabilmente la trattazione più rigorosa possibile del problema, questo procedimento ha come contro l'introduzione di un nuovo parametro. Per quanto concerne i modelli non lineari, è buona norma invece cercare di ridurre al minimo i parametri da stimare. Questo è dovuto al fatto che un problema di regressione non lineare non può essere risolto esattamente, ma sono necessarie una serie di approssimazioni basate sulla teoria lineare. La risoluzione di un sistema con molte equazioni altamente non lineari tende infatti a restituire risultati poco robusti o non unici, non riuscendo a far convergere il modello ai dati. Inoltre è importante tener conto che ogni parametro aggiuntivo aumenta considerevolmente la complessità computazionale dell'algoritmo di stima.

Ci limiteremo quindi a considerare come indice di bontà del fit il solo WRSS in quanto è comunque preferibile assegnare un valore, anche se approssimato, ai pesi dei dati che non assegnarne affatto. Nel nostro caso si è posto:

$$v(t_i) = \left[ \frac{y_{obs}(t_i)}{base} \right]$$

Questa scelta corrisponde a ritenere più attendibili i valori con minore ampiezza relativa. Infatti da un esame visivo si può notare che il segnale è più rumoroso dopo l'arrivo del tracciante (quando appunto la luminosità è più intensa).

La stima di  $v(t_i)$  è subordinata a quella di  $base$ . Anch'esso viene valutato separatamente nel seguente modo:

$$base = \sum_{i.t.c. t_i \in [0; 1s]} y_{obs}(t_i)$$

Questa assegnazione altro non è che la media aritmetica dei valori osservati durante il primo secondo (quando ancora non è arrivato il tracciante).

A questo punto abbiamo tutti gli elementi necessari per stimare i parametri del modello. In termini matematici possiamo riassumere quanto detto fin qui nel seguente modo:

- ◆ Funzione Gamma-variata

$$\Gamma(t) = y(t) = \begin{cases} base + A(t-t_0)^\alpha e^{-(t-t_0)^\beta} & t \geq t_0 \\ base & t < t_0 \end{cases}$$

- ◆ Parametri da stimare per ogni locazione spaziale

$$P = [A \ t_0 \ \alpha \ \beta]^T$$

- ◆ Stimatore: minimi quadrati non lineari pesati

$$\hat{P}_{LS} = \arg \min \left[ \frac{\sum_{i=1}^N (y_{obs}(t_i) - y(t_i, P))^2}{v(t_i)} \right]$$

$$\text{con } v(t_i) = \left[ \frac{y_{obs}(t_i)}{base} \right] \quad \text{e} \quad base = \sum_{i.t.c. t_i \in [0; 1s]} y_{obs}(t_i)$$

## **5. PRE-PROCESSING**

Una volta acquisiti i filmati dalla strumentazione si rivelano necessarie alcune pre-elaborazioni volte a ridurre lo spazio in memoria dei dati, migliorando l'efficienza computazionale dei passaggi successivi. Inoltre in questa fase verranno utilizzati degli algoritmi in grado di ridurre l'errore di misurazione, attenuare la rumorosità dei dati e compensare alcuni possibili errori di procedura.

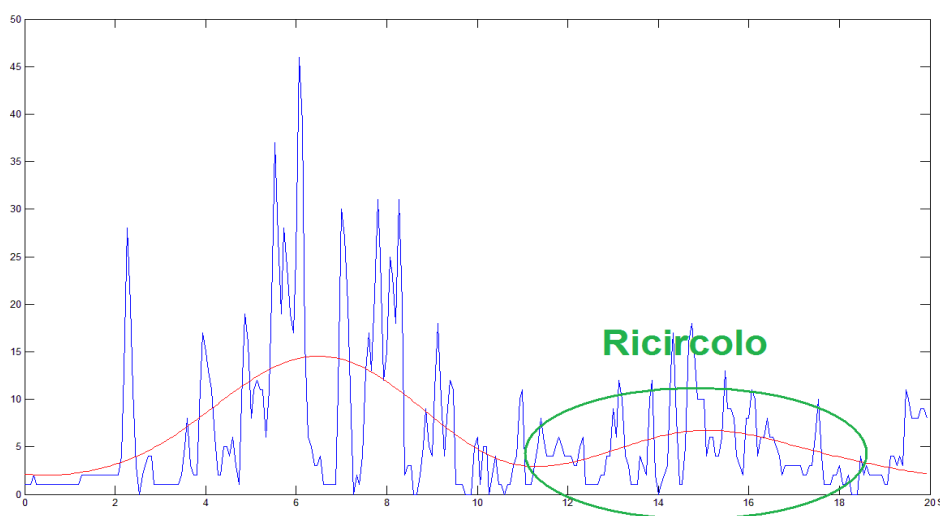
### **5.1. DATA REDUCTION**

I filmati ottenuti attraverso il procedimento sopra descritto sono in formato non compresso e conseguentemente sono di dimensioni molto elevate, il che li rende difficilmente processabili senza incorrere in overflow di memoria. A titolo di esempio un filmato medio è composto da 1574 frame di dimensioni 305 x 597 pixel. Il software utilizzato (Matlab) gestisce di default i dati nel formato a doppia precisione (double), cioè vengono impiegati 64bit per memorizzare ogni singolo dato. Si calcola facilmente come le dimensioni del solo filmato in memoria superino i 2GB, senza considerare che normalmente ogni funzione richiede dello spazio aggiuntivo, spesso proporzionale ai dati, per essere eseguita. Risulta quindi evidente che l'elaborazione dei dati in questo formato non possa essere eseguita su un comune hardware a meno di non utilizzare tecniche complesse per la gestione ottimale della memoria centrale che, comunque, limiterebbero pesantemente le prestazioni. È Tuttavia possibile operare in un altro modo, partendo dal presupposto che non tutti i dati hanno uguale importanza, o meglio, hanno diversa importanza in base allo scopo per cui sono stati raccolti. È stata dunque posta particolare attenzione alla riduzione dei dati a disposizione, eliminando le informazioni irrilevanti al fine di questo studio o, in taluni casi, trovando il giusto compromesso tra la perdita d'informazione e il guadagno prestazionale derivante. Ogni filmato è stato dunque ridimensionato attraverso 4 tecniche distinte applicate a cascata nel seguente ordine:

1. Riduzione dell'intervallo temporale di osservazione
2. Riduzione dell'intervallo spaziale di osservazione
3. Resize dei frame
4. Decimazione temporale

### 5.1.1. Riduzione dell'intervallo temporale di osservazione

Da un'analisi visiva dell'andamento temporale di alcuni pixel si può già avere un'idea di quale sia l'evoluzione cinetica del tracciante: inizialmente si verifica un repentino aumento dell'intensità luminosa in corrispondenza dell'arrivo dell'agente di contrasto. Segue poi una fase di diminuzione di intensità (che è correlata alla concentrazione), dovuta alla circolazione sanguigna che ripristina le condizioni iniziali prima dell'infusione. La cinetica rispecchia quindi il comportamento che ci si aspettava dal tracciante. A sorpresa, però, la fase di ripristino viene seguita da un nuovo aumento di concentrazione. La causa di questo fenomeno è probabilmente dovuta al fatto che il tempo sperimentale è sufficientemente lungo da includere nella misura una parte indesiderata dovuta al ricircolo dello stesso agente di contrasto nel pixel. Infatti il tempo di vita delle microbolle nell'organismo è di alcuni minuti e il tasso di sopravvivenza al primo passaggio attraverso i capillari polmonari è relativamente medio-alto [14].



*Figura 5.1: Andamento temporale di un pixel contenente tracciante. In blu: segnale prelevato dallo strumento; in rosso: media locale del segnale; cerchiato in verde: nuovo aumento di concentrazione dovuto al ricircolo sanguigno*

Poiché nel modello utilizzato non si tiene conto di questa eventualità è necessario troncare la serie temporale prima che questa si verifichi. In termini pratici questa operazione viene effettuata manualmente stimando l'istante di troncamento da una semplice osservazione visiva. Questo passaggio si rivela dunque necessario non solo per ridurre l'ingombro in memoria dei dati e il

tempo di esecuzione dei passaggi successivi (in particolare quelli che operano su ogni frame), ma anche per eliminare un ingresso indesiderato che altererebbe la stima dei parametri del modello, in particolare la costante del tempo di discesa  $\beta$ , che risulterebbe sempre stimata per eccesso.

### 5.1.2 Riduzione dell'intervallo spaziale di osservazione

Lo spazio sinoviale rappresenta solo una porzione della superficie presa in esame dell'ecografo e poiché è d'interesse il solo tracciante eventualmente presente in questa zona, si possono limitare l'altezza e la larghezza dei frame del filmato eliminandone i bordi (Fig. 5.2). Si è scelto di tagliare la cornice esterna dell'immagine di un numero di pixel tale da rendere le dimensioni del frame risultante pari alla più grande potenza di due minore delle dimensioni originarie.

In altre parole, siano  $h$  e  $w$  rispettivamente l'altezza e la larghezza del frame originario e  $h_2$  e  $w_2$  rispettivamente l'altezza e la larghezza del frame dopo l'operazione di riduzione dell'intervallo spaziale di osservazione, tra  $h_2$  e  $w_2$  e  $h$  e  $w$  sussistono le seguenti relazioni:

$$h_2 = 2^{\lfloor \log_2(h) \rfloor} \quad w_2 = 2^{\lfloor \log_2(w) \rfloor}$$



Figura 5.2: area rilevata dall'ecografo di dimensioni  $h$  per  $w$ . In rosso: area della sinovia; in verde: dimensioni ( $h_2$  e  $w_2$ ) del frame dopo la riduzione dell'intervallo spaziale

Benché possa essere ritenuta possibile l'eliminazione di una superficie maggiore, la scelta di questi particolari valori rende possibile un'ulteriore ottimizzazione in quanto l' algoritmo per il calcolo

della trasformata di Fourier (FFT), di cui si fa ampio uso nelle fasi successive, risulta avere una complessità computazionale nettamente inferiore per dati così dimensionati [8]. Come per l'operazione precedente, anche in questo caso non si tratta solo di eliminare dati superflui per ridurre l'ingombro in memoria e processare una quantità inferiore di informazioni, ma bensì di formattare i dati rimanenti in modo tale da ottimizzare le operazioni successive.

### 5.1.3 Resize dei frame

La seguente tecnica prende il nome di “image resizing”. Essa consente, partendo da un'immagine iniziale, di ottenerne una nuova versione con una o entrambe le dimensioni modificate a piacimento. È possibile sia aumentare che ridurre ciascuna dimensione, attraverso la scelta di un fattore di scala. In entrambi i casi è necessario definire una funzione di mappatura che consente di ricavare il valore da attribuire a ciascun nuovo pixel. Visto lo scopo di ridurre il numero di dati si è scelto come valore di scala 0,5 per entrambe le dimensioni, il che corrisponde ad un dimezzamento sia dell'altezza che della larghezza. Non si pongono ambiguità nell'arrotondamento dei nuovi valori in quanto nel passaggio precedente si è ridimensionato ciascun frame in modo tale da ottenere dimensioni pari a potenze di 2 (e tali rimangono anche dopo questo passaggio) .

La funzione di mappatura utilizzata è la media aritmetica, applicata ad ogni quattro pixel adiacenti, come mostrato in figura 5.3. Nuovamente, anche per la funzione di mappatura, non ci sono ambiguità visto il particolare dimensionamento dei dati. Questa operazione viene applicata ad ogni frame il che consente di ridurre le dimensioni totali dei dati di un fattore 4.

Analizzandola nel dominio del tempo il risultato consiste nel mediare la concentrazione di tracciante contenuta in quattro pixel adiacenti. Ricordando che ogni osservazione è affetta da errore possiamo scrivere la seguente relazione:

$$\hat{y}_{obs_1}(t_i) = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M (y_j(t_i) + e_j(t_i)) = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M y_j(t_i) + \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M e_j(t_i) \quad \text{con } M=4$$

dove con  $\hat{y}_{obs_1}(t_i)$  si intende il valore calcolato nell'istante  $t_i$  del primo pixel del nuovo frame (in verde nella figura 5.3) e, per non appesantire la notazione, la doppia sommatoria dei quattro



pixel adiacenti del frame iniziale viene scandita in modo lineare da una singola.

Per quanto riguarda la prima sommatoria, supponendo che locazioni spaziali vicine abbiano un'evoluzione cinetica molto simile, l'errore di approssimazione che si compie può essere trascurato. Poiché, invece, il rumore è modellato come una variabile aleatoria a media nulla e indipendente oltre che nel tempo anche nello spazio, la seconda sommatoria convergere a 0 per M che tende a  $\infty$ . Nel nostro caso il termine dovuto all'errore di misura non scompare del tutto in quanto  $M=4$ . In ogni caso, indicando con  $e_2(t_i)$  l'errore associato ai dati dopo l'operazione di resize, la relazione che lo lega con  $e(t_i)$  è la seguente:

$$\text{Var}(e_2(t_i)) = \frac{1}{M} \text{Var}(e(t_i)) = \frac{1}{4} \text{Var}(e(t_i))$$

ovvero la varianza risulterà essere quattro volte più piccola che nel segnale originario.

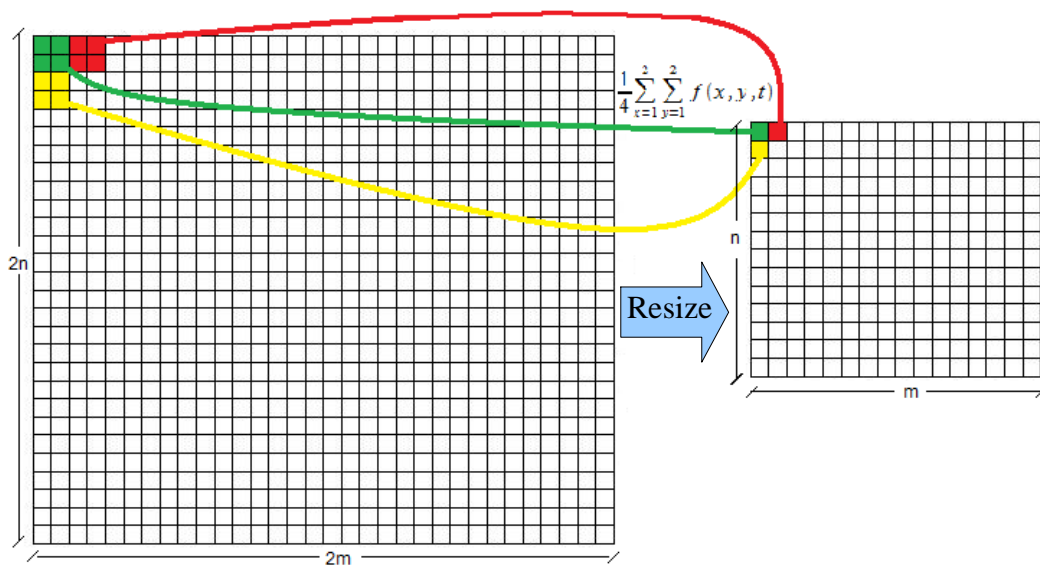


Figura 5.3: Resize dei frame

Traendo le conclusioni di questa operazione possiamo dire che essa permette un'importante riduzione dei dati. Questa riduzione si paga in termini di un peggioramento della risoluzione spaziale che a sua volta però apporta una riduzione dell'errore di misurazione.

#### 5.1.4 Decimazione temporale

Il segnale d'interesse ha un'evoluzione relativamente lenta nel tempo. Volendo esprimere lo stesso concetto con un linguaggio più tecnico possiamo dire che il segnale d'interesse è a basse frequenze, o meglio ancora, che la maggior parte dell'energia del segnale è concentrata alle basse frequenze. Poiché rispetto all'evoluzione del segnale la frequenza di campionamento è molto elevata ( $f_c = 15\text{Hz}$ ), il segnale risulta essere sovracampionato ed è quindi possibile ridurre il numero di campioni senza avere una significativa perdita di qualità. Il procedimento che permette di ridurre il numero di campioni prende il nome di "decimazione".

Per una corretta decimazione di un segnale sono necessarie alcune assunzioni:

- ◆ il segnale è a banda limitata;
- ◆ il segnale è sovracampionato di un fattore pari o superiore al fattore di decimazione

Essendo il segnale in questione di durata finita esso non può avere una banda limitata. È comunque pratica comune parlare di limitazione in banda anche per tali segnali. Nel fare questo, si considera che la trasformata di Fourier del segnale,  $Y(f)$ , sia pari a zero per  $f > B$  tale che

$|Y(f)| < \epsilon$ . Sotto questa ipotesi, per il teorema di Shannon, la frequenza di campionamento deve essere  $f_c > 2B$ . Nel caso in cui  $f_c > 2kB$  con  $k > 1$  si parla di sovracampionamento del segnale di un fattore  $k$ . La stima di  $B$ , banda del segnale di interesse è tutt'altro che semplice, considerando che noi non conosciamo  $y(t)$ , ma bensì conosciamo

$y_{obs}(t) = y(t) + e(t)$  e che sappiamo poco o nulla su  $e(t)$ . Inoltre in questi casi si usa considerare  $e(t)$  non limitato in banda e ciò complica ulteriormente la stima di  $B$ .

Per semplicità da alcuni esami visivi e numerici si è visto che gran parte dell'energia del segnale campionato era contenuta nelle frequenze inferiori a 2Hz, quindi possiamo porre  $B < 2\text{Hz}$ . Si tenga presente che per una trattazione più rigorosa sarebbe stato necessario stimare  $B$ , ma visto lo scopo di voler esclusivamente ridurre l'ingombro dei dati si è rivelato più comodo assumere come valore di  $B$  un numero abbastanza elevato da potersi considerare sicuramente maggiore

del valore reale. Determinato quindi  $B$ , possiamo calcolare il fattore di sovracampionamento:

$$k \leq \left\lfloor \frac{f_c}{2B} \right\rfloor = 3$$

Possiamo quindi decimare il segnale con un fattore di decimazione pari a 3. Poiché tale operazione può essere vista come un ricampionamento del segnale continuo iniziale ad una frequenza

$$f_{c_2} = f_c / k$$

, è necessario tenere nuovamente conto del teorema di Shannon: infatti sebbene il segnale ha una banda che rispetta le condizioni del teorema, l'errore di misurazione  $e(t)$  ha una banda illimitata. È necessario quindi filtrare il segnale con un filtro passa-basso in modo da eliminare le componenti spettrali del rumore che genererebbero aliasing. In figura 5.4 sono raffigurati i vari passaggi che subisce il segnale. Il rumore è stato raffigurato come costante ma non è detto che lo sia.

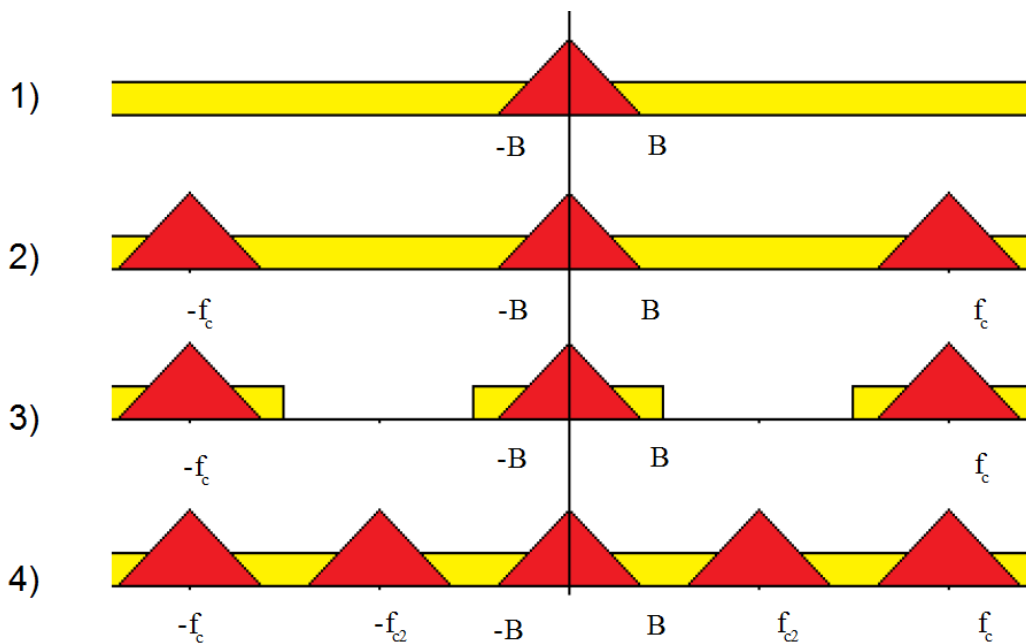


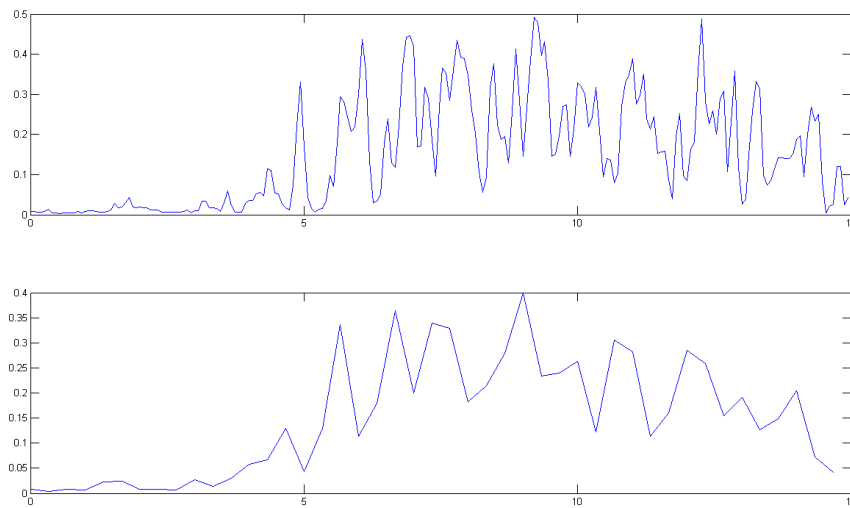
Figura 5.4: vari passaggi della decimazione

In 1) abbiamo lo spettro del segnale continuo e del rumore evidenziati rispettivamente in rosso e giallo; in 2) il segnale è stato campionato con frequenza  $f_c$ , producendo la ripetizione periodica dello spettro in frequenza; in 3) viene applicato il filtro passa-basso della decimazione; in 4) avviene il nuovo campionamento alla frequenza  $f_{c_2} = f_c / k$ .

Come filtro passa-basso è stato scelto un filtro di Chebyshev tipo I con frequenza normalizzata di taglio  $f_t=0,8/k$  e 0,05dB di ondulazione.

Il risultato principale di tale operazione è una riduzione di un fattore  $K=3$  del numero di dati. Va inoltre ricordato che il filtro passa-basso elimina alcune componenti spettrali del rumore, in particolare quelle alle alte frequenze, riducendo di fatto l'energia del rumore rispetto a quella del segnale.

La figura 5.5 rappresenta il segnale prima e dopo l'operazione di decimazione.



*Figura 5.5: in alto: segnale prima della decimazione; in basso: segnale decimato di un fattore  $k=5$*

## 5.2. COMPENSAZIONE ERRORI

I fattori di disturbo che possono influire su una corretta misurazione sono molteplici e non tutti sono eliminabili e/o valutabili correttamente. Abbiamo già visto come l'errore di misurazione possa essere ridotto mediando l'evoluzione temporale di pixel adiacenti (che, data l'elevata risoluzione spaziale, possono essere visti come repliche indipendenti della stessa misurazione) oppure filtrando opportunamente il segnale eliminando alcune delle componenti armoniche del rumore.

Mentre l'errore considerato nei precedenti paragrafi si riferiva principalmente all'errore insito nella misurazione, caratteristico di ogni strumento, i dati sono tuttavia affetti da un altro tipo d'errore.

La procedura di acquisizione prevede una perfetta immobilità di tutta la strumentazione e, in particolare, dell'articolazione in esame. Inoltre le condizioni ambientali dovrebbero essere il più possibile simili per ogni esame, in quanto possono influire sulla taratura dello strumento. È facile immaginare che entrambe le condizioni siano ben difficili da soddisfare perfettamente, per questo è stato necessario sviluppare alcune tecniche con le quali è stato elaborato il segnale, volte a ridurre eventuali errori di procedura e a rendere l'algoritmo più robusto rispetto ad ingressi modificanti, cioè quegli ingressi che possono influire sulle caratteristiche dello strumento.

Da un'analisi visiva dei filmati si sono riscontrati i seguenti fattori come possibili fonti d'errore:

- ◆ una non perfetta immobilità della mano del paziente, della sonda ecografica o del piano di lavoro;
- ◆ una non corretta identificazione e posizionamento della regione sinoviale;
- ◆ differenze di taratura del livello di luminosità in esami diversi;

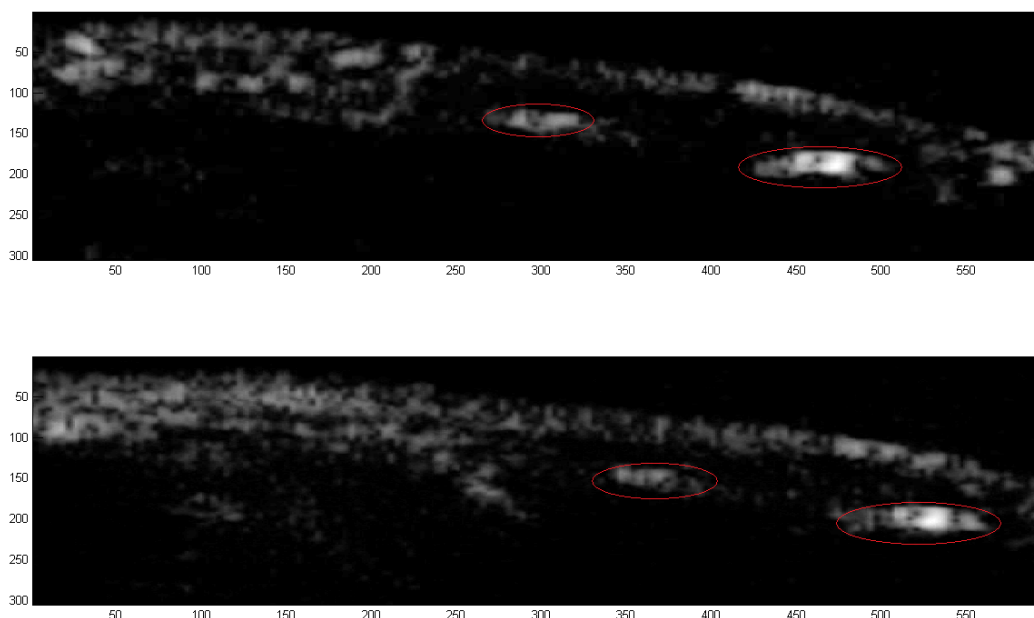
Per ognuna di queste possibili fonti d'errore è stata sviluppata una metodologia volta a ridurre gli effetti indesiderati:

- ◆ registrazione di ogni frame rispetto al frame iniziale;
- ◆ registrazione dell'anatomica con il frame iniziale;
- ◆ normalizzazione dei dati rispetto all'osso;

### 5.2.1. Registrazione di ogni frame rispetto al frame iniziale

Come sopra detto, il mantenimento di una perfetta immobilità della sonda, del piano di lavoro e in particolare dell'articolazione in esame durante tutta la durata dell'esperimento non è un obiettivo facilmente raggiungibile. Considerando inoltre l'elevata risoluzione spaziale della tecnica ecografica, è facile immaginare che spostamenti millimetrici del paziente si traducono in spostamenti di svariati pixel nell'immagine. Dallo studio si erano già esclusi quei filmati che mostravano spostamenti evidenti dell'articolazione durante l'esame. Non tutti gli spostamenti sono però facilmente individuabili ad occhio nudo data l'elevata rumorosità delle immagini.

Mettendo a confronto due frame di uno stesso filmato (Fig. 6.1), presi in istanti diversi, si può infatti notare una traslazione delle strutture ossee.



*Figura 5.6: frame presi a una distanza di 30s l'uno dall'altro. In rosso sono state cerchiare le strutture ossee; si può notare chiaramente che c'è stata una traslazione*

È quindi necessario allineare i vari frames del filmato. L'operazione di allineamento prende il nome di “registrazione”.

Per semplicità si è supposto che i frames del video potessero essere solo traslati rispetto al primo frame, e non ruotati o deformati. Sotto questa assunzione la registrazione di due frame si riduce a determinare le componenti della traslazione lungo le due dimensioni.

Per fare questo è necessario calcolare la matrice di cross-correlazione tra il primo ed ogni successivo frame. Ricordando che abbiamo rappresentato i dati con una funzione  $f(x, y, t)$  con  $0 \leq x \leq h-1$  e  $0 \leq y \leq w-1$ , le componenti della matrice risultante  $C_k$  per ogni istante  $t_k$  possono essere calcolate con la seguente formula:

$$C_k(i, j) = \sum_{m=0}^{h-1} \sum_{n=0}^{w-1} f(m, n, 1) f(m+i, n+j, t_k)$$

con  $0 \leq i \leq 2h-1$  e  $0 \leq j \leq 2w-1$

La matrice di cross-correlazione contiene per ogni coordinata  $(i, j)$  un valore che esprime la “somiglianza” tra il primo frame e una versione traslata di  $i$  pixel lungo  $x$ , e  $j$  pixel lungo  $y$  del  $k$ -esimo frame. Facendo una media delle traslazioni che hanno un indice di correlazione maggiore del 95% della correlazione massima, pesata con l'indice di correlazione stesso, si ottengono con buona approssimazione le traslazioni effettive lungo le due dimensioni che è necessario applicare per allineare i frame.

Assumendo come modello di costo computazionale le sole moltiplicazioni, si può notare che il calcolo di ogni indice di correlazione ne richiede  $h \cdot w$ . Gli indici totali da calcolare sono

$4 \cdot h \cdot w$ , per un totale di  $4 \cdot h^2 \cdot w^2$  moltiplicazioni per ogni frame. La complessità computazionale è dunque quadratica e, nonostante la registrazione venga eseguita dopo aver applicato le tecniche di riduzione dati del capitolo precedente, l'elevato numero di quest'ultimi la rende particolarmente onerosa.

Si è dunque sviluppato un algoritmo più efficiente della banale implementazione della definizione della matrice di cross-correlazione.

La cross-correlazione di due vettori bidimensionali può anche essere vista come la convoluzione del primo per un vettore ottenuto leggendo il secondo al contrario:

$$C_k = f(m, n, 1) * \text{rot180}(f(m, n, t_k))$$

dove  $*$  indica l'operatore di convoluzione e  $\text{rot180}$  una rotazione della matrice di  $180^\circ$ , che corrisponde a leggere il vettore al contrario.

Ricordando che la convoluzione nel dominio dello spazio corrisponde alla moltiplicazione nel dominio della frequenza, possiamo riscrivere la precedente operazione come:

$$C_k = IDFT2(DFT2(f(m, n, 1)) * DFT2(rot180(f(m, n, t_k))))$$

dove DFT2 e IDFT2 corrispondono rispettivamente alla trasformata bidimensionale discreta di Fourier e all'anti trasformata bidimensionale discreta di Fourier.

Il vantaggio di questa scrittura rispetto alla formulazione iniziale è che esiste un algoritmo (Fast Fourier Transform: FFT) in grado di calcolare la DFT in tempo quasi lineare (più precisamente

$O(n \log(n))$ ) per dati con dimensioni uguali a potenze di due (si ricorderà che l'operazione di riduzione dell'intervallo spaziale di osservazione spiegata nel paragrafo 5.1.2. ha proprio come effetto quello di ottenere dati così dimensionati). È quindi possibile calcolare la matrice di cross-correlazione in maniera efficiente.

### 5.2.2. Registrazione dell'anatomica con il primo frame del filmato

La regione della sinovia è stata selezionata a mano su un'immagine anatomica cartacea dell'articolazione ottenuta con lo stesso ecografo operante in B-mode. Successivamente è stata fedelmente riportata (sempre a mano) sulla stessa immagine in versione digitale.

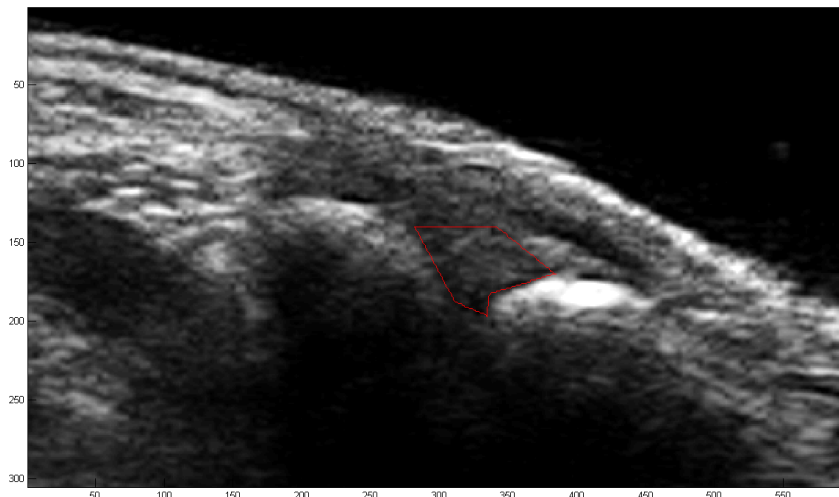


Figura 5.7: immagine in B-mode dell'articolazione con evidenziato in rosso la regione della sinovia



Anche in questo caso, come nel precedente, è possibile che l'anatomica non sia perfettamente allineata con il video. Per risolvere il problema non si fa altro che eseguire l'algoritmo di registrazione illustrato nel paragrafo precedente prendendo come input l'immagine anatomica e il primo frame del video. Con i valori di traslazione noti è facile ricalcolare la giusta selezione.

### **5.2.3 Normalizzazione dei dati rispetto all'osso**

Poiché gli esami sono stati raccolti nell'arco di due anni è facile che la taratura della strumentazione ecografica possa aver subito delle modificazioni con il passare del tempo e con l'utilizzo. Inoltre anche condizioni ambientali differenti possono influire su quest'ultima. Per ovviare a questo problema e per permettere l'utilizzo di altre macchine con caratteristiche differenti si provvede ad una normalizzazione dei dati.

L'output dello strumento ha un range dinamico di 256 valori di grigio, dove 0 rappresenta il nero e 255 il bianco. Poiché l'osso è il materiale con la più alta impedenza acustica esso risulta il più chiaro nelle immagine, e quindi sarà caratterizzato dai valori più alti della scala di grigio.

La normalizzazione dei dati rispetto all'osso prevede di dividere tutti i dati per il valore massimo del filmato ottenendo quindi:

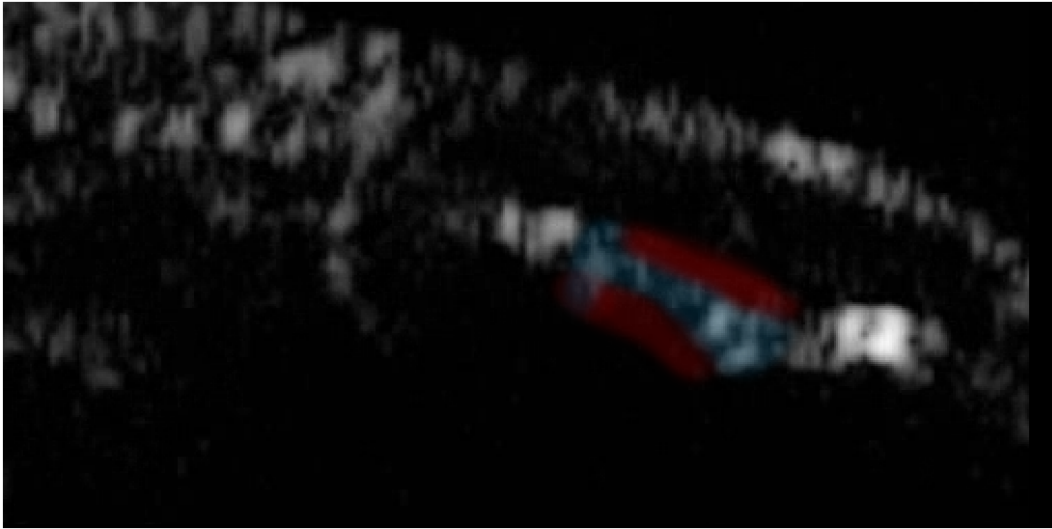
$$\hat{f}(x, y, t) = \frac{f(x, y, t)}{\max\{f(x, y, t)\}}$$

In questo modo i dati avranno un range dinamico che va da 0 a 1 e saranno maggiormente strumento-indipendenti.



## 6. STIMA DEI PARAMETRI

Una volta ridimensionati e corretti, i dati sono pronti per essere elaborati dall'algoritmo di fitting. Per comodità è stata creata una matrice contenente le sole locazioni spaziali della sinovia, organizzata in modo tale che per ogni riga sia contenuta l'evoluzione temporale di quel pixel. Da un'osservazione visiva del filmato si nota però che non tutte le locazioni spaziali sono interessate dall'arrivo del tracciante.



*Figura 6.1: in blu sono evidenziate le zone interessate all'arrivo dell'agente di contrasto, mentre in rosso le zone dove non ve n'è traccia.*

Risulta quindi conveniente adottare alcuni criteri per determinare quali segnali includono tracciante e quali invece no, in modo da limitare il numero di volte che l'algoritmo di fitting deve essere eseguito. Infatti tale algoritmo converge abbastanza velocemente quando i dati "assomigliano" al modello utilizzato, ma nel caso invece siano casuali esso risulta molto lento e il risultato è spesso non coerente con il loro reale andamento temporale.

Per quanto riguarda le locazioni spaziali non interessate dall'arrivo del tracciante si è deciso di porre dei valori convenzionali ai parametri del modello che fossero indicativi dell'assenza dell'agente di contrasto. I valori scelti sono:

$$\begin{bmatrix} A & t_0 & \alpha & \beta \end{bmatrix}^T = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}^T$$

In questo modo tali dati saranno semplicemente modellati come  $y(t) = base$ .

## 6.1. CRITERI DI RICONOSCIMENTO DEL RUMORE

Per quanto appena detto, il riuscire a discernere le locazioni temporali contenenti rumore da quelle contenenti segnale utile è dunque importante sia per una migliore efficienza che per una maggiore robustezza dell'algoritmo. I criteri utilizzati sono basati su due semplici osservazioni:

- ◆ la media temporale del segnale deve essere maggiore del parametro *base* ;
- ◆ l'ampiezza massima del segnale deve essere superiore ad una certa soglia.

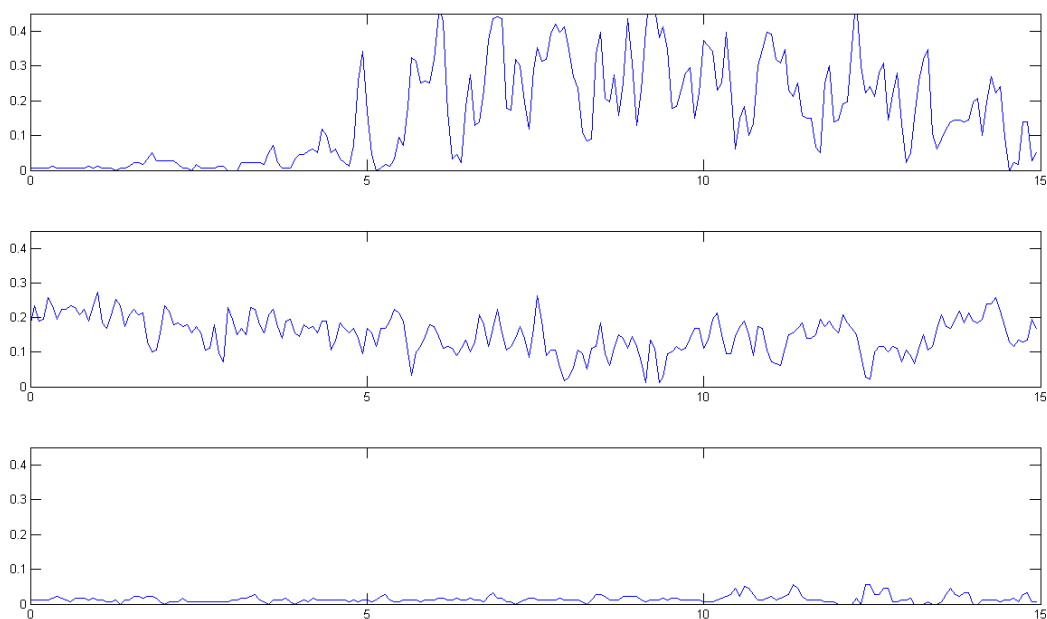


Figura 6.2: andamenti tipici di alcune locazioni spaziali.

Il primo criterio si basa sul fatto che il parametro *base* rappresenta il segnale misurato prima dell'arrivo del tracciante. Se in media il segnale è inferiore a tale soglia si avrebbe a che fare con una concentrazione negativa di tracciante, che chiaramente è priva di significato. I segnali che presentano questa caratteristica sono probabilmente dovuti a locazioni spaziali non appartenenti alla sinovia o particolarmente soggetti a rumore.

Il secondo criterio, invece, è basato sull'idea che dove non arriva il tracciante i valori di intensità luminosa saranno nettamente più bassi. La scelta della soglia si è rivelata un parametro difficile da valutare partendo dai dati ed è quindi stata determinata in modo empirico dopo svariate prove e posta a 0,1. In figura 6.2 sono messe a confronto i tre tipici andamenti del segnale: in alto abbiamo

l'andamento temporale di una locazione spaziale contenente tracciante; in centro una locazione spaziale in cui la media del segnale è inferiore al parametro *base* e in basso una locazione spaziale non interessata all'arrivo dell'agente di contrasto.

## 6.2. ALGORITMO DI FITTING

L'algoritmo utilizzato per il fitting prende il nome di “Trust-region” e rappresenta un miglioramento del più noto algoritmo di Levenberg-Marquardt nel caso in cui siano noti degli intervalli (regioni di fiducia) entro i quali i parametri possono variare. È importante quindi definire dei limiti al di là dei quali la probabilità che il parametro possa assumere tali valori sia sufficientemente piccola da essere trascurata. Il vantaggio che deriva dal definire tali confini sta nell'ottenere comunque risultati abbastanza coerenti con il modello, evitando per esempio valori negativi che sono privi di significato. Le regioni di fiducia per i vari parametri sono state così definite:

- ◆  $0 \leq A \leq 2$
- ◆  $0 \leq t_0 \leq 0,75 \cdot \max\{t\}$
- ◆  $0 \leq \alpha \leq 10$
- ◆  $1 \leq beta \leq \max\{t\}/\ln(2)$

Tali valori sono stati determinati studiando la distribuzione dei parametri dopo aver eseguito un primo fitting con l'algoritmo di Levenberg-Marquardt e valutando quali risultati erano soddisfacenti. Per sicurezza sono comunque stati presi intervalli ben più ampi di quelli di effettiva variabilità dei parametri.

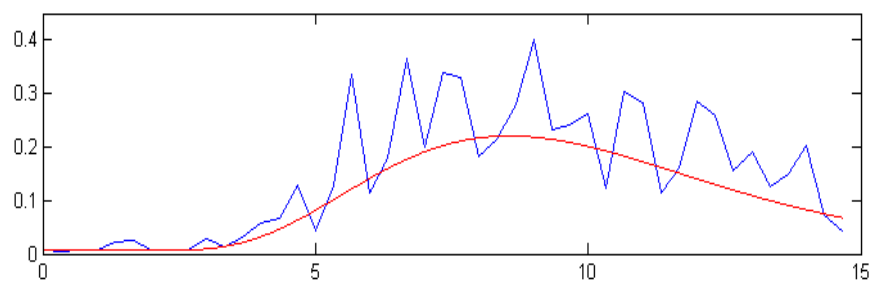


Figura 6.3: esempio di fit



## 7. DISCUSSIONE

La sinovite è l'alterazione patologica primaria nelle artriti infiammatorie croniche ed è presente già nella fase preclinica delle artriti sistemiche, quali l'artrite reumatoide e psoriasica.

La sinovite si accompagna alla neovascolarizzazione della membrana sinoviale. Neovascolarizzazione e formazione del panno sembrano essere due processi distinti, ma tra loro interdipendenti. Nonostante le scarse conoscenze in questo ambito, sembra che la neoangiogenesi preceda la formazione del panno e sia un fattore necessario nel progredire dell'infiammazione.

Le metodiche radiologiche convenzionali (radiologia, TAC, scintigrafia) non permettono una valutazione diretta dell'iperplasia sinoviale. L'esito del processo infiammatorio nel tempo viene valutato per lo più in modo indiretto, monitorando le alterazioni bioumorali, gli indici obiettivi di attività di malattia, l'incapacità funzionale e l'inabilità lavorativa.

L'ecografia potrebbe essere usata come un esame di prima linea nel sospetto di una RA precoce e la CEUS, sfruttando la sua elevata sensibilità ai cambiamenti della vascolarizzazione, può dare indicazioni sull'attività della malattia. Inoltre la CEUS potrebbe offrire importanti informazioni non solo sulla fase precoce dell'artrite, ma anche sul suo follow-up.

Per l'acquisizione dei dati si è posizionato la mano del paziente in una vasca con acqua a 28 °C. L'acqua sostituisce il gel come interfaccia sonda-cute: questo permette di non dover tenere la sonda a contatto con la cute. Così facendo si evita di comprimere i tessuti analizzati riducendo gli artefatti ed evitando di procurare dolore al paziente durante l'esame di una sede già infiammata. La sonda viene quindi posta sempre alla stessa distanza dall'articolazione e il fuoco posizionato a livello della sinovia. La mano rimane appoggiata al fondo della vasca per tutta la durata dell'esame in posizione neutra, limitando al minimo il disturbo per il paziente e gli artefatti dovuti al movimento. L'acqua, mantenuta ad una temperatura gradevole, permette una vasodilatazione costante delle arteriole della mano. Il mezzo di contrasto viene iniettato in bolo in una vena del braccio controlaterale.

La sequenza di immagini così ottenuta occupa però uno spazio elevato in memoria e mal si presta ad essere agevolmente elaborata. Si è dunque posta particolare attenzione nella riduzione dei dati attraverso quattro tecniche distinte:

- ◆ riduzione dell'intervallo temporale di osservazione: il filmato viene limitato ai primi quindici secondi. Tale tempo è sufficiente per osservare l'arrivo e il quasi completo decadimento del tracciante. Inoltre viene risolto il problema del ricircolo di tracciante;
- ◆ riduzione della superficie di osservazione: l'area della sinovia occupa solo una parte della superficie presa in esame. Si opera quindi un'eliminazione dei bordi dei frame tale da rendere le nuove dimensioni pari a potenze di due in modo da ottimizzare le future operazioni di trasformata di Fourier mediante l'algoritmo FFT;
- ◆ resize dei frame: si opera un fattore di scala pari a 0,5 per entrambe le dimensioni. I nuovi valori vengono calcolati come media aritmetica di quattro pixel adiacenti. Grazie all'operazione di media si ha inoltre una riduzione della varianza dell'errore di misura in quanto supposto a media nulla e indipendente nello spazio;
- ◆ decimazione temporale: il filmato viene ricampionato nel tempo con una frequenza di campionamento inferiore. Per evitare fenomeni di aliasing viene prima applicato un filtro passa-basso nel tempo che ha come ulteriore vantaggio quello di eliminare alcune componenti spettrali del rumore.

Successivamente si sono rivelati necessari altri passaggi volti alla correzione automatica di alcuni errori di procedura: data la non perfetta immobilità della mano del paziente durante tutta la durata dell'esame, in alcuni filmati era visibile una traslazione spaziale dell'articolazione. Per ovviare a questo problema si è operata una registrazione di tutti i frame del video rispetto al primo mediante il calcolo efficiente della matrice di cross-correlazione. Tale procedimento è stato impiegato anche per il corretto posizionamento della regione sinoviale. Infine il segnale video, rappresentato con una scala di 256 valori di grigio, è stato normalizzato rispetto al valore massimo, idealmente corrispondente all'osso, per garantire una maggiore indipendenza dalla strumentazione usata.



Lo scopo di questo studio è di ricavare da una sequenza di immagini CEUS un'immagine vettoriale contenente i parametri cinetici dell'andamento temporale del tracciante. Per fare questo si è studiato un modello matematico in grado di approssimare i dati raccolti. Il modello scelto è una funzione gamma-variata espressa dalla seguente relazione:

$$\Gamma(t) = \begin{cases} base + A(t-t_0)^\alpha e^{-(t-t_0)/\beta} & t \geq t_0 \\ base & t < t_0 \end{cases}$$

Inoltre sono state poste le seguenti assunzioni sull'esperimento:

- ◆ l'agente di contrasto è totalmente non diffusibile;
- ◆ non c'è ricircolo dell'agente di contrasto;
- ◆ l'agente di contrasto è confinato nello spazio intravascolare,
- ◆ durante l'esperimento il sistema è stazionario, cioè il flusso ematico è assunto costante;
- ◆ l'agente di contrasto non perturba in modo apprezzabile il sistema.

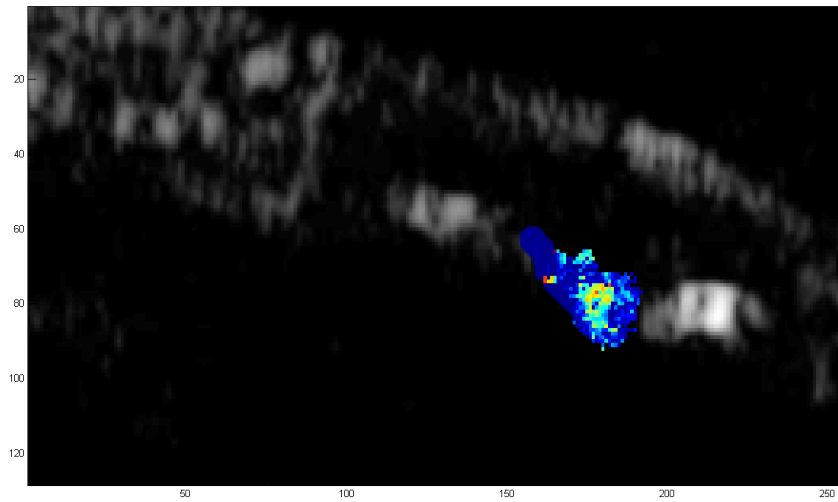
Per quanto riguarda l'errore di misurazione, esso è stato modellato come una variabile aleatoria additiva con media nulla e varianza nota eccetto un fattore di proporzionalità. Inoltre viene supposto sia indipendente sia nello spazio che nel tempo.

Per la stima dei parametri si è scelto uno stimatore ai minimi quadrati non lineari pesati.

L'algoritmo utilizzato per la stima dei parametri è il Trust-Region, che attualmente è considerato lo stato dell'arte nella soluzione di sistemi non lineari. Esso è stato applicato ai soli dati che presentavano caratteristiche tali da permettere una convergenza del modello (ossia quei segnali la cui media fosse superiore alla base). Si sono inoltre esclusi quei dati con intensità luminosa massima al di sotto di una certa soglia in quanto rappresentano locazioni spaziali non interessate dall'arrivo di tracciante.

La mappa parametrica così ottenuta si propone di essere uno strumento in grado di semplificare l'esplorazione e l'individuazione di pattern rilevanti per la diagnosi, la differenziazione e la caratterizzazione dell'artrite. La particolare attenzione posta nell'ottimizzazione dell'algoritmo permette che questo possa essere eseguito su hardware comune. Questo, unito al basso costo dell'esame ecografico (stimato di 60€ da S.S.N. più

110€ dell'agente di contrasto), rende tale tecnica particolarmente economica, soprattutto se confrontata con l'MRI. Concludendo ricordiamo che questo studio preliminare trova la sua collocazione su un più ampio progetto volto ad ottenere degli strumenti di analisi automatica di filmati CEUS in grado di fornire un supporto alla diagnosi medica.



*Figura 7.1: Mappa parametrica relativa al parametro  $\alpha$*





## BIBLIOGRAFIA

- [1] Alarcon GS. *Epidemiology of rheumatoid arthritis*. Rheum Dis Clin North (1995).
- [2] Benvenuto N., Corvaja R., Erseghe T., Laurenti N.. *Communication systems fundamentals and design methods*. Wiley (2007).
- [3] Cariolaro Gianfranco, Pierobon Gianfranco, Calvagno Giancarlo. *Segnali e sistemi*. McGraw-Hill (2005).
- [4] Celis M., J. E. Dennis, *A trust region strategy for nonlinear equality constrained optimization, in Numerical Optimization 1994*. SIAM (1985).
- [5] Cobelli Claudio, Bonadonna Riccardo, *Bioingegneria dei sistemi metabolici*. Pàtron (1998) .
- [6] Cobelli Claudio, David Foster, Gianna Toffolo. *Tracer kinetic in Biomedical Research*. Kluwer Academic (2000).
- [7] Colville-Nash PR, Scott DL. *Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications*. Aim Rheum Dis. (1992)
- [8] Cormen Thomas H.. *Introduction to algorithms Thomas*. MIT Press (2009).
- [9] Gonzalez Rafael C., Woods E., Steven L. Eddins. *Digital image processing using MATLAB*. Pearson (2004).
- [10] H. W. Ott. *Noise reduction techniques in electronic systems 2<sup>nd</sup> ed*. John Wiley and Sons (1988).
- [11] Hossack J.. *Observations of transient perfusion defects in a mouse heart using contrast ultrasound*. IEEE Ultrasonics Sym. (2003).
- [12] Huang-Wei C.. *Differential diagnosis of focal nodular hyperplasia with quantitative parametric analysis in contrast enhanced sonography*. Investigative Radiology, Vol. 41, No. 3 (2006).
- [13] Oppenheim Alan V., Schafer Ronald W.. *Elaborazione numerica dei segnali edizione italiana a cura di Carlo Braccini e Giuseppe Gambardella*. F. Angeli (1996).
- [14] Szabo Thomas L. *Diagnostic ultrasound imaging: inside out*. Burlington (2004) .
- [15] Zhang J., Hu W., Wu Y., Klemer D, Hall A., Kahn C. *A Novel Model for Contrast Enhanced Ultrasound Video and Its Application*. IEEE Ultrasonics Sym. (2006).
- [16] Ciprian Luca. *Elaborazione di una nuova tecnica ecografica con m.d.c. nello studio delle articolazioni della mano*. Università di Padova (2008).