IST. EL. INF.
BIBLIOTECA
Posiz. ARCHIVIO

Consiglio Nazionale delle Ricerche

ISTITUTO DI ELABORAZIONE
DELLA INFORMAZIONE

PISA

FLUOROANGIOGRAFIA DIGITALE APPLICATA ALLO STUDIO DELLA PERMEABILITA' VASALE DEL DISTRETTO RETINICO

P. Ammannati, L. Azzarelli, M. Ballati
R. Bozzi, R. Panicucci

Nota Interna B4-28/29

1988

Stampato in proprio dal Servizio Tecnografico
dell'Istituto di Elaborazione della Informazione - CNR - Pisa

FLUOROANGIOGRAFIA DIGITALE APPLICATA ALLO STUDIO DELLA PERMEABILITA` VASALE DEL DISTRETTO RETINICO

Paola Ammannati, Luciano Azzarelli**, Marirosa Ballati**, Renzo Bozzi**, Romano Panicucci***

* Clinica Oculistica - Universita` di Pisa

** Istituto di Elaborazione della Informazione - CNR Pisa

1. *Introduzione*

In questa nota vengono presentati i risultati preliminari ottenuti dalla attivita` di ricerca condotta dall'Istituto Oftalmologico dell'Universita` di Pisa in collaborazione con l'Istituto di Elaborazione della Informazione (IEI) del CNR di Pisa e con il Laboratorio Baldacci S.p.A. per lo studio della permeabilita` vasale del distretto retinico.

I dati angiografici sperimentali sono stati ricavati utilizzando 12 animali da esperimento (conigli maschi New Zeland del peso di circa 2 kg) che sono stati esaminati mediante tecniche fluoroangiografiche prima e dopo la somministrazione di aminonaftone per un periodo di 7 gg. e con dosaggio di 1 mg/kg per via orale mediante sonda gastrica. Gli esami sono stati eseguiti iniettando nella vena auricolare albumina glicosilata legata alla fluorescina in dosi di 150 mg per animale; le angiografie del fondo oculare sono state eseguite impiegando un retinografo TOPCON RC5W.

Le immagini fluoroangiografiche fissate su pellicola fotografica sono state esaminate impiegando le comuni metodologie e tecniche cliniche e ricorrendo a procedure elaborative per l'analisi numerica delle immagini. Per questo ultimo tipo di indagine e` stato impiegato il sistema per l'oftalmologia digitale EIES realizzato in una precedente collaborazione fra la Clinica Oculistica di Pisa e l'IEI nell'ambito del Progetto Finalizzato "Tecnologie Biomediche e Sanitarie" e del Progetto Strategico "Sistemi Informatici in Biomedicina" del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

2. *Analisi Oftalmologica Tradizionale*

La glicosilazione di siero albumina di coniglio (Sigma) e` stata effettuata per incubazione in tampone di Dulbeceo a T.A. in presenza di glucosio 20 mM.

La molecola dell'albumina, con un notevole numero di radicali lisinici (59 nel coniglio, 60 nell'uomo), presenta un'alta polarita`, cioe` una carica elettrica tale da poter permanere a livello endovasale senza presentare tropismo per le pareti.

Con il processo di glicosilazione i radicali lisinici vengono saturati chimicamente dalla presenza del glucosio. Tale evento determina una sensibile riduzione della polarita` della molecola dell'albumina glicosilata, variando cosi` la sua permanenza nel letto vasale e il suo tropismo verso le pareti; si verifica pertanto una rapida fuoriuscita dal vaso.

Il fondo oculare dei singoli animali e` stato esaminato visivamente durante l'intero ciclo di attivazione dell'albumina glicosilata resa fluorescente al fine di individuare le zone di interesse e i tempi di rilevamento dei dati; sono state quindi ricavate circa 100 immagini fotografiche del fondo retinico inquadrando lo stesso campo, operando nelle stesse condizioni di illuminamento, esposizione e ingrandimento, e adottando uguali tecniche fotografiche di sviluppo, fissaggio e stampa.

Le immagini angiografiche retiniche ricavate dal gruppo di animali prima del trattamento farmacologico con l'aminonaftone presentano particolari e strutture piu` evidenti rispetto a quelli ottenibili utilizzando fluorescina sodica, comunemente impiegata per gli esami fluoroangiografici nell'uomo. Infatti, come si puo` osservare negli angiogrammi riportati in figura 1 (tempo precoce) e in figura 2 (tempo tardivo), si rileva nel tempo precoce un aspetto ben demarcato dei grossi vasi che viene ulteriormente esaltato nei tempi tardivi, contrariamente alla normale dinamica circolatoria; si puo` rilevare inoltre che anche la coroide presenta un eccesso di captazione della sostanza fluorescente.

Fig. 1 - Angiogramma retinico, ricavato nel tempo precoce con fluoresceina sodica, relativo ad un animale prima del trattamento con aminonaftone.

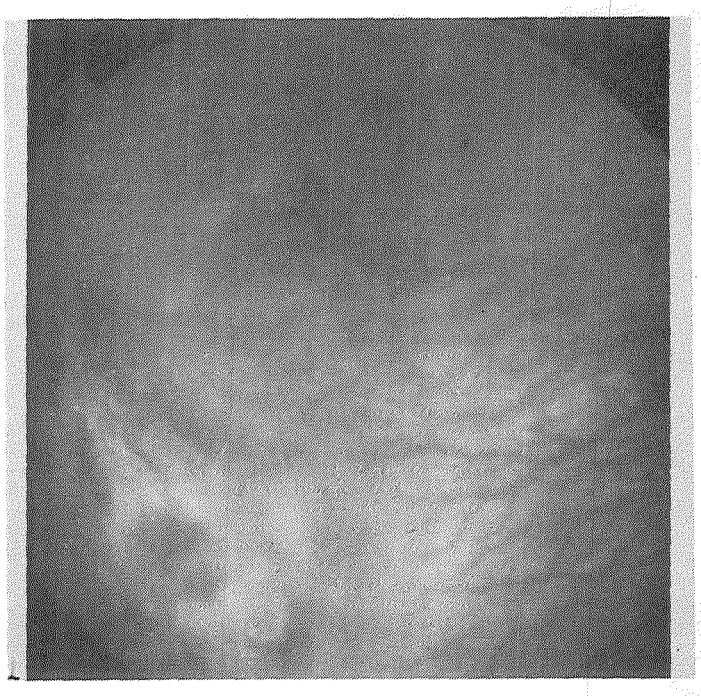

Fig. 2 - Angiogramma retinico, ricavato nel tempo tardivo con fluoresceina sodica, relativo ad un animale prima del trattamento con aminonaftone.

Nella foto rappresentata in figura 5 e` mostrata la stazione EIES: si possono individuare il sistema di calcolo, il dispositivo MFA/36/LS per l'acquisizione delle immagini, e il monitor di uscita sul quale e` possibile rappresentare immagini con una risoluzione massima di 1024x1024 pixel; nel disegno di figura 6 e` rappresentato uno schema di principio che illustra la configurazione interna alla stazione.

Le immagini ricavate come descritto nel precedente paragrafo, sono state digitalizzate mediante il microfotometro MFA/36/LS della stazione di lavoro e preelaborate per correggere le distorsioni radiometriche e geometriche introdotte in fase di formazione e acquisizione. Per quanto si sia cercato di acquisire lo stesso campo di interesse, per inevitabili motivi dovuti alle tecniche manuali visive di individuare le zone di interesse, le immagini non sono perfettamente sovrapponibili, si e` reso quindi necessario eseguire una serie di elaborazioni per effettuare una accurata registrazione delle immagini al fine di consentire confronti affidabili.

Come e` stato gia` accennato, le immagini risultano essere poco leggibili a causa del basso contrasto, e non perfettamente confrontabili dal punto di vista fotometrico a causa delle variazioni della intensita` di illuminamento e di risposta del fondo retinico, che dipende anche dall'angolo di incidenza della luce. E` stato necessario quindi impiegare algoritmi per l'esaltazione del contrasto e procedure di normalizzazione fotometrica.

Tutte le immagini sono state successivamente esaminate eseguendo una serie di misure fotometriche all'interno di alcuni grossi vasi prescelti e comuni a tutte le immagini; sono state eseguite analisi di tipo statistico sulle zone circostanti (coroide) per esaminare la distribuzione radiometrica dei dati; sono state infine eseguite misure metriche sui vasi selezionati per determinarne il calibro e il decorso.

Valutando i risultati delle analisi si e` accertato che la risposta alle indagini mediche e` mediamente omogenea per tutti gli animali e con linee di tendenze comuni, per cui in questa relazione viene presentata solo una serie di immagini relative alle analisi eseguite su un singolo animale, prima e dopo il trattamento farmacologico.

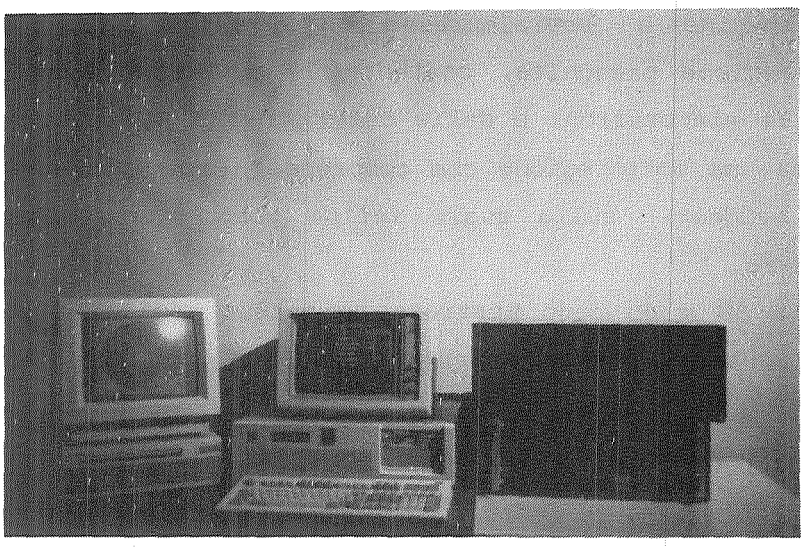

Figura 5 - Stazione di lavoro EIES per l'oftalmologia digitale.

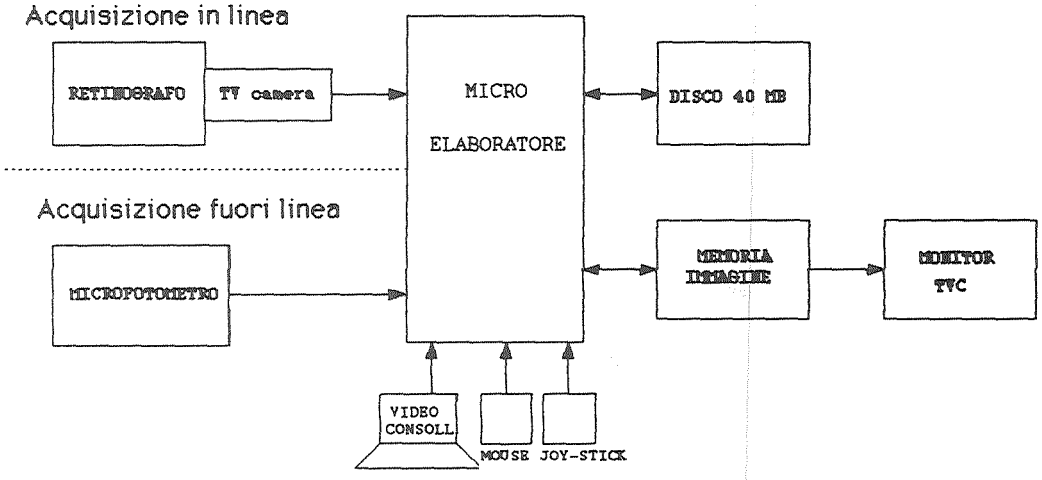

Figura 6 - Architettura della stazione EIES

Nella figura 7 e` mostrata una porzione del fluoroangiogramma del fondo retinico di un individuo non trattato rilevato durante la fase precoce; sull'immagine e` sovraimpresso un quadrato allo scopo di individuare la regione prescelta, costante in tutte le immagini, per l'esecuzione delle elaborazioni e delle osservazioni. Da questa regione e` stata estratta una sottoregione che comprende alcuni grossi vasi che risultano piu` evidenti, sulla quale infine sono state eseguite le analisi e le misure.

Nelle figure 8a e 8b sono mostrate le intere regioni relative al riquadro della figura 7, acquisite rispettivamente nei tempi precoce e tardivo prima del pretrattamento con aminonaftone; nelle figure 9a e 9b sono mostrate invece le stesse regioni acquisite rispettivamente dallo stesso individuo nei tempi precoce e tardivo dopo il trattamento con aminonaftone. All'interno di queste immagini e` evidenziata una finestra nella quale e` stata eseguita una procedura di restaurazione ed enhancement dei dati.

A conferma delle osservazioni visive e delle relative considerazioni cliniche descritte sinteticamente nel paragrafo 2, sono state ricavate le distribuzioni dei valori radiometrici rappresentate negli istogrammi riportati rispettivamente nelle figure 10a-b-c-d.

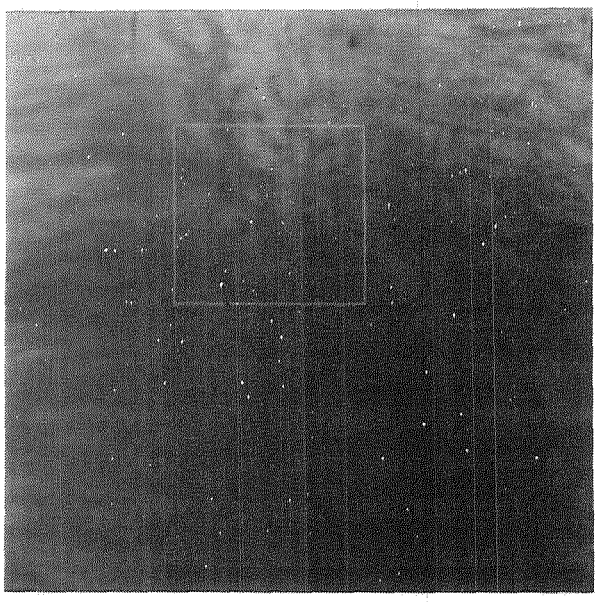

Figura 7 - Immagine digitale di una porzione di angiogramma relativo ad un animale prima del trattamento farmacologico.

Figura 8a - Immagine acquisita nel tempo precoce prima del trattamento: nel riquadro immagine restaurata.

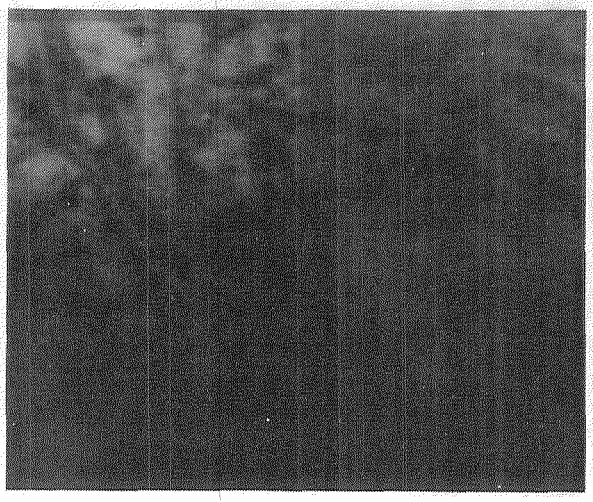

Figura 8b - Immagine acquisita nel tempo tardivo prima del trattamento: nel riquadro immagine restaurata.

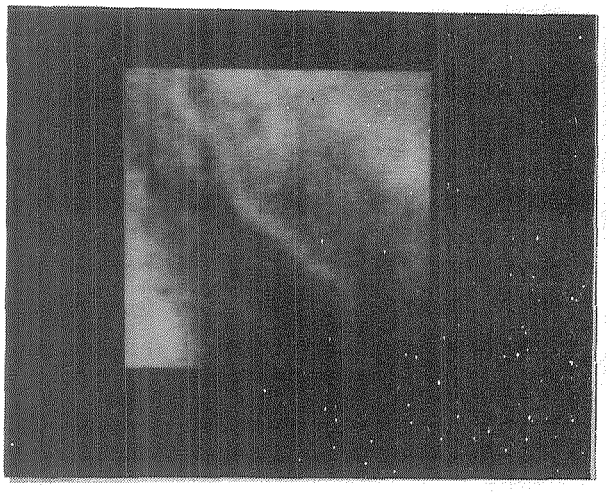

Figura 9a - Immagine acquisita nel tempo precoce dopo il trattamento: nel riquadro immagine restaurata.

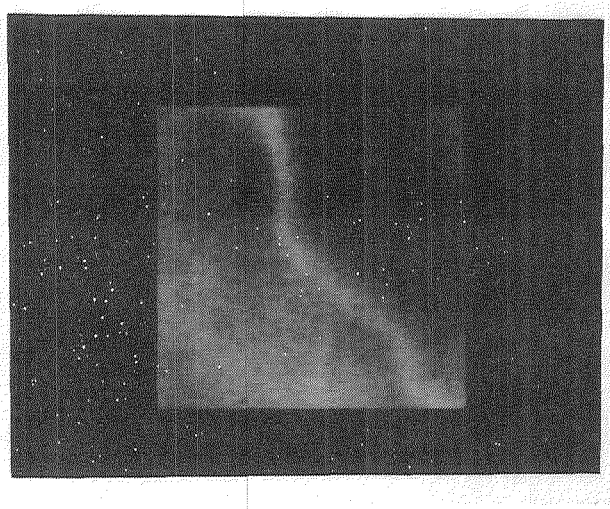

Figura 9b - Immagine acquisita nel tempo tardivo dopo il trattamento: nel riquadro immagine restaurata.

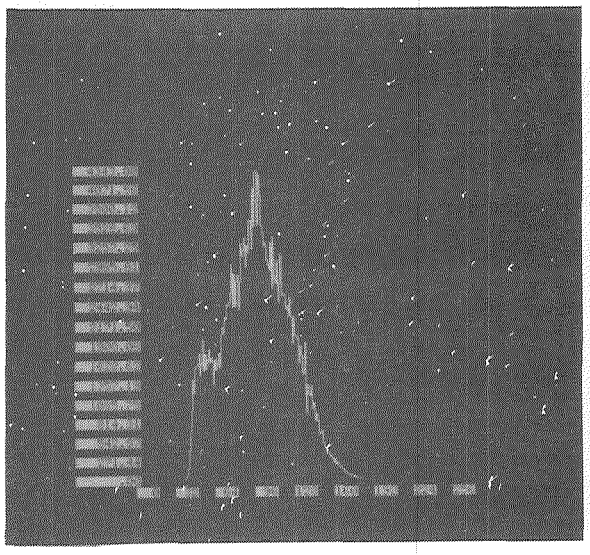

Figura 10a - Distribuzione dei valori radiometrici di figura 8a.

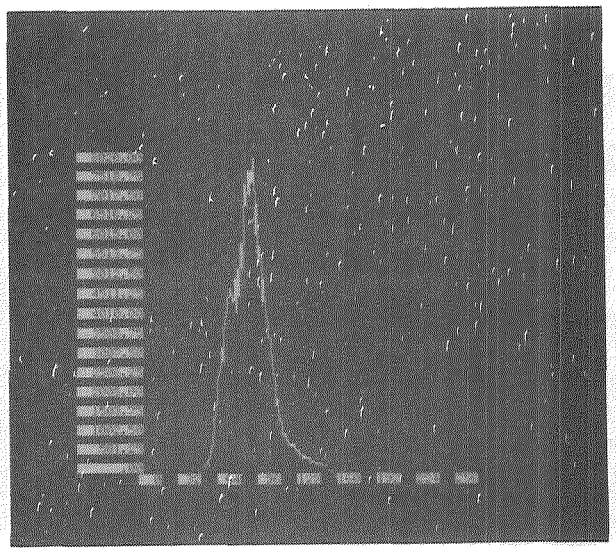

Figura 10b - Distribuzione dei valori radiometrici di figura 8b.

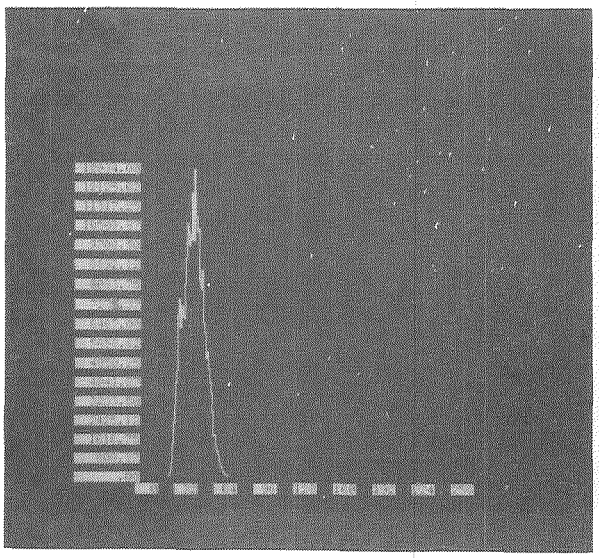

Figura 10c - Distribuzione dei valori radiometrici di figura 8c.

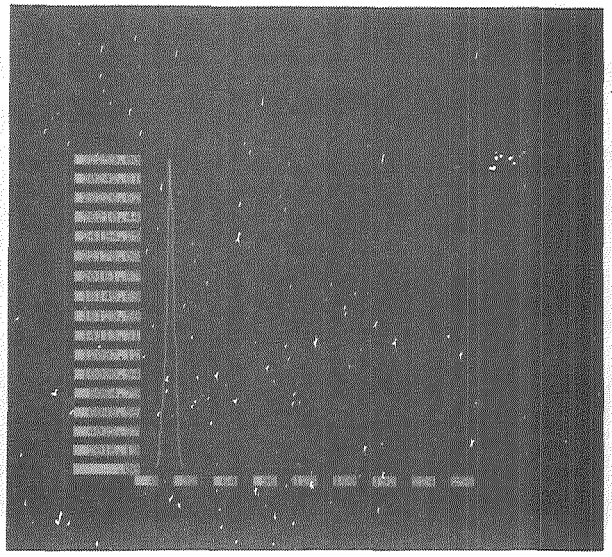

Figura 10d - Distribuzione dei valori radiometrici di figura 8d.

Dall'esame di questi istogrammi e` possibile notare che le immagini ricavate dagli animali prima del trattamento (sia nel tempo precoce che in quello tardivo) hanno un contenuto informativo piu` elevato ed una dinamica di distribuzione piu` estesa, che risulta essere centrata rispetto alla scala di misura, rispetto agli istogrammi relativi alle acquisizioni eseguite sugli animali dopo il trattamento farmacologico.

Questa distribuzione giustifica anche la minore leggibilita` della seconda serie di immagini (fig. 10c e 10d) dovuta, apparentemente, all'azione del farmaco somministrato.

Sulle sottoregioni relative ai vasi e` stata eseguita un prima elaborazione per uniformare la dinamica di rappresentazione e consentire i necessari confronti; a questo scopo sono state impiegate tecniche di espansione delle scale radiometriche utilizzando opportuni fattori di normalizzazione all'interno della dinamica di acquisizione e rappresentazione. Sono inoltre state eseguite alcune correzioni radiometriche per ridurre le distorsioni introdotte dalla non linearita` delle caratteristiche di trasferimento della pellicola fotografica utilizzata e dallo schermo fluorescente a raggi catodici del monitor.

Nelle figure 11a e 11b e` riportato un esempio della tecnica di espansione impiegata: la figura 11a mostra l'istogramma della sottoregione relativa all'immagine angiografica rilevata nel tempo precoce dal coniglio non trattato (fig.8a); nella figura 11b e` mostrato lo stesso istogramma espanso sull'intera dinamica. Gli effetti di questa espansione e normalizzazione sono osservabili nei riquadri piu` contrastati visibili nelle relative immagini mostrate in figura 8a, e in quelle riportate nelle figure 8b, 8c e 8d.

Come si puo` notare, le sottoregioni di interesse risultano essere molto piu` contrastate e visibili senza per questo che sia stata modificata la struttura geometrica delle strutture. Gia` questo miglioramento della rappresentazione consente un'osservazione visiva molto piu` accurata e precisa che permette una prima verifica delle ipotesi espresse nel paragrafo 2.

Per le misure radiometriche e` stata impiegata una tecnica di rappresentazione a falsi colori mediante una scala cromatica a 8 colori

saturi utilizzata nelle stesse condizioni di taratura per tutte le immagini. Infatti, osservando l'immagine riquadrata di figura 8a, si puo` notare la netta demarcazione del vaso dal tessuto circostante che sembra provare l'ipotesi della permeabilita` vasale alla albumina glicosilata che ha gia` abbandonato in gran parte il letto vasale.

Tale considerazione puo` essere ulteriormente confermata dalla osservazione della figura 8b relativa al tempo tardivo; infatti il letto vasale risulta essere ulteriormente svuotato e il vaso ancor meglio demarcato.

Osservando invece le immagini riportate nelle figure 8c e 8d, i vasi non risultano altrettanto demarcati nonostante l'utilizzo della stessa sostanza, nelle stesse dosi e mediante rilevamenti eseguiti con la stessa metodica e temporizzazione.

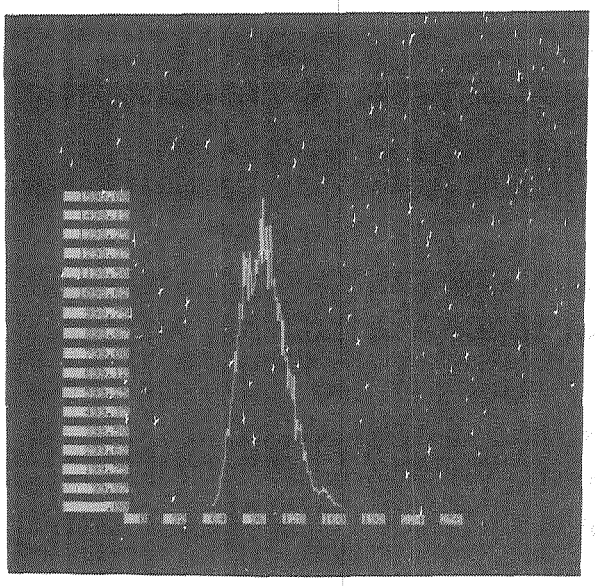

Figura 11a - Distribuzione dei valori radiometrici di figura 8b relativi al tempo tardivo.

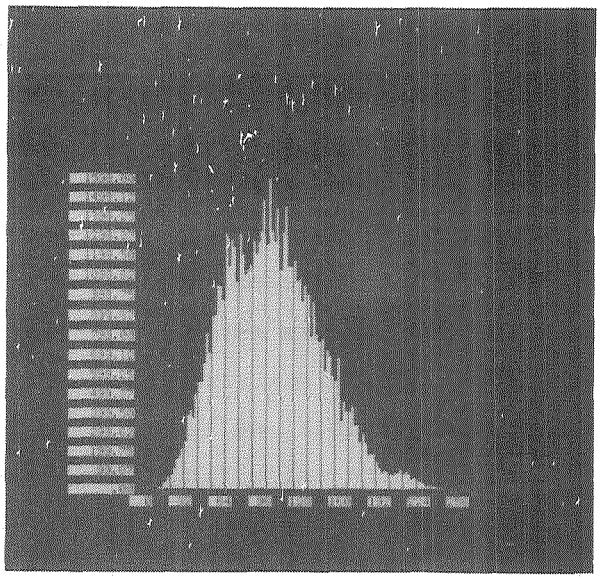

Figura 11b - Espansione di scala della distribuzione radiometrica.

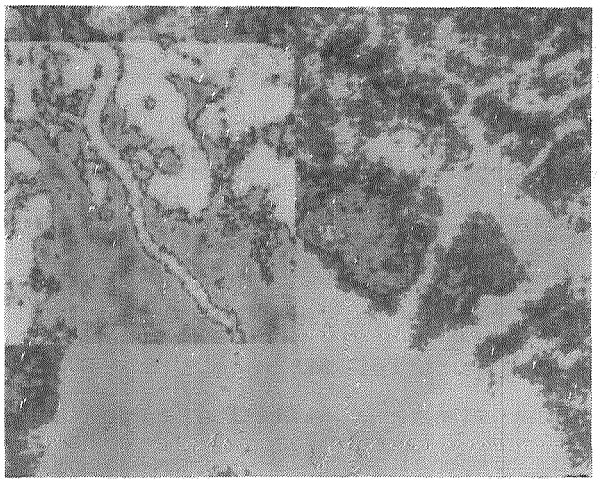

Figura 12a - Quantizzazione e rappresentazione a falsi colori della immagine di figura 8a.

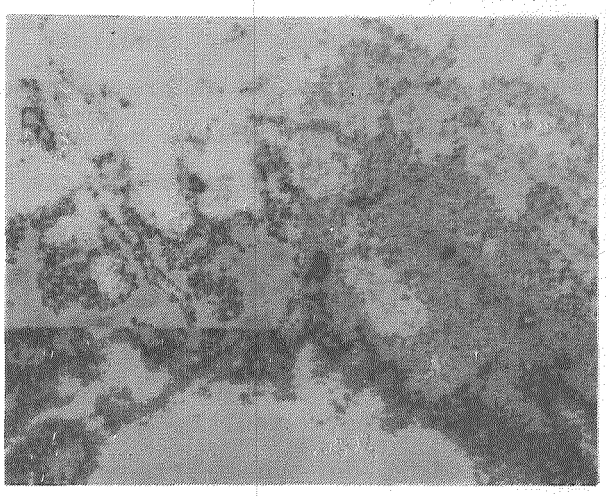

Figura 12b - Quantizzazione e rappresentazione a falsi colori della immagine di figura 8b.

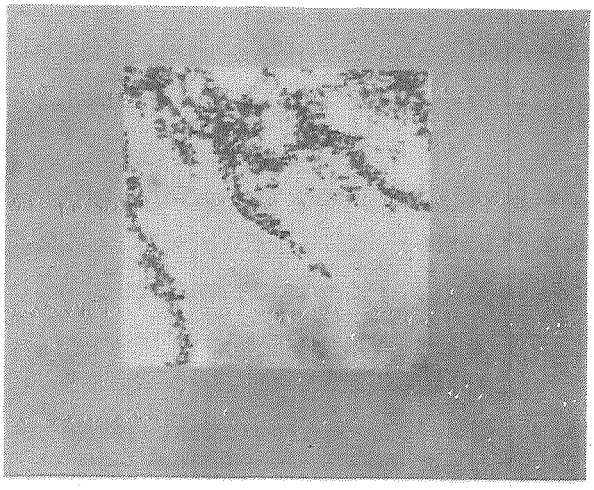

Figura 12c - Quantizzazione e rappresentazione a falsi colori della immagine di figura 8c.

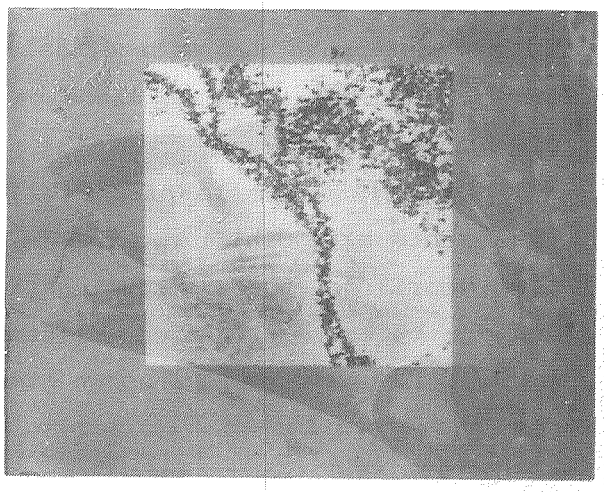

Figura 12d - Quantizzazione e rappresentazione a falsi colori della immagine di figura 8d.

In questi ultimi casi l'albumina glicosilata sembra essere sempre presente nel vaso con una distribuzione uniforme per cui i bordi del vaso stesso risultano essere molto meno evidenti; inoltre la fluorescenza circostante risulta essere notevolmente ridotta a conferma che il travaso e` risultato ridotto per una probabile minore permeabilita` dovuta al pretrattamento farmacologico (aminonaftone).

Come si puo` notare nelle figure 12a e 12b, corrispondenti rispettivamente alle immagini riportate nelle figure 8a e 8b, i valori radiometrici, rappresentati da bande di colore, risultano essere costantemente concentrati ai bordi del vaso il cui letto risulta essere uniforme. Nelle figure 12c e 12d la stessa scala cromatica tarata mette in evidenza una notevole uniformita` dei valori radiometrici del vaso.

Sono state inoltre eseguite alcune misure radiometriche puntuali all'interno dei vasi ottenendo valori coerenti con le osservazioni e valutazioni precedentemente descritte.

CONCLUSIONI

Gli studi e le analisi eseguiti e i risultati preliminari ottenuti sembrano confermare le ipotesi presentate avvalorando l'efficacia dell' aminonaftone quale stabilizzatore della permeabilita` vasale. Risulta quindi confermata nel microcircolo retinico la gia` nota efficacia di tale farmaco applicato in altre patologie con danno delle pareti vasali (diabete ecc.).

Si ritiene che le misure e le osservazioni eseguite siano sufficientemente attendibili nonostante le difficolta` di lettura e di indagine propria del tipo di sperimentazione e dei particolari soggetti utilizzati; tuttavia si ritiene necessario proseguire gli studi e le sperimentazioni, prima impiegando un numero maggiore di casi in modo da ricavare una casistica piu` probante, poi eseguendo una sperimentazione e valutazione sull'uomo impiegando anche metodologie di rilevamento piu` precise, ad esempio utilizzando campi di osservazione piu` ridotti che consentano ingrandimenti maggiori dei particolari di interesse e quindi misure piu` attendibili.

BIBLIOGRAFIA

1) L.Azzarelli, M.Chimenti, O.Salvetti, P.Ammannati, M.Lazzeri:
"A system for biomedical image acquisition and processing".
Proc. of the Congr. on Physics in Environmental and Biomedical Research, ed. by S.Onori and E.Tabet, 1985

2) L.Azzarelli, R.Bozzi, M.Chimenti, O.Salvetti:
"A software environment for digital image processing".
Mem. S.A.It. Vol.52, 1983

3) R.V.Campo and T.A.Aabert:
"Digital subtraction angiography in the diagnosis of retinal vascular disease". Am. J. Ophthal. 96:632-640, Nov. 1983

4) N.M.Duirey, F.C.Delai, F.S.Grayender:
"Monocromatic ophthalmoscopy and fundus photography. The patological fundus". Arch. Ophthalm. 97:288, 1979

5) A.W.Fryczkawski, D.L.Delaney et al.:
"Experimental intravenous digital subtraction angiography (DSA) of orbitaland choroidal circulation. Preliminary study".
Invest. Radiol. 18,512-516, Nov.-Dec. 1983

6) P.R.Pressner, J.Richard, O.Darselmann et al.:
"Quantitative measurement of retinal blood flow in human beings by application of digital image processing".
Method to telev. flucresc. in angiograms. Albreght von Graefes, Arch. Klin. Exp. Ohthalm., 221, 110-112 n.3, 1983

7) J.S.Read, A.C.Peterson, H.Bruce et al.:
"The television ophthalmoscope image processor: method and applications". Computer in Ophthalm., Apr. 1979

8) S.Cesaro, M.Re, O.Salvetti:
"A semi-automatic procedure for the analysis of geometrical features in the eye vessel network". Nota Interna IEI B4-07, 1987

9) L.Poli, O.Salvetti:
"Metodi di classificazione di strutture lineari in oftalmologia digitale". Nota Interna IEI B4-13, 1986

10) L.Azzarelli, M.Chimenti, L.Poli, O.Salvetti:
"Algoritmi di preelaborazione per immagini oftalmologiche".
Nota Interna IEI B4-11, 1986

11) P.Ammannati, D.Siravo, A.M.Wirth, L.Azzarelli, M.Chimenti, O.Salvetti: "Computerized image processing in ophthalmology".
Atti della Fondazione Giorgio Ronchi, Firenze, n.4, pp.565.598, 1986

12) M.Baldacci, R.Catalani, E.Fascetti, G.B.Gervasi:
"Polypeptide fraction from bovine factor VIII does not influence human platelet aggregation and blood coagulation.
Pharmacol. Res. Commun. 20:1, 1988