

POLITECNICO DI TORINO

Corso di Laurea Magistrale in
Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

Identificazione di singole unità motorie in contrazioni isometriche volontarie mediante ultrasonografia 3D ad elevato frame rate

Relatori

Prof. Kristen Mariko MEIBURGER

Prof. Alberto BOTTER

Ing. Marco CARBONARO

Ing. Silvia SEONI

Candidato

Melania NARDELLA

Ottobre 2024

Sommario

La contrazione del muscolo scheletrico è un complesso fenomeno elettromeccanico, controllato dal sistema nervoso attraverso il reclutamento delle unità motorie (UM). L'analisi delle funzionalità delle UM è fondamentale per la diagnosi di patologie neuromuscolari, nella ricerca neurofisiologica oltre che in applicazioni cliniche, come la riabilitazione e la medicina dello sport. Tradizionalmente, l'elettromiografia (EMG) è stata la tecnica di riferimento per investigare l'attivazione muscolare e le proprietà elettrofisiologiche delle UM. Più recentemente, tuttavia, è stata dimostrata la validità dell'ultrasonografia (US) per lo studio della risposta meccanica, ovvero il rapido spostamento tissutale che segue l'attivazione elettrica. In particolare, l'impiego di tecnologie US ad elevato frame rate ha permesso di ottenere la risoluzione temporale necessaria per l'imaging degli eventi meccanici associati alla contrazione delle UM, i quali si verificano su scale temporali molto brevi (<200 ms).

La US ad elevato frame rate, combinata con l'elettromiografia ad alta densità (HDsEMG), è stata applicata con successo per l'identificazione della regione di spostamento tissutale delle singole UM in video 2D della sezione trasversale del muscolo. Questo lavoro di tesi si propone di estendere la trattazione mediante l'utilizzo di una sonda matriciale 32x32 (frequenza centrale di 8 MHz) per imaging volumetrico, al fine di stimare il volume muscolare che comprende le fibre delle singole UM. L'acquisizione dei dati sperimentali è stata condotta su cinque soggetti, durante contrazioni isometriche volontarie a basso livello di forza del muscolo adduttore del mignolo. Le registrazioni sono state effettuate per una durata di 5 secondi, utilizzando una modalità di acquisizione che prevede l'attivazione simultanea di tutti i 1024 elementi in trasmissione, mentre sono state valutate due modalità di ricezione della sonda. La configurazione utilizzata ha permesso di ottenere un frame rate di 500 volumi al secondo. Su ciascun soggetto, a parità di set up sperimentale, sono state effettuate prove successive per valutare la capacità della metodologia proposta di identificare il volume associato alla stessa UM in prove differenti.

A partire dai video ultrasonografici 3D sono state stimate le sequenze di velocità tissutale 3D (3D-TVS). Utilizzando gli istanti di attivazione delle singole UM,

ottenuti dalla decomposizione dei segnali HDsEMG, si sono ottenute, mediante Spike Triggered Averaging delle 3D-TVS, le mappe 3D di attivazione per ciascuna UM (volume di UM). Si è riscontrato che il 46% delle UM decomposte dai segnali HDsEMG possono essere identificate con successo negli US, mostrando un volume coerente con l'architettura fusiforme del muscolo adduttore del mignolo. La ripetibilità longitudinale (tra le prove effettuate sullo stesso soggetto) è stata quantificata valutando la distanza tra i centroidi dei territori segmentati nelle fette trasversali del volume relativo alla stessa UM in ciascuna prova. I risultati hanno evidenziato che queste distanze tra centroidi risultano inferiori rispetto alle distanze tra territori casuali, che non rappresentano la stessa UM. Questo lavoro costituisce un punto di partenza nell'imaging volumetrico della risposta meccanica delle fibre di una UM in contrazioni volontarie, fornendo possibili vie per lo studio della neuromeccanica tridimensionale dell'attivazione muscolare. Nello specifico, nonostante si tratti ancora di uno studio preliminare, il metodo proposto ha la potenzialità di diventare uno strumento non invasivo per la localizzazione completa (3D) del fascio di fibre in contrazione.

Ringraziamenti

Desidero esprimere la mia più sincera gratitudine a tutti coloro che mi hanno supportato nel corso di questi anni accademici e durante la stesura di questa tesi.

Un ringraziamento particolare va ai miei relatori: al professor Botter, per la preziosa guida, e alla professoressa Meiburger, per avermi dato l'opportunità di lavorare a questo progetto e di acquisire esperienza pratica con la strumentazione di ricerca. Ringrazio inoltre l'ingegner Seoni per la disponibilità e i preziosi consigli, e l'ingegner Carbonaro per il costante supporto durante tutto il percorso.

Un ringraziamento va agli Amici di Casa, per essere sempre al mio fianco, pronti a offrire consigli e incoraggiamento.

La vostra amicizia è una delle cose più preziose che ho.

Un pensiero speciale va alle quattro "Ragazze del Muretto", che mi accompagnano in ogni tappa, da sempre.

Non trovo parole adeguate per esprimere la mia gratitudine alla mia bellissima famiglia, che ha sempre creduto in me con dedizione instancabile. Un grazie di cuore a mio fratello e a mio padre.

Infine, soprattutto, ringrazio mia madre, per tutto.

Indice

Elenco delle tabelle	VIII
Elenco delle figure	IX
Acronimi	XIII
Introduzione	1
1 Anatomia e Fisiologia della Contrazione Muscolare Scheletrica	5
1.1 Anatomia del muscolo scheletrico	5
1.2 Meccanismo di contrazione muscolare	7
1.2.1 Generazione di un potenziale d'azione di singola fibra	7
1.2.2 Accoppiamento eccitazione-contrazione	8
1.2.3 Ciclo di contrazione muscolare	8
1.3 Produzione di forza	9
1.3.1 Unità motorie	9
1.3.2 Twitch meccanico	10
1.3.3 Controllo di forza	11
2 Tecniche di Indagine delle Unità Motorie	13
2.1 Ultrasonografia	14
2.1.1 Beamforming in trasmissione	15
2.1.2 Beamforming in ricezione	15
2.1.3 Elaborazione dei segnali RF: imaging B-mode e velocità tissutale	18
2.1.4 Ultrasonografia 3D	22
3 Materiali e Metodi	24
3.1 Set up sperimentale e strumentazione	24
3.1.1 Elettromiografia di superficie ad alta densità	24
3.1.2 Ultrasonografia 3D ad elevato frame rate	25

3.1.3	Sincronizzazione tra dati elettromiografici e ultrasonografici	29
3.1.4	Misura di forza	30
3.2	Protocollo sperimentale	30
3.3	Metodo	31
3.3.1	Decomposizione dei segnali HDsEMG	33
3.3.2	Beamforming volumetrico	33
3.3.3	Calcolo della Sequenza di Velocità Tissutale 3D	33
3.3.4	Calcolo delle mappe di attivazione delle singole UM	35
4	Analisi e Validazione	37
4.1	Segmentazione	37
4.2	Validazione	38
4.2.1	Tracciamento longitudinale	38
4.2.2	Metriche	39
5	Risultati e Discussione	42
5.1	Estrazione delle mappe 3D di unità motoria	42
5.2	Caratterizzazione geometrica	48
5.3	Confronto modalità di acquisizione	48
5.4	Validazione metodo	48
5.4.1	Risultati tracciamento longitudinale	48
5.4.2	Risultati metriche	50
6	Conclusioni	52
	Bibliografia	54

Elenco delle tabelle

5.1	Risultati dell'applicazione del criterio di correlazione per l'esclusione delle mappe di UM che non presentano regioni con correlazione significativa. La colonna "Verosimili UM" riporta il numero di mappe che, a seguito di un'ispezione visiva, mostrano caratteristiche morfologiche coerenti con quelle attese per le UM.	47
5.2	Risultati del tracciamento longitudinale delle UM. Le colonne rappresentano il numero di UM che sono state osservate in N sessioni differenti sul soggetto. La prima riga comprende tutte le UM tracciate a partire dai dati HDsEMG; la seconda il sottoinsieme di queste UM tracciate che presenta mappa di attivazione, ricavata dai dati US, con valore di correlazione sopra soglia.	49

Elenco delle figure

1	Diagramma del meccanismo fisiologico di attivazione di un'Unità Motoria (UM) e della strumentazione utilizzata per acquisirlo. Il comando motorio proveniente dal cervello, viaggia lungo il midollo spinale; da qui originano i motoneuroni, i quali trasmettono potenziali d'azione motori al un gruppo di fibre muscolari che innervano, generando potenziali d'azione corrispondenti che si propagano lungo la membrana delle fibre. Questo porta alla contrazione delle fibre muscolare, che si accorciano e ispessiscono. Questo fenomeno può essere misurato con due tecniche differenti: da una parte con l'Elettromiografia Ad Alta Densità (HDsEMG), mediante una matrice di elettrodi sulla cute, si può acquisire il segnale dovuto all'attività elettrica delle fibre muscolari e da questo estrarre i potenziali d'azione delle singole UM. Oppure si può osservare la risposta meccanica di spostamento delle fibre mediante ultrasonografia. In particolare, dai segnali acquisiti dagli elementi della sonda, si stima la componente nella direzione assiale dello spostamento radiale dato dall'ispessimento della fibra in contrazione (rappresentato dalle frecce azzurre). L'immagine è adattata da [20].	3
1.1	Organizzazione del muscolo scheletrico su diverse scale: dal muscolo fino alle proteine contrattili.	7
2.1	Schema a blocchi del dispositivo ecografico.	15
2.2	Il beamforming in trasmissione forma il fascio di onde sonore uscente attraverso l'interferenza costruttiva delle onde sferiche emesse dai singoli elementi del trasduttore. La differenziazione dei ritardi applicati ai singoli elementi permette di ottenere steering (a) e focalizzazione (b) del fascio.	16
2.3	a) Emissione ad onda piana b) Ogni punto riflettente nel mezzo genera un'onda sferica che arriva in tempi proporzionali alla distanza orizzontale ai vari elementi, determinando un profilo ad iperbole dei segnali RF ricevuti dai trasduttori.	18

3.1	Set-up sperimentale per l'acquisizione di dati ultrasonografici e elettromiografici.	25
3.2	Configurazione multiplexata 4:1 per l'accoppiamento della sonda Vermon a 1024 elementi con il sistema Verasonics Vantage a 256 canali. In foto (a) è visibile la sonda matriciale e l'adattatore MUX, intercambiabile, che la collega al sistema. b) diagramma della configurazione.	26
3.3	Schema della geometria della sonda matriciale Vermon di 1024 elementi piezoelettrici (divisi in quattro sotto-aperture) e come questi sono collegati ai 256 canali del sistema Verasonics per mezzo dell'adattatore 1024-MUX. Ciascuno dei 256 interruttori del 1024-MUX UTA collega quattro elementi: per esempio, i primi elementi di ciascuna delle quattro sotto-apertura (E1, E257, E513, E769) sono tutti collegati al canale 1 mediante un interruttore.	27
3.4	Aperture utilizzate nei quattro eventi di RX, nella modalità a blocchi.	28
3.5	Aperture utilizzate nei quattro eventi di RX, nella modalità Sparse Random Aperture Compounding (SRAC). Sulla destra è evidenziata la complementarità tra le quattro aperture, che complessivamente ricoprono l'intera sonda.	29
3.6	32
3.7	(a) Esempio di segnali HDsEMG per un soggetto rappresentativo. Per ogni canale è mostrato un brano di circa 10 secondi di segnale. (b) Istanti di attivazione delle sei UM che l'algoritmo di decomposizione ha estratto a partire dai segnali in (a). I diversi colori rappresentano le varie unità motorie identificate.	34
3.8	Esempio di due volumi beamformati (rappresentati in modalità B-mode) acquisiti sullo stesso soggetto con le due diverse modalità: (a) a blocchi e (b) SRAC	35
4.1	Segmentazione su diverse sezioni trasversali di una mappa di attivazione 3D relativa a un'UM esemplificativa. In ogni sezione, il contorno rosso evidenzia l'insieme dei pixel-oggetto, che rappresenta il territorio della UM, ottenuto applicando una soglia pari al 60% dell'intensità massima nella sezione. Il simbolo "X" individua il centroide della regione segmentata.	38
4.2	MUAP medi di 3 UM e, sotto, i treni di attivazione della rispettiva UM a partire dai quali sono ottenuti mediante Spike Triggered Averaging (STA) della matrice di segnali singolo differenziali.	40
4.3	Esempio di UM tracciata: sono rappresentati in colori diversi i MUAP relativi alla stessa UM in tre diverse sessioni in cui è reclutata.	40

4.4	In colori diversi sono visualizzati i territori segmentati per le varie occorrenze della stessa UM nelle sessioni effettuate su un soggetto. Come metriche di validazione si considera la distanza dei centroidi dei territori rispetto al centroide della sessione di riferimento ('x' in rosso) e la dispersione dei centroidi rispetto al centroide medio (ottenuto mediando le coordinate di tutti i centroidi nella fetta).	41
5.1	Mappe di attivazione di cinque UM reclutate in un'acquisizione significativa effettuata sul terzo soggetto (contrazione al 5% Massima Contrazione Volontaria (MVC), modalità di acquisizione a blocchi). "Y" rappresenta la direzione dorso-palmare, "X" quella distale - prossimale. Per ognuna UM sono mostrati cinque sezioni trasversali (riga superiore) e cinque sezioni parallele al muscolo (riga inferiore). Per le UM rappresentate in (a)- (d) sono chiaramente visibili i territori di forma circolare nelle sezioni trasversali e un'attivazione più lineare nei piani paralleli al muscolo. Queste ultime sono presenti solo nelle sezioni corrispondenti alla coordinata in direzione dorso-palmare (Y) in cui è localizzata l'UM. Nell'UM (e) non è invece possibile identificare questo tipo di attivazione.	45
5.2	Distribuzione dei valori massimi delle mappe di correlazione. La distribuzione blu fa riferimento alle mappe reali (ottenute a partire da pattern di attivazione di UM reclutate durante la contrazione misurata); quella in rosso alle mappe fittizie (ottenute a partire da pattern di attivazione generati casualmente).	47
5.3	Confronto del contrasto delle mappe di UM tra le due modalità di acquisizione.	49
5.4	Nella figura sono mostrati, in colori diversi, i territori e i centroidi della stessa UM, in tutte le sessioni in cui è osservata.	50
5.5	(a) Distribuzione delle distanze euclidee tra i centroidi di una UM nelle sessioni in cui è tracciata rispetto ad UM casuali. (b) Distribuzione della dispersione tra i centroidi nei due insiemi (tracciamento rispetto ad associazioni causali).	51

Acronimi

UM

Unità Motoria

US

Ultrasonografia

RS

Reticolo Sarcoplasmatico

E-C

accoppiamento Eccitazione-ContraZIONE

SNC

Sistema Nervoso Centrale

MVC

Massima ContraZIONE Volontaria

EMG

Elettromiografia

HDsEMG

Elettromiografia Ad Alta Densità

TX

Trasmissione

RX

Ricezione

SRAC

Sparse Random Aperture Compounding

MUAP

Motor Unit Action Potential

CKC

Convolution Kernel Compensation

STA

Spike Triggered Averaging

RF

Radio Frequenza

DAS

Delay and Sum

TVS

Sequenza di Velocità Tissutale

ROI

Region of Interest

RM

Risonanza Magnetica

Introduzione

La locomozione umana è controllata dal Sistema Nervoso Centrale (SNC) mediante il reclutamento delle unità motorie, le più piccole strutture del muscolo scheletrico capaci di contrazione volontaria[1]. Un'Unità Motoria (UM) è costituita da un motoneurone e dalle fibre muscolari da questo innervate[2], localizzate in un territorio circoscritto all'interno del muscolo. Il controllo di un'UM è codificato dal pattern di scarica del motoneurone, che origina dal midollo spinale. Questa attivazione induce la depolarizzazione ripetitiva delle fibre muscolari, causando una rapida successione di contrazioni e rilasciamenti delle fibre, noti come *twitch* meccanici. Quello che appare quindi come un movimento fluido del muscolo è il risultato di vibrazioni ad alta frequenza delle fibre al suo interno.

L'analisi della funzionalità delle UM è fondamentale per la diagnosi delle malattie neuromuscolari, nella ricerca neurofisiologica oltre che in applicazioni cliniche, come la medicina dello sport [3] e la riabilitazione [4].

Tradizionalmente, lo studio dell'attività delle UM è stato condotto tramite tecniche elettromiografiche (EMG), acquisendo l'attività elettrica del muscolo mediante elettrodi intramuscolari (iEMG)[5] o superficiali (sEMG)[6]. I recenti progressi nelle tecniche EMG, in particolare la possibilità di campionare il segnale da più punti sulla superficie muscolare utilizzando matrici di elettrodi (Elettromiografia Ad Alta Densità (HDsEMG)), hanno permesso di registrare e decomporre i segnali delle singole UM[7, 8].

Oltre che nel dominio bioelettrico, la contrazione muscolare può essere studiata in quello meccanico, misurando la risposta meccanica del muscolo tramite imaging a ultrasuoni. L'Ultrasonografia (US) è stata applicata allo studio delle proprietà del muscolo sia dal punto di vista anatomico che funzionale [9, 10], inizialmente analizzando la risposta a livello dell'intero muscolo[11, 12]. Se l'ultrasonografia tradizionale è limitata alla rilevazione di movimenti lenti del muscolo nel suo complesso, l'introduzione di sistemi ad elevato frame rate ha permesso di ottenere la risoluzione temporale necessaria all'imaging dei *twitch* delle UM, movimenti caratterizzati da ampiezza micrometrica e che hanno luogo in intervalli di tempo dell'ordine del millisecondo.

L'ultrasonografia ad elevato frame rate è stata quindi applicata alla visualizzazione del rapido movimento di regioni localizzate del muscolo che accompagna l'attivazione di una UM, sia in contrazioni stimulate elettricamente [13, 14, 15] che in contrazioni volontarie [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22]. La complessità della fisiologia muscolare, caratterizzata da numerose UM, con territori parzialmente sovrapposti, che si attivano simultaneamente con pattern di attivazione differenti, rende l'identificazione di queste unità una sfida impegnativa. Inoltre, la complessa interazione tra le fibre muscolari e il tessuto connettivo circostante[23] può influire sulla corretta identificazione dei *twitch*. Nonostante questo gli studi sopra citati hanno dimostrato la validità dell'ultrasonografia ad elevato frame rate per l'imaging delle UM.

In particolare, gli approcci proposti si basano sulla stima del campo di velocità assiale del tessuto scansionato: infatti, in condizioni di contrazione isometriche, le fibre muscolari si trovano in un continuo stato di ripetuto accorciamento e rilassamento, senza però che ci sia nessun movimento complessivo apprezzabile nelle immagini US B-mode. La localizzazione dei fasci in movimento richiede la stima, a partire dai segnali campionati dagli elementi del trasduttore, della velocità assiale, che è la componente per la quale si riesce ad avere la migliore risoluzione. Dal campo di velocità assiale è poi possibile isolare i rapidi movimenti locali associati all'attivazione delle singole UM e quindi stimare la distribuzione spaziale delle fibre che la compongono.

Negli studi sopracitati si sono utilizzate sonde US lineari, limitando l'analisi ad una sezione trasversale del muscolo. Tecniche di imaging US tridimensionali hanno la potenzialità di ottenere una visione più completa della struttura e della dinamica delle UM, fornendo informazione aggiuntiva per la comprensione della neuromeccanica muscolare e dei meccanismi di generazione della forza.

Un primo tentativo di visualizzazione 3D in vivo delle UM è stato effettuato da Deffieux et al.[24] in contrazioni stimulate elettricamente. In questo studio si fa ancora uso di una sonda 1D, ma questa è montata su un motore lineare che ne permette la traslazione lungo l'asse del muscolo (imaging stroboscopico); la ricostruzione del volume è effettuata acquisendo in istanti successivi e sincronizzati con la stimolazione, piani trasversali equidistanti.

Lo studio condotto in questa tesi propone un approccio alternativo di imaging volumetrico delle UM, basato sull'utilizzo di sonde matriciali. Questa nuova tecnica, rispetto alla precedente, consente l'acquisizione simultanea di dati da tutto il volume muscolare, offrendo un'analisi più completa e dettagliata della dinamica muscolare e permettendo l'acquisizione di contrazioni volontarie.

Dal punto di vista tecnologico, la sfida principale dell'applicazione di questo tipo di sonda è mantenere la stessa risoluzione temporale (necessaria a rilevare i movimenti ad alta frequenza delle fibre muscolari attive) quando il numero di elementi della sonda risulta più elevato rispetto ad una sonda lineare, disponendo

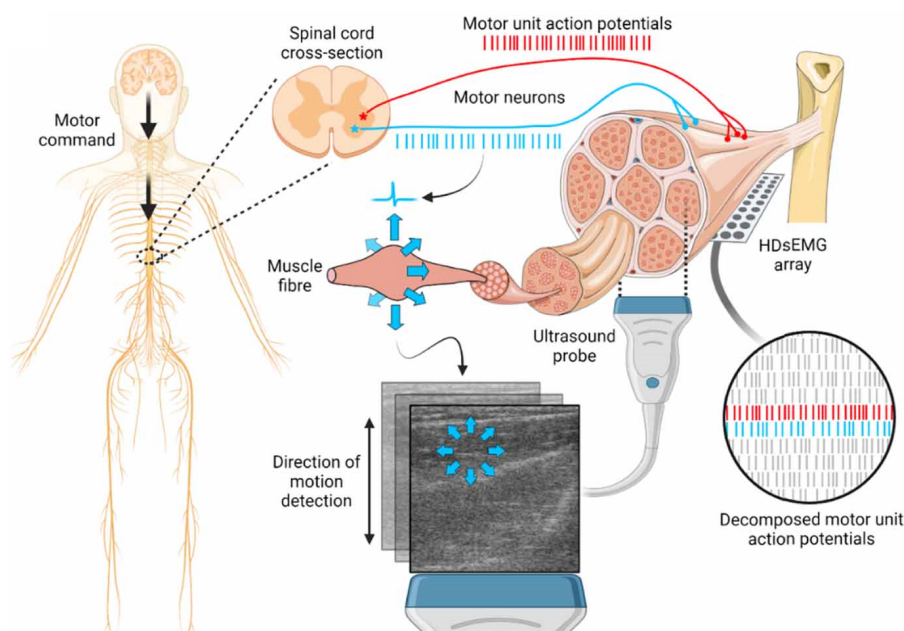


Figura 1: Diagramma del meccanismo fisiologico di attivazione di un'UM e della strumentazione utilizzata per acquisirlo. Il comando motorio proveniente dal cervello, viaggia lungo il midollo spinale; da qui originano i motoneuroni, i quali trasmettono potenziali d'azione motori ad un gruppo di fibre muscolari che innervano, generando potenziali d'azione corrispondenti che si propagano lungo la membrana delle fibre. Questo porta alla contrazione delle fibre muscolare, che si accorciano e ispessiscono. Questo fenomeno può essere misurato con due tecniche differenti: da una parte con l'HDsEMG, mediante una matrice di elettrodi sulla cute, si può acquisire il segnale dovuto all'attività elettrica delle fibre muscolari e da questo estrarre i potenziali d'azione delle singole UM. Oppure si può osservare la risposta meccanica di spostamento delle fibre mediante ultrasonografia. In particolare, dai segnali acquisiti dagli elementi della sonda, si stima la componente nella direzione assiale dello spostamento radiale dato dall'ispessimento della fibra in contrazione (rappresentato dalle frecce azzurre). L'immagine è adattata da [20].

di un sistema US ad un numero limitato di canali. A tale scopo, in questa tesi sono state testate due modalità di acquisizione differenti.

Viene qui proposto un metodo per l'identificazione delle fibre di UM nel volume in contrazioni isometriche volontarie del muscolo che si basa sull'uso combinato di dati US volumetrici e segnali HDsEMG. L'algoritmo è stato testato e validato su dati sperimentali. Il resto di questa tesi è organizzato come segue: in primo luogo vengono forniti i fondamenti teorici sull'anatomia e fisiologia della contrazione muscolare (Capitolo 1) e sulle tecniche di indagine delle UM, focalizzandosi su quelle

impiegate in questo studio, ossia l'HDsEMG e US 3D (Capitolo 2). Il Capitolo 3 descrive il set-up sperimentale, il protocollo adottato per l'acquisizione dei dati e la *pipeline* utilizzata per identificare le UM nei volumi US. Il Capitolo 4 illustra come il metodo è stato validato, mentre il Capitolo 5 presenta e discute i risultati ottenuti. Infine, il Capitolo 6 conclude la tesi.

Capitolo 1

Anatomia e Fisiologia della Contrazione Muscolare Scheletrica

Il muscolo scheletrico ha come funzione principale quella di generare, attraverso la sua contrazione, una forza che viene applicata sulle ossa dello scheletro per produrre movimento o stabilizzare la postura. Il controllo dei muscoli scheletrici è principalmente volontario e avviene tramite i neuroni del sistema nervoso somatico. Il tessuto che compone i muscoli volontari (tessuto muscolare scheletrico) è caratterizzato da eccitabilità e contrattilità. L'eccitabilità indica la capacità delle cellule muscolari di rispondere a stimoli specifici generando segnali elettrici, mentre la contrattilità è la sua capacità di contrarsi in risposta a questi stimoli[25]. Per comprendere come il muscolo generi forza contraendosi in risposta ad uno stimolo, è essenziale esaminarne l'anatomia.

1.1 Anatomia del muscolo scheletrico

Ogni muscolo scheletrico è un organo composto da fibre muscolari (l'unità cellulare fondamentale), da tessuti connettivi, vasi sanguigni e nervi.

La membrana plasmatica della cellula muscolare è detta sarcolemma e al suo interno si trova il citoplasma, noto come sarcoplasma. Il sarcolemma presenta delle invaginazioni dette tubuli T, dei tunnel che penetrano all'interno della fibra. All'interno del sarcoplasma si trovano le miofibrille, gli organelli contrattili del muscolo scheletrico, sottili filamenti che si estendono per l'intera lunghezza della fibra. Ogni miofibrilla è avvolta da una rete di sacche membranose denominata Reticolo Sarcoplasmatico (RS). In una fibra muscolare rilassata, il RS immagazzina

ioni calcio Ca^{2+} [25].

Questa struttura a triade di RS-tubulo T-RS ha un ruolo fondamentale nel meccanismo fisiologico che, quando una fibra muscolare viene stimolata, consente la propagazione di questo stimolo elettrico all'intera fibra e che determina l'inizio della risposta meccanica di contrazione (come sarà discusso nella sezione 1.2.2).

Le miofibrille sono costituite da due tipi di strutture, i filamenti sottili e filamenti spessi. Questi sono organizzati in compartimenti che si ripetono sequenzialmente nella fibra muscolare, detti sarcomeri. Un sarcomero è delimitato alle due estremità da regioni a forma di disco, note come dischi Z. I filamenti sottili si ancorano ai dischi Z, mentre i filamenti spessi sono situati tra i filamenti sottili. All'interno del sarcomero, i filamenti sottili e spessi si sovrappongono parzialmente e in modo variabile a seconda dello stato di contrazione, rilassamento o estensione della fibra muscolare. Questa sovrapposizione crea un pattern caratteristico di bande chiare e scure visibili al microscopio, conosciuto come striature. Tale organizzazione è responsabile dell'aspetto striato del muscolo scheletrico.

I filamenti spessi e quelli sottili sono principalmente costituiti da due proteine contrattili: la miosina e l'actina. I filamenti spessi sono formati da miosina, una proteina di forma allungata simile a due bastoni da golf attorcigliati. Le molecole di miosina si dispongono con le code a formare il corpo del filamento spesso, mentre le teste sporgono verso l'esterno del sarcomero, estendendosi verso i filamenti sottili. I filamenti sottili sono costituiti da molecole di actina e proteine regolatrici, la tropomiosina e la troponina. I filamenti di tropomiosina, tenuti in posizione da molecole di troponina, bloccano i siti di legame dell'actina, impedendo così l'interazione con la miosina quando il muscolo è rilassato [25]. La gerarchia delle strutture del muscolo scheletrico sopra descritta può essere visualizzata in figura 1.1.

Oltre alle fibre muscolari il muscolo scheletrico presenta componenti di tessuto connettivo, che circondano e proteggono le fibre muscolari e l'intero muscolo. In alcuni casi, il tessuto connettivo si estende al di fuori del muscolo a formare il tendine, una struttura fibrosa che collega il muscolo ad altri elementi, quali ossa o altri muscoli [25]. Inoltre, il muscolo scheletrico è altamente irrorato e innervato. I neuroni che stimolano le fibre muscolari sono detti motoneuroni. Un motoneurone è localizzato nel midollo spinale o nel tronco encefalico, dove riceve e integra input sensoriali e comandi motori provenienti dai centri superiori [26]. Da qui, attraverso l'assone, il motoneurone si estende fino al muscolo target, dove si sfocia in molteplici ramificazioni, dette terminazioni assoniche, ciascuna che si estende verso una fibra muscolare e terminante in un bottone sinaptico. Nel bottone sinaptico sono sospese vescicole con all'interno acetilcolina, il neurotrasmettitore responsabile della comunicazione tra il neurone e la fibra muscolare. La cellula nervosa e quella muscolare non sono a contatto diretto: uno spazio, detto fessura sinaptica, separa il bottone sinaptico del motoneurone e la regione di sarcolemma

su cui questo si affaccia, detta placca motoria, dove si trovano i ricettori per l'acetilcolina. La giunzione tra il bottone sinaptico e la placca motoria è conosciuta come giunzione neuromuscolare[25].

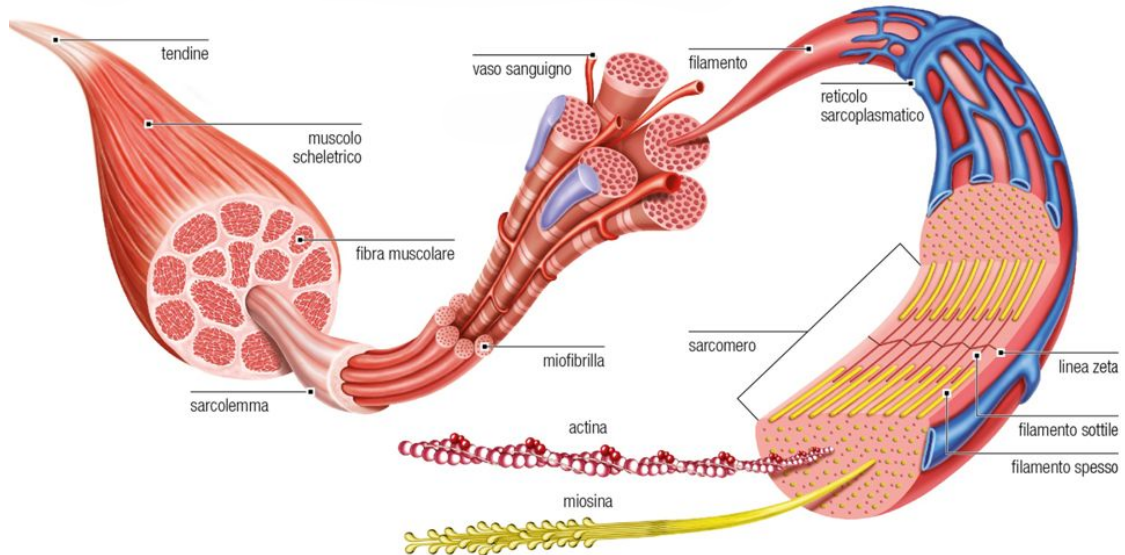


Figura 1.1: Organizzazione del muscolo scheletrico su diverse scale: dal muscolo fino alle proteine contrattili.

1.2 Meccanismo di contrazione muscolare

Di seguito si descrivono i meccanismi che, a partire dall'impulso del SNC, conducono alla contrazione del muscolo scheletrico e quindi alla generazione di forza da parte di questo.

1.2.1 Generazione di un potenziale d'azione di singola fibra

Un impulso di depolarizzazione, detto potenziale d'azione (AP, dall'inglese *Action Potential*), viaggia lungo l'assone del motoneurone. L'arrivo dell'impulso nervoso al bottone sinaptico causa l'esocitosi delle vescicole contenenti acetilcolina. Il neurotrasmettitore rilasciato nella fessura sinaptica diffonde fino ai recettori nella placca motoria, dove provoca l'apertura dei canali del sodio Na^+ . Il sodio entra quindi nel sarcoplasma e induce all'interno della cellula muscolare, a livello della placca motoria, una carica positiva. Questa variazione di potenziale determina la generazione di un AP, una repentina depolarizzazione della membrana, che si

propaga lungo il sarcolemma. La giunzione neuromuscolare è solitamente localizzata al centro della fibra muscolare e l'AP indotto nella placca motoria, da qui propaga verso entrambe le estremità della fibra[25].

1.2.2 Accoppiamento eccitazione-contrazione

L' AP viaggia lungo il sarcolemma e attraverso i tubuli T (essendo questi riempiti di fluido interstiziale), consentendo così di eccitare simultaneamente tutte le miofibrille della fibra muscolare. La variazione di potenziale nei tubuli T attiva l'apertura dei canali per il rilascio di calcio nel RS, che è a contatto con i tubuli. Il calcio, essendo altamente concentrato all'interno, diffonde nel sarcoplasma. L'aumento della concentrazione di calcio funge da innesco della contrazione delle miofibrille. Questa cascata di processi che legano l'eccitazione del sarcolemma alla contrazione delle miofibrille e quindi della fibra è noto come l'accoppiamento Eccitazione-Contrazione (E-C)[25].

1.2.3 Ciclo di contrazione muscolare

Il meccanismo alla base dell'accorciamento delle fibre muscolari durante la contrazione è il fenomeno dello scorrimento dei filamenti spessi rispetto a quelli sottili.

1. L'inizio della contrazione è dato dal rilascio di ioni calcio dal RS. Questi, legandosi alla tropomiosina dei filamenti sottili, ne determinano un cambiamento conformazionale che ha l'effetto di allontanare la troponina dai siti di legame per la miosina che si trovano nell'actina. Ciò permette alle teste di miosina, che sporgono dai filamenti spessi, di legarsi, portando alla formazione dei cosiddetti ponti trasversali.
2. Una volta che i ponti trasversali sono formati, le teste di miosina ruotano, provocando lo scorrimento dei filamenti sottili accanto a quelli spessi e verso il centro del sarcomero.
3. Infine si ha il distacco delle teste di miosina dai siti di legame sull'actina.

Fintanto che il livello di calcio rimane sufficiente, questi passaggi si ripetono ciclicamente: i ponti trasversali si attaccano e si staccano, trascinando i filamenti sottili e facendo avvicinare i dischi Z. Questo provoca l'accorciamento del sarcomero; di conseguenza l'intera fibra muscolare si accorcia[25]. L'accorciamento della fibra muscolare è accompagnato da un suo ispessimento. La relazione tra queste due variazioni è descritta dalla seguente legge empirica:

$$\lambda_{\text{laterale}} = \frac{1}{\sqrt{\lambda_{\text{longitudinale}}}} \quad (1.1)$$

dove $\lambda_{laterale}$ rappresenta la variazione di lunghezza e $\lambda_{longitudinale}$ l'aumento di diametro della fibra. [24].

La contrazione si trasmette lungo la fibra muscolare insieme al potenziale d'azione, viaggiando ad una velocità di alcuni metri al secondo[24]. Le fibre muscolari che si accorciano iniziano a tirare i loro rivestimenti di tessuto connettivo e tendini. Questi prima si estendono e poi, una volta tesi, esercitano trazione sulle ossa a cui sono ancorati. Il risultato, se la tensione sviluppata è sufficiente a superare il carico del muscolo, è il movimento del segmento corporeo[25].

1.3 Produzione di forza

Nel muscolo scheletrico, le fibre muscolari non si contraggono mai individualmente, ma sempre in gruppi. Infatti, quando un AP si propaga lungo l'assone di un motoneurone, questo eccita simultaneamente tutte le fibre muscolari con cui il motoneurone forma giunzioni neuromuscolari. Questo porta alla contrazione quasi all'unisono dell'intero gruppo di fibre, che si comportano come una singola entità[2, 25, 1].

1.3.1 Unità motorie

L'insieme dato da un motoneurone e dalle fibre muscolari che questo innerva prende il nome di UM[2] e rappresenta la più piccola struttura nel corpo umano che sia controllabile volontariamente.

Ogni muscolo è composto da una popolazione di UM, il cui numero può variare da poche decine a diverse centinaia. Anche il numero di fibre muscolari per ciascuna UM, noto come numero di innervazione, varia considerevolmente. Il numero di innervazione è strettamente legato alla massima forza esprimibile dalla UM: le UM più deboli presentano poche fibre muscolari (da alcune unità a qualche decina) e sono quelle predominanti in muscoli designati a movimenti fini. Nei muscoli responsabili dei movimenti potenti e su larga scala, come quelli degli arti, invece, le UM possono essere composte da qualche migliaia di fibre muscolari[26, 25].

Il numero di innervazione non varia solo tra muscoli diversi, ma anche all'interno di uno stesso muscolo. In particolare, la distribuzione del numero di innervazione in funzione della frequenza di UM che innervano quel numero di fibre può essere descritta da una curva esponenziale. In altre parole, un muscolo è composto da molte UM di piccole dimensioni e da poche UM di grandi dimensioni[26].

Le fibre muscolari appartenenti alla stessa UM sono raggruppate in una sottoporzione del muscolo. La loro distribuzione spaziale è indicata con il nome di territorio di UM. Questi territori non hanno confini netti, ma si sovrappongono parzialmente, in quanto le fibre che compongono una certa UM sono mescolate con le fibre delle UM circostanti. La dimensione e la densità di questi territori possono

variare notevolmente a seconda del muscolo: l'area occupata varia dal 10% al 70% della sezione trasversale del muscolo e si hanno tra le 3 e le 20 fibre appartenenti ad una singola unità motoria ogni 100 fibre muscolari[2, 1, 26]. Le fibre muscolari di un'UM spesso non si estendono da un capo all'altro del muscolo, ma solo per una porzione di questo; per esempio è stato dimostrato che nel gastrocnemio mediale le UM si estendono per 10% della lunghezza del muscolo[27]. Questo comporta che, oltre alla trasmissione longitudinale verso i tendini, si ha anche una trasmissione laterale della forza, attraverso i tessuti connettivi[26].

L'unità motoria funge da trasduttore neuromeccanico, traducendo input neurali in forze per la generazione di movimento. Lo stretto accoppiamento tra motoneuroni e fibre muscolari offre un grande vantaggio nello studio del controllo motorio da parte del sistema nervoso. Infatti, poiché in condizioni fisiologiche, un potenziale d'azione nel motoneurone si riflette sempre nell'eccitazione delle fibre dell'UM, il pattern di attivazione neurale può essere dedotto dai AP delle fibre muscolari, facilmente misurabili mediante acquisizione elettromiografica[1]. L'integrazione degli AP delle singole fibre che compongono un'UM prende il nome di AP di UM(MUAP) e costituisce la rappresentazione elettrica dell'attivazione di un'UM. Un singolo MUAP è un segnale impulsivo tipicamente bifasico (ma che può avere anche altre forme)[2].

1.3.2 Twitch meccanico

La breve contrazione di tutte le fibre muscolari che compongono un'UM in risposta a un singolo AP nel suo motoneurone prende il nome di twitch meccanico di UM.

Un twitch meccanico è caratterizzato dalle seguenti fasi:

- *periodo di latenza*(2 ms): è il ritardo che si osserva tra l'applicazione dello stimolo e l'inizio della contrazione. Corrisponde all'intervallo durante il quale la depolarizzazione si propaga nel sarcolemma e avviene il rilascio di ioni calcio dal RS.
- *periodo di contrazione*(10-100 ms): è il periodo nel quale lo scorrimento dei filamenti determina la contrazione e lo sviluppo di tensione nelle fibre muscolari.
- *periodo di rilassamento*(10-100 ms): è la fase in cui la diminuzione della concentrazione di calcio riporta la fibra nella condizione di rilassamento e la tensione nelle fibre diminuisce.

Un twitch è un segnale positivo con una durata complessiva 20-200 ms[25][26] e costituisce la rappresentazione meccanica dell'attivazione muscolare. Il singolo

evento di contrazione, essendo un evento così rapido, sfugge alle tecniche di imaging tradizionali, e richiede quindi sistemi ad elevato *frame rate*.

1.3.3 Controllo di forza

Il movimento viene generato attraverso l'attivazione coordinata di una popolazione di UM nel muscolo da parte del SNC; questo regola la produzione di forza controllando quali e quante UM sono attivate (reclutamento), con che tempistiche e la frequenza con cui sono attivate.

Reclutamento: Principio di Hennman

Il reclutamento delle UM durante una contrazione volontaria avviene con un ordine fisso: dalle UM più piccole a quelle più grandi[28, 26]. Ogni UM è infatti caratterizzata da una soglia di reclutamento, ovvero il livello minimo di forza necessario affinché questa venga attivata, tipicamente espresso come percentuale del massimo livello di contrazione (MVC). Le UM più piccole, avendo motoneuroni più piccoli e quindi più suscettibili, hanno una soglia di attivazione più bassa, per cui sono attivate per prime. Progressivamente poi, se il compito motorio richiede lo sviluppo di una forza maggiore, si aggiungono UM via via più grandi[26]. Questo schema di reclutamento ordinato è noto come "Principio di Henneman". I movimenti che richiedono forze limitate coinvolgono quindi solo UM piccole, che apportano un delta di forza molto piccolo durante la contrazione, permettendo un maggiore controllo. Di conseguenza, questi movimenti sono deboli ma altamente precisi. Al contrario, per movimenti più potenti, vengono attivate progressivamente UM più grandi, con un numero di innervazione maggiore, consentendo l'esecuzione di sforzi maggiori ma con un minor grado di precisione[25]. Data la distribuzione esponenziale del numero di innervazione e, di conseguenza, della soglia di reclutamento in un muscolo, la maggior parte delle unità motorie viene attivata a basse intensità di stimolo. Man mano che l'intensità della contrazione aumenta, viene reclutato un numero progressivamente minore di unità motorie[26].

Frequenza di stimolazione

L'altra variabile controllata dal SNC è la frequenza con la quale l'UM è attivata. Il pattern di AP è diverso nei diversi motoneuroni, per cui le varie UM vengono stimulate in maniera asincrona[25]. Il contributo di forza apportato al movimento da una singola UM dipende dalla frequenza dei AP del suo motoneurone e in particolare aumenta all'aumentare della frequenza.[26] Infatti, poiché come si è detto la durata del twitch meccanico è maggiore di quella del singolo AP, una sequenza di questi stimoli sufficientemente ravvicinati (dopo il periodo refrattario, ma prima che la fibra si rilassi completamente), fa sì che i twitch si sommino. Quello

che ne risulta è una contrazione sostenuta ma fluttuante, detta tetano incompleto. Lo stato di parziale contrazione residua dei filamenti muscolari, combinato con una tensione preesistente dei legamenti, determina un incremento della forza generata rispetto alla contrazione precedente[25].

Ciò che appare come un movimento fluido è dunque, in realtà, il risultato della somma dei rapidi twitch delle diverse unità motorie, attive in modo asincrono[2].

Capitolo 2

Tecniche di Indagine delle Unità Motorie

Diverse tecniche, sia funzionali che di imaging, sono state impiegate per studiare l'eccitazione muscolare e il movimento tissutale associato, a vari livelli di analisi. Tra le tecniche funzionali, l'Elettromiografia (EMG) costituisce la metodica di riferimento per lo studio delle proprietà elettriche del muscolo. Le correnti ioniche coinvolte nella propagazione dei potenziali d'azione lungo le fibre muscolari si sommano per determinare potenziali di campo extracellulare che possono essere facilmente misurati mediante elettrodi[26], dando luogo al segnale EMG. La forma dei potenziali letti dipende dal posizionamento degli elettrodi oltre che dall'anatomia del muscolo e dei tessuti circostanti. Tradizionalmente, l'attività delle UM è stata acquisita in maniera invasiva (iEMG), con elettrodi ad ago inseriti all'interno del muscolo, oppure non invasivamente, acquisendo segnali con elettrodi posti sulla superficie cutanea (sEMG). Gli sviluppi della tecnica negli ultimi decenni hanno portato all'introduzione della HDsEMG, che consiste nel campionamento del segnale derivato dall'attività elettrica muscolare da molti punti sulla superficie, per mezzo di matrici di elettrodi. L'HDsEMG permette la descrizione del contributo attivo a compiti motori sia a livello globale che, grazie ad algoritmi di decomposizione del segnale interferente, delle singole UM. L'EMG garantisce l'elevata risoluzione temporale per lo studio dei twitch meccanici, ma sia per l'iEMG che sEMG, il campo di vista è limitato: nell'iEMG alle poche UM nel volume attorno all'ago[7], nell'sEMG e HDsEMG alla superficie del muscolo (fino ad 1 cm di profondità[29]), per via dell'effetto di filtro passa-basso esercitato dal tessuto interposto tra sorgente e cute.

Le UM sono state studiate anche mediante tecniche di imaging, come la Risonanza Magnetica (RM) e l'US. Queste tecniche offrono il vantaggio di fornire, oltre

a informazioni funzionali, anche dettagli anatomici. In particolare, una variante della RM, detta RM di diffusione, che rileva movimenti microscopici delle molecole d'acqua nei tessuti, è stata applicata in contrazioni stimulate elettricamente alla visualizzazione delle UM[30] e allo studio del profilo del twitch delle fibre muscolari[31].

D'altra parte, l'ultrasonografia offre un modo non invasivo per ottenere informazioni meccaniche e strutturali in un ampio campo visivo nei tessuti molli, come i muscoli [32]. Questa tecnica, nota per la sua elevata risoluzione spaziale, richiede specifiche modifiche nelle modalità di insonazione e ricezione al fine di ottenere anche una risoluzione temporale adeguata, necessaria per la sua applicazione efficace all'imaging dello spostamento assiale del tessuto associato alla contrazione. Questa modalità prende il nome di ultrasonografia ad elevato frame rate, nota anche come ultrasonografia ultrafast. Un vantaggio dell'ecografia è la possibilità di visualizzare in tempo reale i tessuti in movimento[33], per cui può essere applicata alla contrazione muscolare volontaria (e non solo quelle indotte da stimolazione, come nel caso della RM). Di seguito viene approfondita l'US, con particolare attenzione all'imaging volumetrico e alle elaborazioni dei segnali impiegate in questa specifica applicazione.

2.1 Ultrasonografia

L'imaging ultrasonografico si basa sulla trasmissione di un'onda acustica ad alta frequenza (1-15 MHz), generata da elementi piezoelettrici disposti su una sonda. Questi elementi, quando attivati da un impulso elettrico, vanno incontro a una vibrazione meccanica che causa, a sua volta, la vibrazione (compressione e rarefazione periodica) delle molecole del tessuto a contatto con la sonda. Queste vibrazioni si trasmettono da una molecola all'altra; in questo modo l'onda si propaga in profondità nel tessuto. Quando l'onda incontra una discontinuità di impedenza acustica, parte dell'onda viene riflessa verso la sonda, parte viene diffusa e una parte viene trasmessa e continua la sua propagazione. Le onde riflesse e parte di quelle diffuse ritornano alla sonda e causano una nuova vibrazione degli elementi piezoelettrici che, per le proprietà di questi cristalli, si traduce in una variazione di potenziale ai loro capi e quindi in un segnale elettrico che può essere elaborato per generare un'immagine.

In figura 2.1 si riporta lo schema a blocchi dello strumento. La sonda, come descritto, funziona sia da trasmettitore che da ricevitore.

Uno dei blocchi fondamentali è il *beamformer*, che svolge un ruolo cruciale sia nella fase di Trasmissione (TX) che in quella di Ricezione (RX).

Il beamforming è una tecnica di filtraggio spaziale; è applicato due volte in ogni evento di TX-RX (impulso-eco): in trasmissione, per l'emissione dell'onda e in

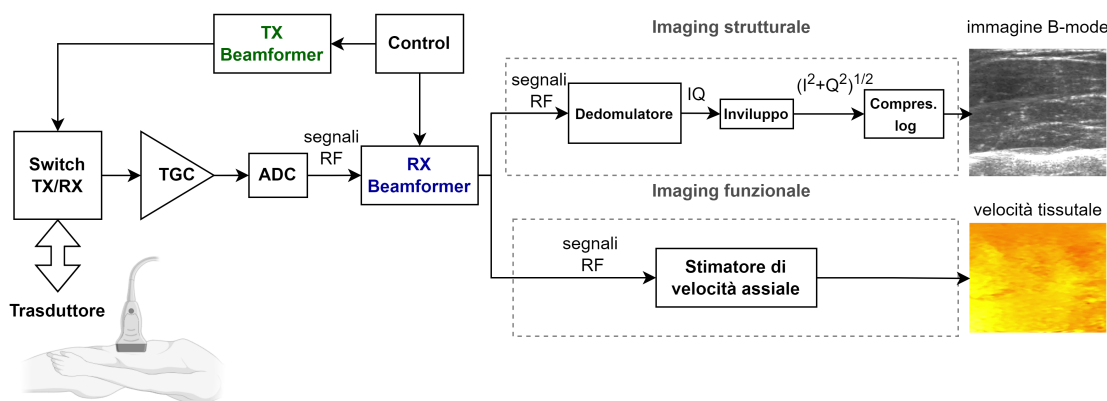


Figura 2.1: Schema a blocchi del dispositivo ecografico.

ricezione, per l'elaborazione dei segnali ricevuti.

2.1.1 Beamforming in trasmissione

Il beamforming in TX è utilizzato per dare la forma e la direzione desiderata all'onda emessa. Le tecniche di *steering* e focalizzazione consentono di direzionare il fascio emesso, introducendo ritardi differenziati (come illustrato nelle figure 2.2a e 2.2b) tra i vari elementi dell'array in TX.

L'ultrasonografia tradizionale viene eseguita mediante insonazione linea per linea, utilizzando beamforming in TX per generare fasci focalizzati. Questo limita la frequenza di acquisizione a 20-60 Hz[34]. L'ultrasonografia ad elevato frame rate, per superare questo limite ed ottenere frequenze di acquisizione elevate (centinaia di Hz, fino a 15 kHz), sfrutta l'insonazione ad onda piana, non focalizzata, del mezzo in TX e la ricezione parallela degli echi di ritorno. In questo caso, tutti gli elementi sono attivati senza ritardo in trasmissione e ricevono in parallelo, permettendo la ricostruzione di un'intera immagine con un singolo evento di TX-RX[34]. Questo tuttavia peggiora la risoluzione dell'immagine. Per migliorarne la qualità, si utilizza la tecnica dell'*angle compounding*[34], ovvero si sfrutta lo steering del fascio ultrasonoro per generare onde piane a diverse angolazioni e la generazione dell'immagine viene fatta combinando i segnali acquisiti da ciascun angolo.

2.1.2 Beamforming in ricezione

Il beamforming in RX costituisce un passaggio fondamentale nel processo di formazione di un'immagine US a partire dagli echi acquisiti dagli elementi della sonda in fase di ricezione. Ha l'obiettivo di isolare selettivamente i segnali

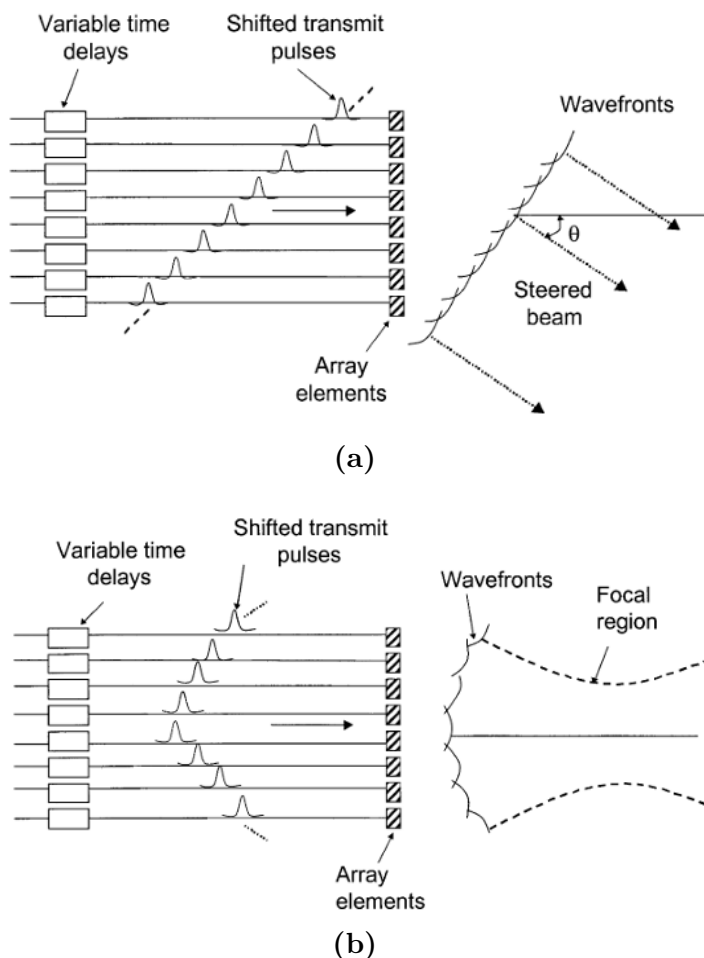


Figura 2.2: Il beamforming in trasmissione forma il fascio di onde sonore uscente attraverso l'interferenza costruttiva delle onde sferiche emesse dai singoli elementi del trasduttore. La differenziazione dei ritardi applicati ai singoli elementi permette di ottenere steering (a) e focalizzazione (b) del fascio.

provenienti da una direzione d'interesse. Questo si realizza ritardando i segnali ricevuti dai vari elementi del trasduttore in modo tale che gli echi prodotti da un punto nel tessuto siano aggregati in fase[33]. La ricostruzione dell'immagine viene quindi fatta combinando linearmente i segnali in Radio Frequenza (RF) nel tempo, campionati spazialmente dagli elementi della sonda. Cambiando il modo di combinare i dati in ingresso, è possibile cambiare la funzione di filtraggio spaziale[33]. La tecnica di beamforming più semplice per la ricostruzione di un'immagine ultrasonografica è l'algoritmo di Delay and Sum (DAS). Il concetto alla base di questa tecnica è intuitivo (si basa su concetti base della propagazione

delle onde) e la sua implementazione è lineare. Grazie alla sua semplicità ed efficienza, è la tecnica più utilizzata in ultrasonografia a elevato frame rate[35].

Delay And Sum

Ipotizzando, per semplicità, un trasduttore lineare e una trasmissione ad onda piana, un oggetto puntiforme che si trova nel mezzo, quando è investito dall'onda, diventa a sua volta sorgente di un'onda acustica, riemessa quasi-uniformemente in tutte le direzioni (onda sferica).

Tutti gli elementi del trasduttore ricevono questa onda, ma in istanti diversi, in funzione della distanza del singolo elemento dall'oggetto riflettente. Il tempo di volo, ovvero il tempo che intercorre tra l'attivazione degli elementi del trasduttore e quello in cui l'onda riflessa viene ricevuta dal singolo cristallo, può essere espresso esplicitamente ed è dato dalla somma di due intervalli:

- il tempo di andata, ovvero quello che impiega l'onda piana dalla superficie del trasduttore a raggiungere la profondità d_{TX} a cui si trova l'oggetto riflettente. Questa componente è uguale per tutti gli elementi.
- il tempo di ritorno, che impiega l'onda sferica, originata in quel punto, a percorrere il tragitto d_{RX} nella direzione opposta fino all'elemento i -esimo dell'array. Questo può essere semplicemente espresso dal Teorema di Pitagora:

$$d_{RX}(X_s, x_i) = \sqrt{(x_i - x_s)^2 + z_s^2} \quad (2.1)$$

dove $X_s = (x_s, z_s)$ sono le coordinate del punto riflettente e x_i la coordinata dell'elemento i -esimo.

Per cui complessivamente, il tempo di volo dell'elemento i -esimo è dato dalla formula:

$$\tau_i(X_s) = \frac{d_{TX}(X_s) + d_{RX}(X_s, x_i)}{c} \quad (2.2)$$

dove c è la velocità dell'onda acustica nel mezzo[35].

L'onda sferica dell'eco di ritorno giungerà per prima al trasduttore più vicino, quello posizionato alla stessa ascissa del punto riflettente, mentre i tempi di volo saranno maggiori, all'aumentare della distanza orizzontale. Questo determina profili ad iperbole come può essere visto in figura 2.3.

Quindi, dalla geometria, si possono ricavare i tempi di volo di ciascun elemento. A partire da questi è possibile isolare, nel segnale acquisito da ciascun elemento, il contributo dell'onda riflessa dall'oggetto. Questi contributi vengono quindi combinati linearmente:

$$y_{DAS}(t) = \sum_{i=1}^N w_i \hat{s}_i(t - \tau_i) \quad (2.3)$$

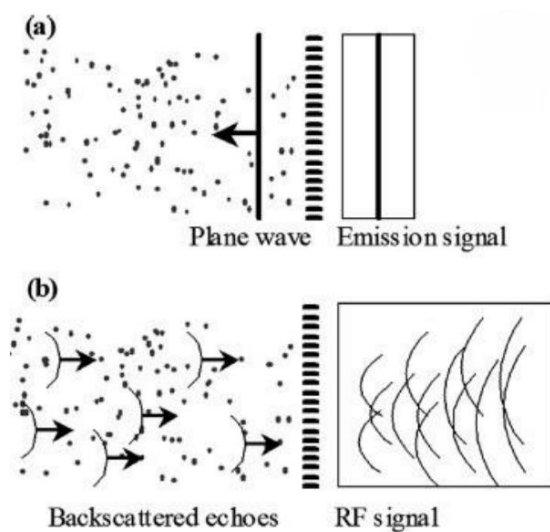


Figura 2.3: a) Emissione ad onda piana b) Ogni punto riflettente nel mezzo genera un'onda sferica che arriva in tempi proporzionali alla distanza orizzontale ai vari elementi, determinando un profilo ad iperbole dei segnali RF ricevuti dai trasduttori.

dove \hat{s}_i è il segnale acquisito dall' i -esimo elemento piezoelettrico della sonda.

τ_i è il tempo di volo dell' i -esimo elemento.

w_i è il peso predefinito da applicare al segnale dell' i -esimo elemento.

Questo è vero per un singolo oggetto nello spazio scansionato. Il mezzo insonato è in generale fatto da moltissimi punti riflettenti; per ricostruire l'intensità di ciascun pixel dell'immagine:

1. si discretizza il piano scansionato (griglia)
2. per ciascun punto della griglia si calcola il tempo di volo con ciascun sensore del trasduttore sulla base delle coordinate geometriche del pixel
3. si ricostruisce l'intensità del punto come somma pesata del valore che i segnali RF assumono nei rispettivi tempo di volo.

2.1.3 Elaborazione dei segnali RF: imaging B-mode e velocità tissutale

A partire dai segnali RF beamformati, tipicamente si procede con gli step di demodulazione, involuppo e compressione logaritmica, al fine di ottenere immagini in modalità B-mode, dove il tono di grigio codifica per l'intensità dell'eco riflesso da quel punto nella fetta scansionata. In questo modo si ottengono informazioni

strutturali sul mezzo e la localizzazione delle strutture ecogene al suo interno. Tuttavia, l'US può essere utilizzata anche per ottenere informazioni funzionali: a partire dai segnali RF, è possibile anche stimare la velocità tissutale [36].

Stimatori di velocità

In generale, le tecniche per la stima della velocità assiale in ultrasonografia possono essere classificate sulla base di numerosi criteri, tra cui:

- (a) Il tipo di dato in ingresso:
 - Segnali in radiofrequenza (RF)
 - Segnali demodulati (I/Q)
- (b) La dimensionalità dei dati in ingresso:
 - Unidimensionali (1D)
 - Bidimensionali (2D), ovvero l'insieme dei segnali in profondità ottenuti in trasmissioni successive.
- (c) Il dominio in cui opera lo stimatore:
 - Frequenza
 - Fase
 - Tempo

Nonostante le differenze tra le tecniche, tutte si basano su un principio comune: il bersaglio, ovvero un punto che funge da oggetto diffusore degli ultrasuoni, situato all'interno di un tessuto, essendo in moto, varia la sua distanza dalla sonda tra due insonazioni successive. Questa variazione di distanza provoca una traslazione del segnale retrodiffuso dal bersaglio, che si manifesta come uno spostamento di fase e nel tempo degli echi tra due trasmissioni consecutive[37]. Nell'applicazione classica, che è la flussimetria doppler, la stima della velocità assiale tradizionalmente è effettuata tramite l'autocorrelazione 1D, una tecnica nel dominio della frequenza che misura lo spostamento di fase medio rispetto alla frequenza centrale dell'impulso, detto scarto Doppler, presente nel segnale Doppler complesso (IQ). Sono poi state proposte altre tecniche che operano direttamente nel dominio del tempo a partire da dati 2D, come la cross-correlazione, che stima la velocità assiale del bersaglio tramite la misura dello spostamento nel tempo, invece che in frequenza, tra gli echi retrodiffusi con la massima corrispondenza.

É stato in seguito proposto, in [37], uno stimatore della velocità basato su autocorrelazione 2D; questo stimatore combina le prestazioni generalmente superiori

delle tecniche 2D nel dominio temporale con la relativa semplicità dell'autocorrelazione 1D ed è stato dimostrato avere prestazioni migliori rispetto a quest'ultima e, quando si lavora con dati caratterizzati da un basso rapporto segnale-rumore, anche agli approcci 2D.

Autocorrelazione 2D

I dati in ingresso a questo stimatore sono bidimensionali, costituiti dall'insieme di segnali in profondità ottenuti insonando la stessa linea di scansione con una sequenza di impulsi trasmessi ad una frequenza centrale f_{RFc} . Questo input bidimensionale discreto verrà di seguito rappresentato con $r(m, n)$, dove m sono i campioni in profondità e n gli impulsi nel tempo.

In questo contesto, le due dimensioni vengono denominate secondo una terminologia specifica: l'asse del tempo (degli impulsi successivi), è indicato con '*slow-time*', mentre quello della profondità è detto '*fast-time*'. La frequenza corrispondente all'asse fast-time è la frequenza RF (f_{RF}), mentre quella associata all'asse slow-time è la frequenza Doppler (F_D).

Il periodo di campionamento lungo l'asse fast-time verrà di seguito indicato con t_s e il numero totale di campioni in questa dimensione è detto 'lunghezza del *range gate*'. Nell'altra dimensione, di slow-time, l'intervallo tra gli impulsi trasmessi dalla sonda è detto periodo di ripetizione degli impulsi T_s e il numero di impulsi trasmessi è detto 'lunghezza dell'*ensemble*'.

f e F sono, rispettivamente, la frequenza RF e la frequenza Doppler normalizzate ($f = f_{\text{RF}}t_s$; $F = F_D T_s$). Il primo passo consiste nel calcolo della Trasformata di Fourier bidimensionale dei dati $r(m, n)$. Poiché, come si è già detto, la variazione della distanza tra bersaglio e sonda dovuta al movimento del primo fa sì che questo set di segnali RF retrodiffusi sono uno la versione traslata dell'altro, lo spettro 2D $\Gamma(f, F)$ sarà nullo ovunque tranne che nel raggio del piano delle frequenze normalizzate (f, F) che ha pendenza F/f , data dalla formula:

$$\frac{F}{f} = \frac{2vT_s}{ct_s} \quad (2.4)$$

Dove v è la velocità assiale di movimento del bersaglio. In altri termini, per una certa frequenza RF normalizzata f' all'interno della banda dell'impulso trasmesso, lo spettro 2D è diverso da zero solo per un valore di frequenza Doppler F' dato dalla formula:

$$F' = \frac{2vT_s f'}{ct_s} \quad (2.5)$$

Quindi, al contrario di quanto assunto dall'approccio convenzionale dell'autocorrelazione 1D, che considera la frequenza RF media dell'impulso trasmesso costante,

la natura stocastica dello spettro 2D implica che la frequenza RF media varia considerevolmente nel tempo e in maniera randomica, ma è stato dimostrato che la corrispondente frequenza Doppler media segue queste fluttuazioni; dunque, il loro rapporto rimane costante e proporzionale alla velocità assiale media.

$$\frac{\langle F \rangle}{\langle f \rangle} \propto v \quad (2.6)$$

Questo è vero nel caso ideale di segnali infiniti; la limitazione della finestra di osservazione nel caso reale, di segnali finiti, porta all'allargamento dello spettro, che sarà dunque non nulla in una regione ellittica piuttosto che in una linea.

Per poter ricavare v si vogliono ottenere $\langle f \rangle$ e $\langle F \rangle$ come le coordinate del centro di massa dello spettro; tuttavia, per le proprietà della trasformata di Fourier 2D dei segnali reali, lo spettro risulta simmetrico rispetto all'origine del piano delle frequenze; per rimuovere la simmetria e poter calcolare il centro di massa viene ricavato il segnale analitico di $r(m, n)$, indicato con $\tilde{r}(m, n)$, definito come

$$\tilde{r}(m, n) = r(m, n) - j\hat{r}(m, n) \quad (2.7)$$

Dove $\hat{r}(m, n)$ è la trasformata di Hilbert discreta di $r(m, n)$. Sfruttando le proprietà della trasformata di Hilbert si ottiene un segnale analitico la cui trasformata di Fourier $\tilde{R}(f, F)$ è nullo nel semipiano negativo e pari al doppio della trasformata di Fourier del segnale $r(m, n)$, $R(f, F)$, in quello positivo:

$$\tilde{R}(f, F) = \begin{cases} 2R(f, F) & 0 \leq f < 0.5 \\ 0 & -0.5 \leq f < 0 \end{cases} \quad (2.8)$$

Il centro di massa nel semipiano positivo dello spettro $\Gamma(f, F)$ del segnale $r(m, n)$ può essere quindi semplicemente calcolato come il centroide dello spettro del segnale analitico $\tilde{\Gamma}(f, F) = |\tilde{R}(f, F)|^2$. Infine, poiché è noto che la pendenza del raggio nel piano delle frequenze che passa per il centroide ($\langle f \rangle$, $\langle F \rangle$) è definita dalla formula 2.4, la stima della velocità assiale media sarà data da:

$$\langle v \rangle = \frac{ct_s \langle F \rangle}{2T_s \langle f \rangle} \quad (2.9)$$

In questo modo sarebbe possibile ottenere la stima della velocità assiale media nel dominio della frequenza; l'autocorrelatore 2D tuttavia opera direttamente nel dominio del tempo: invece di ottenere la velocità come centro di massa dello spettro del segnale analitico, è stato dimostrato che una stima delle frequenze può essere ottenuta valutando la funzione di autocorrelazione $\tilde{\gamma}(m', n')$ del segnale analitico, definita come

$$\tilde{\gamma}(m', n') = \sum_{m=0}^{M-m'-1} \sum_{n=0}^{N-n'-1} \tilde{r}(m, n) \tilde{r}^*(m+m', n+n') \quad (2.10)$$

per due valori specifici di ritardo: ($m'=1, n'=0$) e ($m'=0, n'=1$).

Da qui la formula per ricavare la stima della velocità assiale mediante autocorrelazione 2D:

$$\langle v \rangle = \frac{ct_s \langle F \rangle}{2T_s \langle f \rangle} = \frac{ct_s}{2T_s} \cdot \frac{\tan^{-1} \left(\frac{\text{Im}[\tilde{\gamma}(0,1)]}{\text{Re}[\tilde{\gamma}(0,1)]} \right)}{\tan^{-1} \left(\frac{\text{Im}[\tilde{\gamma}(1,0)]}{\text{Re}[\tilde{\gamma}(1,0)]} \right)} \quad (2.11)$$

I passaggi che nella pratica permettono di stimare la velocità assiale dai segnali RF ai vari istati di campionamento della sonda sono qui di seguito riassunti.

Algorithm 1 Autocorrelatore 2D per la stima della velocità assiale

Require: Matrice $r(m, n)$ con M lunghezza del range gate e N lunghezza dell'ensemble

Require: t_s : periodo di campionamento nel fast-time

Require: T_s : periodo di ripetizione degli impulsi

Ensure: Stima della velocità assiale media (v)

Calcolo del segnale analitico: $\tilde{r}(m, n) = r(m, n) - \hat{r}(m, n)$

Calcolo della funzione di autocorrelazione del segnale analitico: $\tilde{\gamma}(m', n')$

Calcolo della velocità assiale media dalla formula:

$$\langle v \rangle = \frac{ct_s \langle F \rangle}{2T_s \langle f \rangle} = \frac{ct_s}{2T_s} \cdot \frac{\tan^{-1} \left(\frac{\text{Im}[\tilde{\gamma}(0,1)]}{\text{Re}[\tilde{\gamma}(0,1)]} \right)}{\tan^{-1} \left(\frac{\text{Im}[\tilde{\gamma}(1,0)]}{\text{Re}[\tilde{\gamma}(1,0)]} \right)}$$

2.1.4 Ultrasonografia 3D

Il vantaggio principale dell'US 3D rispetto alle altre tecniche di imaging volumetrico (tomografia computerizzata e RM), oltre al costo inferiore e all'assenza di radiazioni ionizzanti, è la velocità dell'acquisizione. Questo dà la possibilità di osservare eventi in tempo reale.

Ci sono tre modi per fare US 3D:

- Scansione freehand: l'operatore sposta arbitrariamente la sonda sulla cute mentre sensori di posizionamento (per esempio sensore ottico o di campo magnetico) ne rilevano le posizioni, necessarie poi alla ricostruzione del volume.
- Traslazione meccanica (o imaging stroboscopico): il trasduttore è azionato da un motore (interno o esterno alla sonda) per ruotare, inclinarsi o traslare. Vengono acquisite più immagini 2D e le informazioni di asse di rotazione o di inclinazione o la traslazione sono utilizzate per ricostruire da questo il volume

- Scansione mediante trasduttori volumetrici, tra cui le sonde matriciali. Questi, a differenza delle tecniche precedenti di imaging 3D basate su sonde 1D, hanno la potenzialità di acquisire dati volumetrici ad alta frequenza, consentendo la visualizzazione tridimensionale di strutture dinamiche in tempo reale, come il cuore o il muscolo. Inoltre, eliminando la necessità di componenti meccaniche, consentono di acquisire volumi senza distorsioni, requisito essenziale per un'accurata diagnosi clinica.

Tuttavia, le sonde matriciali presentano anche alcuni svantaggi e sfide significative che devono essere considerate per garantire un imaging 3D accurato. Dal punto di vista tecnologico, l'impedenza di ciascun elemento nelle sonde matriciali è significativamente maggiore rispetto a quella dei trasduttori lineari, rendendo difficile il bilanciamento dell'impedenza. Inoltre, per evitare il *cross-talk* tra gli elementi, questi devono essere posizionati ad almeno mezza lunghezza d'onda di distanza l'uno dall'altro. Ciò si traduce in un numero elevato di elementi di dimensioni estremamente ridotte, il che complica il processo di fabbricazione. Per ridurre le difficoltà nella fabbricazione le dimensioni degli array devono essere limitate, il che riduce il campo visivo nelle immagini.

Infine, la ricostruzione di volumi 3D in tempo reale richiede una potenza di calcolo significativa, il che rende cruciale scegliere l'algoritmo di ricostruzione utilizzato nell'ottica di bilanciare accuratezza e velocità computazionale.

Capitolo 3

Materiali e Metodi

3.1 Set up sperimentale e strumentazione

Per questo studio sono state effettuate due tipologie di misurazioni in parallelo sul muscolo: elettromiografia di superficie e imaging ultrasonografico volumetrico. Le acquisizioni combinate HDsEMG e 3D US sono state condotte durante contrazioni isometriche volontarie del muscolo adduttore del mignolo, ciascuna della durata di cinque secondi, mantenute a un livello di forza costante pari al 5% e, successivamente, al 10 % della Massima Contrazione Volontaria (MVC). Le motivazioni dietro la scelta del muscolo adduttore del mignolo sono duplici: è un muscolo superficiale, requisito fondamentale per la decomposizione dei segnali HDsEMG[38] e ha dimensioni ridotte, qualità che lo rende ideale per essere scansionato con il campo visivo limitato della sonda utilizzata (circa 100 mm²).

Nello studio sono stati coinvolti cinque soggetti sani (età compresa tra 20 e 40 anni, 3 uomini e 2 donne), senza storia clinica di disturbi o patologie neurologiche né muscolo-scheletriche. Di seguito vengono riportati la strumentazione e il protocollo sperimentale utilizzato. Un'illustrazione del set-up sperimentale complessivo è riportata nella figura 3.1.

3.1.1 Elettromiografia di superficie ad alta densità

L'attività elettrica muscolare è stata registrata utilizzando un sistema HDsEMG, con una matrice di 32 elettrodi disposti in quattro righe e otto colonne, con una distanza interelettrodica di 5 mm. I segnali, acquisiti in derivazione monopolare, sono stati condizionati con un filtro con banda passante di 10-500 Hz e con guadagno 46 dB, campionati ad una frequenza di 2049 Hz e infine convertiti su 16 bit tramite un sistema wireless di acquisizione HDsEMG (MEACS, LISiN, Politecnico di Torino, Torino, Italia [39, 40]).

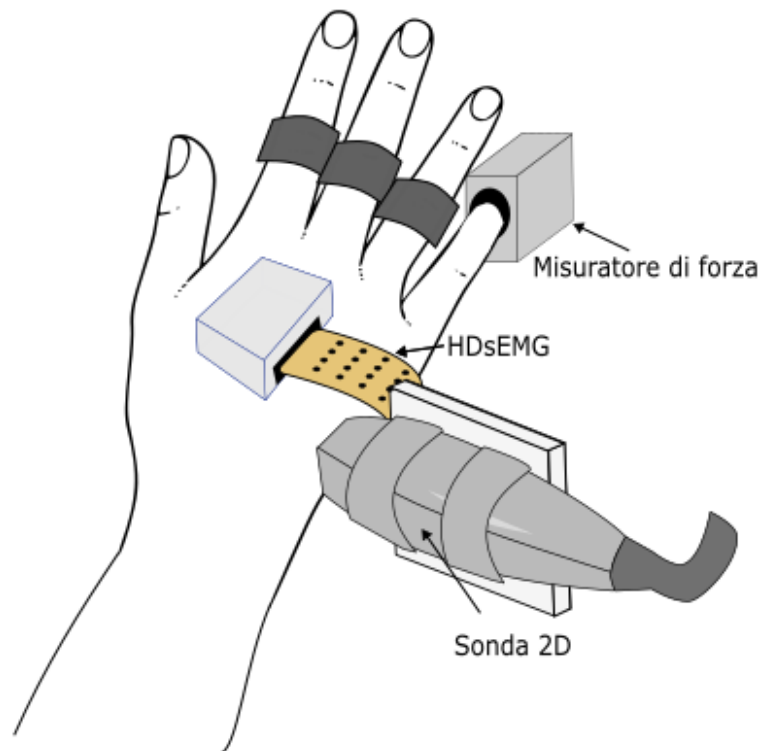


Figura 3.1: Set-up sperimentale per l'acquisizione di dati ultrasonografici e elettromiografici.

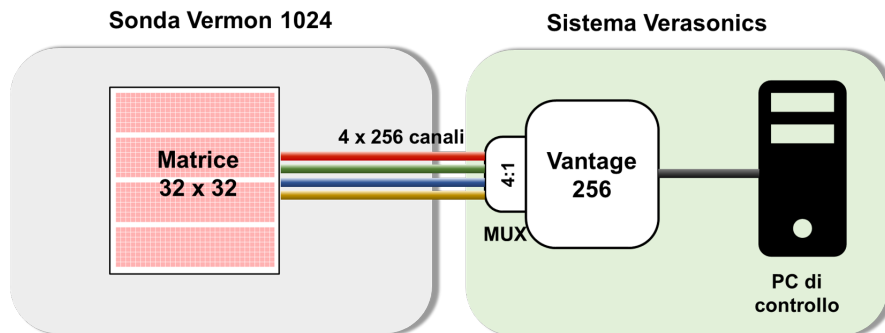
3.1.2 Ultrasonografia 3D ad elevato frame rate

I dati volumetrici in radiofrequenza (RF) sono stati acquisiti con il sistema ad ultrasuoni Verasonics Vantage 256 (Verasonics Inc. Kirkland, WA, USA), una piattaforma programmabile per ricerca, accoppiata con una sonda matriciale per imaging volumetrico (Vermon, Tours, Francia), con una frequenza centrale di 7,81 MHz (in figura 3.2). La sonda consiste in una matrice di 1024 elementi piezoelettrici, larghi $275 \mu\text{m}$ e disposti con un *pitch* di 0.3 mm su una superficie priva di curvatura in 32 righe e 32 colonne. Tre righe mancanti di elementi dividono la matrice in quattro sotto-aperture di 8 righe e 32 colonne ciascuna (come mostrato in 3.3), determinando un'apertura complessiva di 9,6 mm per 10,5 mm. Un adattatore 1024-MUX (1024-MUX UTA di Verasonics Inc. Kirkland, WA, USA) collega la sonda al sistema Vantage 256 e realizza il multiplexing 4:1 dei 256 canali del sistema

Vantage 256 con i 1024 elementi del trasduttore, come si osserva nelle figure 3.2b e 3.3.



(a)



(b)

Figura 3.2: Configurazione multiplexata 4:1 per l'accoppiamento della sonda Vermon a 1024 elementi con il sistema Verasonics Vantage a 256 canali. In foto (a) è visibile la sonda matriciale e l'adattatore MUX, intercambiabile, che la collega al sistema. b) diagramma della configurazione.

Il 1024-MUX UTA prevede 256 interruttori a quattro stati: ciascun interruttore può connettere un canale del sistema a quattro elementi del probe, uno per ogni sotto-apertura. Mentre in TX l'interruttore ha la possibilità di collegare tutti e

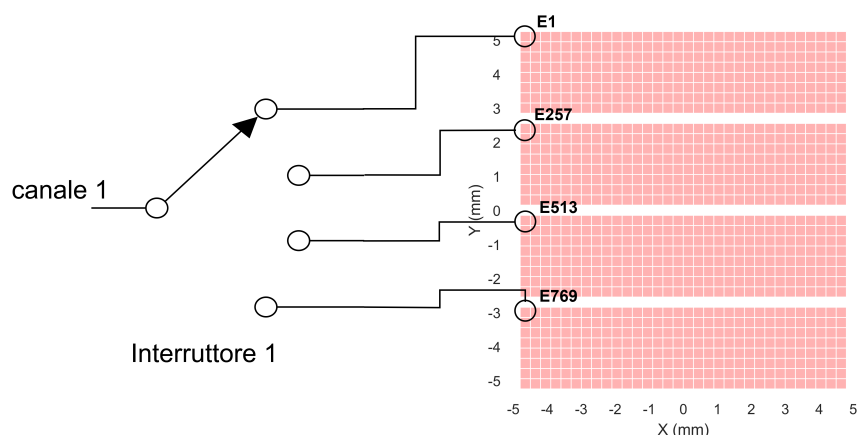


Figura 3.3: Schema della geometria della sonda matriciale Vermon di 1024 elementi piezoelettrici (divisi in quattro sotto-aperture) e come questi sono collegati ai 256 canali del sistema Verasonics per mezzo dell'adattatore 1024-MUX. Ciascuno dei 256 interruttori del 1024-MUX UTA collega quattro elementi: per esempio, i primi elementi di ciascuna delle quattro sotto-apertura (E1, E257, E513, E769) sono tutti collegati al canale 1 mediante un interruttore.

quattro gli elementi in parallelo, permettendo l'attivazione dell'apertura completa (1024 elementi), in RX la configurazione multiplexata 4:1 permette di ricevere da soli 256 canali alla volta.

La sonda è stata programmata attraverso un codice MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) personalizzato per eseguire il processo di acquisizione di seguito riportato. In TX, tutti i 1024 elementi piezoelettrici del trasduttore vengono attivati simultaneamente senza ritardi, generando un'onda piana non focalizzata. Questo tipo di insonazione del mezzo, pur portando ad una risoluzione peggiore, permette l'elevato frame rate richiesto da questa applicazione. La forma d'onda dell'impulso trasmesso da ogni trasmettitore è un treno d'onda quadrata a 2 cicli, alla frequenza di 7,81 MHz. Durante la fase di ricezione (RX), vengono acquisiti i segnali di un gruppo di 256 elementi, chiamato apertura, campionati a una frequenza quattro volte superiore a quella centrale della sonda, ossia 31,25 MHz. Per acquisire l'intera apertura della sonda matriciale, è dunque necessaria una sequenza di quattro eventi di TX-RX, nei quali il 1024-MUX UTA commuta tra quattro aperture diverse in RX. Ogni singolo evento di RX utilizza una delle quattro aperture, ciascuna composta da 256 elementi attivi. Le aperture sono progettate in modo da selezionare un solo dei quattro elementi connessi allo stesso interruttore e affinché ciascun elemento sia attivo in uno e un solo evento di RX; in altri termini le quattro aperture utilizzate in ricezione sono complementari. Sono state testate due modalità diverse di ricezione della sonda, che differiscono per il set di aperture utilizzate in RX:

- Modalità a blocchi: si ricevono i segnali da una sotto-apertura della matrice alla volta. Le quattro aperture sono quelle rappresentate in 3.4.
- Modalità SRAC: ciascuna apertura consiste in un insieme di 256 elementi scelti casualmente nella sonda (con le limitazioni sopra indicate). Questa tecnica prende il nome di Sparse Random Aperture Compounding (SRAC)[41]. Le quattro aperture sono quelle rappresentate in 3.5.

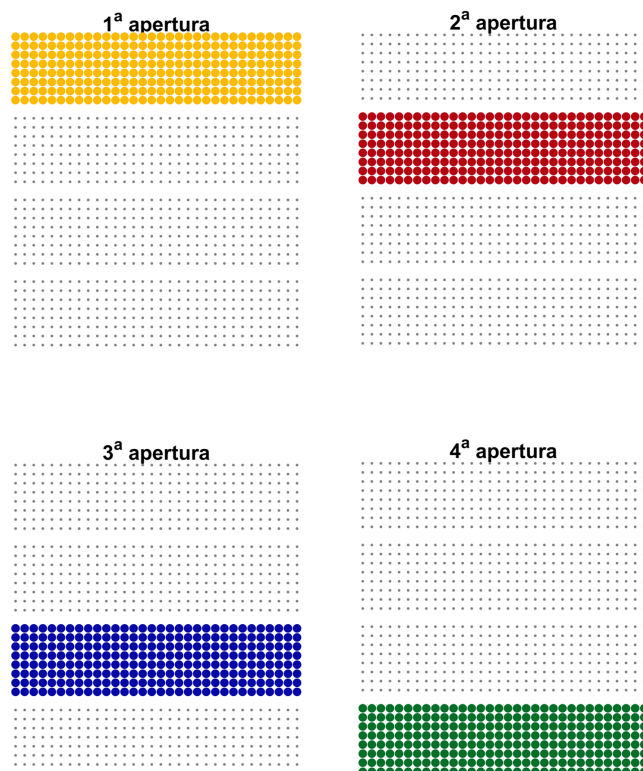


Figura 3.4: Aperture utilizzate nei quattro eventi di RX, nella modalità a blocchi.

È stato selezionato un intervallo tra i singoli eventi di TX-RX pari a 0,5 ms, di conseguenza il tempo necessario per l'acquisizione di un singolo frame volumetrico è di 2 ms, corrispondente a un frame rate di 500 volumi al secondo. Il frame rate e la durata della registrazione sono stati selezionati tenendo conto delle limitazioni nello spazio per la memorizzazione, rappresentando un buon compromesso tra questo e una risoluzione temporale e durata della registrazione sufficienti a garantire un'elaborazione il più accurata possibile.

Per ogni test, vengono acquisiti 2500 volumi in radiofrequenza (RF), ognuno composto da un set di 1024 canali. Ogni canale è un segnale di 1536 campioni,

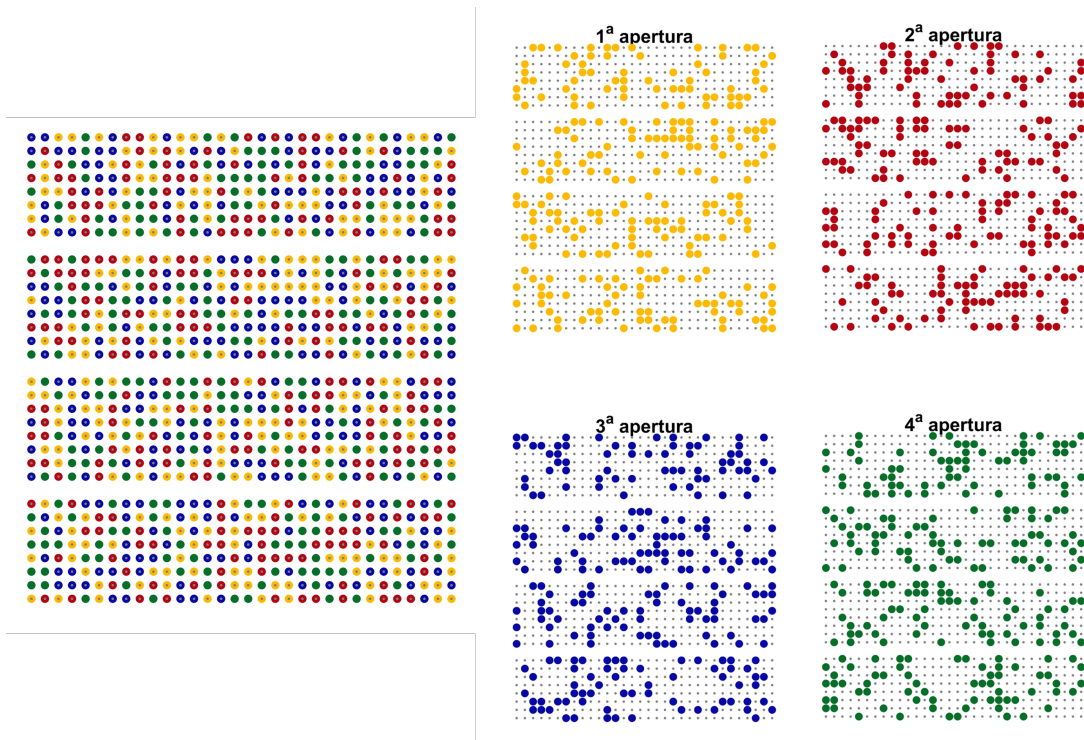


Figura 3.5: Aperture utilizzate nei quattro eventi di RX, nella modalità SRAC. Sulla destra è evidenziata la complementarità tra le quattro aperture, che complessivamente ricoprono l'intera sonda.

che rappresentano la digitalizzazione del segnale analogico ricevuto dai sensori piezoelettrici.

3.1.3 Sincronizzazione tra dati elettromiografici e ultrasonografici

L'acquisizione ultrasonografica è stata programmata per essere attivata dal fronte di salita di un trigger esterno, un impulso rettangolare della durata di 0,5s fornito da un generatore esterno (StimTrig; LISiN, Politecnico di Torino, Italia) e dato in ingresso al sistema Verasonics. Il trigger è stato acquisito, dall'inizio alla fine di ogni registrazione, dal sistema HDsEMG e in seguito usato in fase di post processing per selezionare i campioni dei segnali EMG che coincidono temporalmente con i cinque secondi della finestra di acquisizione ultrasonografica.

3.1.4 Misura di forza

La misura della componente orizzontale della forza di adduzione del mignolo è stata effettuata attraverso una cella di carico. Il segnale della forza espressa durante le contrazioni è stato acquisito e visualizzato in real time su uno schermo come feedback visivo per il soggetto.

3.2 Protocollo sperimentale

Prima dell'applicazione della matrice di elettrodi, la cute sopra al muscolo è stata adeguatamente preparata con una leggera esfoliazione chimica e poi ricoperta con pasta conduttiva. La griglia è stata quindi posizionata sopra il muscolo adduttore del mignolo, con le colonne della griglia di elettrodi che avvolgono il lato esterno della mano destra, dal palmo al dorso, parallele all'asse longitudinale della mano. Il soggetto è stato fatto sedere con l'avambraccio immobilizzato su di un apposito piano tramite una fascia, il mignolo bloccato all'interno del misuratore di forza e le altre dita fissate. Di seguito, la sonda ultrasonografica è stata posizionata prossimalmente rispetto alla griglia di elettrodi e centrata rispetto alle colonne in modo da scansionare lo stesso volume della griglia. Il sistema a ultrasuoni è stato utilizzato in questa fase di posizionamento in modalità di imaging in tempo reale per effettuare piccoli aggiustamenti ed assicurare che il muscolo fosse visualizzato correttamente. La sonda è stata quindi fissata in posizione da un braccio isometrico. Del gel per ultrasonografia è stato interposto per migliorare l'accoppiamento tra il trasduttore e la cute. Prima dell'acquisizione è stato richiesto al soggetto di effettuare alcune contrazioni durante le quali è stato fornito il feedback visivo del livello di forza in tempo reale su di un display. Il massimo livello di contrazione espresso in queste prove è stato selezionato come valore di riferimento di MVC. Terminata questa fase di preparazione, al soggetto è stato richiesto di effettuare una contrazione mantenendo per l'intera durata di registrazione un livello di forza costante, prima al 5% e poi al 10% MVC. Durante la contrazione è stato mostrato al soggetto il feedback sul livello di forza in tempo reale, insieme con il riferimento del valore target da mantenere. I segnali HDsEMG sono stati acquisiti durante l'intera contrazione, mentre i dati US sono stati registrati per cinque secondi a partire dal trigger, nel mezzo della contrazione.

Su ciascun soggetto, a parità di set-up sperimentale, sono state effettuate diverse sessioni di registrazione, con le quali sono stati testati

- due livelli di forza: 5% MVC e 10%MVC
- due modalità di acquisizione: la modalità a blocchi e SRAC.

Per ciascuna delle quattro combinazioni di livello di forza-modalità di acquisizione sono state eseguite due prove, per un totale di 8 registrazioni per soggetto.

3.3 Metodo

Di seguito viene presentata la sequenza di elaborazione proposta per l'identificazione della regione tridimensionale nel volume scansionato in cui sono localizzate le fibre muscolari di una singola UM reclutata. L'identificazione del fascio di fibre muscolari avviene localizzando le porzioni del muscolo che mostrano movimenti sincroni con l'attività elettrica, estratta dai segnali HDsEMG. La pipeline completa è illustrata schematicamente in figura 3.6.

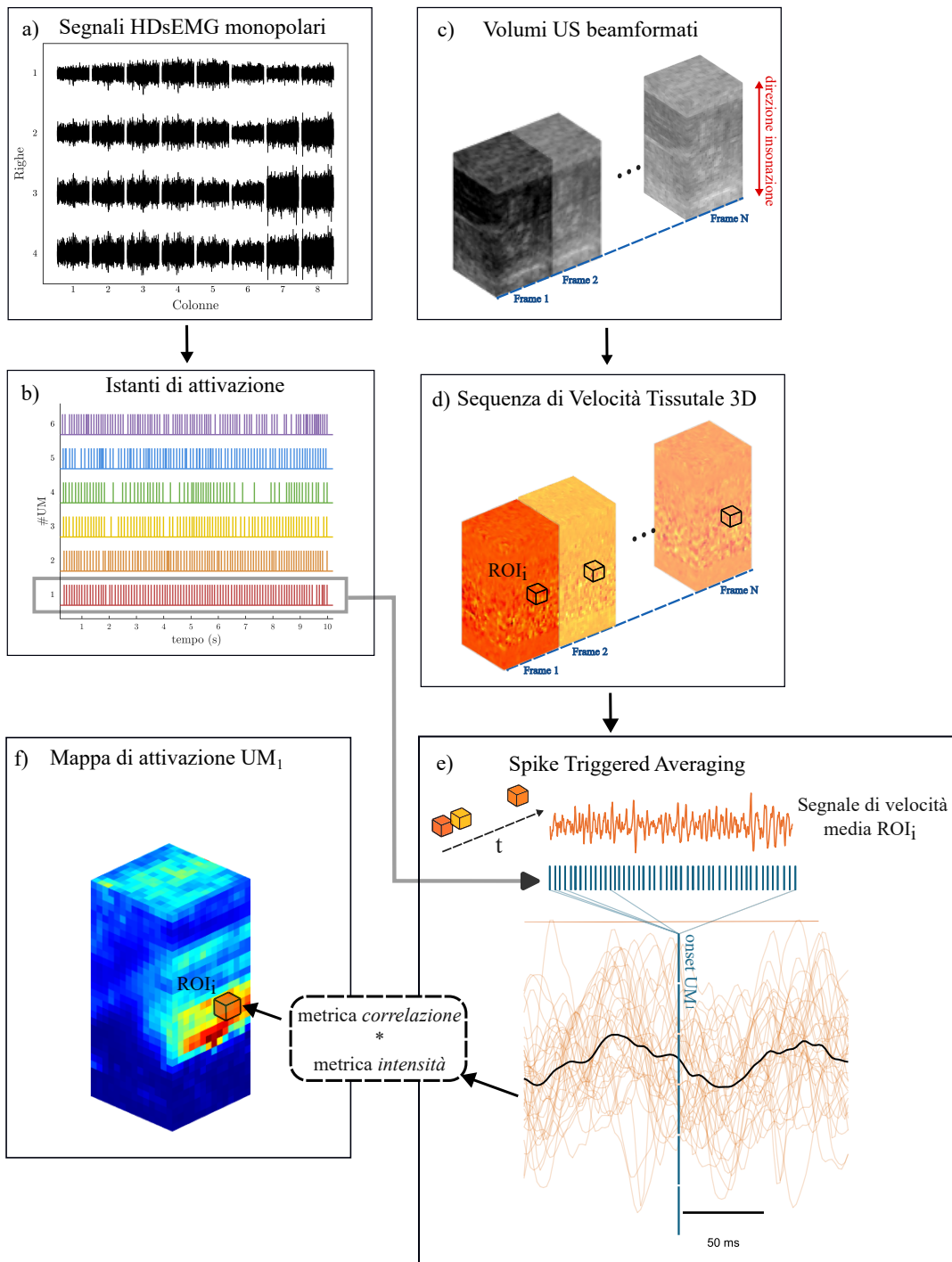


Figura 3.6

Figura 3.6: Panoramica dell’algoritmo proposto per l’identificazione di un’UM. (a) Segnali monopolari HDsEMG di una griglia 4x8 di elettrodi. (b) Pattern di attivazione delle UM ottenuti mediante decomposizione dei segnali HDsEMG. (c) Sequenza di volumi US beamformati, rappresentati in modalità B-mode. (d) Sequenza di Velocità Tissutale (TVS)-3D ottenute con l’approccio di autocorrelazione 2D. (e) Analisi effettuata sulla ROI_i (corrispondente al cubetto rappresentato in (d)), che prevede: calcolo del segnale di velocità media della ROI. Spike Triggered Averaging (STA) di questo segnale sulla base degli istanti di attivazione dell’UM (da b)). Dalle epoche di 200 ms del segnale di velocità vengono calcolate una metrica di correlazione e una di intensità, che codificano per l’intensità del voxel corrispondente alla ROI_i in f). Effettuando questo tipo di analisi per ogni ROI si ottiene la mappa di attivazione dell’UM (f).

3.3.1 Decomposizione dei segnali HDsEMG

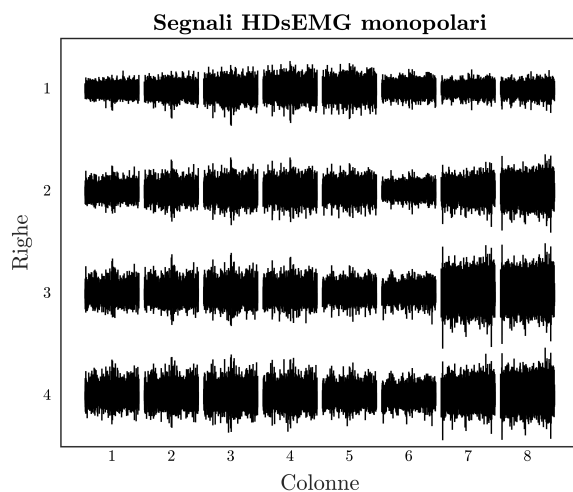
I segnali HDsEMG monopolari acquisiti (esempio in figura 3.7a) sono sottoposti a decomposizione offline nei pattern di attivazione delle singole UM reclutate nella contrazione durante la registrazione (figura 3.7b). A tal fine, è stato utilizzato l’algoritmo di Convolution Kernel Compensation (CKC), implementato nell’interfaccia DEMUSE, che è stato validato a questo scopo[42].

3.3.2 Beamforming volumetrico

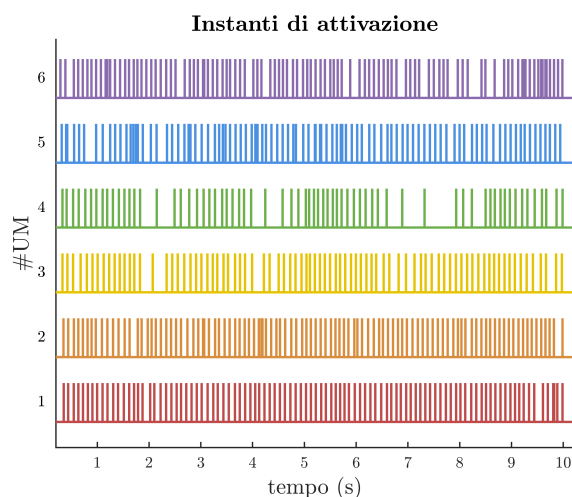
A partire dai dati in RF sono stati generati i volumi beamformati, utilizzando una versione bi-planare del DAS classico (per array lineari) descritto al paragrafo 2.1.2, pensata per dati acquisiti con sonde matriciali. Per ricostruire l’intensità del singolo voxel vengono combinati linearmente i segnali RF di tutti i 1024 elementi della sonda, opportunamente ritardati sulla base della distanza elemento-voxel. Per l’apodizzazione è stata utilizzata la finestra Tukey. Ogni volume (frame), ricostruito a partire da un set di 1024 segnali RF, è costituito da 1536 voxel in direzione assiale e 32 voxel in entrambe le direzioni laterali, corrispondenti ad un volume fisico di tessuto scansionato pari a 37.8 mm x 9.6 mm x 10.5 mm (esempio in figura 3.8)

3.3.3 Calcolo della Sequenza di Velocità Tissutale 3D

Dalle sequenze di 2500 volumi US beamformati sono ricavate le sequenze di volumi di velocità tissutale, di seguito indicate come TVS-3D. Per la stima della velocità assiale (avvicinamento/allontanamento del tessuto rispetto alla sonda) è stata impiegata l’autocorrelazione 2D[37] (descritta al paragrafo 2.1.3), con uno spostamento massimo nella direzione assiale di 0.5 mm e una *sliding window* di 4 ms. Successivamente alla stima, i volumi TVS-3D sono stati troncati a una



(a)



(b)

Figura 3.7: (a) Esempio di segnali HDsEMG per un soggetto rappresentativo. Per ogni canale è mostrato un brano di circa 10 secondi di segnale. (b) Istanti di attivazione delle sei UM che l’algoritmo di decomposizione ha estratto a partire dai segnali in (a). I diversi colori rappresentano le varie unità motorie identificate.

profondità massima di 20 mm, per focalizzarsi sulla regione di interesse, e in seguito sottocampionati a 64 voxel lungo la direzione assiale. I volumi finali TVS-3D presentano una griglia di 64x32x32 voxel, corrispondente a un volume fisico di 20 mm x 9,6 mm x 10,5 mm, con una risoluzione di 0,3 mm sia nelle direzioni laterali che in profondità.

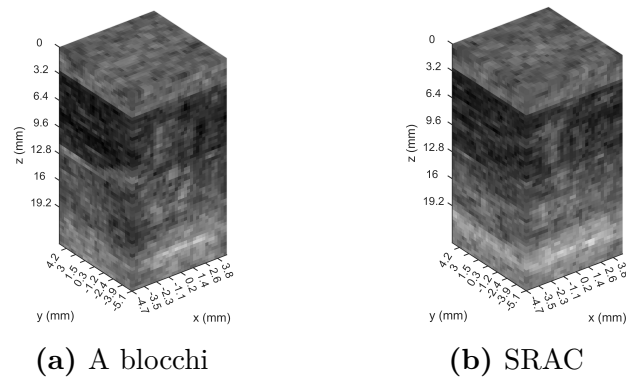


Figura 3.8: Esempio di due volumi beamformati (rappresentati in modalità B-mode) acquisiti sullo stesso soggetto con le due diverse modalità: (a) a blocchi e (b) SRAC

3.3.4 Calcolo delle mappe di attivazione delle singole UM

Nelle TVS-3D, la velocità stimata del tessuto nella direzione di insonazione è quella associata allo spostamento del tessuto risultante dall'attivazione di tutte le UM reclutate in un dato istante. Per identificare spazialmente le singole UM, è necessario isolare lo spostamento associato all'attivazione di ciascuna di esse. Questo viene fatto applicando, per ogni UM, STA alla TVS-3D a partire dai suoi istanti di attivazioni (ottenuti tramite la decomposizione dei segnali HDsEMG e ricampionati alla frequenza di acquisizione ecografica). Per questa analisi, il volume TVS-3D è stato suddiviso in sotto-porzioni (Region of Interest (ROI)) di $4 \times 4 \times 4$ voxel, corrispondenti a cubetti di tessuto di circa 2 mm^3 . Le ROI sono state estratte sistematicamente scorrendo l'intero volume con un passo di 2 voxel nelle tre direzioni spaziali. Per ogni ROI è stato applicata la tecnica di STA al segnale di velocità media nel tempo, ottenuto mediando i valore dei voxel appartenenti alla ROI in ogni frame. Dal segnale di velocità, filtrato con banda passante di 5-100 Hz, vengono estratti i *twitch*, ovvero epoche di 200 ms attorno ad ogni sparo. Per ciascuna ROI vengono calcolati:

- il valore medio di correlazione tra tutti i *twitch*, indicativo del grado di sincronizzazione del movimento della ROI con i pattern di attivazione EMG
- il valore di intensità, ricavato come massimo del segnale ottenuto come media al quadrato delle epoche sulla loro deviazione standard. Questo parametro è indicativo, oltre che della sincronicità, dell'ampiezza dello spostamento.

Viene quindi associata a ciascuna ROI il prodotto tra il valore di correlazione e quello di intensità. In questo modo si costruisce, per ogni UM, una mappa 3D in cui

il valore di un voxel codifica il grado di sincronizzazione temporale del movimento di quella specifica porzione di tessuto con l'attività elettrica dell'UM.

Capitolo 4

Analisi e Validazione

L'obiettivo di questa sezione è presentare l'analisi svolta a partire dalle mappe 3D di UM ottenute tramite il metodo proposto. L'analisi si articola in due fasi: in primo luogo si esegue una caratterizzazione delle regioni di attivazione attribuite a ciascuna UM, valutandone proprietà geometriche di forma e dimensioni. In secondo luogo, si procede con la validazione del metodo, quantificando la sua capacità di identificare la stessa UM, reclutata in sessioni diverse nello stesso soggetto, nella stessa posizione spaziale.

La segmentazione dei territori di UM costituisce il primo passo per entrambe queste fasi.

4.1 Segmentazione

La segmentazione delle regioni di UM è stata effettuata sulle singole fette della mappa 3D di attivazione, estratte lungo piani perpendicolari all'asse longitudinale della mano, in quanto sono questi che ci si aspetta contengano la sezione trasversale del muscolo, data la sua l'architettura fusiforme.

Per eseguire la segmentazione, si utilizza un metodo di *thresholding* dell'immagine: sono considerati come pixel-oggetto quelli la cui intensità supera il 60% del valore massimo rilevato nella fetta. Dalla maschera binaria così ottenuta è poi selezionato l'insieme più ampio di pixel 8-connessi. Questo gruppo di pixel è stato considerato come la rappresentazione del territorio di UM nella sezione bidimensionale.

Una volta definito il territorio della UM, è stato calcolato il centroide della regione segmentata, pesato in base all'intensità dei pixel, in modo da tenere conto, oltre alla distribuzione geometrica della regione, anche della distribuzione dell'attività al suo interno. Il risultato della segmentazione e del calcolo del centroide, riferito a una specifica UM di un soggetto esemplificativo, è illustrato in figura 4.1, dove sono mostrate alcune delle sezioni segmentate.

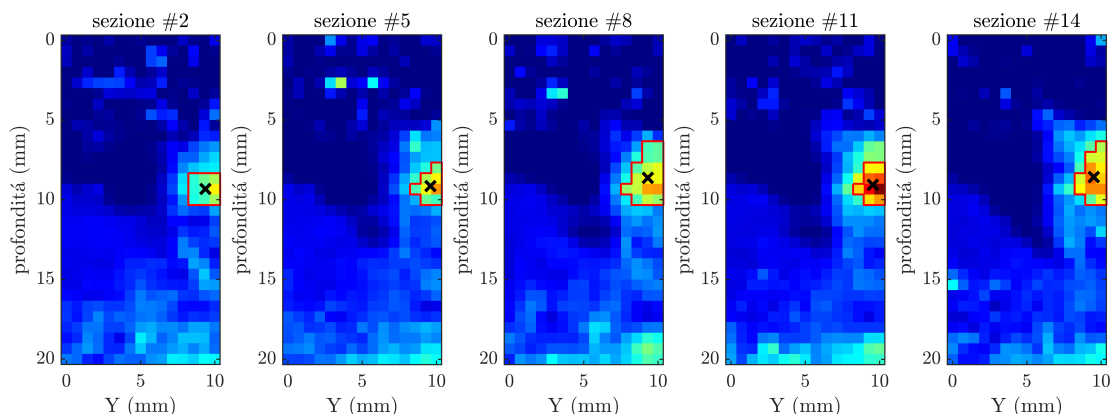


Figura 4.1: Segmentazione su diverse sezioni trasversali di una mappa di attivazione 3D relativa a un'UM esemplificativa. In ogni sezione, il contorno rosso evidenzia l'insieme dei pixel-oggetto, che rappresenta il territorio della UM, ottenuto applicando una soglia pari al 60% dell'intensità massima nella sezione. Il simbolo "X" individua il centroide della regione segmentata.

4.2 Validazione

Al fine di validare il metodo di identificazione delle UM, è stata valutata la sua coerenza nel localizzare la stessa UM vista in acquisizioni diverse effettuate sullo stesso soggetto.

Per l'identificazione e il tracciamento delle UM nelle diverse sessioni sperimentali, ci si è basati sui segnali HDsEMG. La possibilità di tracciare le UM tramite HDsEMG è intrinseca alla modalità stessa di registrazione. Infatti, è stato dimostrato[43] che, utilizzando un numero sufficiente di canali, la HDsEMG consente di identificare la rappresentazione univoca dell'attività di una singola UM, escludendo la possibilità che UM diverse generino forme d'onda identiche.

L'algoritmo impiegato per il tracciamento longitudinale, è descritto di seguito.

4.2.1 Tracciamento longitudinale

Questo metodo traccia le UM sfruttando la somiglianza attesa tra profili medi dei potenziali d'azione della stessa UM (MUAP) in prove differenti in cui questa è reclutata; la misura di similarità utilizzata è il massimo della cross-correlazione, che indica quanto bene i due profili si sovrappongono quando sono allineati nel tempo. In particolare, la tecnica utilizzata prevede i seguenti passaggi:

1. *Pre-elaborazione dei segnali:* Dalla matrice 4x8 di segnali HDsEMG acquisiti in derivazione monopolare, si calcola la matrice 3x8 dei segnali singolo differenziali,

sottraendo i segnali lungo la direzione delle fibre muscolari (ovvero lungo le colonne)[44]. Viene poi rimossa da questi l'interferenza di rete (la componente a 50 Hz e le sei armoniche successive).

2. *Calcolo dei MUAP medi*: per ogni UM reclutata in ciascuna prova si ottengono i profili medi di attivazione di ogni canale, mediante STA a partire dal pattern di attivazione dell'UM (ottenuto dalla decomposizione dei segnali HDsEMG, come descritto al paragrafo 3.3.1). A tal fine vengono estratti da ciascun canale HDsEMG epoche della durata di 60 ms centrate negli istanti di attivazione di quella UM; dalla media di queste epoche si ottengono i MUAP (esempio in figura 4.2).
3. *Associazione delle UM*: per effettuare l'associazione i MUAP di ciascuna UM di una sessione di riferimento sono cross-correlati con i MUAP di tutte le UM di una sessione successiva. Nello specifico, vengono prese a riferimento le N UM decomposte nella prima prova effettuata sul soggetto; per l' UM_i nella prova di riferimento si ricerca l'UM corrispondente nelle sette prove successive, se reclutata. Per effettuare questa associazione, si individuano i canali dell' UM_i che soddisfano due criteri:
 - valore quadratico medio superiore al 50% del massimo; ovvero un canale della matrice HDsEMG in cui l'attività dell' UM_i è presente
 - rapporto segnale-rumore superiore a 4 dB.

Si concatenano tra loro i MUAP medi dei canali selezionati per UM_i e lo stesso si fa con gli stessi canali di un'UM della prova successiva; si calcola quindi il massimo della cross-correlazione tra i due segnali ottenuti dalla concatenazione. L' UM_i della prova di riferimento viene associata all' UM_j tra le M UM della sessione considerata, che presenta il massimo della cross-correlazione, a condizione che tale valore sia superiore a 0.9. In figura 4.3 si può notare la somiglianza tra le forme d'onda dei MUAP di una stessa UM tracciata in tre diverse sessioni sperimentali.

4.2.2 Metriche

Sulle UM tracciate è stata quantificata la capacità del metodo di localizzarle sempre nella stessa posizione del volume scansionato calcolando, in ciascuna fetta del volume 3D, le seguenti metriche:

- distanza euclidea tra i centroidi in ogni sessione rispetto al centroide della sessione di riferimento

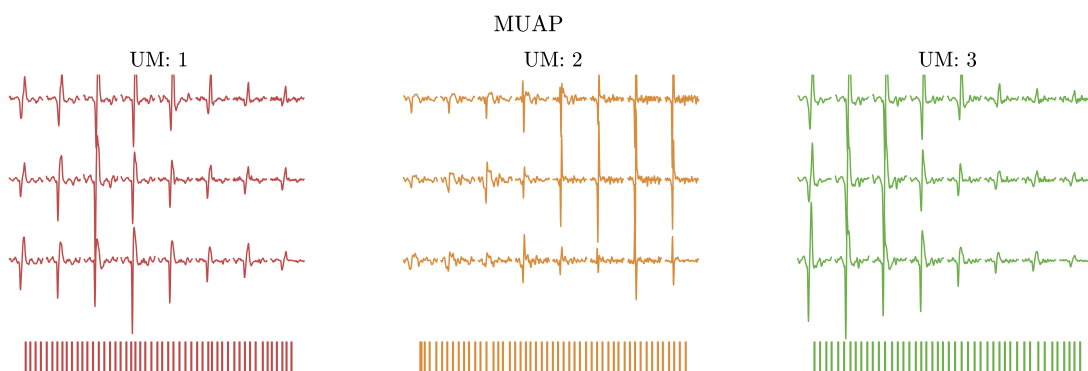


Figura 4.2: MUAP medi di 3 UM e, sotto, i treni di attivazione della rispettiva UM a partire dai quali sono ottenuti mediante STA della matrice di segnali singolo differenziali.

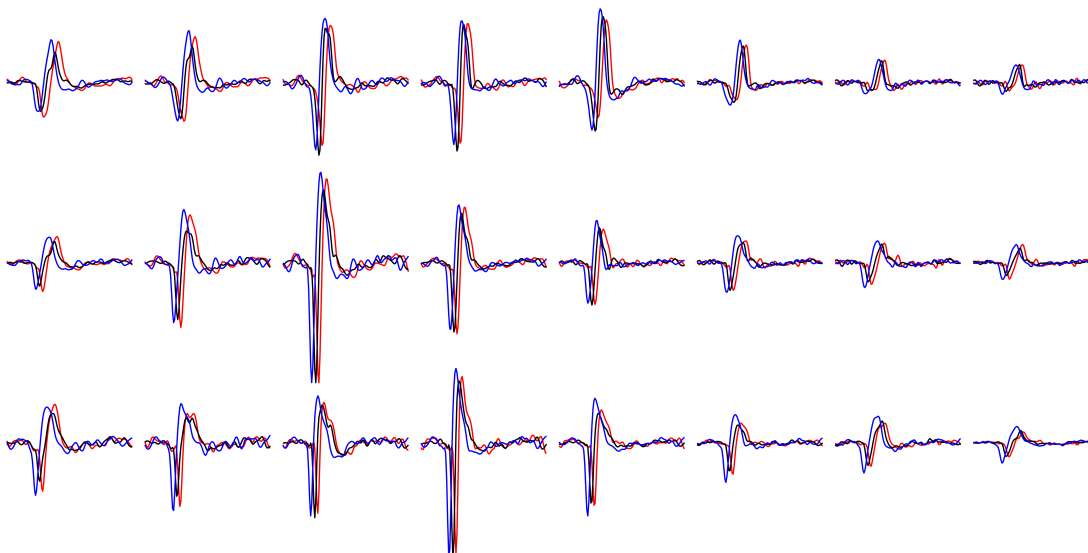


Figura 4.3: Esempio di UM tracciata: sono rappresentati in colori diversi i MUAP relativi alla stessa UM in tre diverse sessioni in cui è reclutata.

- dispersione dei centroidi, calcolata come media delle distanze euclidee del centroide in ciascuna prova rispetto ad un centroide medio.

In entrambi i casi sono mediati i valori ottenuti tra le varie fette. Questi valori sono confrontati con le stesse metriche calcolate per accoppiamenti di UM effettuati in maniera casuale: ad ogni UM della sessione di riferimento viene

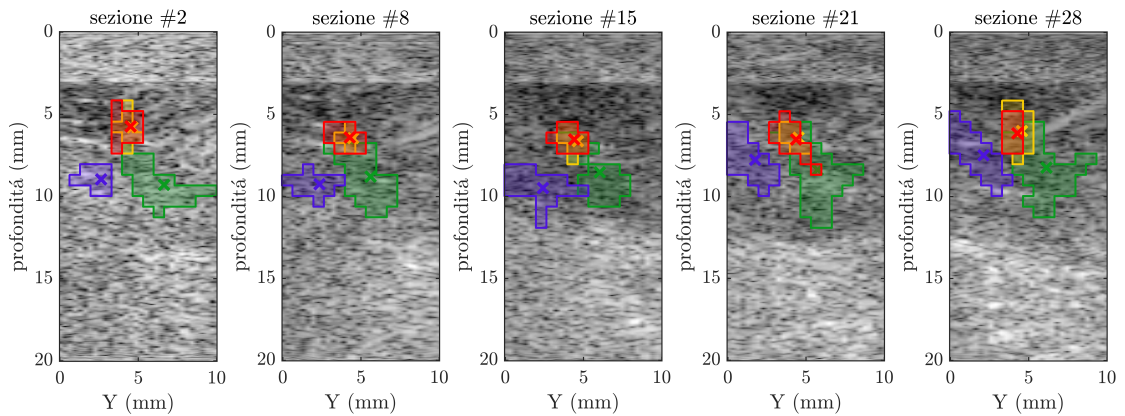


Figura 4.4: In colori diversi sono visualizzati i territori segmentati per le varie occorrenze della stessa UM nelle sessioni effettuate su un soggetto. Come metriche di validazione si considera la distanza dei centroidi dei territori rispetto al centroide della sessione di riferimento ('x' in rosso) e la dispersione dei centroidi rispetto al centroide medio (ottenuto mediando le coordinate di tutti i centroidi nella fetta).

associata, in ogni sessione in cui è reclutata, un'UM casuale tra quelle identificate. Una visualizzazione dei centroidi delle occorrenze della stessa UM in sessioni diverse è presente in figura 4.4.

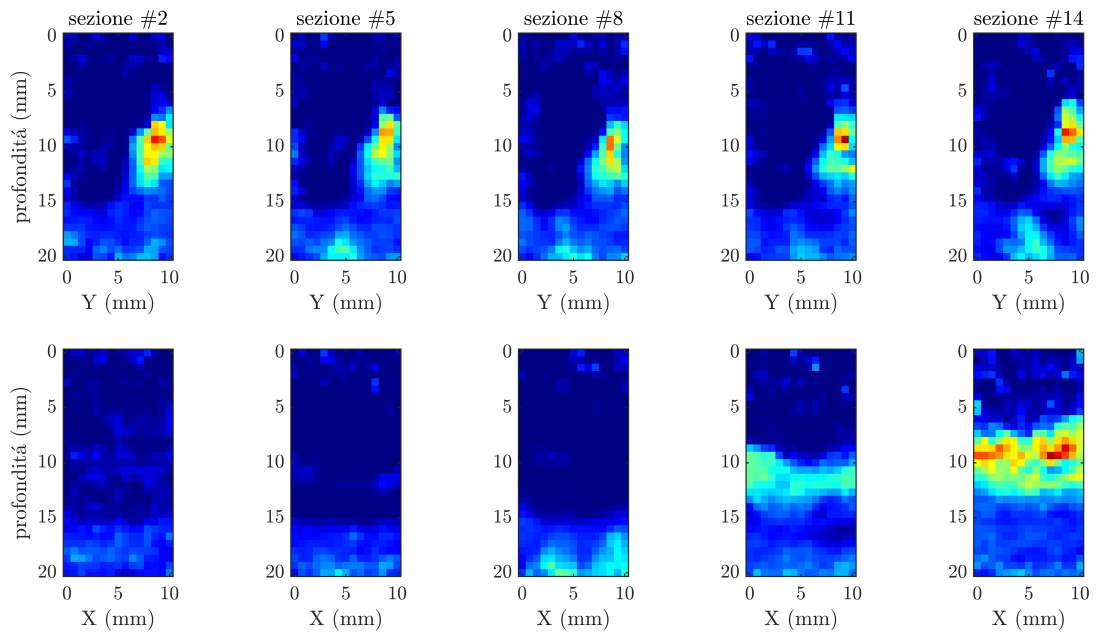
Capitolo 5

Risultati e Discussione

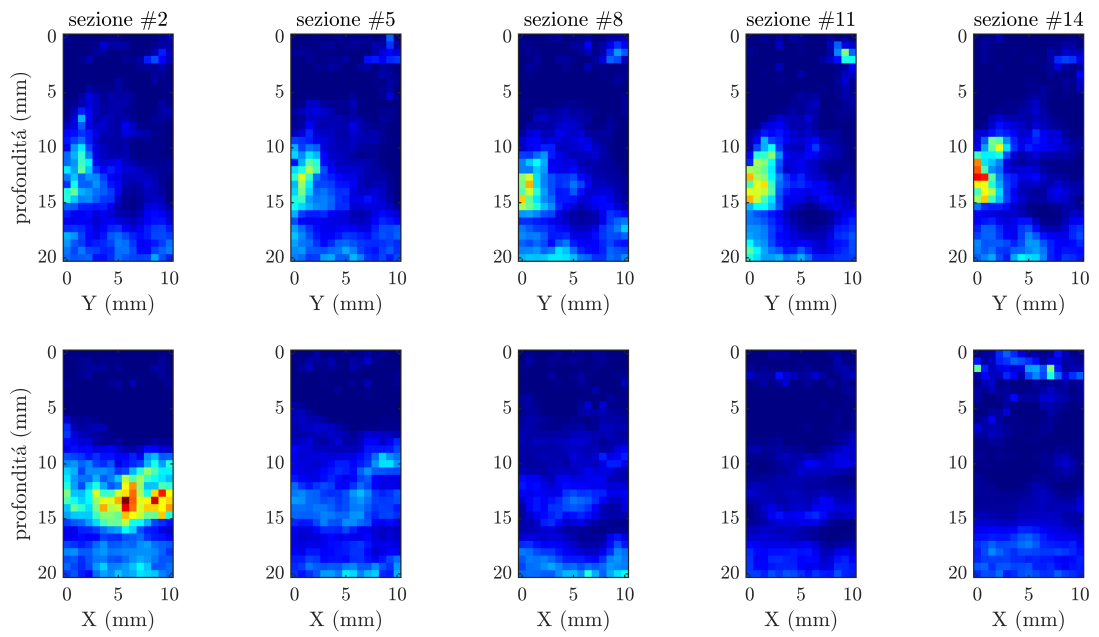
5.1 Estrazione delle mappe 3D di unità motoria

Escludendo le UM che non presentano un numero sufficiente di spari all'interno della finestra di acquisizione ecografica, è stato analizzato un totale di 227 UM, includendo tutti i soggetti e le acquisizioni effettuate su ciascuno.

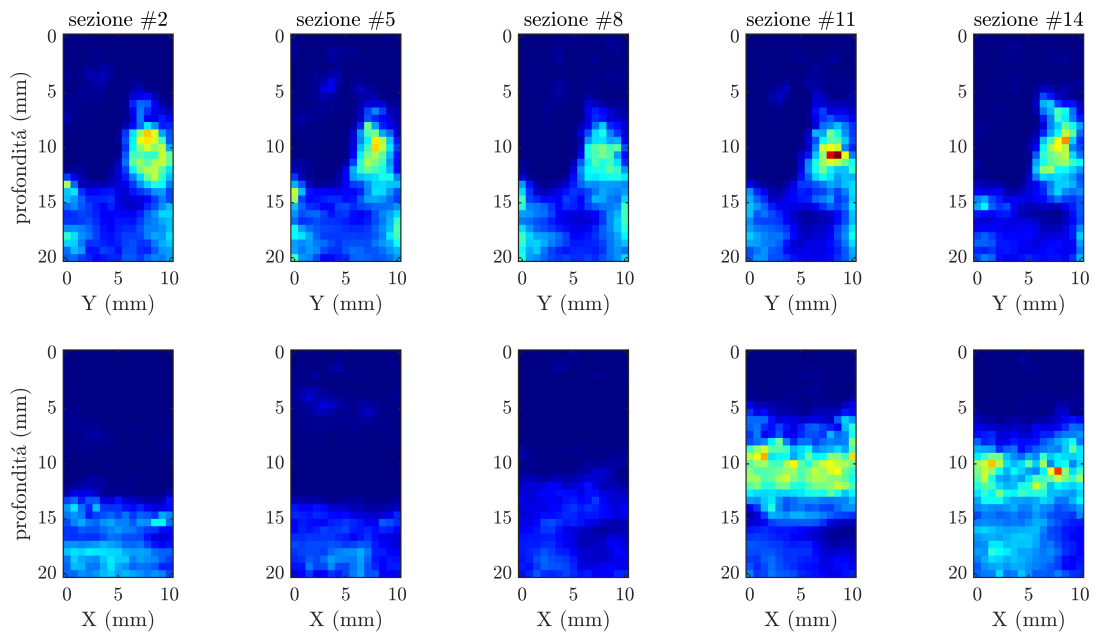
In figura 5.1 si mostrano, a titolo di esempio, le mappe di attivazione ottenute per cinque delle UM reclutate in un'acquisizione significativa effettuata sul terzo soggetto.



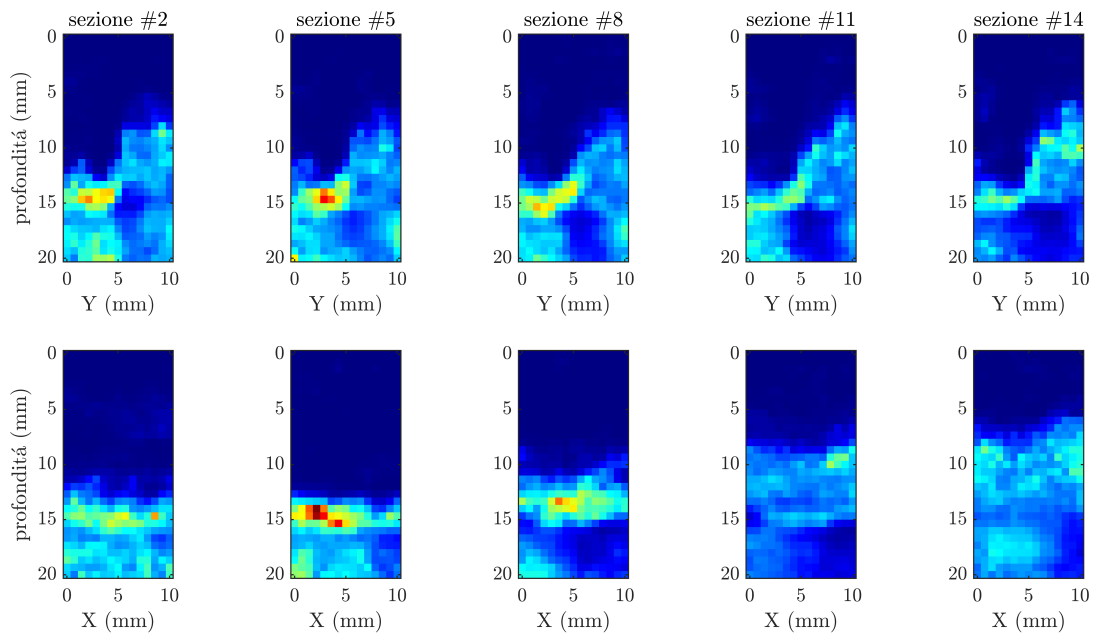
(a)



(b)



(c)



(d)

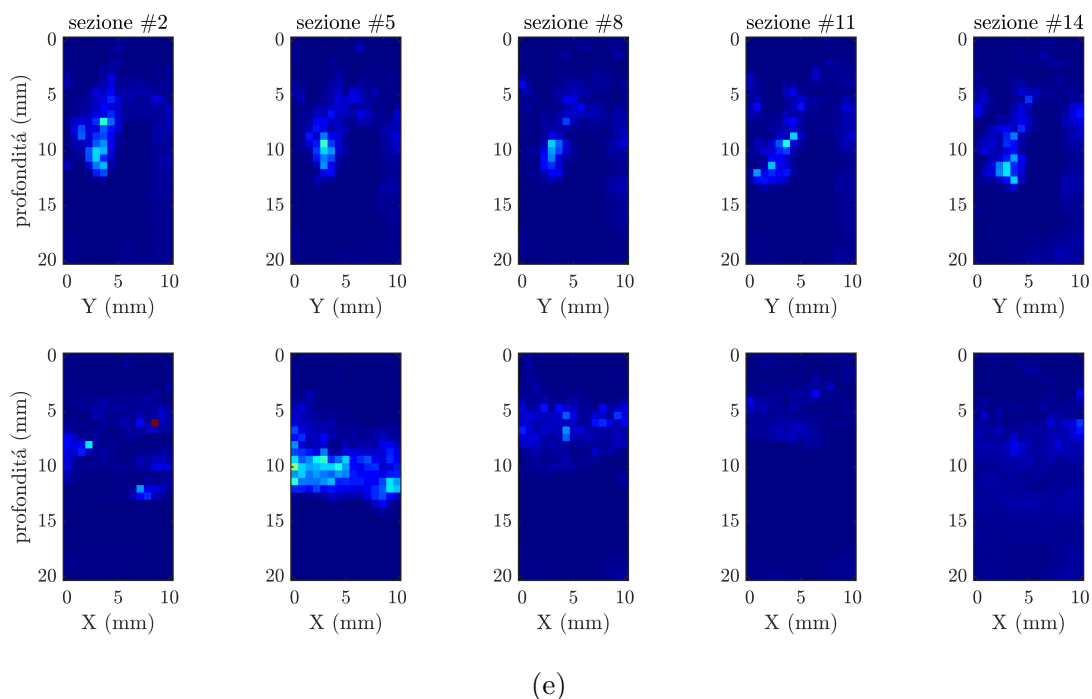


Figura 5.1: Mappe di attivazione di cinque UM reclutate in un'acquisizione significativa effettuata sul terzo soggetto (contrazione al 5% MVC, modalità di acquisizione a blocchi). "Y" rappresenta la direzione dorso-palmare, "X" quella distale - prossimale. Per ognuna UM sono mostrati cinque sezioni trasversali (riga superiore) e cinque sezioni parallele al muscolo (riga inferiore). Per le UM rappresentate in (a)- (d) sono chiaramente visibili i territori di forma circolare nelle sezioni trasversali e un'attivazione più lineare nei piani paralleli al muscolo. Queste ultime sono presenti solo nelle sezioni corrispondenti alla coordinata in direzione dorso-palmare (Y) in cui è localizzata l'UM. Nell'UM (e) non è invece possibile identificare questo tipo di attivazione.

Le mappe 3D ottenute dal metodo hanno evidenziato, in un ampio numero di casi, le caratteristiche morfologiche di strutture simil-cilindriche, coerenti con l'architettura fusiforme del muscolo. Queste si manifestano come territori circolari nelle sezioni trasversali (perpendicolari all'asse longitudinale del muscolo) e come regioni di attivazione lineare in alcune delle sezioni parallele al muscolo, in funzione della posizione specifica dell'UM lungo la direzione dorso-palmare. È il caso, ad esempio, delle UM in figura 5.1 (a)-(d) . L'estrazione di questo tipo di mappe conferma la corretta identificazione delle UM e supporta la validità del metodo per la loro ricostruzione tridimensionale.

Tuttavia, non tutte le mappe ottenute a partire da pattern di attivazione di UM

reclutate durante la contrazione hanno mostrato queste caratteristiche attese. In particolare, in un discreto numero di mappe, come nel caso dell'UM in figura 5.1 (e), non si rileva alcuna regione con una correlazione significativa del movimento tissutale. Questo potrebbe essere rappresentativo di UM la cui attivazione contribuisce al segnale HDsEMG, ma che si trovano al di fuori del volume di scansione US oppure, ancora, di limitazioni metodologico-strumentali nel rilevamento di alcune attivazioni. Per caratterizzare questo aspetto e distinguere un'attivazione significativa da una non significativa è stata analizzata la distribuzione dei valori massimi di correlazione ottenuti nelle 227 mappe (distribuzione blu in figura 5.2). Questa distribuzione è stata confrontata con una distribuzione analoga delle mappe generate applicando il medesimo algoritmo, ma a partire da pattern di attivazione fittizi, generati casualmente con frequenze e variabilità di sparo simili a quelle delle attivazioni reali. Poiché questi pattern di attivazione non corrispondono a nessuna UM fisicamente presente e attiva nel muscolo durante l'acquisizione, ci si aspetta che il metodo non identifichi alcuna regione con un movimento correlato a tali attivazioni. Ciò che ne risulta fornisce quindi una caratterizzazione delle mappe derivanti da rumore, artefatti o altri fattori non legati all'attività effettiva di fibre muscolari e che, come tali, devono essere escluse.

Come atteso, le mappe derivate da pattern di attivazione fittizi (distribuzione rossa in figura 5.2) presentano valori di correlazione molto bassi, con una distribuzione stretta e centrata su valori prossimi allo zero. D'altra parte, le mappe ottenute a partire da istanti di attivazione delle UM effettivamente reclutate mostrano una distribuzione più ampia, sebbene caratterizzata da un picco in corrispondenza di correlazioni basse. Questo picco è costituito dalle mappe 3D osservate che non evidenziano valori di correlazione significativi. Per evitare di includere nella trattazione successiva queste mappe, potenzialmente non rappresentative di alcuna attività di fibre muscolari, è stato scelto un criterio di esclusione basato sulla correlazione. In particolare, è stata scelta una soglia fissata a tre deviazioni standard sopra la media delle correlazioni delle mappe fittizie. Sulla base di questa soglia, sono state escluse le 124 UM che presentavano valori di correlazione inferiori alla soglia stabilita, mentre le restanti 103 UM, corrispondenti al 45%, sono state incluse nell'analisi.

Per valutare l'efficacia del criterio basato sulla correlazione per l'esclusione delle mappe non rappresentative, è stata effettuata un'analisi visiva delle mappe (risultati in tabella 5.1): delle 103 mappe mantenute, 43 (pari al 41%) rispecchiano le caratteristiche morfologiche attese (regioni di attivazione circolari nelle sezioni trasversali e lineari nelle sezioni ortogonali), mentre solo 22 su 124 delle mappe scartate presentano queste caratteristiche. Questo evidenzia due aspetti significativi: da un lato il criterio permette, basandosi solo sulla correlazione, senza incorporare alcuna informazione di forma, di escludere una buona quota di UM che non hanno le caratteristiche attese. Dall'altro lato, non esiste una correlazione diretta tra

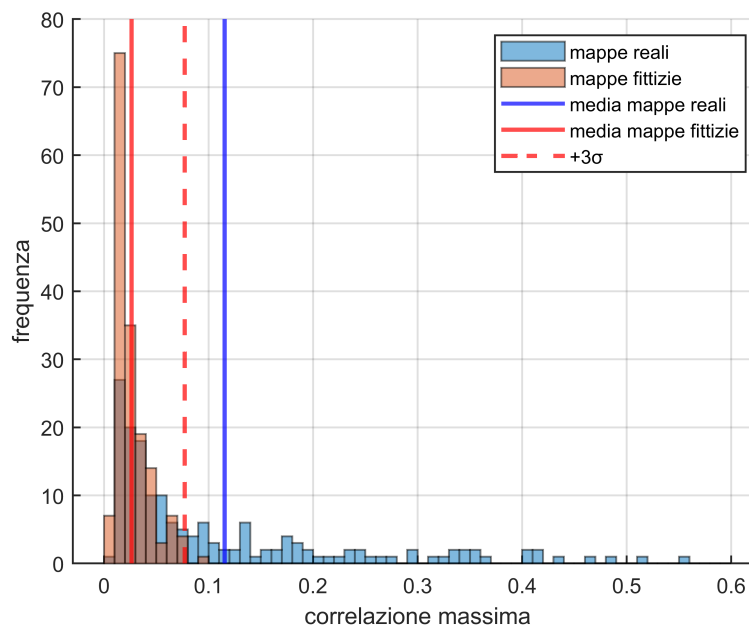


Figura 5.2: Distribuzione dei valori massimi delle mappe di correlazione. La distribuzione blu fa riferimento alle mappe reali (ottenute a partire da pattern di attivazione di UM reclutate durante la contrazione misurata); quella in rosso alle mappe fittizie (ottenute a partire da pattern di attivazione generati casualmente).

le mappe con valori di correlazione sopra la soglia e quelle che rappresentano effettivamente UM: non tutte le mappe escluse possono essere considerate prive di significato e non tutte quelle sopra soglia hanno le caratteristiche morfologiche di un'UM. Ciò sottolinea che la correlazione non è un indicatore univoco di validità per l'analisi delle UM e suggerisce che esistano artefatti che necessitano di un trattamento differente.

	# UM	UM verosimili
UM mappa < soglia	124	22
UM mappa > soglia	103	43
Totale UM	227	65

Tabella 5.1: Risultati dell'applicazione del criterio di correlazione per l'esclusione delle mappe di UM che non presentano regioni con correlazione significativa. La colonna "Verosimili UM" riporta il numero di mappe che, a seguito di un'ispezione visiva, mostrano caratteristiche morfologiche coerenti con quelle attese per le UM.

5.2 Caratterizzazione geometrica

Il valore medio dei territori identificati di UM nelle sezioni trasversali è pari a $1.87 \text{ mm}^2 \pm 2.31 \text{ mm}^2$, un dato che risulta in accordo con le dimensioni riportate nella letteratura scientifica. La notevole variabilità dei valori osservati può essere attribuita, oltre che alla variabilità fisiologica, al fatto che, come discusso (5.1), non tutte le 103 mappe utilizzate rappresentano territori di UM. Alcune mappe per esempio potrebbero includere regioni che non riflettono il movimento delle sole fibre muscolari, ma anche del tessuto passivo circostante, portando ad una sovrastima delle dimensioni medie. Inoltre, la scelta di un metodo di segmentazione a soglia influenza la dimensione dei territori identificati: soglie più alte tendono a ridurre le dimensioni delle aree individuate.

5.3 Confronto modalità di acquisizione

Per confrontare le due modalità di acquisizione testate (modalità a blocchi e modalità SRAC), è stata analizzata la distribuzione dei valori di contrasto nelle mappe ottenute in entrambi i casi (figura 5.3). Il contrasto è stato calcolato come

$$\text{contrasto} = \frac{\overline{\text{pixel oggetto}} - \overline{\text{pixel sfondo}}}{\sigma(\text{pixel sfondo})} \quad (5.1)$$

Il test di Mann-Whitney ha fornito un p-value di 0.16, suggerendo che non ci sia differenza statisticamente significativa tra le distribuzioni di contrasto ottenute con le due modalità di acquisizione.

5.4 Validazione metodo

5.4.1 Risultati tracciamento longitudinale

È stata valutata la tracciabilità longitudinale di 37 UM, ovvero l'insieme delle UM identificate nella sessione di riferimento per ognuno dei 5 soggetti. Di queste UM, 30 (ovvero l'83%) sono state identificate in almeno un'altra sessione, 28 (78%) in almeno due sessioni, 17 (47%) in almeno quattro sessioni e infine solo 5 (15%) UM sono state identificate in tutte le sessioni eseguite sullo stesso soggetto (tabella 5.2). Un sottoinsieme di queste UM tracciate (tramite HDsEMG) presentano una mappa 3D di attivazione sopra soglia e sono dunque incluse nella validazione del metodo; i relativi numeri sono riportati in tabella.

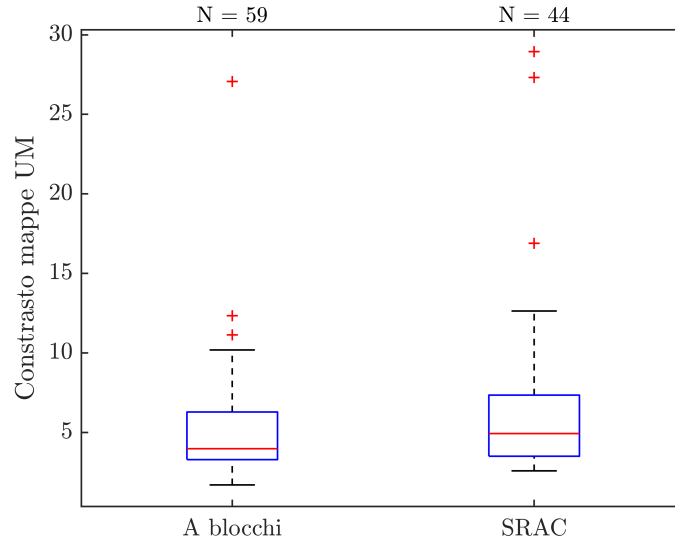


Figura 5.3: Confronto del contrasto delle mappe di UM tra le due modalità di acquisizione.

# UM tracciate	2 sessione	3 sessioni	5 sessioni	tutte le sessioni
HDsEMG	30	28	17	5
US	16	10	6	0

Tabella 5.2: Risultati del tracciamento longitudinale delle UM. Le colonne rappresentano il numero di UM che sono state osservate in N sessioni differenti sul soggetto. La prima riga comprende tutte le UM tracciate a partire dai dati HDsEMG; la seconda il sottoinsieme di queste UM tracciate che presenta mappa di attivazione, ricavata dai dati US, con valore di correlazione sopra soglia.

5.4.2 Risultati metriche

I risultati ottenuti dall'analisi della distanza euclidea e della dispersione dei centroidi delle UM tracciate longitudinalmente, rispetto a UM casuali, permettono di valutare l'affidabilità del metodo. Nella figura 5.4 sono visualizzati i centroidi della stessa UM nelle diverse sessioni in cui è osservata; questi mostrano una chiara coerenza spaziale.

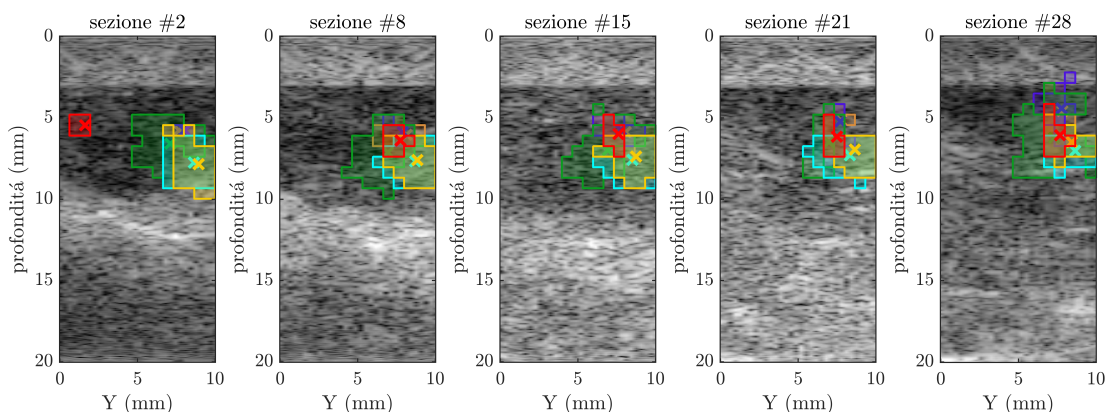
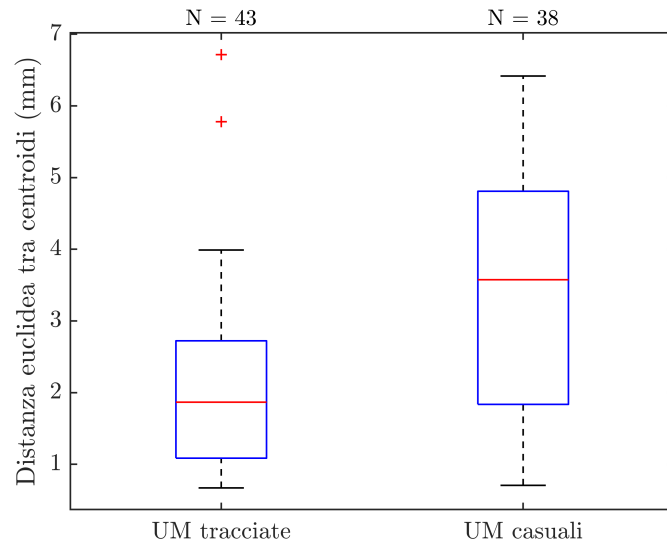


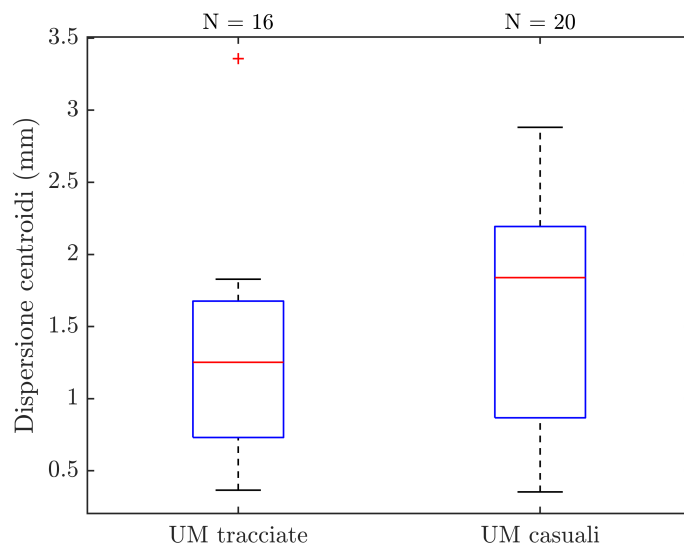
Figura 5.4: Nella figura sono mostrati, in colori diversi, i territori e i centroidi della stessa UM, in tutte le sessioni in cui è osservata.

I boxplot in figura 5.5a e 5.5b mostrano le distribuzioni dei valori delle due metriche nell'insieme delle UM tracciate rispetto ad UM associate casualmente. Per quanto riguarda le distanze euclidee, il test Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test), ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra le due distribuzioni ($p\text{-value}=0.00176$), suggerendo che le UM tracciate presentino effettivamente distanze inferiori rispetto a quelle associate casualmente. Per le dispersioni, invece, nonostante le mediane risultino inferiori nel caso delle UM tracciate, la differenza non è risultata statisticamente significativa ($p\text{-value} = 0.13$).

Il fatto che le dispersioni non risultino significativamente inferiori per le UM tracciate e che le distanze mostrino distribuzioni non completamente separate nei due casi è riconducibile a diversi fattori. Da un lato questi valori sono sensibili a movimenti, anche millimetrici, dalla mano rispetto alla sonda tra una sessione e l'altra. Dall'altro sia la sovrapposizione spaziale fisiologica di UM differenti che il fatto che il campo visivo della sonda abbia un'area limitata rispetto all'area delle UM stimate fanno sì che queste distanze, anche per UM diverse, possano essere comunque ridotte. Nonostante queste limitazioni il fatto che le distanze risultino significativamente inferiori nel caso di UM tracciate suggerisce l'effettiva validità del metodo nel riuscire a localizzare un'UM nello spazio in modo coerente.



(a)



(b)

Figura 5.5: (a) Distribuzione delle distanze euclidee tra i centroidi di una UM nelle sessioni in cui è tracciata rispetto ad UM casuali. (b) Distribuzione della dispersione tra i centroidi nei due insiemi (tracciamento rispetto ad associazioni causali).

Capitolo 6

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato proposto un metodo basato sull'ultrasonografia 3D ad elevato frame rate per l'identificazione delle porzioni di volume muscolare contenenti le fibre delle singole unità motorie. La metodologia sviluppata combina dati volumetrici acquisiti tramite sonda ecografica 2D con i segnali elettromiografici ad alta densità. Il metodo è stato testato su dati sperimentali acquisiti da cinque soggetti sani durante contrazioni isometriche volontarie a basso livello di forza.

L'analisi si è concentrata sulla ricostruzione del volume 3D delle UM e sulla caratterizzazione geometrica delle regioni segmentate nelle sezioni trasversali. I risultati indicano che una discreta percentuale delle UM decomposte dai segnali HDsEMG possono essere identificate con successo nei volumi ecografici, mostrando volumi coerenti con la loro morfologia attesa. Ciò suggerisce la validità del metodo proposto per una mappatura 3D non invasiva dell'attività delle UM. Diverse UM, tuttavia, non sono state localizzate correttamente, fatto che può essere in parte ricondotto alla non perfetta corrispondenza tra il campo visivo HDsEMG e quello, limitato, della sonda US. Inoltre, questo e altri artefatti osservati nei dati potrebbero riflettere limiti metodologici e strumentali nell'identificazione delle attivazioni, che richiedono ulteriori approfondimenti.

È stata inoltre valutata la coerenza nella localizzazione delle UM tra diverse sessioni sperimentali eseguite sullo stesso soggetto, dimostrando che il metodo tende a localizzare le stesse UM nella stessa regione del volume muscolare, con distanze significativamente inferiori rispetto a quelle che si otterrebbero per associazioni casuali.

Seppure non qui investigate, le potenzialità del metodo vanno oltre la semplice localizzazione spaziale 3D, offrendo la possibilità per studiare anche la dinamica temporale della propagazione del twitch lungo le fibre muscolari. Un possibile sviluppo potrebbe essere quello di decodificare le sequenze di attivazione direttamente dai dati ecografici. Questo porterebbe a superare la limitazione dell'attuale metodo che, basandosi sugli istanti ricavati dall'HDsEMG, è limitato all'analisi

delle UM superficiali, sfruttando quindi solo parzialmente il potenziale dell'ecografia in profondità. In questo modo si aprirebbe inoltre la strada a una metodologia indipendente, interamente basata sull'ecografia, che possa poi essere validata con il confronto con la tecnica di riferimento, che è quella elettromiografica. Una possibilità interessante è anche l'uso di matrici di elettrodi trasparenti agli ultrasuoni, che possano permettere una migliore sovrapposizione tra i campi visivi delle due tecniche.

Una sfida per l'applicabilità del metodo rimane la grande mole di dati da elaborare, trattandosi di una tecnica sia volumetrica che ad alta frequenza. È quindi necessario ricorrere a tecniche di *parallel computing* e sfruttare le capacità di elaborazione delle moderne GPU.

Nonostante le limitazioni, questo lavoro costituisce un significativo punto di partenza nell'imaging volumetrico della risposta meccanica delle fibre di una UM in contrazioni volontarie, che apre la strada a future ricerche in campo neuromeccanico. Il metodo proposto ha la potenzialità di diventare uno strumento non invasivo per la localizzazione completa (3D) del fascio di fibre in contrazione, con possibili applicazioni in riabilitazione, diagnosi di patologie neuromuscolari e controllo protesico.

Bibliografia

- [1] C. J. Heckman e Roger M. Enoka. «Motor unit». In: *Comprehensive Physiology* 2 (4 2012), pp. 2629–2682. ISSN: 20404603. DOI: 10.1002/cphy.c100087 (cit. alle pp. 1, 9, 10).
- [2] John V. Basmajian e Carlo J. de Luca. *Muscle Alive*. 1985 (cit. alle pp. 1, 9, 10, 12).
- [3] Hande Türker e Hasan Sözen. «Surface Electromyography in Sports and Exercise». In: *Electrodiagnosis in New Frontiers of Clinical Research*. A cura di Hande Turker. Rijeka: IntechOpen, 2013. Cap. 9. DOI: 10.5772/56167. URL: <https://doi.org/10.5772/56167> (cit. a p. 1).
- [4] Roberto Merletti, Matteo Avenaggiato, Alberto Botter, Ales Holobar, Hamid Marateb e Taian M.M. Vieira. *Advances in surface EMG: Recent progress in detection and processing techniques*. 2010. DOI: 10.1615/CritRevBiomedEng.v38.i4.10 (cit. a p. 1).
- [5] Jasper R. Daube e Devon I. Rubin. *Needle electromyography*. 2009. DOI: 10.1002/mus.21180 (cit. a p. 1).
- [6] Dario Farina e Ales Holobar. *Characterization of Human Motor Units from Surface EMG Decomposition*. 2016. DOI: 10.1109/JPROC.2015.2498665 (cit. a p. 1).
- [7] Roberto Merletti, Aleš Holobar e Dario Farina. *Analysis of motor units with high-density surface electromyography*. 2008. DOI: 10.1016/j.jelekin.2008.09.002 (cit. alle pp. 1, 13).
- [8] E. Martinez-Valdes, C. M. Laine, D. Falla, F. Mayer e D. Farina. «High-density surface electromyography provides reliable estimates of motor unit behavior». In: *Clinical Neurophysiology* 127 (6 2016). ISSN: 18728952. DOI: 10.1016/j.clinph.2015.10.065 (cit. a p. 1).
- [9] Juerd Wijntjes e Nens van Alfen. *Muscle ultrasound: Present state and future opportunities*. 2021. DOI: 10.1002/mus.27081 (cit. a p. 1).

-
- [10] Marco Carbonaro, Olivier Seynnes, Nicola A. Maffiuletti, Chiara Busso, Marco A. Minetto e Alberto Botter. «Architectural changes in superficial and deep compartments of the tibialis anterior during electrical stimulation over different sites». In: *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering* 28 (11 2020). ISSN: 15580210. DOI: 10.1109/TNSRE.2020.3027037 (cit. a p. 1).
- [11] A. Botter, T. M.M. Vieira, I. D. Loram, R. Merletti e E. F. Hodson-Tole. «A novel system of electrodes transparent to ultrasound for simultaneous detection of myoelectric activity and B-mode ultrasound images of skeletal muscles». In: *Journal of Applied Physiology* 115 (8 2013). ISSN: 87507587. DOI: 10.1152/jappphysiol.00090.2013 (cit. a p. 1).
- [12] Andrew J. Tweedell, Matthew S. Tenan e Courtney A. Haynes. «Differences in muscle contraction onset as determined by ultrasound and electromyography». In: *Muscle and Nerve* 59 (4 2019). ISSN: 10974598. DOI: 10.1002/mus.26395 (cit. a p. 1).
- [13] Christer Grönlund, Kenji Claesson e Andreas Holtermann. «Imaging Two-Dimensional mechanical waves of skeletal muscle contraction». In: *Ultrasound in Medicine and Biology* 39 (2 2013). ISSN: 1879291X. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.09.005 (cit. a p. 2).
- [14] R Waasdorp, W Mugge, HJ Vos, JH de Groot, N de Jong, MD Verweij, AC Schouten e V Daeichin. «Tracking electromechanical muscle dynamics using ultrafast ultrasound and high-density EMG». In: *2019 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS)*. 2019, pp. 2137–2140. DOI: 10.1109/ULTSYM.2019.8925557 (cit. a p. 2).
- [15] Rick Waasdorp, Winfred Mugge, Hendrik J. Vos, Jurriaan H. De Groot, Martin D. Verweij, Nico De Jong, Alfred C. Schouten e Varya Daeichin. «Combining Ultrafast Ultrasound and High-Density EMG to Assess Local Electromechanical Muscle Dynamics: A Feasibility Study». In: *IEEE Access* 9 (2021). ISSN: 21693536. DOI: 10.1109/ACCESS.2021.3067162 (cit. a p. 2).
- [16] Robin Rohlén, Erik Stålberg e Christer Grönlund. «Identification of single motor units in skeletal muscle under low force isometric voluntary contractions using ultrafast ultrasound». In: *Scientific Reports* 10 (1 2020). ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/s41598-020-79863-1 (cit. a p. 2).
- [17] Robin Rohlen, Erik Stalberg, Karen Helene Stoverud, Jun Yu e Christer Gronlund. «A Method for Identification of Mechanical Response of Motor Units in Skeletal Muscle Voluntary Contractions Using Ultrafast Ultrasound Imaging - Simulations and Experimental Tests». In: *IEEE Access* 8 (2020). ISSN: 21693536. DOI: 10.1109/ACCESS.2020.2980053 (cit. a p. 2).

- [18] Hazrat Ali, Johannes Umander, Robin Rohlén e Christer Grönlund. «A deep learning pipeline for identification of motor units in musculoskeletal ultrasound». In: *IEEE Access* 8 (2020). ISSN: 21693536. DOI: 10.1109/ACCESS.2020.3023495 (cit. a p. 2).
- [19] Marco Carbonaro, Kristen M. Meiburger, Silvia Seoni, Emma F. Hodson-Tole, Taian Vieira e Alberto Botter. «Physical and electrophysiological motor unit characteristics are revealed with simultaneous high-density electromyography and ultrafast ultrasound imaging». In: *Scientific Reports* 12 (1 2022). ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/s41598-022-12999-4 (cit. a p. 2).
- [20] Emma Lubel, Bruno Grandi Sgambato, Deren Y. Barsakcioglu, Jaime Ibáñez, Meng Xing Tang e Dario Farina. «Kinematics of individual muscle units in natural contractions measured in vivo using ultrafast ultrasound». In: *Journal of Neural Engineering* 19 (5 ott. 2022). ISSN: 17412552. DOI: 10.1088/1741-2552/ac8c6c (cit. alle pp. 2, 3).
- [21] Rohlén R, Carbonaro M, Meiburger KM, Cerone GL, Botter A e Grönlund C. «Spatially repeatable components from ultrafast ultrasound are associated with motor unit activity in human isometric contractions». In: *Journal of Neural Engineering* 20 (lug. 2023) (cit. a p. 2).
- [22] Robin Rohlén, Emma Lubel, Bruno Grandi Sgambato, Christian Antfolk e Dario Farina. «Spatial decomposition of ultrafast ultrasound images to identify motor unit activity – A comparative study with intramuscular and surface EMG». In: *Journal of Electromyography and Kinesiology* 73 (dic. 2023), p. 102825. ISSN: 10506411. DOI: 10.1016/j.jelekin.2023.102825 (cit. a p. 2).
- [23] Peter P. Purslow. «Muscle fascia and force transmission». In: *Journal of Bodywork and Movement Therapies* 14.4 (2010), pp. 411–417. ISSN: 1360-8592. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2010.01.005>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360859210000069> (cit. a p. 2).
- [24] Thomas Deffieux, Jean Luc Gennisson, Mickaël Tanter e Mathias Fink. «Assessment of the mechanical properties of the musculoskeletal system using 2-D and 3-D very high frame rate ultrasound». In: *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 55 (10 2008). ISSN: 08853010. DOI: 10.1109/TUFFC.917 (cit. alle pp. 2, 9).
- [25] Gerard Tortora. *Principles of Anatomy and Physiology 12th ed - G. Tortora*. Vol. 53. 2009 (cit. alle pp. 5–12).

- [26] Roberto Merletti e Dario Farina. «Physiology of Muscle Activation and Force Generation». In: *Surface Electromyography: Physiology, Engineering, and Applications*. 2016, pp. 1–29. DOI: 10.1002/9781119082934.ch01 (cit. alle pp. 6, 9–11, 13).
- [27] Taian M.M. Vieira, Ian D. Loram, Silvia Muceli, Roberto Merletti e Dario Farina. «Postural activation of the human medial gastrocnemius muscle: Are the muscle units spatially localised?» In: *Journal of Physiology* 589 (2 2011). ISSN: 14697793. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.201806 (cit. a p. 10).
- [28] Elwood Henneman. «Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge». In: *Science* 126 (3287 1957). ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.126.3287.1345 (cit. a p. 11).
- [29] Andrew J. Fuglevand, David A. Winter, Aftab E. Patla e Daniel Stashuk. «Detection of motor unit action potentials with surface electrodes: influence of electrode size and spacing». In: *Biological Cybernetics* 67 (2 1992). ISSN: 03401200. DOI: 10.1007/BF00201021 (cit. a p. 13).
- [30] Matthew G. Birkbeck, Linda Heskamp, Ian S. Schofield, Andrew M. Blamire e Roger G. Whittaker. «Non-invasive imaging of single human motor units». In: *Clinical Neurophysiology* 131 (6 2020). ISSN: 18728952. DOI: 10.1016/j.clinph.2020.02.004 (cit. a p. 14).
- [31] Linda Heskamp, Matthew G. Birkbeck, Roger G. Whittaker, Ian S. Schofield e Andrew M. Blamire. «The muscle twitch profile assessed with motor unit magnetic resonance imaging». In: *NMR in Biomedicine* 34 (3 2021). ISSN: 10991492. DOI: 10.1002/nbm.4466 (cit. a p. 14).
- [32] Thomas L. Szabo. *Diagnostic Ultrasound Imaging: Inside Out*. 2004. DOI: 10.1055/s-2005-861725 (cit. a p. 14).
- [33] Babak Mohammadzadeh Asl e Roya Paridar. *Beamforming in Medical Ultrasound Imaging*. Springer Nature Singapore, 2024. ISBN: 978-981-99-7527-3. DOI: 10.1007/978-981-99-7528-0 (cit. alle pp. 14, 16).
- [34] J. Souquet e J. Bercoff. «Ultrafast Ultrasound Imaging». In: *Ultrasound in Medicine Biology* 37.8, Supplement (2011), S17. ISSN: 0301-5629. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2011.05.098 (cit. a p. 15).
- [35] Vincent Perrot, Maxime Polichetti, François Varray e Damien Garcia. «So you think you can DAS? A viewpoint on delay-and-sum beamforming». In: *Ultrasonics* 111 (2021). ISSN: 0041624X. DOI: 10.1016/j.ultras.2020.106309 (cit. a p. 17).

- [36] Frida Lindberg, Mattias Mårtensson, Christer Grönlund e Lars Åke Brodin. «Evaluation of ultrasound Tissue Velocity Imaging: A phantom study of velocity estimation in skeletal muscle low-level contractions». In: *BMC Medical Imaging* 13 (1 2013). ISSN: 14712342. DOI: 10.1186/1471-2342-13-16 (cit. a p. 19).
- [37] Thanasis Loupas, Robert W. Gill e J. T. Powers. «An Axial Velocity Estimator for Ultrasound Blood Flow Imaging, Based on a Full Evaluation of the Doppler Equation by Means of a Two-Dimensional Autocorrelation Approach». In: *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 42 (4 1995). ISSN: 08853010. DOI: 10.1109/58.393110 (cit. alle pp. 19, 33).
- [38] A. Del Vecchio, A. Holobar, D. Falla, F. Felici, R. M. Enoka e D. Farina. «Tutorial: Analysis of motor unit discharge characteristics from high-density surface EMG signals». In: *Journal of Electromyography and Kinesiology* 53 (2020). ISSN: 18735711. DOI: 10.1016/j.jelekin.2020.102426 (cit. a p. 24).
- [39] Giacinto Luigi Cerone e Marco Gazzoni. «A wireless, minaturized multi-channel sEMG acquisition system for use in dynamic tasks». In: *2017 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference, BioCAS 2017 - Proceedings*. Vol. 2018-January. 2017. DOI: 10.1109/BIOCAS.2017.8325129 (cit. a p. 24).
- [40] Giacinto Luigi Cerone, Alberto Botter e Marco Gazzoni. «A modular, smart, and wearable system for high density sEMG detection». In: *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 66 (22 2019). ISSN: 15582531. DOI: 10.1109/TBME.2019.2904398 (cit. a p. 24).
- [41] Miguel Bernal, Bryan Cunitz, Daniel Rohrbach e Ron Daigle. «High-frame-rate volume imaging using sparse-random-aperture compounding». In: *Physics in Medicine and Biology* 65 (17 2020). ISSN: 13616560. DOI: 10.1088/1361-6560/ab9372 (cit. a p. 28).
- [42] Aleš Holobar e Damjan Zazula. «Multichannel blind source separation using convolution Kernel compensation». In: *IEEE Transactions on Signal Processing* 55 (9 2007). ISSN: 1053587X. DOI: 10.1109/TSP.2007.896108 (cit. a p. 33).
- [43] Dario Farina, Francesco Negro, Marco Gazzoni e Roger M. Enoka. «Detecting the unique representation of motor-unit action potentials in the surface electromyogram». In: *Journal of Neurophysiology* 100 (3 2008). ISSN: 00223077. DOI: 10.1152/jn.90219.2008 (cit. a p. 38).
- [44] E. Martinez-Valdes, F. Negro, C. M. Laine, D. Falla, F. Mayer e D. Farina. «Tracking motor units longitudinally across experimental sessions with high-density surface electromyography». In: *Journal of Physiology* 595 (5 mar. 2017), pp. 1479–1496. ISSN: 14697793. DOI: 10.1113/JP273662 (cit. a p. 39).