
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Corelații între diagnosticul ecografic prenatal, necropsia anatomopatologică și testele imagistice postnatale în malformațiile cardiace

Doctorand **Camelia Curta (Albu)**

Conducător de doctorat Acad.Prof.dr. **Florin Stamatian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Bazele embriologice și genetica dezvoltării inimii	19
1.1. Embriologia inimii	19
1.2. Mecanismele genetice ale dezvoltării inimii	19
1.3. Genetica malformațiilor cardiace	20
2. Malformațiile cardiace congenitale	21
2.1. Incidență și evoluție	21
2.2. Prevalența malformațiilor cardiace congenitale în funcție de tipul malformativ	22
2.3. Importanța clinică și impactul socio-economic	22
3. Diagnosticul malformațiilor cardiace congenitale „in vivo”	24
3.1. Ecocardiografia fetală	24
3.1.1. Diagnosticul ecografic al malformațiilor cardiace fetale în primul trimestru de sarcină	25
3.1.2. Diagnosticul ecografic al malformațiilor cardiace fetale în al doilea trimestru de sarcină	26
3.2. Examinarea cordului fetal prin rezonanță magnetică in vivo, evoluție și perspective	27
4. Examinarea cordului fetal și diagnosticul malformațiilor cardiace post-mortem	28
4.1. Autopsia fetală și particularitățile examinării cordului fetal	28
4.1.1. Importanța autopsiei fetale	28
4.1.2. Particularitățile examinării anatomopatologice a fătului	29
4.1.3. Examinarea anatomopatologică a cordului fetal	30
4.2. Examinarea prin rezonanță magnetică post mortem	32
4.2.1. Evoluție și perspective	32
4.2.2. Examinarea cordului fetal prin RMN post mortem	33
5. Abordarea multidisciplinară a malformațiilor cardiace	36
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	41
2. Metodologie generală	43
2.1. Descrierea studiilor	43
2.2. Analiza statistică	43

3. Studiul 1 - Evaluarea metodei de disecție cardiacă pe secțiuni de patru camere ca alternativă la disecția convențională la feții cu vârstă gestațională mică	45
3.1. Introducere	45
3.2. Obiective	46
3.3. Material și metodă	46
3.3.1. Considerații generale	46
3.3.2. Examinarea RMN postmortem	47
3.3.3. Analiza imaginilor	47
3.3.4. Examenul anatomopatologic	48
3.3.5. Analiza statistică	51
3.4. Rezultate	53
3.4.1. Valoarea diagnostică a metodei de examinare pe secțiuni de patru camere pentru identificarea structurilor cardiace anatomice de interes în comparație cu RMN post mortem la 7T	53
3.4.2. Valoarea diagnostică a metodei de examinare pe secțiuni de patru camere în determinarea statusului malformativ al structurilor cardiace fetale în comparație cu RMN post mortem la 7T	56
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	62
4. Studiul 2 - Evaluarea tehnicii de disecție a cordului fetal pe secțiuni de patru camere în primul trimestru de sarcină	63
4.1. Introducere	63
4.2. Obiective	64
4.3. Material și metodă	64
4.3.1. Examinarea RMN post mortem	64
4.3.2. Examinarea anatomopatologică a cordului fetal	65
4.3.3. Analiza statistică	67
4.4. Rezultate	67
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	75
5. Studiul 3 - Evaluarea RMN post mortem de câmp înalt la 7T comparativ cu autopsia convențională: un studiu morfometric	77
5.1. Introducere	77
5.2. Obiective	78
5.3. Material și metodă	78
5.4. Rezultate	79

5.5. Discuții	82
5.6. Concluzii	84
6. Studiul 4 - Metodă alternativă de evaluare a creierului la feți de trimestru doi cu malformații cardiace și malformații ale sistemului nervos central	85
6.1. Introducere	85
6.2. Obiective	86
6.3. Material și metodă	86
6.3.1. Considerații generale	86
6.3.2. Achiziția RMN post mortem	87
6.3.3. Examinarea anatomopatologică	87
6.3.4. Măsurătorile lobului temporal	88
6.3.5. Măsurătorile straturilor corticale cerebrale	89
6.3.6. Analiza statistică	91
6.4. Rezultate	91
6.5. Discuții	99
6.6. Concluzii	101
7. Discuții generale	103
8. Concluzii generale	107
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111
ANEXE	125

Cuvinte cheie: Imagistica prin rezonanță magnetică; Microscopie; Macroscopie; Malformații cardiace; Imagistică fetală post mortem; Patologie fetală; Imagistica prin rezonanță magnetică cu câmp înalt;

INTRODUCERE

Metodele de diagnostic prenatal sunt în continuă dezvoltare. În prezent, în mâinile unui examinator experimentat, ultrasonografia poate diagnostica anomalii cardiace complexe încă de la vârste gestaționale mici, acest lucru permițând evaluarea complexă a cazului și orientarea conduitei terapeutice (4).

Adesea, anatomopatologul este pus în fața unui cord de dimensiuni reduse, friabil, cu anomalii structurale uneori foarte complexe (6). În aceste cazuri, examinarea standard a cordului este o provocare majoră.

Imagistica post mortem, în special examinarea prin RMN post-mortem, a cunoscut o dezvoltare accelerată în ultimul deceniu (7,8). Astfel examinarea cordului

fetal la vârste gestaționale mici sau chiar la embrioni a devenit posibilă, uneori cu rezultate superioare examinării anatomopatologice, de exemplu în cazul embrionilor (11,12).

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Evaluarea pacienților cu malformații cardiace complexe necesită o bază solidă de cunoștințe pentru identificarea defectelor structurale. Examinările ultrasonografice prenatale joacă un rol esențial în diagnosticul precoce al bolilor cardiace congenitale și deciziile terapeutice ulterioare (42).

Examinarea anatomopatologică și în unele cazuri imagistica post mortem, oferă o imagine de ansamblu a profilului malformativ, completând diagnosticul prenatal și orientând sfatul genetic și managementul sarcinilor viitoare (9).

În ultimul deceniu s-a conturat tot mai mult importanța evaluării fetale prin imagistică post mortem. Rolul acesteia se dorește a fi atât diagnostic cat și didactic (7).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Evaluarea metodei de disecție cardiacă pe secțiuni de patru camere ca alternativă la disecția convențională la feții cu vârstă gestațională mică

Comparativ cu examinarea convențională, metoda de disecție a cordului pe secțiuni de patru camere (4CCD) poate fi efectuată de orice anatomopatolog, folosind instrumente disponibile în mod uzual în serviciile de anatomie patologică.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua eficiența metodei 4CCD în examinarea inimilor fetale mici folosind imagistica prin rezonanță magnetică post mortem la 7T ca standard.

Metodă. Doisprezece feți cu vârsta gestațională între 13 și 19 săptămâni au fost incluși în acest studiu. Toți feții au fost supuși examenului RMN post mortem la 7T înainte de examinarea patologică. Metoda 4CCD a fost utilizată pentru examinarea cardiacă în toate cazurile, urmând aceleași orientări pentru secționarea cardiacă.

Rezultate. Metoda 4CCD a reușit să identifice toate structurile anatomice cardiace în comparație cu examinarea RMN post mortem, demonstrând o sensibilitate de 95,8% [95% CI, 94,5-95,8] și specificitate de 100% [95% CI, 32,3-100]. Precizia generală în identificarea structurilor anatomice cardiace a fost de 95,8% [95% CI, 93,4-95,8]. De asemenea, metoda 4CCD a fost capabilă să detecteze anomalii cardiace cu o precizie generală diagnostică de 91% [95% CI, 85,8-94,2], sensibilitate de 67,6% [95% CI, 54,5-75,3] și specificitate de 97% [95% CI, 93,7-99].

Concluzii. Comparativ cu RMN-ul post-mortem, metoda 4CCD de evaluare a inimii fetale a arătat o eficiență foarte bună în identificarea tuturor structurilor

anatomice vizate. Rezultate mai rezervate au fost obținute pentru evaluarea statusului malformativ, deși cele mai multe discrepanțe au fost legate de aprecierea subiectivă a diametrelor.

Studiul 2. Evaluarea tehnicii de disecție a cordului fetal pe secțiuni de patru camere în primul trimestru de sarcină

Examinarea cordului la embrioni și fetii de prim trimestru rămâne o provocare pentru anatomopatologi (88).

Scopul principal al studiului a fost de a identifica și standardiza o metodă de examinare anatomopatologică a cordului la fetii de prim trimestru, începând cu vârsta gestațională de 9 săptămâni, care să poată fi implementată în orice serviciu de anatomie patologică generală.

Al doilea scop a fost de a evalua capacitatea metodei de a vizualiza structurile anatomice cardiace în comparație cu examinarea RMN post mortem de înaltă rezoluție, la 7T.

Metodă. În acest studiu, au fost incluși zece feți cu vârsta gestațională cuprinsă între 9 și 13 săptămâni de amenoree. Toate cazurile incluse în studiu au fost fixate în soluție de formaldehidă 10% înainte de examinarea RMN post-mortem, pentru a preveni supraîncalzirea țesuturilor, datorită timpului lung necesar pentru scanare. Examinarea cordului fetal la feții incluși în studiu a s-a făcut prin examinare microscopică a secțiunilor de patru camere succesive, obținute prin efectuarea de secțiuni transversale la nivelul toracelui (4CCD-ST).

Rezultate. Acuratețea generală a examinării prin 4CCD-ST comparativ cu RMN post mortem pe toți parametrii examinați a fost de 80% (95% CI 73.4 – 85.4), cu Se de 82.9% (95% CI 79 – 86.1) și Sp de 65.2% (95% CI 45.2 – 81.6). VPP a fost de 92.4% (95% CI 88 – 96), iar VPN de 42.9% (95% CI 29.7 – 53.6). Kappa (Cohen) a fost de 0.4 indicând o corespondență generală moderată între cele două metode.

Concluzii. Examinarea cordului la fetii de trimestru unu prin 4CCD-ST, este o tehnică, fiabilă și reproductibilă, indicată în situațiile în care autopsia clasică nu este posibilă, ea putând identifica cu succes majoritatea structurilor anatomice cardiace aspectul acestora și raportul dintre ele.

Studiul 3. Evaluarea RMN post mortem de câmp înalt la 7T comparativ cu autopsia convențională: un studiu morfometric.

Exceptând datele referitoare la greutatea cardiacă fetală, nu există studii morfometrice care să furnizeze date morfometrice privind dimensiunile cardiace normale funcție de vârsta gestațională.

Este important de evaluat dacă măsurătorile cardiace obținute prin RMN post mortem la 7T sunt comparabile cu cele efectuate în timpul autopsiei la feții de dimensiuni reduse.

Scopul studiului nostru a fost de a stabili dacă RMN post-mortem la 7T poate efectua măsurători tridimensionale ale inimii fetale și de a obține rezultate comparabile

cu măsurătorile macroscopice post-mortem efectuate la autopsie, la feți cu greutate corporală mai mică de 500 g.

Metodă: Au fost luați în considerare 12 feți de trimestru doi, cu vârsta gestațională cuprinsă între 13 și 19 săptămâni de amenoree. Toți feții au rezultat în urma întreruperii terapeutice a sarcinii (TOP) datorită unor sindroame plurimalformative sau prezenței anomaliilor cromozomiale. Toate cazurile au fost fixate corespunzător în soluție de formaldehidă 10%, iar ulterior au fost examinate folosind un aparat RMN de 7T. După examinarea imagistică post mortem, toate cazurile au fost supuse autopsiei convenționale. Măsurătorile cardiace pe trei axe au fost efectuate prin ambele metode de examinare, folosind aceleași repere.

Rezultate: S-a observat o corelație puternică între măsurătorile RMN post-mortem la 7T și măsurătorile efectuate la autopsie, cu $p < 0.001$. Coeficientul de corelație (r) pentru toate cele trei axe măsurate, a fost mai mare sau egal cu 0,90. Graficele Bland Altman au arătat un acord general bun între măsurătorile efectuate prin ambele metode.

Concluzie: Utilizând RMN post-mortem de 7 T pentru evaluarea morfometrică tridimensională a cordului fetal la fetii de trimestru doi, cu greutate corporală mai mică de 500g, se obțin rezultate comparabile cu măsurătorile macroscopice efectuate în timpul autopsiei convenționale.

Studiul 4. Metodă alternativă de evaluare a creierului la feți de trimestru doi cu malformații cardiace și malformații ale sistemului nervos central

Cercetarea RMN ex vivo este cheia pentru obținerea de date cantitative care să permită o mai bună evaluare a structurilor cerebrale.

Scopul principal al acestui studiu a fost de a evalua capacitatea RMN post mortem de a măsura structuri cerebrale detaliate la feți din al doilea trimestru de sarcină, comparativ cu măsurătorile patologice digitale macroscopice și microscopice.

Un alt obiectiv a fost de a observa dacă în studiul nostru, prezența bolilor cardiace congenitale se corelează cu prezența anomaliilor de la nivelul plăcii corticale și zonei marginale.

Metodă. Lotul de studiu a fost compus din treizeci de cazuri consecutive de feți cu vârsta gestațională cuprinsă între 15 și 27 de săptămâni care au fost scanate post-mortem prin RMN de 3Tesla (T), sau de 7T. Ulterior toți feții au fost supuși autopsiei invazive, efectuată de un anatomopatolog cu expertiză în examinarea fetală fără a avea informații referitoare la rezultatele examinărilor imagistice. Lungimea și înălțimea lobului temporal au fost evaluate bilateral, prin măsurători macroscopice computerizate, respectiv pe imaginile de RMN post-mortem, utilizând un model matematic. Luând în considerare diferențele de intensitate a semnalului pe achizițiile prin RMN post mortem la nivelul creierului, pentru a facilita efectuarea măsurătorilor liniare, am considerat oportun, pentru acest studiu, împărțirea peretelui telencefalic

fetal în trei compartimente arhitectonice, după cum urmează: compartimentul proliferativ, compartimentul tranzitor și compartimentul extern.

Rezultate. Am observat o corelație foarte puternică între măsurătorile macroscopice computerizate (CB) și măsurătorile prin RMN post-mortem (r între 0,93 și 0,98, $p < 0,001$). S-a observat o corelație puternică între măsurătorile RMN post-mortem și cele microscopice pentru compartimentul proliferativ și tranzitor (r între 0,69 și 0,86, $p < 0,001$) și o corelație moderată pentru măsurătorile compartimentului extern ($r = 0,57$, $p = 0,004$). Plot-urile Bland-Altman au arătat un acord general bun între măsurători, astfel că mai mult de 95% dintre valori s-au situat între limitele superioare și inferioare de acord pentru fiecare categorie. Coeficientul de acord Cohen κ nu a arătat nici o asociere semnificativă statistic între prezența malformațiilor cardiace și anomalii ale sistemului nervos central ($\kappa < 0,10$, $p > 0,05$).

Concluzii. RMN fetal post-mortem poate identifica și efectua măsurători detaliate ale structurilor cerebrale la nivelul lobilor temporali care sunt comparabile cu microscopia la feții cu vârsta gestațională medie de 19 săptămâni (+/- SD 2,6 săptămâni) și greutatea fetală medie de 311,5g (+/- SD 199,21 g). Corelația și acordul dintre măsurători nu au fost influențate de prezența malformațiilor cardiace.

Concluzii generale

Disecția cordului fetal pe secțiuni de patru camere după modelul prezentat în această lucrare este o alternativă eficientă la tehnică de disecție standard, la fetii cu vârstă gestațională mică sau în situațiile în care examinarea standard nu este posibilă.

Un avantaj al disecției cordului pe secțiuni de patru camere este că poate fi efectuată cu instrumentar uzual, care se găsește în orice serviciu de anatomie patologică generală, chiar și pe inimi cu greutate mai mică de 1 gram.

Examinarea anatomopatologică a cordului la embrioni și feți de prim trimestru pe secțiuni transversale la nivelul toracelui, poate identifica structurile anatomice cardiace, raportul dintre ele și dispoziția organelor la nivelul toracelui. Examinarea venelor pulmonare, venelor cave și canalului arterial este dificil de apreciat prin această tehnică.

Examinarea RMN post mortem de înalta rezoluție permite aprecierea morfometrică a cordului cu rezultate comparabile cu măsurătorile macroscopice, efectuate la autopsie.

Determinările morfometrice prin RMN post mortem de 7T efectuate la nivelul creierului se corelează nu doar cu măsurătorile macroscopice efectuate la nivelul lobului temporal dar și cu măsurătorile microscopice ale compartimentelor peretelui telencefalic descrise în studiul 4.

Anomaliile de migrare neuronală observate microscopic la fetii incluși în studiu, au putut fi identificate și prin RMN post mortem de înaltă rezoluție.

Nu am identificat o corelație statistică între prezența malformațiilor cardiace congenitale și anomaliile de migrare neuronală la fetii aflați în trimestrul 2 de sarcină.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Aspectele originale ale tezei pot fi observate în fiecare din cele patru studii prezentate. În primul studiu, publicat într-o revistă de specialitate ca parte a cercetării doctorale, am utilizat pentru prima dată imagistica prin RMN post mortem ca standard pentru validarea unei tehnici de disecție anatomopatologică. În al doilea studiu, am propus și evaluat o metodă de examinare a cordului fetal la feți de prim trimestru, începând cu vârsta gestațională de 9 săptămâni. Iar în studiile trei și patru, am efectuat și evaluat măsurători liniare ale cordului și creierului fetal prin RMN post mortem. Valorile numerice obținute prin examinarea imagistică post mortem au fost comparate nu doar cu măsurători liniare macroscopice clasice sau computerizate, dar și cu măsurători liniare microscopice.

O contribuție inovativă este identificarea unei tehnici de examinare anatomopatologică a cordului fetal la feții de trimestru 1 și feții cu greutate mai mică de 500 g. Tehnica propusă poate fi utilizată în orice serviciu de anatomie patologică generală și permite diagnosticarea celor mai frecvente anomalii cardiace, având sensibilitate și specificitate crescute.

Având în vedere dificultatea examinării embrionilor și implicit a cordului embrionar, în această teză am propus o tehnică de examinare a acestora, cu acuratețe generală de 80% în detecția structurilor cardiace.

Cercetarea de față evidențiază noi modalități de utilizare a imagisticii post mortem, nu doar ca element de diagnostic dar și ca unealtă în evaluarea morfometrică a structurilor fetale sau ca standard pentru validarea altor metode de investigație, aplicabilitatea acestora putând fi extrapolată și la alte specialități.

SUMMARY OF THE PHD THESIS

Correlations between prenatal
ultrasound diagnosis,
pathological necropsy, and
postnatal imaging examinations
in cardiac malformations

PhD student **Camelia Curta (Albu)**

PhD Supervisor Acad.Prof.dr. **Florin Stamatian**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENT

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Embryological bases and genetics of cardiac development	19
1.1. Embryology of the heart	19
1.2. Genetic mechanisms of cardiac development	19
1.3. Genetics of cardiac malformations	20
2. Congenital cardiac malformations	21
2.1. Incidence and evolution	21
2.2. Prevalence of congenital heart malformations depending on the malformative type	22
2.3. Clinical importance and socio-economic impact	22
3. Diagnosis of congenital heart malformations "in vivo"	24
3.1. Fetal echocardiography	24
3.1.1. Ultrasound diagnosis of fetal cardiac malformations in the first trimester of pregnancy	25
3.1.2. Ultrasound diagnosis of fetal heart malformations in the second trimester of pregnancy	26
3.2. Fetal heart examination by in vivo magnetic resonance imaging, evolution and perspectives	27
4. Examination of the fetal heart and diagnosis of post-mortem heart malformations	28
4.1. Fetal autopsy and peculiarities of fetal heart examination	28
4.1.1. Importance of fetal autopsy	28
4.1.2. Particularities of the anatomopathological examination of the fetus	29
4.1.3. Anatomopathological examination of the fetal heart	30
4.2. Post-mortem magnetic resonance examination	32
4.2.1. Evolution and perspectives	32
4.2.2. Examination of the fetal heart by post-mortem MRI	33
5. Multidisciplinary approach to heart malformations	36
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/objectives	41
2. General methodology	43
2.1. Description of the studies	43
2.2. Statistical analysis	43

3. Study 1 - The evaluation of the Four-Chamber Cardiac Dissection method of the fetal heart as an alternative to conventional inflow–outflow dissection in small gestational-age fetuses	45
3.1. Introduction	45
3.2. Objectives	46
3.3. Material and method	46
3.3.1. General considerations	46
3.3.2. Postmortem MRI examination	47
3.3.3. Image analysis	47
3.3.4. Anatomopathological examination	48
3.3.5. Statistical analysis	51
3.4. Results	53
3.4.1. Diagnostic value of the four-chamber cardiac dissection method for the identification of anatomical cardiac structures of interest compared to post-mortem MRI at 7T	53
3.4.2. Diagnostic value of the four-chamber cardiac dissection method in determining the malformative status of fetal cardiac structures compared to post-mortem MRI at 7T	56
3.5. Discussions	60
3.6. Conclusions	62
4. Study 2 - Evaluation of the Four-Chamber Cardiac Dissection method of the fetal heart in the first trimester of pregnancy	63
4.1. Introduction	63
4.2. Objectives	64
4.3. Material and method	64
4.3.1. Post-mortem MRI examination	64
4.3.2. Anatomopathological examination of the fetal heart	65
4.3.3. Statistical analysis	67
4.4. Results	67
4.5. Discussions	74
4.6. Conclusions	75
5. Study 3 - Evaluation of high-field post-mortem MRI at 7T compared to conventional autopsy: a morphometric study	77
5.1. Introduction	77
5.2. Objectives	78
5.3. Material and method	78
5.4. Results	79
5.5. Discussions	82
5.6. Conclusion	84

6. Study 4 - Alternative method of brain evaluation in second trimester fetuses with heart malformations and malformations of the central nervous system	85
6.1. Introduction	85
6.2. Objectives	86
6.3. Material and method	86
6.3.1. General considerations	86
6.3.2. Post-mortem MRI acquisition	87
6.3.3. Anatomopathological examination	87
6.3.4. Measurements of the temporal lobe	88
6.3.5. Measurements of cerebral cortical layers	89
6.3.6. Statistical analysis	91
6.4. Results	91
6.5. Discussions	99
6.6. Conclusions	101
7. General discussions	103
8. General conclusions	107
9. Originality and innovative contributions of the PhD thesis	109
REFERENCES	111
ANNEXES	125

Keywords: Magnetic resonance imaging; Microscopy; Macroscopic; Heart malformations; Post mortem fetal imaging; Fetal pathology; High field magnetic resonance imaging.

INTRODUCTION

Prenatal diagnostic methods are constantly developing. Currently, in the hands of an experienced examiner, ultrasonography can diagnose complex heart abnormalities as early as young gestational ages, this allows for a complex assessment of the case and the orientation of therapeutic conduct (4).

Often, the pathologist is put in front of a small, brittle heart with sometimes very complex structural abnormalities (6) . In these cases, standard heart examination is a major challenge.

Post-mortem imaging, especially post-mortem MRI examination, has experienced an accelerated development over the past decade (7,8). Thus, the examination of the fetal heart at small gestational age or even in embryos has become

possible, sometimes with results superior to anatomopathological examination, for example in the case of embryos (11,12).

THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Evaluation of patients with complex cardiac malformations requires a solid knowledge base for the identification of structural defects. Prenatal ultrasound examinations play an essential role in the early diagnosis of congenital heart disease and subsequent therapeutic decisions (42).

Anatomopathological examination, and in some cases post-mortem imaging, provides an overview of the malformative profile, completing the prenatal diagnosis and guiding genetic advice and management of future pregnancies (9).

In the last decade, the importance of fetal evaluation by post-mortem imaging has been increasingly outlined. Its role is intended to be both diagnostic and didactic (7).

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. The evaluation of the Four-Chamber Cardiac Dissection method of the fetal heart as an alternative to conventional inflow-outflow dissection in small gestational-age fetuses

Compared with conventional examination, the Four-Chamber Cardiac Dissection (4CCD) method can be performed by any pathopathologist, using instruments commonly available in pathology departments.

The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of the 4CCD method in examining small fetal hearts using post-mortem magnetic resonance imaging at 7T as standard.

Method. Twelve fetuses of gestational age between 13 and 19 weeks were included in this study. All fetuses underwent post-mortem MRI examination at 7T before pathological examination. The 4CCD method has been used for cardiac examination in all cases, following the same guidelines for cardiac sectioning.

Results. The 4CCD method was able to identify all cardiac anatomical structures compared to post-mortem MRI examination, demonstrating a sensitivity of 95.8% [95% CI, 94.5-95.8] and specificity of 100% [95% CI, 32.3-100]. The overall accuracy in identifying cardiac anatomical structures was 95.8% [95% CI, 93.4-95.8]. Also, the 4CCD method was able to detect cardiac abnormalities with a general diagnostic accuracy of 91% [95% CI, 85.8-94.2], sensitivity of 67.6% [95% CI, 54.5-75.3] and specificity of 97% [95% CI, 93.7-99].

Conclusions. Compared to post-mortem MRI, the 4CCD method of fetal heart evaluation showed very good efficiency in identifying all the anatomical structures targeted. More reserved results were obtained for the evaluation of the malformative status, although most discrepancies were related to the subjective assessment of diameters.

Study 2. Evaluation of the Four-Chamber Cardiac Dissection method of the fetal heart in the first trimester of pregnancy

Examination of the heart in embryos and first trimester fetuses remains a challenge for pathologists (88).

The main purpose of the study was to identify and standardize a method of pathological examination of the heart in first trimester fetuses, starting with a gestational age of 9 weeks, which could be implemented in any general pathology service.

The second purpose was to evaluate the ability of the method to visualize cardiac anatomical structures as compared to the post-mortem MRI examination of high resolution at 7T.

Method. Ten fetuses with gestational age between 9 and 13 weeks of amenorrhea were included in this study. All cases included in the study were fixed in formaldehyde solution 10% before post-mortem MRI examination, in order to prevent overheating of the tissues, due to the long time required for scanning. The pathologic examination of the fetal heart of the fetuses included in the study was performed by microscopic examination of the four chambers cardiac sections, obtained by performing transverse thoracic sections (4CCD-ST).

Results. The overall accuracy of the examination by 4CCD-ST compared to the post-mortem MRI on all the examined parameters was 80% (95% CI 73.4 – 85.4), with Se of 82.9% (95% CI 79 – 86.1) and Sp of 65.2% (95% CI 45.2 – 81.6). VPPs were 92.4% (95% CI 88 – 96) and VPN 42.9% (95% CI 29.7 – 53.6). Kappa (Cohen) was 0.4 indicating a moderate overall correspondence between the two methods.

Conclusions. Examination of the heart in first trimester fetuses by 4CCD-ST, is a technique, reliable and reproducible, indicated in situations where classical autopsy is not possible. It can successfully identify most of the cardiac anatomical structures their appearance and the ratio between them.

Study 3. Evaluation of high field post-mortem MRI at 7T compared to conventional autopsy: a morphometric study.

Except for data on foetal heart weight, there are no morphometric studies providing morphometric data on normal cardiac sizes depending on gestational age.

It is important to assess whether cardiac measurements obtained by post-mortem MRI at 7T are comparable to those taken during autopsy in small fetuses.

The goal of our study was to determine whether post-mortem MRI at 7T can perform three-dimensional measurements of the fetal heart and to obtain results comparable to post-mortem macroscopic measurements made at autopsy, in fetuses with a body weight of less than 500 g.

Method: 12 second trimester fetuses with gestational age of between 13 and 19 weeks of amenorrhea were considered. All fetuses resulted from the therapeutic

termination of pregnancy (TOP) due to plurimalformative syndromes or the presence of chromosomal abnormalities. All cases were properly fixed in 10% formaldehyde solution, and were subsequently examined using a 7T MRI machine. After post-mortem imaging examination, all cases were subjected to conventional autopsy. Three-axis cardiac measurements were carried out by both methods of examination, using the same cues.

Results: A strong correlation was observed between post-mortem MRI measurements at 7T and autopsy measurements, with $p < 0.001$. The correlation coefficient (r) for all three axes measured was greater than or equal to 0.90. Bland Altman's graphs showed good overall agreement between the measurements made by both methods.

Conclusion: Using 7 T post-mortem MRI for three-dimensional morphometric evaluation of the fetal heart in second-trimester fetuses with a body weight of less than 500g, results comparable to macroscopic measurements performed during conventional autopsy are obtained.

Study 4. Alternative method of brain evaluation in second trimester fetuses with heart malformations and malformations of the central nervous system

Ex vivo MRI research is the key to obtaining quantitative data that allows a better evaluation of brain structures.

The main purpose of this study was to assess the ability of post-mortem MRI to measure detailed brain structures in fetuses in the second trimester of pregnancy, compared to macroscopic and microscopic digital pathological measurements.

Another objective was to observe whether in our study, the presence of congenital heart disease correlates with the presence of abnormalities in the cortical plate and the marginal area.

Method. The study group was composed of thirty consecutive cases of fetuses with gestational age between 15 and 27 weeks that were scanned post-mortem with an MRI machine of 3Tesla (T), or of 7T. Subsequently, all the fetuses were subjected to invasive autopsy, performed by a pathologist with expertise in fetal examination without having information on the results of imaging examinations. The length and height of the temporal lobe were evaluated bilaterally, by computerized macroscopic measurements, respectively on post-mortem MRI images, using a mathematical model. Considering the differences in signal intensity on post-mortem MRI acquisitions in the brain, in order to facilitate the performance of linear measurements, we considered it appropriate, for this study, to divide the fetal telencephalic wall in three architectural compartments, as follows: the proliferative compartment, the transitory compartment and the external compartment.

Results. We observed a very strong correlation between computerized macroscopic measurements and post-mortem MRI measurements (r between 0.93 and 0.98, $p < 0.001$). A strong correlation was observed between post-mortem and

microscopic MRI measurements for the proliferative and transitory compartment (r between 0.69 and 0.86, $p < 0.001$) and a moderate correlation for the measurements of the external compartment ($r = 0.57$, $p = 0.004$). The Bland-Altman plots showed an overall good agreement between the measurements, so that more than 95% of the values were between the upper and lower limits of the agreement for each category. The Cohen κ coefficient did not show any statistically significant association between the presence of heart malformations and abnormalities of the central nervous system ($\kappa < 0,10$, $p > 0,05$).

Conclusions. Post-mortem fetal MRI can identify and perform detailed measurements of brain structures that are comparable to microscopy in fetuses with an average gestational age of 19 weeks (+/- SD 2.6 weeks) and average fetal weight of 311.5g (+/- SD 199.21 g). The correlation and agreement between the measurements were not influenced by the presence of heart malformations.

General conclusions

The four-chambers cardiac dissection method of the fetal heart according to the model shown in this paper is an effective alternative to standard dissection technique, in fetuses with low gestational age or in cases where standard examination is not possible.

An advantage of the four-chambers cardiac dissection method is that it can be performed with the usual instrumentation, which is found in any service of general pathology, even on hearts weighing less than 1 gram.

Pathological examination of the heart in embryos and first trimester fetuses using 4CCD-ST, can identify cardiac anatomical structures, the ratio between them and their location in the thoracic cavity. Examination of the pulmonary veins, caval veins and arterial duct is difficult to appreciate with this technique.

High-resolution post-mortem MRI examination allows morphometric assessment of the heart with results comparable to macroscopic measurements, performed at autopsy.

The morphometric determinations by post-mortem MRI at 7T performed in the brain correlate not only with the macroscopic measurements but also with the microscopic measurements as described in study 4.

Neural migration abnormalities microscopically observed in the fetuses included in the study could also be identified by high-resolution post-mortem MRI.

We have not identified a statistical correlation between the presence of congenital heart malformations and neural migration abnormalities in fetuses in the second trimester of pregnancy.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality aspects of the thesis can be observed in each of the four studies presented. In the first study, published in a specialized journal as part of doctoral research, we

first used post-mortem MRI imaging as a standard for validating a pathological dissection technique. In the second study, we proposed and evaluated a method of fetal heart examination in first trimester fetuses, starting with the gestational age of 9 weeks. And in studies three and four, we performed and evaluated linear measurements of the fetal heart and brain by post-mortem MRI. The numerical values obtained by post-mortem imaging examination were compared not only with classical or computerized macroscopic linear measurements, but also with microscopic linear measurements.

An innovative contribution is the identification of a technique of pathological examination of the fetal heart in 1st trimester fetuses and fetuses weighing less than 500 g. The proposed technique can be used in any general pathology service and allows to diagnose the most common cardiac abnormalities, having increased sensitivity and specificity.

Given the difficulty of examining embryos and implicitly of the embryonic heart, in this thesis we proposed a technique of their examination, with general accuracy of 80% in the detection of cardiac structures.

The present research highlights new ways of using post-mortem imaging, not only as a diagnostic element but also as a tool in the morphometric evaluation of fetal structures or as a standard for validating other investigation methods.