

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

*DIPARTIMENTO DI*

Neuroscienze, Biomedicina e Movimento

*SCUOLA DI DOTTORATO DI*

Scienze Ingegneria Medicina

*DOTTORATO DI RICERCA IN*

Imaging Multimodale in biomedicina

CICLO /ANNO (1° anno d'Iscrizione) 28°-2013

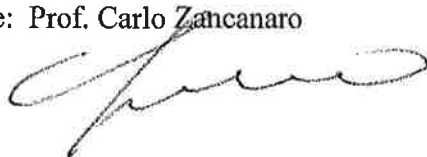
TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

**Tecniche avanzate di neuroimaging in risonanza magnetica nello studio delle alterazioni cerebrali in processi patologici e fisiologici**

S.S.D. BIO/16

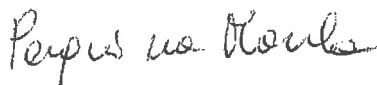
Coordinatore: Prof. Carlo Zancanaro

Firma



Tutor: Prof. Pasquina Marzola

Firma






Dottorando: Dott./ssa Silvia Fiorini

Firma



Quest'opera è stata rilasciata con licenza Creative Commons Attribuzione – non commerciale  
Non opere derivate 3.0 Italia . Per leggere una copia della licenza visita il sito web:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/it/>

-  **Attribuzione** Devi riconoscere una menzione di paternità adeguata, fornire un link alla licenza e indicare se sono state effettuate delle modifiche. Puoi fare ciò in qualsiasi maniera ragionevole possibile, ma non con modalità tali da suggerire che il licenziante avalli te o il tuo utilizzo del materiale.
-  **NonCommerciale** Non puoi usare il materiale per scopi commerciali.
-  **Non opere derivate** —Se remixi, trasformi il materiale o ti basi su di esso, non puoi distribuire il materiale così modificato.

## Sommario

Il lavoro della mia tesi riguarda l'utilizzo e l'approfondimento di tecniche avanzate di neuroimaging per lo studio di modelli animali di patologie cerebrali; specificatamente è stato studiato un modello sperimentale di sclerosi multipla e un modello sperimentale di invecchiamento fisiologico.

Inizialmente mi sono focalizzata sulla messa a punto del protocollo sperimentale per l'imaging funzionale (fMRI) in un modello sperimentale per la forma cronica-progressiva della sclerosi multipla. (EAE, Encefalomielite Sperimentale Autoimmune). Grazie a queste tecniche è stato possibile studiare la plasticità cerebrale, cioè la capacità che ha il cervello di riorganizzarsi in seguito ad un danno indotto dalla patologia neurodegenerativa, permettendo così lo svolgimento di uno specifico compito anche se l'area o le aree normalmente deputate al controllo di tale funzione risultano danneggiate. Tecniche moderne come l'imaging funzionale, che permettono di monitorare non invasivamente le aree cerebrali attivate da uno specifico stimolo, non sono ancora state usate nell'EAE nonostante sia stato dimostrato, in diversi studi clinici, che la fMRI può fornire importanti informazioni sulla entità di riorganizzazione corticale cerebrale spontanea oppure indotta da terapia. I dati ottenuti con questo esperimento sono stati pubblicati su *The Journal of Neuroscience* (July 8, 2015- 35(27):10088–10100).

Successivamente, durante il secondo e terzo anno di dottorato, mi sono dedicata allo studio dell'invecchiamento fisiologico del cervello in quanto in entrambi i casi (processi fisiologici e patologici) quello che otteniamo sono delle modificazioni che vanno ad influenzare sia l'architettura sia la composizione microstrutturale dei tessuti colpiti. Diviene quindi importante caratterizzare questi effetti sulle microstrutture e la loro riorganizzazione mediante queste tecniche innovative. Negli ultimi dieci anni sono stati pubblicati molti studi sull'invecchiamento cerebrale umano basati su tecniche avanzate di risonanza magnetica. Gli studi clinici sono però potenzialmente influenzati da diversi fattori come lo stile di vita (es. esercizio fisico, apporto calorico, stress) e la variabilità genetica. Modelli sperimentali di invecchiamento potrebbero essere quindi utili

per la distinzione degli eventi fisiologici da quelli patologici e per investigare l'impatto dei fattori ambientali e genetici. Potrebbero inoltre essere una valida piattaforma per studiare l'effetto di eventuali terapie farmacologiche e non, nel ritardare l'invecchiamento cerebrale.

Nello specifico, il secondo anno del mio lavoro di tesi è stato dedicato all'utilizzo delle tecniche DTI (Diffusion tensor imaging) e volumetria (VBM).

La DTI è uno strumento che permette di valutare, grazie alla sua elevata sensibilità, l'organizzazione microstrutturale e l'orientamento dei tratti della sostanza bianca, fornendo informazioni dettagliate sull'integrità della stessa. In questo lavoro sono state effettuate misure quantitative di ADC (Apparent Diffusion Coefficient) e FA (Fractional Anisotropy) su tutto il cervello; sono stati condotti inoltre studi volumetrici per valutare eventuale atrofia.

Sono stati trovati valori aumentati di ADC e diminuiti di FA con l'aumentare dell'età, in accordo con quello osservato nei casi studiati sull'uomo: tutto ciò conferma l'instaurarsi di un deterioramento delle connessioni neurali con l'avanzare dell'età; inoltre, questi risultati riflettono un'alterazione generalizzata del cervello.

Considerando l'indagine volumetrica, è stato rilevato un aumento del volume di CSF (CerebroSpinal Fluid) (adulti vs giovani, giovani vs vecchi) che riflette una ben documentata atrofia del cervello osservato nell'uomo. I dati DTI analizzati negli animali di laboratorio riproducono in maniera consistente i dati riportati in letteratura nell'uomo, evidenziando quindi il potenziale ruolo dei piccoli animali come modelli sperimentali per lo studio dei processi neurodegenerativi.

Infine, in quest'ultimo anno mi sono dedicata da un lato a verificare istologicamente i risultati ottenuti in vivo con MRI e dall'altro a completare lo studio attraverso l'acquisizione di dati di spettroscopia localizzata protonica (MRS). Nella letteratura clinica diversi studi hanno investigato le alterazioni dei metaboliti cerebrali legati all'invecchiamento riportando in generale una diminuzione con l'età del metabolita NAA (N-Acetil aspartato) che viene assunto come un marker neuronale. Tuttavia c'è un certo grado di controversia in letteratura a riguardo dei cambiamenti nella concentrazione cerebrale dei

metaboliti; questo anche a causa della difficoltà a confrontare gli studi da diversi laboratori dovuta principalmente al diverso posizionamento dei pixel. Comunque diversi studi hanno riportato un trend verso la diminuzione di NAA con l'aumento dell'età, sebbene altri studi abbiano riportato un andamento costante. Per questo motivo è stato intrapreso lo studio di MRS sul modello sperimentale. Gli spettri protonici localizzati acquisiti nell'ippocampo e nella corteccia parietale e frontale sono stati analizzati con il software LCModel che permette di quantificare i metaboliti prendendo come riferimento il segnale dell'acqua. I valori sono stati confrontati (giovani vs vecchi) ed abbiamo ottenuto un aumento statisticamente significativo della concentrazione assoluta (i.e. relativamente all'acqua) di NAA con l'aumentare dell'età nella corteccia prefrontale. Questo risultato è sorprendente in quanto la maggior parte dei dati umani indicano l'andamento opposto.

I dati di spettroscopia localizzata, essendo quindi in disaccordo con i risultati clinici, meriterebbero un ulteriore approfondimento.

## **Abstract**

This thesis is focused on the development and application of advanced neuroimaging techniques in the study of experimental models of brain pathologies. Specifically, experimental models of brain aging and multiple sclerosis have been investigated. During the last ten years, many neuroimaging clinical investigations of brain aging based on advanced magnetic resonance techniques have been reported. Clinical studies are potentially affected by confounding factors such as lifestyle (e.g. physical exercise, caloric intake, stress) and genetic variability. Experimental models of aging may therefore be useful for the separation of physiological events from pathological ones, as well as for evaluation of the impact of environmental and genetic factors. Such models may also represent a valuable platform to study the efficacy of pharmacological or physical therapies for the delay of brain aging.

In the first part of the work, I focused on the development and optimization of protocol for functional imaging (fMRI) applied in an experimental model of EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) for chronic-progressive form of multiple sclerosis. By using fMRI techniques, it was possible to study brain plasticity, i.e. the ability of the brain to reorganize itself after damage caused by neurodegenerative disease. Brain plasticity enables the performance of a specific task even if the area, or areas, normally delegated to control this function are damaged. Functional imaging, that allows to monitor non-invasively the brain areas activated by a specific stimulus, has not yet used in EAE although several clinical studies have shown that fMRI can provide valuable information on the extent of spontaneous or therapy-induced cortical cerebral reorganization. Data obtained from this study have been published in *The Journal of Neuroscience*, July 8, 2015 - 35(27):10088–10100.

Subsequently, during the second and third year of my PhD, I have focused on the study of physiological brain aging. Similarly, to pathological conditions, physiological aging also causes alterations which can affect the architecture and the microstructural composition of the brain. The use of MRI innovative techniques could be important for characterize these alterations and their effects

on brain reorganization. The second year of my PhD was dedicated to the use of DTI (diffusion tensor imaging) and volumetric techniques. Due to its high sensitivity DTI allows to evaluate the microstructural organization and orientation of the white matter tracts, providing detailed information on the integrity of biological tissues. In this work, we carried out DTI acquisitions of the whole brain and evaluated total as well as white and gray matter volumes. Specifically, we evaluated FA (Fractional Anisotropy) and ADC (apparent diffusion coefficient) from DTI acquisitions. FA and ADC are considered reliable marker of brain tissue integrity.

We found increased values of ADC and decreased values of FA with increasing age, in agreement with that observed in humans: this result confirms previous evidence of neural connections deterioration with aging. Moreover, our results reflected generalized alteration in the microstructure of the brain, rather than localized alterations. Considering the morphological study, we observed increased volume of CSF (CerebroSpinal Fluid) (young vs adult, young vs old) that reflects a well-documented atrophy of the brain observed in humans. Results obtained by DTI and volumetry in animal models are in agreement with literature data reported in humans, thus confirming the potential role of experimental models for the study of neurodegenerative processes.

Finally, the aim of the last year was to confirm the results obtained in vivo by using histological techniques and to complete the study through the acquisition of localized proton spectroscopy (MRS) data.

In the clinical literature, several studies investigated the alterations of cerebral metabolites in aging and generally reported a decreasing trend of the NAA metabolite (N-acetyl aspartate, a well-known neuronal marker) content with age. However, there is a certain degree of controversy in the literature about the changes in the cerebral concentration of this metabolite, potentially due to the difficulty in comparing studies between different laboratories also caused by different positioning of pixels. In order to have a comparison with clinical data, we acquired localized proton spectra in the experimental model of aging. Proton spectra were acquired in the hippocampus and in the parietal and frontal cortex and analyzed with the LCModel software to quantify the absolute concentration of

metabolites, taking as reference the water signal. Data from different age groups (young vs. older) were compared. A statistically significant increase of the absolute concentration (i.e. relatively water) of NAA with increasing age in the prefrontal cortex was detected. This result is surprising considering the opposite trend observed in humans. Localized spectroscopy data, then, being in disagreement with the clinical results, deserve further investigations.



## **Indice**

Capitolo 1: Introduzione	11
Capitolo 2: Imaging a Risonanza Magnetica	16
Capitolo 3: Tecniche MRI e modelli sperimentali utilizzati	40
3.1 Imaging funzionale (fMRI)	40
3.2 Diffusion Tensor Imaging (DTI)	51
3.3 Spettroscopia protonica localizzata (MRS)	56
3.4 I Modelli sperimentali utilizzati	60
3.4.1 Il modello sperimentale di EAE (Encefalomielite Sperimentale Autoimmune)	60
3.4.2 Il modello di invecchiamento fisiologico cerebrale	62
Capitolo 4: Materiali e Metodi	63
4.1 Preparazione e trattamento degli animali	63
4.1.1 Imaging funzionale (fMRI) e volumetria (VBM)	63
4.1.2 Diffusion Tensor Imaging (DTI) e spettroscopia protonica localizzata (MRS)	66
4.2 Imaging	67
4.2.1 Imaging funzionale (fMRI)	68
4.2.2 Analisi delle immagini fMRI	70
4.2.3 Diffusion Tensor Imaging (DTI)	72
4.2.4 Voxel-based-morphometry o volumetria (VBM)	73
4.2.5 Spettroscopia protonica localizzata (MRS)	75
4.2.6 Istologia	74
Capitolo 5: Risultati	76
5.1 Modello sperimentale di EAE (Encefalomielite Sperimentale Autoimmune)	76
5.1.1 Evoluzione della malattia e Imaging morfologico (VBM)	76
5.1.2 Imaging funzionale (fMRI)	79
5.2 Modello di invecchiamento fisiologico	81
5.2.1 Imaging morfologico (VBM)	81
5.2.2 Diffusion Tensor Imaging (DTI)	83

5.2.3 Altri esperimenti: Spettroscopia Protonica	
Localizzata (MRS) e imaging funzionale (fMRI)	88
Capitolo 6: Discussione e conclusioni	97
Capitolo 7: Bibliografia	101
Appendice 1: Pubblicazioni	107

Allegati:

Functional Magnetic Resonance Imaging of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Reveals Brain Cortex Remodeling.

In vivo long-term magnetic resonance imaging activity of ferritin-based magnetic nanoparticles versus a standard contrast agent.

Manganese-enhanced magnetic resonance imaging investigation of the interferon- $\alpha$  model of depression in rats.

Pancreatic cancer growth using magnetic resonance and bioluminescence imaging.

Investigation of normal brain aging in rodent experimental model by DTI, Volumetry and localized proton spectroscopy (abstract)

## 1. Introduzione

La Risonanza Magnetica per immagini (nel seguito abbreviata come MRI, dall'inglese Magnetic Resonance Imaging) è una tecnica utilizzata principalmente in campo medico per produrre immagini ad alta definizione dell'interno del corpo. La MRI è basata sui principi della Risonanza Magnetica Nucleare (abbreviata NMR, dall'inglese Nuclear Magnetic Resonance), una tecnica spettroscopica usata dai ricercatori per ottenere informazioni di tipo chimico e fisico, sulle molecole. La MRI è nata inizialmente come tecnica di imaging tomografico, in grado cioè di produrre l'immagine di un sottile strato del corpo umano a partire dal segnale NMR. Successivamente, la tecnica ha trovato applicazione anche nell'imaging volumetrico. Il lavoro svolto durante il periodo di dottorato riguarda l'utilizzo e approfondimento di tecniche innovative di risonanza magnetica, che permettono di caratterizzare a livello microstrutturale cambiamenti che si verificano a livello cerebrale a seguito sia di processi fisiologici che patologici.

Inizialmente mi sono focalizzata sulla messa a punto del protocollo sperimentale per l'imaging funzionale (fMRI) in un modello di encefalomyelite sperimentale autoimmune (abbreviata come EAE, dall'inglese Experimental Autoimmune Encephalomyelitis), il quale rappresenta un robusto modello sperimentale per la forma cronica-progressiva della sclerosi multipla (MS) ed è stato ampiamente caratterizzato usando tecniche standard di risonanza magnetica nucleare. Grazie a queste tecniche innovative come l'imaging funzionale (fMRI), che permettono di monitorare non invasivamente le aree cerebrali attivate da uno specifico stimolo, è stato possibile studiare la plasticità cerebrale, cioè la capacità che ha il cervello di riorganizzarsi in seguito ad un danno indotto dalla patologia neurodegenerativa. In questo modo, lo svolgimento di uno specifico compito viene portato a termine anche se l'area o le aree normalmente deputate al controllo di tale funzione risultano danneggiate. Questa capacità cerebrale è stata dimostrata in particolare nei malati di sclerosi multipla anche dopo un singolo isolato episodio di malattia tramite esami di Imaging Funzionale (fMRI). Pertanto lo studio dei meccanismi alla base della plasticità cerebrale ha un valore cruciale sia

per le prospettive di poter riuscire a limitare le conseguenze funzionali della malattia che come reale end-point per le moderne terapie.

Le tecniche di fMRI non sono ancora state usate nell'EAE nonostante sia stato dimostrato, in diversi studi preclinici, che la fMRI può fornire importanti informazioni sulla entità di riorganizzazione corticale cerebrale spontanea oppure indotta da terapia. La nascita della fMRI viene fatta risalire ai lavori pionieristici del gruppo di Ogawa, che dimostrarono per la prima volta nel 1990 la possibilità di acquisire un segnale MRI dipendente dalla concentrazione locale di Hb deossigenata (Ogawa et al, 1990). Da quel momento, le tecniche di fMRI hanno conosciuto un enorme sviluppo principalmente nelle applicazioni cliniche, ma anche nelle applicazioni sperimentali su animali da laboratorio.

Lo scopo di questa prima parte è stata quella di ottimizzare ed applicare protocolli di fMRI per studiare la plasticità neuronale nella corteccia somatosensoriale in ratti DA (Dark Agouti) affetti da EAE in fase acuta e tardiva, ed individuare possibili correlazioni fra il danno cerebrale, osservato tramite tecniche MRI standard in vivo ed esami istologici, e la plasticità cerebrale. Dati di fMRI e istologici sono stati raccolti e analizzati su un ampio gruppo di animali affetti da EAE a due punti temporali 30 e 60 giorni dopo l'induzione.

L'esecuzione di esperimenti di fMRI nel piccolo animale da laboratorio è resa complicata dal fatto che l'animale deve essere anestetizzato (per evitare artefatti da movimento) e che una serie di parametri fisiologici, come pCO<sub>2</sub> nel sangue, frequenza di respirazione e temperatura corporea devono necessariamente essere tenuti sotto controllo e all'interno di ben determinati range fisiologici durante l'intero esperimento. Esistono due possibili approcci:

1. Inibizione della respirazione spontanea: l'animale viene paralizzato con una soluzione 0.075 mg/ml di pancuronio bromuro in salina eparinizzata 25UI/ml, per infusione intravenosa al rate di 0.5 mg/kg. Questa procedura richiede la ventilazione artificiale tramite intubazione endotracheale con agocanula collegata direttamente all'apparato di ventilazione. Questa procedura consente un ottimo controllo dei parametri fisiologici, ma al termine dell'esperimento l'animale deve essere sacrificato in quanto l'azione paralizzante del pancuronio non è reversibile e anche per motivi etici.

2. Tenere l'animale in respirazione spontanea, sotto un blando anestetico che conservi la risposta funzionale. In letteratura sono descritti dei protocolli che utilizzano medetomidina (Domitor® 1mg, Orion Corporation Finlandia e distribuito da Janssen animal health, Milano) che mostra una potente e selettiva affinità per i recettori alfa<sub>2</sub>-adrenergici che, a livello dell'encefalo, inibiscono il rilascio di noradrenalina. Questo anestetico è stato utilizzato per la prima volta nella fMRI come anestetico indipendente (Weber et al, 2007): somministrato per via sottocutanea con infusione continua, non richiede l'intubazione e la ventilazione artificiale, quindi l'animale è mantenuto in uno stato di respirazione spontanea e non viene paralizzato. I parametri fisiologici vengono monitorati e gli animali che non presentano valori nel range fisiologico esclusi.

In questo lavoro di tesi, si è optato per il secondo approccio soprattutto perché viene salvaguardato il benessere dell'animale e permette studi longitudinali, in quanto l'animale viene risvegliato alla fine della sessione di imaging.

Successivamente, mi sono dedicata allo studio dell'invecchiamento fisiologico del cervello perché i processi di sviluppo, di invecchiamento e anche patologici del sistema nervoso centrale influenzano sia l'architettura sia la composizione microstrutturale dei tessuti colpiti. Negli ultimi dieci anni sono stati pubblicati molti studi di invecchiamento cerebrale nell'uomo basati sulle tecniche avanzate di risonanza magnetica. Gli studi clinici sono potenzialmente influenzati da diversi fattori come lo stile di vita (es. esercizio fisico, apporto calorico, stress) e la variabilità genetica. Modelli sperimentali di invecchiamento potrebbero essere quindi utili per la distinzione degli eventi fisiologici da quelli patologici, nonché per studiare l'impatto dei fattori ambientali e genetici. Potrebbero inoltre essere una valida piattaforma per studiare l'effetto di eventuali terapie farmacologiche e non, nel ritardare l'invecchiamento cerebrale. Scopo di questa seconda parte è stato lo studio dell'invecchiamento cerebrale in un modello murino mediante tecniche di risonanza magnetica avanzate e la valutazione del suo potenziale valore traslazionale. Nello specifico, sono state utilizzate tecniche DTI (Diffusion tensor imaging) e tecniche di analisi volumetrica. La DTI è uno strumento che permette di valutare, grazie alla sua elevata sensibilità, l'organizzazione microstrutturale e l'orientamento dei tratti della sostanza bianca,

fornendo informazioni dettagliate sull'integrità dei tessuti biologici. In questo lavoro sono state effettuate misure quantitative di ADC (Apparent Diffusion Coefficient) e FA (Fractional Anisotropy) su tutto il cervello; viene inoltre valutato il volume complessivo dell'organo.

Sono stati trovati valori aumentati di ADC e diminuiti di FA con l'aumentare dell'età, in accordo con quello osservato nei casi studiati sull'uomo: tutto ciò conferma l'instaurarsi di un deterioramento delle connessioni neurali con l'avanzare dell'età; inoltre, questi risultati riflettono un'alterazione generalizzata del cervello.

Considerando la parte di imaging volumetrico, è stato rilevato un aumento del volume del fluido cerebrospinale, CSF (CerebroSpinal Fluid) (adulti vs giovani, vecchi vs giovani) riflette un ben documentato restringimento (atrofia) del cervello osservato nell'uomo. I dati DTI analizzati negli animali di laboratorio riproducono in maniera consistente i dati riportati nell'uomo in letteratura, evidenziando quindi il potenziale ruolo dei piccoli animali come modelli sperimentali per lo studio dei processi neurodegenerativi.

Infine, sono stati acquisiti dati di spettroscopia protonica localizzata (MRS). Nella letteratura clinica diversi studi hanno investigato le alterazioni dei metaboliti cerebrali legati all'invecchiamento riportando in generale una diminuzione con l'età del metabolita NAA (N-Acetil aspartato) che viene assunto come un marker neuronale. Tuttavia c'è un certo grado di controversia in letteratura a riguardo dei cambiamenti nella concentrazione cerebrale dei metaboliti. Questo anche a causa della difficoltà a confrontare gli studi da diversi laboratori causata principalmente dal diverso posizionamento dei pixel. Comunque diversi studi hanno riportato un trend verso la diminuzione di NAA con l'aumento dell'età, sebbene altri studi abbiano riportato un andamento costante. Per questo motivo è stato intrapreso lo studio di MRS sul modello sperimentale. Gli spettri protonici localizzati acquisiti nell'ippocampo e nella corteccia parietale e frontale sono stati analizzati con il software LCModel che permette di quantificare i metaboliti prendendo come riferimento il segnale dell'acqua. In particolare mi sono focalizzata sul dato quantitativo relativo al metabolita NAA (N-Acetil aspartato) perché i dati di letteratura nell'umano

generalmente indicano una sua diminuzione con l'età. Inoltre il contenuto di NAA è generalmente assunto come un marker neuronale. I valori sono stati confrontati statisticamente (giovani vs vecchi). Abbiamo ottenuto un aumento piccolo ma statisticamente significativo della concentrazione assoluta (i.e. relativamente all'acqua) di NAA con l'aumentare dell'età nella corteccia prefrontale. Questo risultato è sorprendente in quanto la maggior parte dei dati umani indicano l'andamento opposto. Una possibile spiegazione sta nel fatto che la nostra quantificazione è ottenuta tramite il raffronto con il segnale dell'acqua e una possibile diminuzione del contenuto di acqua tissutale con l'età potrebbe aver alterato i risultati.

I dati di spettroscopia localizzata, essendo quindi in disaccordo con alcuni studi clinici, meriterebbero un ulteriore approfondimento.

Come sarà evidente dalla lettura della tesi, il lavoro riportato è fortemente interdisciplinare. Specificatamente richiede competenze nell'ambito della fisiologia, dell'istologia, della programmazione di sequenze di acquisizione e nell'analisi dei dati. Il mio ruolo negli esperimenti descritti è stato: ottimizzazione delle procedure per il trattamento degli animali (scelta di anestesia, controllo fisiologico etc), disegno sperimentale, analisi ex vivo, interpretazione dei risultati.

## 2. Imaging a risonanza magnetica

La Risonanza Magnetica ha esordito come modalità di imaging tomografico per produrre immagini NMR di una sezione del corpo umano. Immaginate di aver suddiviso il distretto anatomico in esame in sezioni di spessore *Thk* (dall'inglese Thickness). Con il termine imaging tomografico si fa riferimento ad una tecnica in grado di produrre un risultato, in un certo senso, equivalente all'eliminazione dell'anatomia localizzata al di sopra e al di sotto della sezione in esame. Ciascuna sezione risulterà composta di vari elementi tridimensionali detti voxel, il cui volume è di circa  $3 \text{ mm}^3$  nel corpo umano e molto più piccolo nel corpo di animali da laboratorio. L'immagine di risonanza magnetica di una sezione risulterà composta da un insieme di elementi bidimensionali chiamati pixel, la cui intensità è proporzionale all'intensità del segnale NMR del voxel corrispondente (“The basics of MRI”, Joseph P. Hornak, Ph.D, III Edizione 2011).

### 2.1 Fenomeni microscopici responsabili dell'MRI

Il corpo umano è principalmente costituito da acqua e grasso. L'elevata presenza di atomi di idrogeno in questi due elementi fa sì che il corpo umano sia costituito per il 63% da atomi di idrogeno. Poiché i nuclei di idrogeno sono tra quelli in grado di produrre un segnale di risonanza magnetica, l'MRI utilizza in primo luogo la loro abbondanza per produrre immagini del corpo.

Ciascun voxel di una sezione anatomica del corpo umano, di cui si vuole generare l'immagine di risonanza magnetica, può contenere uno o più tessuti. Immaginando di poter fare uno zoom sul voxel è possibile vedere le cellule, in ognuna delle quali ci sono molecole di acqua. Ogni molecola di acqua è composta da un atomo di ossigeno e due di idrogeno. Se ora immaginiamo di ingrandire uno degli atomi di idrogeno è possibile vedere, oltre la nuvola degli elettroni, un nucleo costituito da un singolo protone. Il protone possiede una proprietà chiamata spin che:

1. può essere immaginata come un piccolo momento magnetico
2. farà sì che il nucleo possa produrre un segnale NMR.



Che cos'è lo spin? Lo spin è una proprietà fondamentale della natura come la carica elettrica o la massa. Lo spin assume valori multipli di  $1/2$  e può essere positivo (+) o negativo (-). I protoni, gli elettroni e i neutroni possiedono uno spin. Ogni singolo elettrone, protone e neutrone possiede uno spin di  $1/2$ .

In un atomo di deuterio ( $2H$ ), con un elettrone spaiato, un protone spaiato ed un neutrone spaiato, quindi, lo spin elettronico totale è  $1/2$  e lo spin nucleare totale è 1. Due o più particelle con spin di segno opposto possono appaiarsi ed annullare gli effetti misurabili dello spin risultante. Ne è un esempio l'elio. Sono gli spin nucleari spaiati ad essere importanti nell'NMR.

I nuclei sono costituiti da protoni e neutroni tenuti insieme da forze nucleari. Protoni e neutroni hanno approssimativamente la stessa massa (circa 1840 volte quella dell'elettrone) e ad essi ci si riferisce collettivamente col termine nucleoni. Il modello a shell dei nuclei stabilisce che i nucleoni, così come gli elettroni atomici, riempiono degli orbitali. Quando il numero di protoni o neutroni è uguale a 2, 8, 20, 28, 50, 82 e 126, gli orbitali sono pieni.

Poiché i nucleoni hanno spin, nel riempire gli orbitali possono appaiarsi (spin up-spin down, così come avviene per gli elettroni negli orbitali atomici) annullando lo spin risultante. Quasi tutti gli elementi della tavola periodica hanno un isotopo con uno spin nucleare diverso da zero. L'NMR può essere eseguita soltanto su isotopi con uno spin nucleare risultante non nullo (*i.e.* con spin nucleari spaiati) e la cui abbondanza naturale sia sufficientemente alta da poter essere rivelata. Alcuni nuclei che sono di interesse in MRI sono elencati di seguito.

Nuclei	Protoni spaiati	Neutroni spaiati	Spin risultante	$\gamma$ (MHz/T)
$^1\text{H}$	1	0	$\frac{1}{2}$	42,58
$^2\text{H}$	1	1	1	6,54
$^{31}\text{P}$	1	0	$\frac{1}{2}$	17,25
$^{23}\text{Na}$	1	2	$\frac{3}{2}$	11,27
$^{14}\text{N}$	1	1	1	3,08
$^{13}\text{C}$	0	1	$\frac{1}{2}$	10,71
$^{19}\text{F}$	1	0	$\frac{1}{2}$	40,08

## 2.2 Livelli di energia e transizioni NMR

Per capire come si comportano le particelle con spin in un campo magnetico di intensità  $B_0$ , si deve considerare un protone. Come abbiamo visto, il protone possiede uno spin nucleare non nullo che fa sì che si comporti come un piccolo vettore di momento magnetico, e cioè come un piccolo magnete con un polo nord ed un polo sud. Quando il protone si trova in un campo magnetico esterno, il suo spin si allinea con questo campo magnetico, proprio come farebbe un magnete. Ci sono due possibili configurazioni che corrispondono a diversi livelli energetici. Nella configurazione (o stato) di bassa energia il momento magnetico è allineato parallelamente al campo, mentre nella configurazione ad alta energia antiparallelamente al campo (Fig.2.1). L'energia dei due stati dello spin può essere rappresentata da un diagramma dei livelli di energia. Si può dimostrare che la differenza di energia tra i due stati vale:

$$E = h \gamma B$$

dove  $h$  è la costante di Plank ( $6.626 \times 10^{-34}$  Js) e  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico.

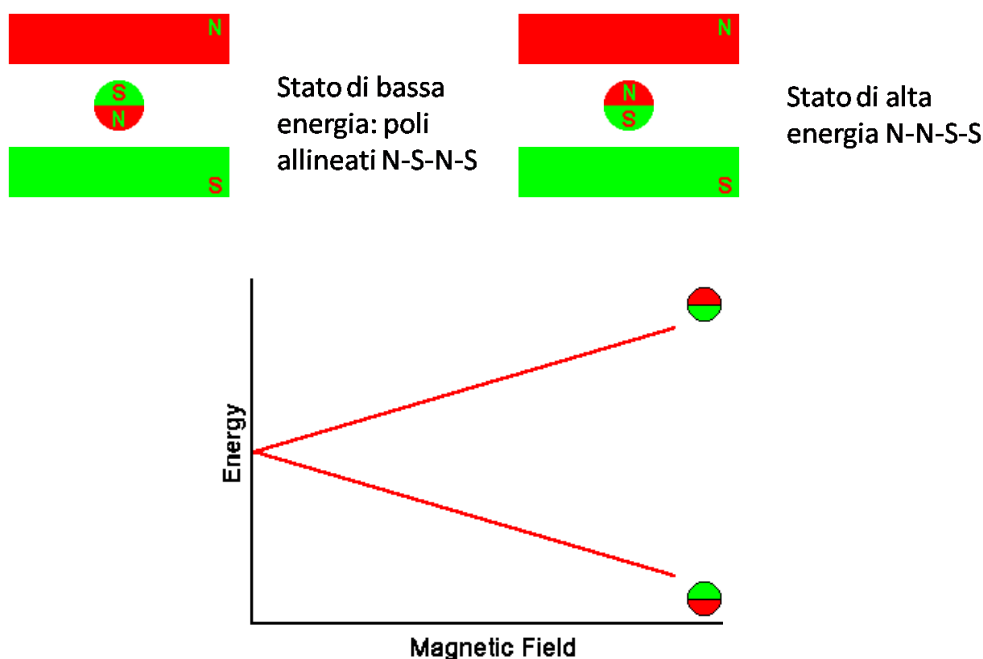


Figura 2.1 Livelli di energia che possono essere assunti dagli spin nei due diversi stati.

È noto dalla meccanica quantistica che un protone può saltare da uno stato di energia ad un altro assorbendo o emettendo un fotone la cui energia ( $E=h\nu$ ) sia esattamente uguale alla differenza di energia tra i due stati:

$$h\nu = h \gamma B_0$$

ovvero:

$$\nu = \gamma B_0$$

Per l'idrogeno,  $\gamma = 42.58 \text{ MHz / T}$ . La frequenza  $\nu$  è detta *frequenza di risonanza o frequenza di Larmor*.

Negli esperimenti NMR la frequenza del fotone si trova nel range delle radiofrequenze (RF). Nella spettroscopia NMR,  $\nu$  è tra i 60 e gli 800 MHz per i nuclei di idrogeno; nell'MRI clinica,  $\nu$  è tipicamente tra 65 e 130 MHz per l'imaging con nuclei di idrogeno.

### 2.3 L'osservazione del fenomeno di risonanza

L'esperimento più semplice che è possibile condurre per rendersi conto dell'esistenza del fenomeno di risonanza è quello cosiddetto a onda continua (Fig.2.2).

Ci sono due modi per eseguirlo. Nel primo, si varia lentamente il campo magnetico cui è sottoposto il campione di spin mentre un segnale RF di frequenza costante esplora i livelli di energia. Quando la differenza di energia tra i due stati di spin del campione è pari all'energia del segnale RF, ha luogo la risonanza e si registra assorbimento di energia da parte del campione. In alternativa, l'esperimento può essere eseguito in un campo magnetico costante, variando la frequenza dell'impulso RF.

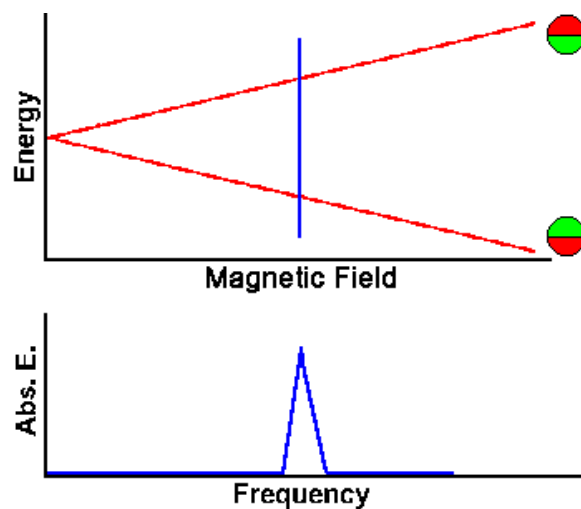


Figura 2.2 Rappresentazione del fenomeno di risonanza.

#### 2.4 Popolazione dei livelli di energia

Quando un gruppo di spin viene immerso in un campo magnetico  $B$ , ciascuno spin si orienta secondo una delle due possibili orientazioni. A temperatura ambiente, il numero degli spin nel livello energetico più basso,  $N_+$ , supera lievemente il numero di quelli nel livello energetico superiore,  $N_-$ .

Il rapporto tra le popolazioni dei due stati di spin è dato dalla statistica di Boltzmann:

$$N_-/N_+ = e^{-\Delta E/kT} = e^{-h \gamma B/kT}$$

dove  $\Delta E$  è la differenza energetica tra gli stati di spin,  $k$  è la costante di Boltzmann,  $1.3805 \times 10^{-23}$  J/Kelvin;  $T$  è la temperatura in gradi Kelvin. Al diminuire della temperatura, il rapporto  $N_-/N_+$  diminuisce; all'aumentare della temperatura, il rapporto si avvicina a 1. Il segnale in risonanza magnetica ha origine dalla differenza tra l'energia assorbita dagli spin che fanno una transizione

dallo stato energetico più basso a quello più alto e l'energia emessa dagli spin che simultaneamente fanno una transizione dal livello energetico più alto a quello più basso. Il segnale è così, proporzionale alla differenza di popolazione tra i due stati. L'NMR ha una discreta sensibilità, dal momento che è in grado di rilevare differenze di popolazioni molto piccole. Quindi la diminuzione della temperatura aumenterebbe il segnale NMR. Tuttavia, questo non può essere usato per gli esseri viventi, per cui per aumentare il segnale si aumenta B. È il fenomeno della risonanza, ovvero lo scambio di energia ad una frequenza specifica tra gli spin e lo spettrometro a fornire all'NMR questa sensibilità. Altri due fattori influenzano il segnale in risonanza magnetica: l'abbondanza naturale dell'isotopo e l'abbondanza biologica. L'abbondanza naturale di un isotopo è la percentuale di nuclei aventi un dato numero di protoni e di neutroni, ovvero un dato peso atomico. Per l'idrogeno, ad esempio, ci sono tre isotopi:  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  e  $^3\text{H}$ . L'abbondanza naturale di  $^1\text{H}$  è del 99.985%, mentre di  $^2\text{H}$  è 0.015%. L'abbondanza biologica è, invece, la percentuale di un determinato tipo di atomo all'interno del corpo umano (idrogeno 0.63).

## 2.5 Magnetizzazione macroscopica

È difficile descrivere l'NMR su scala microscopica. Risulta più conveniente la descrizione macroscopica. Il primo passaggio nello sviluppo della descrizione macroscopica è definire il pacchetto di spin. Il pacchetto di spin è un gruppo di spin che sono soggetti allo stesso campo magnetico. In ogni istante, il campo magnetico dovuto ad ogni pacchetto di spin può essere rappresentato come un vettore di magnetizzazione. L'intensità di ogni vettore di magnetizzazione è proporzionale alla differenza di popolazione tra i due stati di spin ( $N^+ - N^-$ ). La somma vettoriale dei vettori di magnetizzazione provenienti da tutti i pacchetti di spin è la magnetizzazione risultante (o magnetizzazione "netta"). Per descrivere l'imaging di risonanza magnetica è necessario d'ora in poi ragionare in termini di magnetizzazione risultante.

Adottando un sistema di coordinate nel quale l'asse Z è lungo la direzione del campo magnetico esterno (sistema convenzionale di coordinate NMR),

avremo che, all'equilibrio, anche il vettore di magnetizzazione risultante sarà lungo l'asse Z.

## 2.6 Tempi di rilassamento: spin-reticolo ( $T_1$ ) e spin-spin ( $T_2$ )

All'equilibrio, il vettore di magnetizzazione risultante è posizionato lungo la direzione del campo magnetico statico  $B_0$  ed è chiamato magnetizzazione all'equilibrio  $M_0$ . In questa configurazione, la componente Z del vettore di magnetizzazione  $M_Z$  è uguale a  $M_0$ .  $M_Z$  è conosciuta come *magnetizzazione longitudinale*. In questo caso non c'è componente del vettore di magnetizzazione nel piano XY (*magnetizzazione trasversale*  $M_{XY}$ ). È possibile modificare l'intensità del vettore di magnetizzazione risultante esponendo il sistema di spin nucleari ad una onda elettromagnetica di frequenza pari alla differenza di energia tra gli stati degli spin. Se si cede sufficiente energia, è possibile saturare il sistema di spin ed ottenere  $M_Z = 0$ .

Al termine dell'eccitazione il sistema tende a ritornare alla sua condizione di equilibrio. La costante di tempo che descrive il ritorno all'equilibrio della magnetizzazione longitudinale,  $M_Z$ , è chiamata tempo di rilassamento spin-reticolo,  $T_1$ . L'equazione che descrive questo fenomeno in funzione del tempo  $t$  è:

$$M_Z = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$$

$T_1$  è quindi definito come il tempo necessario per far sì che la componente Z del vettore magnetizzazione riacquisti il 63% del suo valore iniziale. Se il vettore di magnetizzazione risultante è posto lungo l'asse -Z, gradualmente ritornerà alla sua posizione di equilibrio sull'asse +Z ad una velocità regolata dal  $T_1$ . L'equazione che descrive questo fenomeno in funzione del tempo  $t$  è:

$$M_Z = M_0 (1 - 2e^{-t/T_1})$$

Ancora una volta, il tempo di rilassamento spin-reticolo ( $T_1$ ) è il tempo necessario a ridurre la differenza tra la magnetizzazione longitudinale ( $M_Z$ ) e il suo valore di equilibrio di un fattore  $e$ .

Se il vettore di magnetizzazione ha una componente non nulla nel piano XY, esso ruoterà attorno all'asse Z ad una frequenza uguale alla frequenza del fotone che ha causato la transizione tra i due livelli di energia. Questa frequenza è chiamata frequenza di Larmor ed il relativo moto di rotazione del vettore di

magnetizzazione, "precessione". Il comportamento delle componenti longitudinali e trasversali del vettore magnetizzazione è descritto matematicamente dalle equazioni di Bloch. Oltre a ruotare, la magnetizzazione risultante comincia a perdere fase poiché ognuno dei pacchetti di spin che la costituiscono è sottoposto ad un campo magnetico leggermente diverso e ruota ad una propria frequenza di Larmor. Più trascorre il tempo, maggiore è la differenza di fase. Per questo e per tutti gli altri casi in cui si parla di perdita di fase, si deve pensare a questo vettore come sovrapposizione di molti vettori più piccoli prodotti dai singoli pacchetti di spin. La costante di tempo che descrive il decadimento della magnetizzazione trasversale,  $M_{XY}$ , è chiamata tempo di rilassamento spin-spin,  $T_2$ .

$$M_{XY} = M_{XY0} e^{-t/T_2}$$

$T_2$  è sempre minore o uguale a  $T_1$ . La magnetizzazione risultante nel piano XY va a zero e allo stesso tempo la magnetizzazione longitudinale cresce finché lungo l'asse Z non si avrà di nuovo il valore  $M_0$ . In altre parole, il tempo di rilassamento spin-spin,  $T_2$ , è il tempo necessario per far sì che la magnetizzazione trasversale si riduca del 63%. Qualsiasi magnetizzazione trasversale si comporta allo stesso modo: ruota attorno alla direzione di applicazione del campo magnetico e perde fase. Il  $T_1$  regola la velocità di recupero della magnetizzazione longitudinale; il  $T_2$  la velocità con cui la magnetizzazione trasversale decade. Nel precedente discorso, per chiarezza, i processi  $T_2$  e  $T_1$  sono stati mostrati separatamente. In realtà, entrambi i processi accadono simultaneamente, con l'unica restrizione che  $T_2$  è sempre minore o al massimo uguale a  $T_1$ . Sono due i fattori che contribuiscono al decadimento della magnetizzazione trasversale:

- 1) interazioni molecolari (che portano ad un effetto detto  $T_2$  *puro*)
- 2) variazioni del campo magnetico statico  $B_0$  (che portano ad un effetto detto  $T_2$  *di disomogeneità di campo*).

La combinazione di questi due fattori è quella che realmente si verifica nel decadimento della magnetizzazione trasversale. La costante di tempo "combinata" è chiamata  $T_2$  *star* ed è contraddistinta dal simbolo  $T_2^*$ . La relazione tra il  $T_2$  derivante da processi molecolari e quello dovuto a disomogeneità di campo magnetico è la seguente:

$$1/T_2^* = 1/T_2 + 1/T_2 \text{ disomog}$$

## 2.7 Sistema di riferimento rotante

Abbiamo appena visto il comportamento degli spin nel sistema di riferimento del laboratorio. Risulta conveniente introdurre un sistema di riferimento rotante attorno all'asse Z alla frequenza di Larmor.

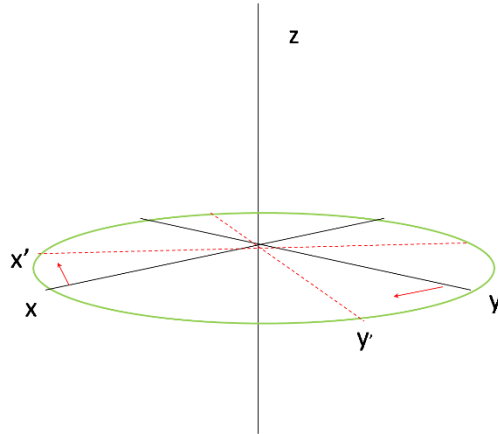


Figura 2.3 Sistema di riferimento rotante attorno all'asse z, alla frequenza di Larmor.

Distinguiamo questo sistema di coordinate che ruota dal sistema del laboratorio dagli apici apposti sui nomi degli assi X e Y, X' Y' (Fig.2.3). Un vettore di magnetizzazione che ruota alla frequenza di Larmor nel sistema del laboratorio appare stazionario in un sistema di riferimento rotante attorno all'asse Z. Nel sistema di riferimento rotante, il rilassamento del vettore di magnetizzazione  $M_z$  al suo valore di equilibrio sarà lo stesso che nel sistema di riferimento del laboratorio. Un vettore di magnetizzazione trasversale che ruota attorno all'asse Z alla stessa velocità del sistema rotante apparirà stazionario in quest'ultimo.

Un vettore di magnetizzazione che viaggia più veloce, rispetto al sistema rotante, ruota in senso orario attorno all'asse Z. Un vettore di magnetizzazione che viaggia più lento, rispetto al sistema rotante, ruota in senso anti-orario attorno all'asse Z. In un campione ci sono pacchetti di spin che viaggiano più velocemente e più lentamente rispetto al sistema rotante e quindi si defasano (Fig.2.4).



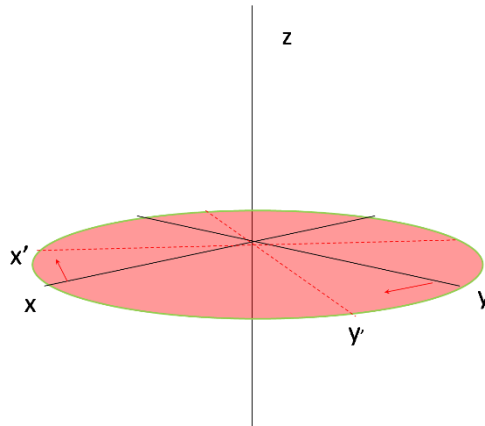


Figura 2.4 Sfasamento dei vettori di magnetizzazione  $M_{x',y'}$  in un sistema di riferimento rotante.

## 2.8 Eccitazione degli spin

Il trasferimento di energia da una sorgente esterna al sistema di spin viene realizzato mediante un campo magnetico variabile nel tempo che opera in aggiunta al campo magnetico statico  $B_0$ . Una spira di filo metallico posta attorno all'asse X quando percorsa da una corrente continua produce un campo magnetico lungo l'asse X. La stessa spira percorsa da una corrente alternata produce invece un campo magnetico che alterna la sua direzione. Nel sistema di riferimento rotante attorno all'asse Z ad una frequenza uguale a quella della corrente alternata, il campo magnetico lungo l'asse X' sarà costante, proprio come nel caso di una corrente continua nel sistema del laboratorio. Lo stesso risultato si otterrebbe muovendo la bobina attorno al sistema di riferimento rotante alla frequenza di Larmor. In risonanza magnetica, il campo magnetico creato dalla bobina attraversata da una corrente alternata alla frequenza di Larmor è chiamato campo magnetico  $B_1$ . Quando la corrente alternata viene accesa e spenta, si crea un campo magnetico pulsato  $B_1$  lungo l'asse X'. Gli spin rispondono a questo impulso con una rotazione del vettore di magnetizzazione attorno alla direzione cui è applicato il campo magnetico  $B_1$ .

L'angolo di rotazione  $\vartheta$  (*flip-angle* in inglese) dipende dall'intervallo di tempo  $\tau$  in cui il campo magnetico  $B_1$  è acceso e dalla sua intensità:

$$\vartheta = 2\pi \gamma B_1 \tau$$

(nei nostri esempi assumeremo  $\tau$  essere molto più piccolo di  $T_1$  e  $T_2$ , in modo da poter trascurare il rilassamento durante il tempo di applicazione dell'impulso).

Un impulso a  $90^\circ$  ruota la magnetizzazione all'equilibrio nel piano  $X'Y'$ . Nel sistema di riferimento del laboratorio la magnetizzazione all'equilibrio descrive una spirale attorno all'asse  $Z$  fino al piano  $XY$  (Fig.2.5). Ci si può ora rendere conto del perché il sistema di riferimento rotante è utile nel descrivere il comportamento della magnetizzazione in risposta ad un campo magnetico pulsato.

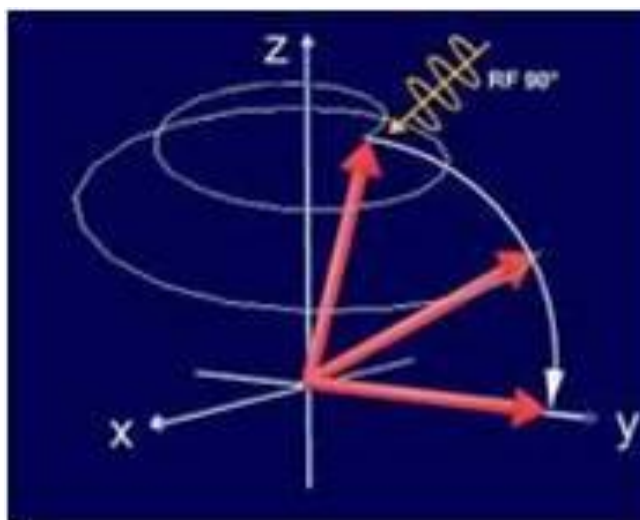


Figura 2.5 L'applicazione di un impulso di RF  $90^\circ$  provoca una rotazione del vettore di magnetizzazione, attorno alla direzione a cui è applicato il campo magnetico, nel piano  $XY$  descrivendo una spirale.

Un impulso a  $180^\circ$  ruota la magnetizzazione all'equilibrio fino all'asse  $-Z$  (anche detto impulso di inversione).

## 2.9 Il segnale NMR nel dominio del tempo (FID)

Il ritorno all'equilibrio del vettore di magnetizzazione di un sistema di spin che ha assorbito un impulso RF genera un segnale che può essere rivelato.

La rotazione del vettore di magnetizzazione trasversale attorno alla direzione del campo magnetico statico  $B_0$  (asse  $Z$ ) induce una corrente nella bobina posizionata attorno all'asse  $X$ . Riportando in un grafico la corrente in funzione del tempo si ottiene un'onda sinusoidale (fig.2.6). Quest'onda decadrà naturalmente secondo la costante di tempo  $T_2^*$  dovuta alla perdita di fase dei pacchetti di spin.

Il segnale originato dal "libero" decadimento della magnetizzazione trasversale è chiamato FID (Free Induction Decay).

## 2.10 La sequenza 90-FID, Spin-Echo ed Echo-Planar Imaging

Per poter rivelare un segnale NMR è necessario che la magnetizzazione di un sistema di spin abbia una componente nel piano perpendicolare alla direzione del campo magnetico statico  $B_0$ . Questa condizione si realizza utilizzando degli impulsi RF. Esponendo il sistema ad una serie di impulsi RF di opportuna intensità e tempo di attivazione (sequenza di impulsi) è possibile produrre un segnale NMR che abbia delle specifiche caratteristiche. Nel semplice caso della sequenza di impulsi 90-FID, un impulso RF a  $90^\circ$  viene usato per ribaltare la magnetizzazione risultante nel piano  $X'Y'$ . Terminato l'impulso, il vettore di magnetizzazione comincia un moto di precessione attorno all'asse  $+Z$ . L'intensità della magnetizzazione trasversale decade con il tempo ed il segnale NMR generato è del tipo FID.

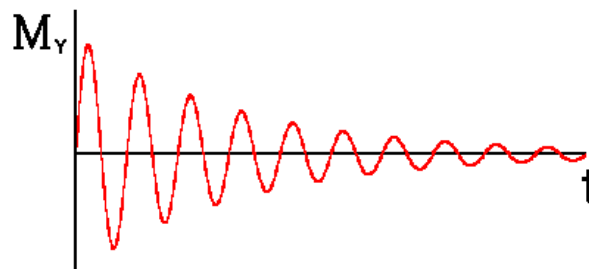


Figura 2.6 Grafico che rappresenta, come onda sinusoidale, la corrente indotta dalla rotazione della magnetizzazione trasversale intorno all'asse Z, in funzione del tempo.

Ogni aspetto di una sequenza di impulsi, in funzione del tempo, può essere descritto da un grafico ad assi multipli detto diagramma temporale. Il diagramma temporale di una sequenza di impulsi 90-FID riporta in funzione del tempo l'energia RF ed il segnale (Fig.2.7).

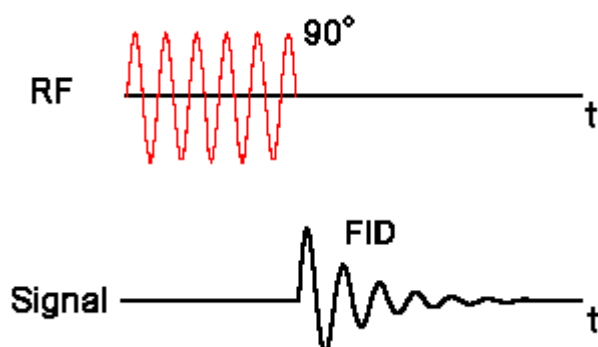


Figura 2.7 Diagramma di una sequenza di impulsi 90-FID che riporta in funzione del tempo l'impulso RF ed il segnale.

Quando questa sequenza viene ripetuta, se per esempio si rende necessario migliorare il rapporto segnale/rumore, l'ampiezza del segnale, dopo aver effettuato la trasformata di Fourier (S), dipenderà dal  $T_1$  e dal tempo che intercorre tra le ripetizioni, chiamato tempo di ripetizione (TR) della sequenza.

$$S = k \rho (1 - e^{-TR/T_1})$$

Nell'equazione del segnale,  $k$  è una costante di proporzionalità e  $\rho$  è la densità degli spin nel campione.

La sequenza di impulsi Spin-Echo (SE) è, invece, comunemente utilizzata per produrre un segnale NMR cosiddetto di echo. Ad un sistema di spin, viene prima applicato un impulso RF a  $90^\circ$  che ribalta la magnetizzazione nel piano  $X'Y'$ ; la magnetizzazione trasversale comincia a perdere fase. Dopo un certo tempo dall'impulso a  $90^\circ$  viene applicato un impulso a  $180^\circ$  (Fig.2.8a). Tale impulso ruota di  $180^\circ$  tutti i pacchetti di spin rispetto all'asse  $X'$  e fa sì che la magnetizzazione, almeno parzialmente, ritorni in fase e produca un segnale chiamato echo (Fig. 2.8b). Il diagramma temporale mostra le relative posizioni dei due impulsi di RF e del segnale.

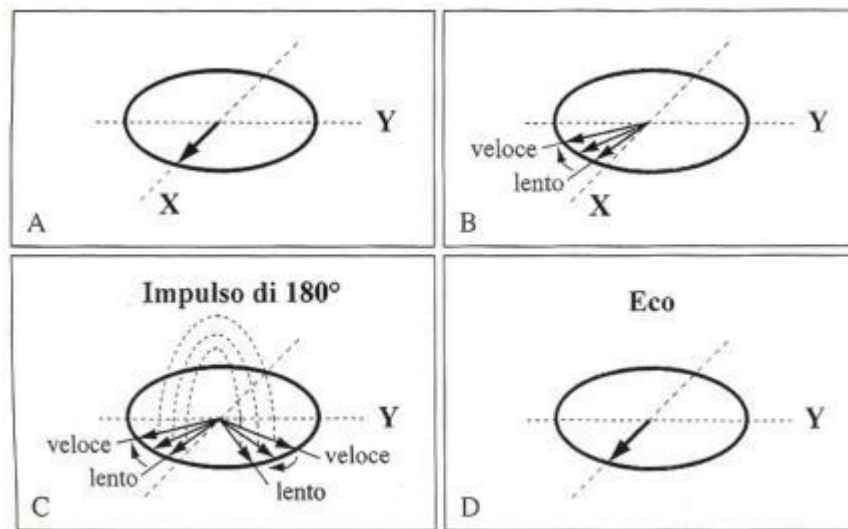
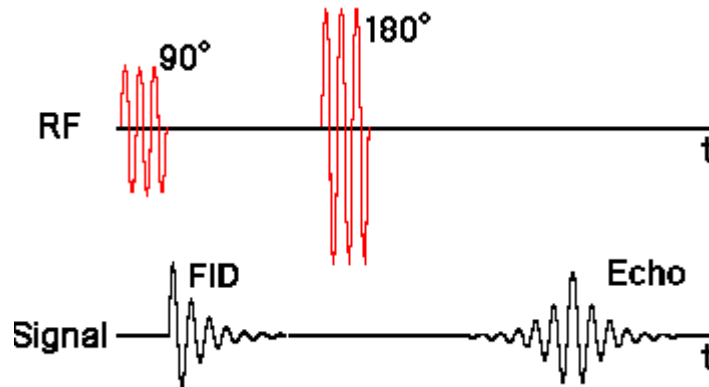


Figura 2.8a-b. In alto (a) il diagramma temporale di una sequenza SE che mostra gli impulsi applicati e i relativi segnali. In basso (b) lo schema di formazione di un segnale di echo.

L'equazione del segnale per una sequenza spin echo ripetuta, espressa in funzione del tempo di ripetizione (TR) e del tempo di echo (TE), definito come il tempo tra un impulso di 90° e la massima ampiezza dell'echo, è:

$$S = k \rho (1 - e^{-TR/T_1}) e^{-TE/T_2}$$

(equazione valida a condizione che il  $TR \gg TE$ ).

Infine, la sequenza EPI (echo-planar imaging) si basa sulla sequenza gradient-echo in cui vengono acquisiti echo multipli, ognuno con una diversa codifica di fase. Dopo un impulso a radio frequenza, viene applicato un gradiente di defasamento sull'asse di lettura contemporaneamente al gradiente di codifica di fase. Dopo questi due gradienti, viene applicato il primo gradiente di lettura. Nel centro del gradiente di lettura, si forma un echo corrispondente ad una linea ad

un'estremità del k-spazio. Finito il gradiente di lettura viene applicato un piccolo gradiente di codifica di fase (chiamato blip) seguito da un altro gradiente di lettura a polarità invertita. Questo secondo gradiente leggerà la riga successiva del k-spazio in direzione opposta. La stessa sequenza blip-lettura viene ripetuta fino all'acquisizione di tutto il k-spazio.

## 2.11 Principi di Imaging: gradienti di campo magnetico

Come descritto in precedenza, l'MRI è una modalità di imaging usata principalmente per costruire immagini a partire dal segnale NMR proveniente dai nuclei degli atomi di idrogeno dell'oggetto esaminato. Nell'MRI per scopi di diagnostica medica i radiologi "osservano" dunque il segnale NMR principalmente proveniente da acqua e grasso, essendo questi i costituenti del corpo umano che contengono le maggiori quantità di idrogeno. Il principio su cui si basa l'imaging MRI è l'equazione di risonanza usata in precedenza, che lega con una relazione di proporzionalità la frequenza di risonanza  $\nu$  di uno spin al campo magnetico  $B_0$  cui questo è sottoposto:

$$\nu = \gamma B_0.$$

Supponiamo, per esempio, che una testa umana contenga solo tre piccole regioni distinte in cui c'è densità di spin di idrogeno (è chiaramente una schematizzazione poiché nella realtà l'intera testa genererebbe un segnale NMR). Quando queste regioni di spin subiscono la stessa intensità di campo magnetico, nello spettro NMR ritroviamo un solo picco. Per riuscire ad individuare la posizione di ciascuna regione nello spazio è necessario trovare un modo che ci permetta di "codificare" nel segnale l'informazione sulla posizione. Un gradiente di campo magnetico è quello che ci permetterà di fare questo.

Un gradiente di campo magnetico è una variazione del campo magnetico rispetto alla posizione. Un gradiente mono-direzionale è una variazione rispetto ad una direzione, mentre un gradiente bi-direzionale è una variazione rispetto a due direzioni. Il tipo di gradiente più utile nell'MRI è un gradiente di campo magnetico lineare mono-direzionale. Un gradiente di campo magnetico mono-direzionale lungo l'asse  $x$  in un campo magnetico  $B_0$  indica che il campo magnetico va aumentando lungo la direzione  $x$ , secondo la formula:

$$B = B_0 + GX$$

con G detto gradiente ed espresso in T/m. Ricordando la relazione di risonanza  $\nu = \gamma B$ , otteniamo:

$$\nu = \gamma B = \gamma(B_0 + G_x x) = \gamma B_0 + \gamma G_x x = \nu_0 + \gamma G_x x$$

In altre parole, la frequenza di risonanza viene a dipendere dalla posizione spaziale degli spin. L'analisi delle frequenze contenute nel segnale NMR (attraverso un'operazione matematica chiamata trasformata di Fourier) permette allora di estrarre l'informazione spaziale sulla posizione degli spin. Se questa operazione viene ripetuta nelle tre direzioni spaziali, è possibile ottenere la mappa completa della distribuzione degli spin (Fig.2.9), cioè in altre parole un'immagine. I simboli per un gradiente di campo magnetico nelle direzioni x, y, z sono rispettivamente  $G_x$ ,  $G_y$  e  $G_z$ .

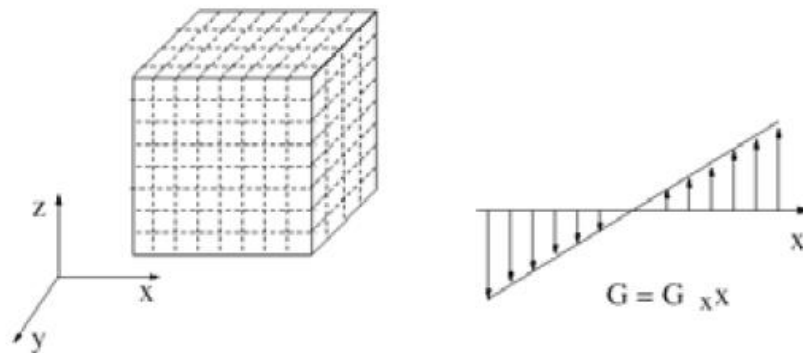


Figura 2.9 Distribuzione spaziale degli spin nelle tre direzioni X, Y e Z.

## 2.12 Meccanismi di contrasto endogeni

Il segnale RM dipende dai parametri  $T_1$ ,  $T_2$ , e dal numero totale di protoni provvisti di spin per unità di volume (densità protonica – DP). Scegliendo opportunamente la sequenza di impulsi RF è possibile imporre al sistema di spin una determinata dinamica, così da ottenere l'informazione dal segnale RM. I parametri che influenzano il risultato dell'immagine sono i tempi  $TR$  (*Tempo di Ripetizione*) e  $TE$  (*Tempo di Echo*) che possono essere lunghi o brevi. Mediante la combinazione di  $TR$  e  $TE$  lunghi o brevi, si avranno immagini pesate in  $T_1$ , in  $T_2$  o in DP.

Il  $T_1$  o *tempo di rilassamento longitudinale* è una misura del tempo richiesto ai protoni per tornare alle condizioni di equilibrio iniziale, grazie alla

cessione di energia al microambiente circostante (reticolo). Per ottenere una sequenza SE  $T_1$ -pesata, si usa un TR breve associato ad un TE breve (Fig. 2.10). La velocità del  $T_1$  dipende da numerosi fattori, tra cui l'intensità del campo  $B_0$  (cresce all'aumentare di questo) e le dimensioni delle molecole (ad esempio, il DNA o i liquidi hanno un  $T_1$  lungo, i lipidi breve). Mediamente, i tessuti viventi immersi in un campo magnetico di intensità 0.1-0.5 T hanno un  $T_1$  compreso tra 300 e 700 millisecondi. Nelle immagini  $T_1$ -pesate il liquido cefalo-rachidiano è scuro mentre il grasso è brillante. Le strutture del SNC (sostanza bianca e grigia) hanno dei segnali di intensità intermedia.

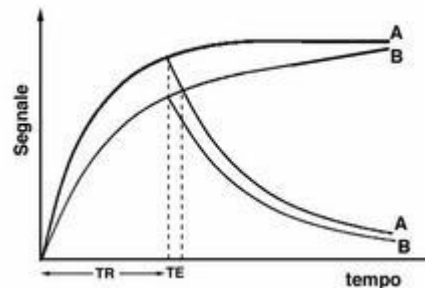


Figura 2.10 Temporizzazione di una sequenza SE- $T_1$  pesata su due tessuti A e B con diverso  $T_1$ .

Il  $T_2$  o *tempo di rilassamento trasversale* è una misura del tempo impiegato dallo spin dei protoni per desincronizzarsi. Questa progressiva desincronizzazione determina l'annullamento della magnetizzazione trasversale (nel piano X-Y, perpendicolare ai piani che attraversano Z). Per ottenere una sequenza SE  $T_2$ -pesata, si usa un TR lungo associato ad un TE lungo (Fig.2.11). L'efficienza di  $T_2$  dipende da vari fattori come ad esempio le dimensioni delle molecole: più la molecola è piccola più lungo sarà il tempo di desincronizzazione; grosse molecole hanno  $T_2$  più brevi. L'acqua ha, quindi, un  $T_2$  lungo. Nei tessuti biologici il  $T_2$  è compreso tra 50 e 150 millisecondi. A differenza del  $T_1$ , il  $T_2$  è poco influenzato dall'intensità di  $B_0$ . I liquidi o, comunque, i tessuti molto idratati, appaiono chiari nelle immagini  $T_2$ -pesate.



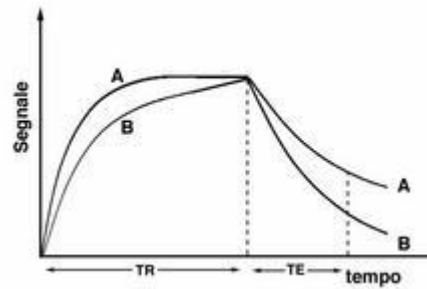


Figura 2.11 Temporizzazione di una sequenza SE T<sub>2</sub>-pesata su due tessuti A e B con diverso T<sub>2</sub>.

La densità dei protoni provvisti di spin ed in precessione in un determinato volume è, infine, alla base della formazione delle immagini dette appunto di Densità Protonica (DP). Per ottenere una sequenza SE DP-pesata, si usa un TR lungo associato ad un TE breve (Fig. 2.12). Le immagini DP presentano una risoluzione di contrasto molto inferiore alle immagini T<sub>1</sub> o T<sub>2</sub> pesate, in quanto tessuti anche molto diversi tra loro possono presentare una densità protonica simile.

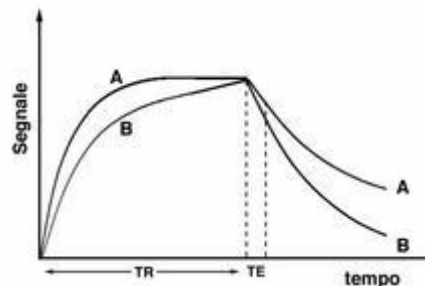


Figura 2.12 Temporizzazione di una sequenza SE-DP-pesata su due tessuti A e B.

### 2.13 Mezzi di contrasto

Nelle immagini MRI si definisce CNR (Contrast to Noise Ratio) tra due zone di intensità di segnale  $SI_1$  e  $SI_2$ , il rapporto  $CNR = |SI_1 - SI_2| / \sigma$ , dove  $\sigma$  è la deviazione standard del rumore di fondo.

Un mezzo di contrasto (m.d.c) è una sostanza che viene introdotta nel corpo per aumentare il CNR tra i tessuti. I mezzi di contrasto sono principalmente costituiti da sostanze paramagnetiche, ma possono essere utilizzate anche sostanze ferromagnetiche. Con meccanismi di azione differenti questi due tipi di sostanze agiscono sui tempi di rilassamento dell'acqua.

Le sostanze ferromagnetiche modificano il contrasto dei tessuti modificando nel loro intorno il campo magnetico  $B_0$  e di conseguenza il  $T_2^*$  delle molecole di acqua dei tessuti nei quali la sostanza va a distribuirsi. Agenti di contrasto ferromagnetici sono tipicamente nanoparticelle di ferro legate a un substrato organico. Le sostanze paramagnetiche modificano il contrasto creando campi magnetici variabili nel tempo che stimolano il rilassamento spin-reticolo e spin-spin delle molecole di acqua. All'origine di questi campi magnetici variabili nel tempo vi sono i moti rotazionali delle molecole del mezzo di contrasto e le transizioni tra gli stati di spin degli elettroni spaiati della sostanza paramagnetica. Campi magnetici a frequenza  $\nu$  e  $2\nu$  inducono una diminuzione del  $T_1$  mentre quelli a frequenza  $< 2\nu$  inducono una diminuzione del  $T_2$ . Un tipico mezzo di contrasto paramagnetico è un complesso di un metallo paramagnetico come il manganese ( $Mn^{+2}$ ), il ferro ( $Fe^{+3}$ ) o il gadolinio ( $Gd^{+3}$ ). Questi ioni non possono essere somministrati in quanto tali a causa della loro elevata tossicità, quindi vengono complessati ad opportuni leganti che ne diminuiscono la tossicità stessa. Il Gadolinio è attualmente l'elemento più usato per i mezzi di contrasto. Esso ha uno spin elettronico di  $7/2$  e quindi ha ben 7 elettroni spaiati che stimolano il rilassamento degli spin tramite transizioni e moti rotazionali. La variazione indotta dal mezzo di contrasto nei tempi di rilassamento  $T_1$  o  $T_2$  dell'acqua, o del tessuto, per unità di concentrazione si definisce *relattività* ( $r_1$  o  $r_2$ ). La relazione matematica che lega  $T_1$ ,  $r_1$ , e la concentrazione di mezzo di contrasto paramagnetico è la seguente:

$$1/T_{i \text{ (post m.d.c.)}} = 1/T_{i \text{ (pre m.d.c.)}} + r_i [\text{Gd}] \quad i=1,2$$

I valori di relattività sono generalmente espressi per un dato valore del campo magnetico  $B_0$  ed una data temperatura.

## 2.14 L'hardware di un sistema di imaging a risonanza magnetica

Forniamo ora una panoramica su quelli che sono i componenti di un tomografo per MRI.

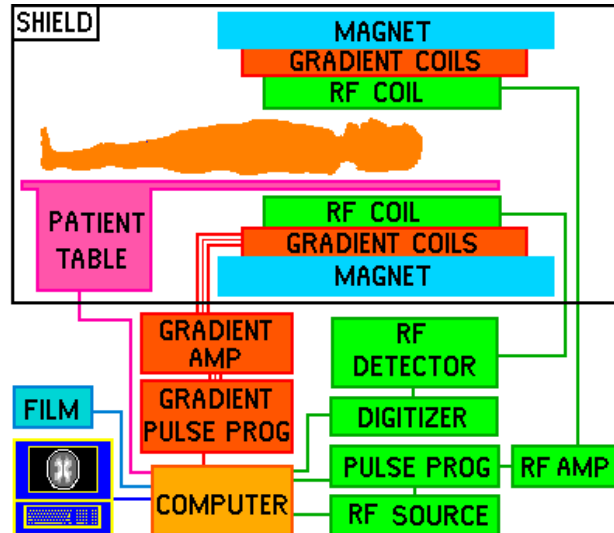


Figura 2.13 Componenti di un tomografo per MRI.

Un sistema di imaging a risonanza magnetica è principalmente costituito da: un magnete; tre generatori di campi magnetici di intensità variabile nello spazio e nel tempo (gradienti); un sistema generatore/ricevitore di radiofrequenze; un sistema computerizzato in grado di controllare tutti i componenti, calcolare e visualizzare le immagini e i dati MRI, gestire l'archiviazione, la stampa ed il trasferimento degli studi (Fig.2.13). Il magnete produce il campo magnetico statico  $B_0$  necessario per la procedura di formazione delle immagini. All'interno del magnete ci sono delle bobine per produrre dei gradienti di campo  $B_0$  nelle direzioni X, Y e Z. Dentro le bobine di gradiente troviamo la bobina di radiofrequenza (RF) che produce il campo magnetico  $B_1$  necessario per far ruotare gli spin di  $90^\circ$ ,  $180^\circ$  o di un qualsiasi altro angolo specificato dalla sequenza di impulsi. La bobina di RF, inoltre, riceve il segnale proveniente dagli spin presenti all'interno del corpo. Il paziente viene posizionato all'interno del magnete per mezzo di un lettino controllato da un computer con un'accuratezza millimetrica. La stanza dove ha luogo la scansione è circondata da uno schermo per radiofrequenze la cui funzione è quella di evitare che segnali RF provenienti da stazioni televisive e postazioni radio possano essere captati dall'apparecchio. Solitamente, le stanze di scansione sono circondate anche da uno schermo

magnetico che impedisce al campo magnetico statico di estendersi al di fuori di un certo limite. Nei magneti più recenti questo schermo è parte integrante del magnete stesso (magneti autoschermati). Il controllo dell'apparecchiatura di risonanza magnetica e di tutti i suoi componenti è effettuato con un computer. I componenti della sezione RF controllati da computer sono la sorgente RF e il programmatore di impulsi. La sorgente produce un'onda sinusoidale della frequenza desiderata. Il programmatore di impulsi conferisce la forma desiderata agli impulsi RF. L'amplificatore di RF aumenta la potenza degli impulsi dai milliwatt ai kilowatt. Il computer controlla anche il programmatore degli impulsi di gradiente stabilendo la forma e l'ampiezza di ciascuno dei tre gradienti di campo. L'amplificatore dei gradienti aumenta la potenza degli impulsi di gradiente a un livello sufficiente per "pilotare" le relative bobine. Le sequenze per imaging vengono selezionate e personalizzate dall'operatore attraverso una postazione di comando (consolle).

#### 2.14.1 Il magnete



Figura 2.14 Tomografo Bruker Biospec 4.7 T del laboratorio di Risonanza Magnetica (Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento) dell'Università di Verona.

Il magnete è il componente più costoso del sistema di imaging a risonanza magnetica. I magneti più diffusi sono quelli di tipo superconduttore, ovvero costituiti da elettromagneti costruiti con conduttori che hanno una resistenza elettrica quasi uguale a zero quando sono raffreddati a una temperatura prossima allo zero assoluto ( $-273.15\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $0\text{K}$ ) mediante immersione in elio liquido. Quando l'avvolgimento viene percorso da una corrente elettrica, questa percorre l'avvolgimento senza perdite fintantoché il conduttore viene tenuto alla temperatura dell'elio liquido (in realtà, alcune perdite nel tempo dell'ordine di una parte per milione del campo magnetico principale per anno si verificano e sono dovute alla resistenza infinitamente piccola dell'avvolgimento). La lunghezza del filo di superconduttore del magnete è tipicamente di molti chilometri. L'avvolgimento di filo è tenuto ad una temperatura di  $4.2\text{K}$  mediante immersione in elio liquido. L'avvolgimento e l'elio liquido sono contenuti in un grande dewar. Il volume tipico di elio liquido in un magnete per imaging è di circa 1500 litri. Nei primi modelli di magneti questo dewar era circondato tipicamente da azoto liquido ( $77.4\text{K}$ ) che si comportava come un termos tra la temperatura della stanza ( $293\text{K}$ ) e l'elio liquido. Nei magneti di generazione successiva, la regione dell'azoto liquido è stata sostituita da un dewar raffreddato da un frigorifero. Questo modello elimina la necessità di aggiungere azoto liquido al magnete ed aumenta la tenuta dell'elio liquido. Sono attualmente in fase di studio magneti che non richiedono elio liquido. I magneti autoschermati hanno dei bassi valori di campo magnetico "ai bordi". Ad una distanza di 4 metri dal magnete esibiscono tipicamente valori di campo magnetico dell'ordine di  $0.5\text{ mT}$  ( $5\text{ gauss}$ ). Questa indicazione è importante per motivi di sicurezza e semplifica l'installazione dell'apparecchiatura. L'effetto di schermo è realizzato mediante un secondo set di avvolgimenti superconduttori nei quali la corrente fluisce in verso opposto.

## 2.14.2 Bobine di radiofrequenza



Figura 2.15a-b. In alto (a) le bobine di volume utilizzate in laboratorio, da sinistra rispettivamente di 15.4 cm di diametro, 7.2 cm e 3.5 cm. In basso (b) le bobine di superficie adatte, rispettivamente, per la testa del ratto (le prime due a sx) e per la testa del topo.

Le bobine di radiofrequenza (RF) creano il campo magnetico  $B_1$  che, in una sequenza di impulsi, ruota la magnetizzazione risultante di un certo angolo rispetto all'asse Z (flip angle). Rivelano, inoltre, la magnetizzazione trasversale e come essa si muove di moto di precessione nel piano XY. Le bobine di RF possono essere divise in tre categorie generali: 1) bobine trasmettenti e riceventi, 2) bobine solamente riceventi e 3) bobine solamente trasmettenti. Le bobine che trasmettono e ricevono servono come trasmettitori dei campi  $B_1$  e ricevitori dell'energia di RF proveniente dall'oggetto esaminato. Una bobina di sola trasmissione è usata per creare il campo  $B_1$  e una bobina solo ricevente è usata in congiunzione con essa per captare o ricevere il segnale dagli spin dell'oggetto esaminato.

Per ciascun tipo di bobina esistono molte varianti che possiamo paragonare ai diversi tipi di lente di una macchina fotografica: così come un buon fotografo può disporre di molte lenti e utilizzare una lente per un oggetto in primo piano diversa da quella per un oggetto a distanza, così una buona risonanza avrà molte bobine per gestire le molteplici esigenze diagnostiche. Una bobina deve risuonare o produrre energia in maniera efficiente alla frequenza di Larmor. Tutte le bobine sono composte di un induttore, o elementi induttivi, e un set di elementi capacitivi. La frequenza di risonanza  $\nu$  di una bobina RF è determinata dall'induttanza (L) dell'induttore e dalla capacità (C) del condensatore.

$$\nu = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$$

Chiaramente la frequenza di risonanza delle bobine deve essere uguale alla frequenza di Larmor. Un altro requisito di una bobina per imaging è che il campo  $B_1$  deve essere perpendicolare al campo magnetico statico  $B_0$ . Esistono molti tipi di bobine per imaging. Le bobine di volume circondano l'oggetto da esaminare mentre le bobine di superficie sono poste in prossimità della parte esaminata (Fig.2.15a). Le bobine di superficie sono largamente utilizzate perché sono bobine solo riceventi e hanno un buon rapporto segnale-rumore per tessuti vicini alla bobina (Fig.2.15b). In generale, la sensibilità di una bobina di superficie decresce al crescere della distanza dalla bobina. La bobina a gabbia di uccello è quella maggiormente utilizzata come bobina di volume ed è la bobina di scelta per gli studi cerebrali. La bobina a singola spira è utile per creare immagini delle estremità, come le mammelle e il polso.

### **3. Tecniche MRI e modelli sperimentali utilizzati**

#### **3.1 Imaging funzionale**

La risonanza magnetica funzionale si basa sulla proprietà di alcuni tipi di immagini MRI di essere sensibili ad alcuni processi biofisici che possono essere direttamente o indirettamente correlati all'attività neuronale. Questo è stato reso possibile dalla scoperta dell'effetto BOLD (dall'inglese blood oxygen level dependent) avvenuta nei primi anni novanta da parte di Ogawa e dei suoi collaboratori (Ogawa et al, 1990). Questo capitolo descrive brevemente le fondamenta neurofisiologiche dell'effetto BOLD, ed introduce alla misurazione dei parametri emodinamici (CBV) come un'alternativa vantaggiosa alla fMRI con BOLD nell'imaging funzionale del cervello nei piccoli animali.

##### **3.1.1 Dall'attività neuronale all'emodinamica**

L'elemento fondamentale dell'elaborazione delle informazioni nel cervello umano è il neurone. Queste cellule esercitano il loro compito di trasmissione dell'informazione attraverso cambiamenti del potenziale di membrana, portando al rilascio sinaptico di neurotrasmettitori. Il cambiamento di potenziale di membrana è la conseguenza del movimento di ioni attraverso le membrane dei neuroni, un processo che prende la tipica forma di una "depolarizzazione" diffusa attraverso gli assoni neuronali e conosciuta come "potenziale d'azione". I potenziali d'azione scendono lungo l'assone autopropagandosi fino al raggiungimento della sinapsi dove innescano il rilascio dei neurotrasmettitori. La generazione dei potenziali d'azione non richiede in sé energia, dal momento che gli ioni si muovono attraverso un gradiente di concentrazione transmembrana. Ad ogni modo, il ripristino dei gradienti di concentrazione in neuroni attivi richiede un livello di energia significativo (Fig.3.1), un aspetto che sottolinea la grande richiesta metabolica del cervello.



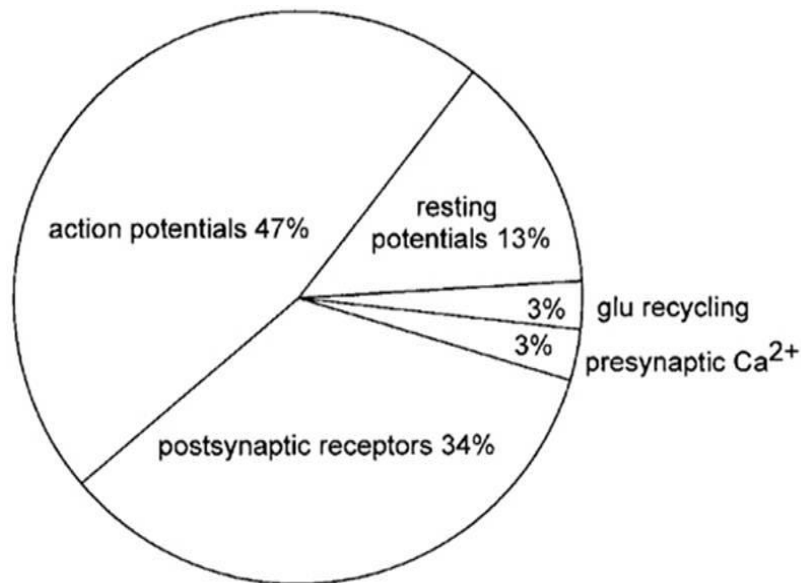


Figura 3.1 Bilancio energetico di un cervello di ratto (Attwell and Laughlin, 2001); la maggior parte della richiesta di energia è data dalla necessità di ripristinare i gradienti di concentrazione ionici.

Quando il cervello viene privato di significative scorte energetiche a livello locale, i metaboliti primari (glucosio e ossigeno) richiesti dai neuroni attivi vengono direttamente forniti dal sistema vascolare; una stretta connessione tra attività neuronale e distribuzione vascolare di glucosio e ossigeno assicura la richiesta metabolica dei neuroni attivi che si riscontra in una gamma molto ampia di condizioni omeostatiche. La presenza di una stretta connessione tra meccanismo neurometabolico e neurovascolare definisce la relazione fisiologica fondamentale alla base di ogni forma di neuroimaging funzionale: le misure dell'attività neuronale correlate al sistema metabolico o vascolare possono essere usate per trarre conclusioni in merito allo stato funzionale del cervello. Un'importante implicazione del meccanismo di connessione neurovascolare è il cambiamento locale nel sistema micro vascolare del cervello in risposta all'attività neuronale. Questo fenomeno, conosciuto come "risposta emodinamica", si presenta tipicamente come un aumento del flusso sanguigno nelle aree con elevata attività neuronale. Questi cambiamenti di flusso sanguigno che accompagnano l'attività neuronale si ritiene che abbiano inizio quando i neuroni attivi rilasciano sostanze che diffondono verso i vasi sanguigni limitrofi. Queste sostanze

vasoattive causano la dilatazione del vaso, riducendone la resistenza nei confronti del flusso e producendo un aumento del flusso stesso.

Molte sostanze sono state identificate come cruciali nel controllo locale del flusso sanguigno, come ad esempio gli ioni  $k^+$ , le adenosine e l'ossido nitrico (Dirnagl et al., 1994; Paulson and Newman, 1987). Quest'ultima sostanza dovrebbe servire da mediatore tra la vasodilatazione locale e distale, attraverso una propagazione approssimativamente simile a quella del potenziale neuronale (Iadecola et al, 1997). Topi che mancano geneticamente di un enzima responsabile della produzione di ossido nitrico mostrano una risposta emodinamica molto attenuata, confermando così il ruolo di questa molecola nell'attivazione dell'aumento del flusso sanguigno attraverso il controllo a monte delle arteriole (Yang et al., 2003).

Comunque, anche altri componenti giocano un ruolo nella cascata di attivazione neuro vascolare e, va notato, che un modello generalmente accettato che dimostri gli specifici eventi neurovascolari alla base della risposta emodinamica, manca ancora. L'effetto maggiore e più probabile dell'aumento di flusso sanguigno è la regolarizzazione del flusso stesso. Studi sui capillari in condizioni basali hanno mostrato una eterogeneità marcata della velocità del flusso attraverso ogni singolo capillare. Durante la stimolazione neuronale, la distribuzione delle velocità del flusso ha mostrato una tendenza a diventare man mano più uniforme. Questo processo è accompagnato da una leggera distensione dei capillari, che porta ad una diminuzione della resistenza al flusso e ad un aumento del flusso e del volume sanguigno nel letto capillare (Ibayashi et al, 1988; Ngai et al., 1995; Hudetz et al, 1997). La distensione aumenta quindi la superficie di ogni singolo capillare, massimizzando così l'efficienza del trasporto di ossigeno e glucosio. Questo fenomeno fornisce anche le basi per la misurazione del volume di sangue dei capillari cerebrali (CBV) come correlazione all'attività neuronale. Al fine di apprezzare meglio i vantaggi dati dall'uso di un singolo parametro emodinamico come il CBV rispetto al BOLD convenzionale, parliamo ora del contrasto BOLD e dei suoi componenti emodinamici.

### 3.1.2 Il contrasto dipendente dal livello di ossigeno del sangue (BOLD)

La grande maggioranza degli studi di fMRI sono basati su un meccanismo di contrasto endogeno conosciuto come “contrasto dipendente dal livello di ossigenazione del sangue” (BOLD). L'emoglobina, la proteina del sangue responsabile del trasporto e della distribuzione dell'ossigeno, mostra proprietà magnetiche differenti a seconda che sia o meno legata all'ossigeno.

L'emoglobina ossigenata (Hb) è diamagnetica (non presenta elettroni spaiati ed ha un momento magnetico pari a zero) mentre l'emoglobina deossigenata (dHb) è paramagnetica, cioè presenta elettroni spaiati e quindi un momento magnetico significativo. Una conseguenza cruciale di ciò è che il sangue non ossigenato ha una suscettibilità magnetica di gran lunga maggiore rispetto al sangue ossigenato. Questo aspetto era stato verificato a livello sperimentale da Thulborn e colleghi nel 1982, il quale scoprì che il decadimento della magnetizzazione trasversale dipendeva dalla proporzione di emoglobina ossigenata (Thulborn et al, 1982).

Gli autori avevano anche notato che la grandezza di questo effetto incrementava con il quadrato dell'intensità del campo magnetico statico, un primo cenno sperimentale alla corsa per campi alti che caratterizza il moderno BOLD fMRI. Questi risultati hanno creato la base teorica per la misurazione delle variazioni dell'ossigenazione del sangue utilizzando la MRI in vivo.

Nel corso degli ultimi anni 80, Ogawa e colleghi (Ogawa et al, 1990) hanno studiato la possibilità di sfruttare le proprietà magnetiche dell'emoglobina per studiare la fisiologia del cervello utilizzando la MRI. Tramite la manipolazione della proporzione di ossigeno fatto respirare ad animali da laboratorio ed utilizzando immagini Gradient-Echo, gli autori sono stati in grado di visualizzare i vasi sanguigni della corteccia cerebrale di roditori vivi, un effetto presente solo in condizioni di ipossia, come conseguenza dell'aumentata presenza di dHb nel sangue.

Questi risultati hanno dimostrato che la presenza di sangue deossigenato diminuisce il segnale misurato in immagini T2\*, rispetto alla presenza di sangue ossigenato. Gli autori hanno supposto che questa scoperta, che si sarebbe

chiamata contrasto BOLD, avrebbe permesso la misurazione dei cambiamenti funzionali nel cervello.

In conseguenza agli esperimenti in vivo, Ogawa e i suoi colleghi furono in grado di dimostrare, tramite l'utilizzo di misurazioni BOLD a livelli diversi di anestesia generale, che la richiesta metabolica di ossigeno era un pre-requisito necessario per il contrasto BOLD (Ogawa et al, 1990).

Inoltre hanno osservato che l'aumento della velocità del sangue ottenuta attraverso l'aggiunta di un vasodilatatore come l'anidride carbonica alla miscela di respirazione, riduceva significativamente il contrasto BOLD (Ogawa et al, 1990). In generale (Fig.3.2), la pionieristica ricerca condotta da Ogawa ha messo in evidenza che il contrasto BOLD dipende dal livello della quantità totale di Hb deossigenata in una determinata regione del cervello, la quale, a sua volta, dipendeva dall'equilibrio tra consumo di ossigeno (metabolismo) e scorta di ossigeno (flusso sanguigno e volume).

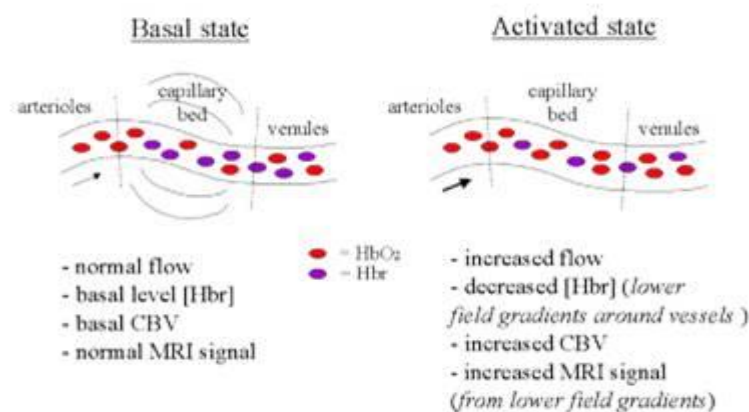


Figura 3.2 Visione generale del meccanismo BOLD e delle variabili a cui è collegato: in condizioni basali (a sinistra) vi è un equilibrio tra la presenza di Hb ossigenata e deossigenata, mentre in condizioni di maggior richiesta di ossigeno (stato attivato, a destra) l'aumento iniziale di Hb deossigenata provoca, a sua volta, un aumento del flusso e volume sanguigno, e quindi di Hb ossigenata (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/education/fmri/brief-introduction-to-fmri-physiology/>).

I primi studi sul fMRI BOLD condotti sugli uomini risalgono al 1992 grazie a tre gruppi. Kwong e colleghi utilizzarono sequenze EPI a 1.5T, e

dimostrarono che il segnale BOLD regione-specifico aumentava nella corteccia visiva ogni volta in cui si presentava uno stimolo visivo (Kwong et al, 1992). Queste scoperte vennero ripetute da uno studio simile pubblicato da Ogawa et al, il quale allo stesso modo misurava i cambiamenti di segnale in sequenze gradient-echo che risultavano dalla presentazione di stimoli di lunga durata (Ogawa et al., 1992). Gli autori hanno anche dimostrato che il segnale dipendeva dal T2\*, dal momento che cambiando il TE erano in grado di far sparire gli effetti dello stimolo.

Risultati simili sono stati riportati da Bandettini (Bandettini et al, 1992) che utilizzò uno stimolo motorio. La pubblicazione di questi studi pionieristici suscitò un grande interesse rispetto a questo metodo, che si diffuse rapidamente e su larga scala. Questi fattori, in congiunzione all'incrementata diffusione di strumenti MRI ed allo sviluppo di sequenze di impulso ad alta velocità, prepararono il terreno per la crescita esponenziale della fMRI tra i primi anni 90 ad oggi.

### 3.1.3 I componenti della risposta emodinamica del BOLD

Il cambiamento del segnale di risonanza magnetica innescato dall'attività neuronale è conosciuto come risposta emodinamica (dall'inglese Haemodynamic response, HDR).

Molte ricerche hanno studiato la natura e l'evoluzione della risposta emodinamica prodotta da differenti stimoli. I risultati di queste ricerche hanno evidenziato una dinamica complessa tra eventi neuronali che innescano la HDR e la forma che assume. Per esempio la risposta neuronale della corteccia avviene dopo decine di millisecondi dallo stimolo sensoriale, ma la prima variazione di HDR visibile non avviene prima di 1 o 2 secondi più tardi (Logothetis et al, 2001). Di conseguenza, si dice che la HDR "è in ritardo" rispetto agli eventi neuronali che l'hanno iniziata. L'andamento temporale della HDR può essere spiegato meglio quando è messo a confronto con quella delle sue componenti individuali (CBV, dall'inglese cerebral blood volume e CBF, dall'inglese cerebral blood flow).

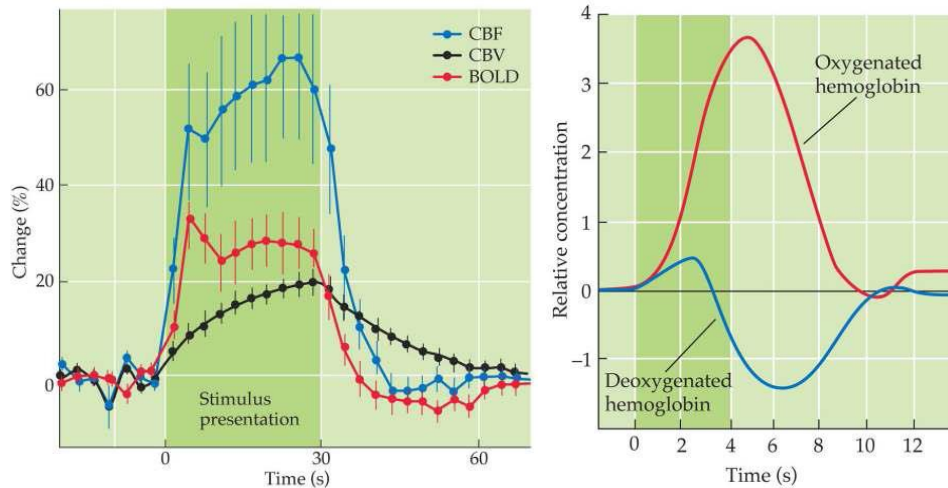


Figura 3.3 A sinistra, viene riportata la dipendenza dal tempo della risposta emodinamica BOLD e i corrispondenti cambiamenti nel CBF e CBV in seguito a stimolazione somatosensoriale dell'attività neuronale con stimolazione della zampa nel ratto (Mandeville et al, 1998). A destra, utilizzando un paradigma simile, Malonek et al (Malonek and Grinvald, 1996) hanno misurato l'evoluzione temporale della concentrazione di Hb ossigenata e deossigenata in seguito ad un breve stimolo sensoriale (4s). ("Probing brain function with pharmacological MRI", Ph.D tesi di Alessandro Gozzi.)

Nella figura 3.3 si nota proprio questo confronto nella corteccia somatosensoriale del ratto sotto stimolazione della zampa (Mandeville et al, 1998). Inoltre viene descritto il cambiamento nel tempo della concentrazione di emoglobina e di emoglobina deossigenata in un analogo paradigma di stimolazione (Malonek and Grinvald, 1996). Mettendo a confronto le due figure, possiamo dedurre le caratteristiche complessive di una tipica HDR: dopo un breve periodo di latenza, aumenta la domanda metabolica grazie all'aumentata attività neuronale che supera i livelli base. Questo aumento porta ad un incremento del flusso sanguigno ossigenato (aumento CBF). I cambiamenti riscontrati nella concentrazione dell'emoglobina e dell'emoglobina de-ossigenata sono significativamente differenti: la curva temporale dell'emoglobina de-ossigenata mostra un rapido incremento, seguita da un rapido declino a valori che sono al di sotto di quelli pre-stimolo. Al contrario l'emoglobina ossigenata mostra un lieve ritardo all'inizio seguito da un più lento graduale incremento, che perdura nel periodo di stimolazione, molto più grande in termini di ampiezza rispetto ai cambiamenti dell'emoglobina de-ossigenata. Questi importanti risultati,

confermati da successive ricerche (riprese da Mangia et al, 2009) suggeriscono che viene fornito più ossigeno all'area stimolata rispetto alle zone limitrofe, risultando in una minore quantità di emoglobina de-ossigenata nel voxel, e quindi ad un aumentato segnale BOLD. Dopo aver raggiunto il suo apice, il segnale BOLD diminuisce in ampiezza fino ad un livello inferiore alla linea base, dove rimane per un lungo intervallo.

3.1.4 Aumentando la sensibilità: fMRI basata sul CBV con l'utilizzo di mezzi di contrasto.

Gli esperimenti di imaging funzionale negli animali da laboratorio sono in generale di difficile esecuzione a causa principalmente di un basso contrast-to-noise-ratio (CNR) rispetto agli studi umani, dovuto al volume del voxel più piccolo e ad una minore dimensione dell'area attivata. Inoltre la necessità di utilizzare anestesia ulteriormente influenza le caratteristiche della risposta nelle aree attivate. Un approccio ampiamente utilizzato per migliorare il CNR è quello di utilizzare un agente di contrasto intravascolare esogeno al fine di aumentare la suscettibilità magnetica del sangue per generare un contrasto funzionale basato su CBV (Van Camp et al, 2005; Van Bruggen et al, 1998).

Un importante implicazione di questo approccio è che, a differenza del contrasto BOLD che dipende dal cambiamento di concentrazione dell'emoglobina ossigenata ed è quindi influenzato dal complesso emodinamico e dai contributi metabolici (flusso sanguigno, ossigenazione del sangue ed estrazione dell'ossigeno), le tecniche funzionali che usano mezzo di contrasto sono sensibili solo alle variazioni del CBV, un singolo componente molto importante della risposta emodinamica. È stato inoltre dimostrato che il cambiamento percentuale di segnale nelle zone attivate, utilizzando una tecnica CBV è molto maggiore di quello che si ottiene con la tecnica BOLD. Uno dei primi lavori su questo argomento è stato pubblicato nel 1998 (Van Bruggen et al, 1998) e ha dimostrato che, mentre l'incremento del segnale misurato nella tecnica BOLD era del 4% circa, quello relativo al CBV dava una diminuzione del 10% circa (vedi fig.3.4).

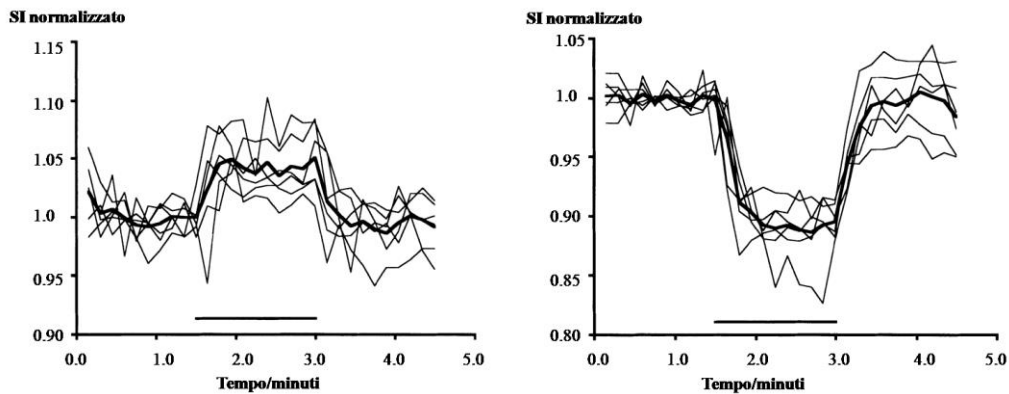


Figura 3.4 A sinistra il cambiamento del segnale MRI ottenuto con la tecnica BOLD in un modello sperimentale di stimolazione somatosensoriale nel ratto. A destra il cambiamento del segnale ottenuto con la tecnica CBV, per lo stesso stimolo.

Le tecniche basate sul CBV utilizzano mezzi di contrasto (MdC) intravascolari paramagnetici o super paramagnetici con alta suscettibilità. I MdC paramagnetici sono sostanze con spin elettronico diverso da zero. Le sostanze dotate di questa proprietà (paramagnetismo) sono caratterizzate dalla presenza di elettroni spaiati: in generale, tanto maggiore è il numero di elettroni spaiati posseduti dall'atomo nella sua configurazione più esterna, tanto maggiore sarà il grado di paramagnetismo. Ioni metallici dotati di questa proprietà sono ad esempio il ferro, il manganese e i lantanidi; tra questi il Gadolinio è quello che possiede il più elevato numero di elettroni spaiati ( $e^- = 7$ ) e per questo motivo è l'elemento più utilizzato per la preparazione dei MdC in risonanza magnetica. I MdC superparamagnetici sono in genere formati da particelle di ossido di ferro con dimensioni molto variabili da un minimo di circa 30 fino ad un massimo di circa 300 nm. Tali prodotti vengono indicati con le sigle SPIO (dall'inglese Superparamagnetic Iron Oxide) e USPIO (dall'inglese Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide).

I mezzi di contrasto paramagnetici sono formati da ioni metallici legati a strutture chimiche organiche (chelanti) che hanno l'obiettivo di ridurre la tossicità intrinseca. Tali mezzi di contrasto vengono iniettati per via endovenosa e determinano un mutamento del campo magnetico locale a livello dei tessuti nei quali si distribuiscono. Le nano particelle di ossido di ferro super paramagnetiche



sono costituite da un core di ossido di ferro (diametro 5-30 nm) rivestite di destrano o altro materiale biocompatibile (Fig.3.5). Tali particelle si mantengono ad alta concentrazione nel sangue per tempi relativamente lunghi, perché il rivestimento diminuisce l'opsonizzazione da parte delle proteine plasmatiche, minimizzando quindi la rimozione da parte del sistema reticoloendoteliale. L'emivita aumenta di conseguenza, permettendo così misurazioni di CBV relativo con buona risoluzione temporale.

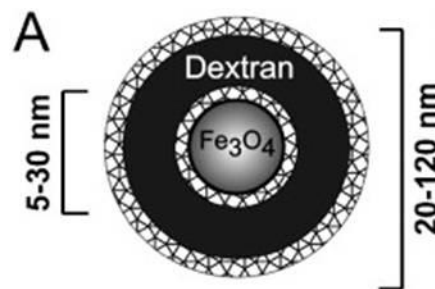


Figura 3.5 Agenti di contrasto SPIO (super paramagnetic iron oxide) contengono un nucleo di ossido di ferro (tipicamente 5-30 nm) ricoperto da destrano o altro materiale chimicamente inerte e bio-compatibile, per formare nano particelle di dimensioni 20-120 nm.

Le tecniche CBV presentano altri vantaggi rispetto alle tecniche BOLD. È noto che il CNR del BOLD aumenta in funzione dell'intensità del campo magnetico statico. Il CNR negli esperimenti basati sul CBV è meno dipendente dall'intensità di campo magnetico, permettendo l'esecuzione di esperimenti di fMRI anche a campi relativamente bassi. La curva di magnetizzazione dell'agente super paramagnetico usato in questa tesi (Endorem, Guerbert), è saturata ad una forza di campo di 2T (Kyrtatos et al, 2009).

Inoltre, i piccoli vasi (incluse le arteriole pre-capillari) si dilatano vigorosamente durante la stimolazione neuronale, al contrario i grandi vasi. mostrano solo una trascurabile dilatazione (Zaharchuk et al, Stroke, 1999). Dal momento che il segnale MRI è più debole nei voxel contenenti i grandi vasi a causa del suo alto contenuto di agente di contrasto, le variazioni di segnale conseguenti alle alterazioni di CBV negli stessi voxel sono intrinsecamente meno pronunciate di quelle rilevate nel parenchima. Tutto ciò fa sì che questa tecnica sia meno suscettibile all'effetto dei grandi vasi. Inoltre, misure sperimentali e modelli teorici hanno anche dimostrato che il metodo CBV ha una sensibilità più uniforme

ai cambiamenti funzionali nelle regioni cerebrali rispetto al metodo BOLD (Mandeville and Marota, 1999). Queste caratteristiche rendono le misure basate su CBV un'alternativa attraente al BOLD fMRI in preclinica.

Da un punto di vista teorico, i parametri che determinano il CNR funzionale nei metodi CBV sono: l'intensità del campo, il tempo di echo della sequenza usata e la dose del mezzo di contrasto. Come già menzionato, dal momento che il contributo BOLD è direttamente proporzionale al campo magnetico mentre i cambiamenti CBV rimangono costanti (grazie alla saturazione magnetica completa dello SPIO a 2T), il guadagno del CNR della tecnica CBV rispetto al BOLD è maggiore a campi bassi.

### 3.2 Diffusion Tensor Imaging (DTI)

L'imaging del tensore di diffusione (DTI) è una tecnica di Risonanza Magnetica che permette l'analisi delle proprietà diffusive delle molecole d'acqua all'interno dei tessuti in vivo, e si presenta come un importante strumento per lo studio dell'architettura microstrutturale delle strutture cerebrali in condizioni sia fisiologiche che patologiche.

Diversi studi condotti sugli esseri umani hanno dimostrato che la Diffusion Tensor Imaging è una tecnica che consente di valutare l'organizzazione microstrutturale e l'orientamento dei tratti della sostanza bianca, e fornisce informazioni dettagliate sulla integrità dei tessuti biologici. Mentre gli studi precedenti che utilizzavano la risonanza magnetica rimanevano focalizzati solo sulle variazioni volumetriche, oggi vi è un aumentato interesse riguardo i cambiamenti che avvengono a livello microstrutturale nel tessuto cerebrale durante l'invecchiamento utilizzando l'imaging del tensore di diffusione (DTI). Questa tecnica è in grado di rilevare sottili cambiamenti nella microstruttura cellulare grazie a modelli di misurazione di diffusione dell'acqua che non possono essere quantificati utilizzando le sequenze MRI tradizionali (Basser e Pierpaoli 1996; Westlye et al 2010). Permette quindi di identificare i primi segni di degenerazione che precedono le alterazioni macroscopiche nell'anatomia del cervello.

La diffusione è il movimento traslazionale delle molecole dovuto all'energia termica delle stesse, questo moto casuale viene chiamato moto browniano. In assenza di ostacoli, il moto browniano delle molecole di acqua è uniforme in tutte le direzioni e viene definito "isotropo". Nei tessuti biologici, l'auto-diffusione delle molecole di acqua non è libera, ma è ostacolata e limitata dalla presenza di vari tipi di barriere come le membrane cellulari, le fibre e la mielina. In questo caso la diffusione sarà maggiore in una direzione rispetto alle altre, e sarà quindi definita "anisotropica". Questa condizione si riscontra nei fasci di materia bianca in quanto la loro organizzazione è altamente direzionale e stretta. Infatti, La diffusività dell'acqua nella materia bianca è maggiormente ostacolata dalle membrane assonali e dalle guaine mieliniche. Nei fasci assonali, la diffusività dell'acqua è quindi molto più intensa lungo la direzione dei fasci, se

paragonata alle altre direzioni. Al contrario, nella materia grigia, la diffusione è abbastanza uniforme in tutte le direzioni.

Introducendo dei gradienti di campo magnetico che variano nello spazio, è possibile ottenere sequenze di risonanza magnetica sensibili alla diffusione dell'acqua lungo una certa direzione, ottenendo le immagini pesate in diffusione (DWI). Dal rapporto di immagini DWI acquisite a differenti livelli di sensibilizzazione di diffusione (conosciuta come valore "b", espresso in  $s\text{ mm}^{-2}$ ), è possibile calcolare una misura quantitativa di diffusività media, conosciuta come "coefficiente di diffusione apparente" (ADC) espressa in  $\text{mm}^2\text{ s}^{-1}$ . Esistono, inoltre, molte misure di anisotropia di diffusione, la più comune è conosciuta come anisotropia frazionale (FA), i cui valori sono compresi in un intervallo tra 0 e 1, e corrispondono rispettivamente alla diffusione isotropica e alla diffusione perfettamente anisotropica.

Durante la maturazione del tessuto cerebrale, gli assoni subiscono una serie di modifiche come la maturazione della struttura e della membrana, e la mielinizzazione (Neil et Al., 1998; Nomura et Al., 1994; Sakuma et Al., 1991). Questo comporta una diminuzione della diffusività media e un aumento della FA, in quanto all'interno della guaina mielinica il movimento dell'acqua diventa sempre più anisotropico durante questa fase di maturazione. Inizialmente si pensava che la causa principale fosse proprio la mielina (Rutherford et Al., 1991), successivamente è stato dimostrato che anche altre modifiche contribuiscono in modo significativo all'aumento dell'anisotropia come lo sviluppo dei neuroni stessi, i quali maturando fanno diminuire lo spazio intercellulare con conseguente diminuzione della diffusione delle molecole di acqua.

Nel contesto degli studi sull'invecchiamento cerebrale, invece, si manifesta la situazione opposta. Il coefficiente di diffusione apparente ADC è considerato una misura grezza della densità di barriera e quindi di cellularità: i tessuti più densi mostrano valori di ADC più bassi. Inoltre è stato constatato, dopo una serie di esperimenti preclinici, che i valori di ADC erano maggiori nella direzione parallela alle fibre di materia bianca (Moseley et al., 1990) e minori nella direzione perpendicolare alle fibre, in quanto la diffusione dell'acqua era

limitata dalle membrane assonali, dai microtubuli, neurofilamenti e dalla mielina (Beaulieu, 2002).

Le principali correlazioni con le alterazioni a livello cerebrale sono una diffusione anisotropica ridotta, che riflette una discontinuità delle membrane assonali orientate in quella direzione, e un aumento della diffusività media che riflette anche qui una rarefazione delle membrane cellulari e di altre strutture che ostacolano la diffusione. Quando comparato alla riduzione dell'anisotropia frazionale in funzione dell'età, l'aumento della diffusività media tende generalmente ad avere un significato più debole. Dato che la tecnica di misurazione sottostante è essenzialmente la stessa sia per la diffusività media (ADC) che per la FA, si potrebbe concludere che la riduzione della FA è più pronunciata rispetto all'aumento della diffusività media.

Da un punto di vista micro strutturale, questo potrebbe essere coerente con una riduzione del numero di barriere disposte con un orientamento anisotropico, senza cambiamenti consistenti nella complessiva densità delle membrane. Tale tendenza potrebbe essere il risultato di un'azione concomitante di molti processi, come una ridotta mielinizzazione e una degenerazione assonale che risultano in una ridotta anisotropia di diffusione, e di processi compensatori come la gliosi reattiva che mitigano la diminuzione generale della densità di membrana.

Un formalismo matematico conosciuto come tensore di diffusione, che corrisponde ad un ellissoide nello spazio (vedi fig. 3.6a), è comunemente usato come modello di diffusione anisotropico nella materia bianca (da qui il nome imaging con tensore di diffusione, DTI). Dopo una diagonalizzazione del tensore di diffusione, si ottiene un autovettore, con componenti  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$  che è tangente alla direzione del fascio all'interno di ogni voxel. Intuitivamente possiamo pensare agli autovettori del tensore di diffusione come esponenti i "confini" fisici alla diffusione dell'acqua. Come mostrato in Fig. 3.6 b, nel caso di diffusione isotropica, l'ellissoide di diffusione corrisponde ad una sfera e i tre autovalori sono uguali. Nel caso invece che la diffusione sia anisotropica,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$  sono minori di  $\lambda_1$ . Dagli autovettori del tensore di diffusione vengono calcolati diversi parametri che esprimono quantitativamente l'anisotropia del tensore di diffusione. Nella presente tesi ci siamo focalizzati sul valore medio dei tre autovettori (ADC)

e sul parametro denominato fractional anisotropy (FA), definiti rispettivamente come:

$$ADC = (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3) / 3$$

$$FA = \sqrt{\frac{1}{2} \frac{\sqrt{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_3 - \lambda_1)^2}}{\sqrt{\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2}}}$$

I valori di FA sono compresi tra 0 (nel caso di diffusione isotropica in cui  $\lambda_1 = \lambda_2 = \lambda_3$ ) e 1 nel caso “teorico” di diffusione completamente lineare ( $\lambda_1 = \lambda_2 = 0$ ). I valori di FA danno una misura della integrità delle fibre assionali.

I principali autovettori sono comunemente rappresentati come un campo o una mappa di colori, su cui il blu corrisponde alla direzione testa-piedi, il rosso corrisponde alla direzione sinistra-destra e il verde corrisponde alla direzione antero-posteriore. La differenza tra la diffusività lungo e attraverso il fascio, aumenta con la densità assonale.

Si può notare quindi come la DTI racchiuda più informazioni sulla materia bianca, e non solamente una misura sullo stato della mielina come fu considerata inizialmente. La sua sensibilità consente di rilevare cambiamenti nella morfologia a livello cellulare, negli assoni e nella mielina, diventando così uno strumento per predire l'esito funzionale dopo ictus e altre lesioni cerebrali.

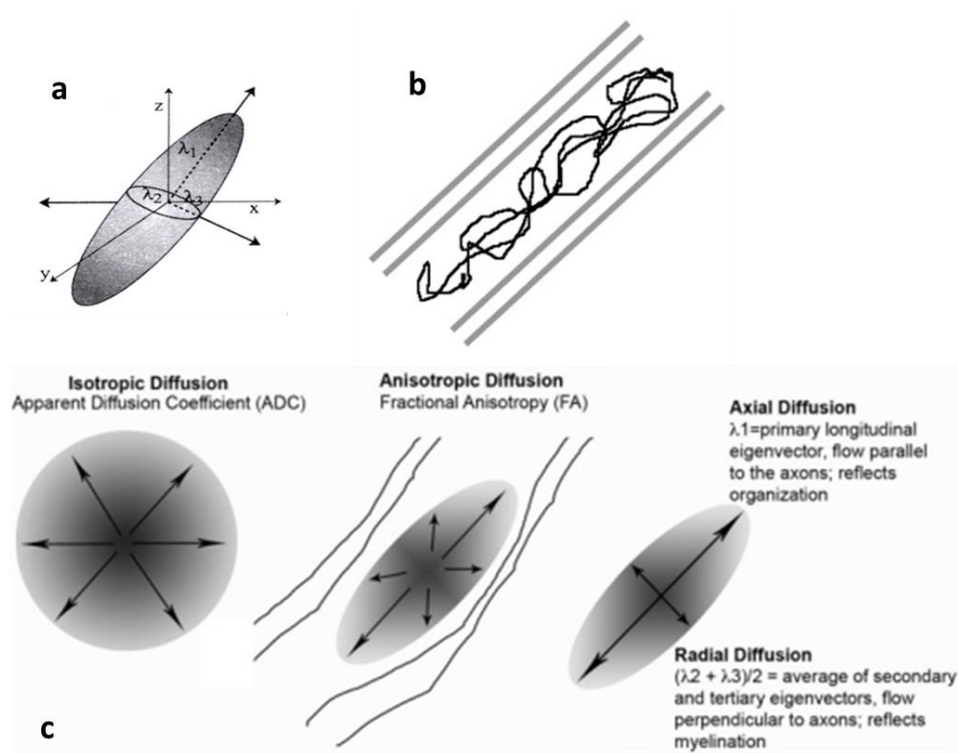


Fig. 3.6 a Rappresentazione dell'ellissoide di diffusione,  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$  sono gli autovalori del tensore di diffusione e rappresentano i coefficienti di diffusione nella direzione longitudinale e nelle due direzioni trasversali, rispettivamente. La diffusione dell'acqua all'interno delle fibre è schematizzata nella parte b della figura; in questo caso  $\lambda_1$  è maggiore di  $\lambda_2$  e  $\lambda_3$ . Nella parte c della figura è rappresentata la diffusione isotropica (l'ellissoide di diffusione è una sfera,  $FA=0$ ) e anisotropica  $FA \neq 0$ . Altri parametri utilizzati comunemente come Axial Diffusivity e Radial Diffusivity sono anche riportati.

### 3.3 Spettroscopia localizzata protonica (MRS)

La Spettroscopia protonica di risonanza magnetica (H-MRS) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere informazioni dettagliate sulla struttura delle molecole osservando il comportamento dei nuclei atomici in un campo magnetico. Si identificano quindi i livelli di alcuni metaboliti in specifiche strutture anatomiche, sulla base del loro caratteristico spettro di risposta a sequenze di impulsi di risonanza magnetica. Dopo aver immerso la molecola in esame in un forte campo magnetico, si misura infatti l'assorbimento di una radiazione di frequenza radio (da 100 a 1000 MHz) che provoca transizioni di spin nucleare in particolari atomi come  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ .

Dato che l'alterazione metabolica precede quella strutturale (morfologica), l'H-MRS rappresenta uno strumento diagnostico in grado di individuare precocemente i cambiamenti fisiologici o patologici che avvengono a livello cerebrale.

Il principio chimico-fisico su cui verte la metodica si basa sul principio secondo cui una determinata specie chimica presenta diverse frequenze di risonanza in rapporto all'ambiente molecolare a cui è chimicamente legato. Il segnale viene rappresentato da un insieme di "picchi" che identificano le diverse molecole, disposti lungo un asse cartesiano in base alle varie frequenze di risonanza di ciascuna molecola. Il grafico che si ottiene viene chiamato "spettro". La Spettroscopia all'idrogeno ( $^1\text{H}$ -MRS) rappresenta oggi la metodica principalmente utilizzata a scopo clinico perché permette di ottenere spettri ad alta risoluzione e consente di individuare numerosi metaboliti cerebrali con diverso significato biochimico, variabili secondo i parametri di acquisizione e il tipo di sequenza utilizzati.

Le informazioni metaboliche fornite da questa tecnica, associate all'imaging tradizionale, favoriscono una caratterizzazione del tessuto in esame. Se nella risonanza magnetica classica l'intensità del segnale di ogni voxel proviene dalla somma di tutte le molecole, situate nello stesso, contenenti idrogeno, nella spettroscopia il segnale proveniente da un certo nucleo viene separato nelle diverse forme chimiche presenti (N-acetil aspartato, Colina, Creatina, Alanina, lipidi, ecc...).



La Spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) è diventata un potente strumento per lo studio non invasivo dei costituenti chimici nei tessuti cerebrali, e fornisce informazioni sul metabolismo negli esseri viventi e sui neurotrasmettitori. La MRS utilizza una serie di impulsi di radiofrequenza per perturbare i nuclei all'interno delle molecole e, successivamente, misura il segnale di risonanza risultante. Il principio chimico-fisico su cui verte la metodica si basa sul principio secondo cui una determinata specie chimica presenta diverse frequenze di risonanza in rapporto all'ambiente molecolare a cui è chimicamente legato. Il segnale viene rappresentato da un insieme di "picchi" che identificano le diverse molecole, disposti lungo un asse cartesiano in base alle varie frequenze di risonanza di ciascuna molecola. Il grafico che si ottiene viene chiamato "spettro" e permette di calcolare il livello di diversi metaboliti; la spettroscopia viene eseguita per un singolo voxel collocata all'interno di una regione di interesse nel cervello. Generalmente, i cambiamenti che avvengono a livello cerebrale legati all'età sono altamente circoscritti e limitati a specifiche regioni: in particolare i lobi frontale e parietale, e l'ippocampo.

La Spettroscopia all'idrogeno ( $^1\text{H}$ -MRS) rappresenta oggi la metodica principalmente utilizzata a scopo clinico perché permette di ottenere spettri ad alta risoluzione e consente di individuare numerosi metaboliti cerebrali con diverso significato biochimico, variabili secondo i parametri di acquisizione e il tipo di sequenza utilizzati.

La MRS è in grado di rilevare N-Acetil-Aspartato (NAA), Colina (Cho), Creatina e fosfocreatina (Cr), Lattato (Lac), Glutammato e Glutamina (Glx), Mio-inositolo (Mi) e, in alcune condizioni, Acido GammaAminoButirrico (GABA). In tabella 1 (riprodotta da Minati et al., sono indicate i principali metaboliti e la loro posizione spettrale (in ppm).

**Table 1. Resonances of the Metabolites Studied in Clinical MR Hydrogen Neurospectroscopy**

Lactate	1.33	ppm (doublet)
Lipids	0-2	ppm (broad resonance)
N-acetyl-aspartate	2.02	ppm
N-acetyl-aspartate	2.52	ppm (second peak)
Total creatine	3.04	ppm
Total creatine	3.93	ppm (second peak)
Total choline	3.24	ppm
Myoinositol	3.54	ppm
Myoinositol	3.62	ppm (second peak)
Glutamate/glutamine	2.1-2.5	ppm (complex)
Water	4.7	ppm

L’NAA rappresenta un indice di funzionalità neuronale in quanto presente solo nei neuroni e non nelle cellule gliali mature; si registra una riduzione permanente dell’NAA nelle malattie degenerative (malattia d’Alzheimer) e nella morte neuronale (ictus), oppure transitoria nelle disfunzioni neuronali acute come le malattie demielinizzanti o nelle aree di penombra ischemica. Elevati livelli di Cho (colina, acetilcolina, glicerofosforicolina e fosfocolina) sono associati ad un aumento della proliferazione cellulare come nei tumori cerebrali o nelle malattie demielinizzanti. Il Mi è un indice di densità delle cellule gliali, considerato utile nella diagnosi differenziale delle demenze. Il Lac è prodotto dalla glicolisi anaerobica in condizioni di ischemia e ipossia, ma anche indicativo di elevato metabolismo cellulare, ad esempio, nei tumori cerebrali. La Cr riflette, infine, le riserve di metabolismo energetico delle cellule.

La spettroscopia offre quindi la possibilità di misurare in modo non invasivo le concentrazioni di diversi metaboliti cerebrali, in particolare l’N-Acetil aspartato (NAA) che si trova solo nei neuroni, ma non nelle cellule gliali mature, ed è spesso utilizzato come marcatore di integrità neuronale. Livelli di NAA inferiori al normale sono stati trovati in condizioni di lesioni al tessuto cerebrale (Friedman et al, 1998; Davie et al, 1994; Lu et al., 1996). Inoltre, si è visto che i livelli di NAA sono noti cambiare sistematicamente con l’età, diventano quindi un marcatore di sviluppo: dato che i livelli di colina riflettono la densità cellulare, che è collegata a sua volta all’integrità di membrana (la colina è un precursore della fosfatidilcolina, il principale costituente delle membrane cellulari) il livello di

NAA è spesso in contrasto con quello della colina sottoforma di rapporto NAA/Cho, che diventa una singola misura di integrità neuronale.

La spettroscopia diviene importante anche grazie alla sua sensibilità allo stato della mielina. Il rapporto Colina/Creatina (Cho/Cre), in modo particolare, viene utilizzato nello studio sullo sviluppo della materia bianca. Charles et Al., scoprirono che I livelli di colina, creatina e NAA sono minori nella materia grigia dei soggetti vecchi rispetto a quelli giovani, mentre non trovarono differenze nella materia bianca (Charles et Al., 1994).

Le alterazioni dei metaboliti cerebrali legati all'invecchiamento riportano, in generale, una diminuzione con l'età del metabolita NAA (N-Acetil aspartato) che viene assunto come un marker neuronale. Tuttavia c'è un certo grado di controversia in letteratura a riguardo dei cambiamenti nella concentrazione cerebrale dei metaboliti. Questo anche a causa della difficoltà a confrontare gli studi da diversi laboratori causata principalmente dal diverso posizionamento dei pixel. Comunque, diversi studi hanno riportato un trend verso la diminuzione di NAA con l'aumento dell'età, sebbene altri studi abbiano riportato un andamento costante. Per questo motivo è stato intrapreso lo studio di MRS sul modello sperimentale.

### 3.4 I Modelli sperimentali utilizzati

3.4.1 Il modello sperimentale di EAE (Encefalomielite Sperimentale Autoimmune).

L'encefalomielite sperimentale autoimmune (abbreviata come EAE, dall'inglese Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) rappresenta un robusto modello sperimentale per la forma cronica-progressiva della sclerosi multipla (MS) ed è stato ampiamente caratterizzato usando tecniche standard di risonanza magnetica nucleare (MRI, dall'inglese Magnetic Resonance Imaging).

In caso di danno cerebrale indotto da specifiche patologie, il cervello mostra una notevole capacità di riorganizzarsi (plasticità cerebrale) che permette per esempio di eseguire uno specifico compito anche se l'area o le aree normalmente deputate al controllo di tale funzione risultano danneggiate. Questa capacità cerebrale è stata dimostrata in particolare nei malati di sclerosi multipla anche dopo un singolo isolato episodio di malattia tramite esami di Imaging Funzionale (fMRI). Pertanto lo studio dei meccanismi alla base della plasticità cerebrale ha un valore cruciale sia per le prospettive di poter riuscire a limitare le conseguenze funzionali della malattia che come reale end-point per le moderne terapie.

Questo lavoro si prefigge di investigare un gruppo di ratti DA, a cui è stata indotta l'Encefalomielite sperimentale autoimmune (EAE), utilizzando tecniche di risonanza magnetica morfologiche e funzionali al fine di stabilire la presenza di plasticità cerebrale rispetto alle condizioni basali (prima dell'immunizzazione) e la possibile correlazione con i danni cerebrali osservati in una risonanza magnetica convenzionale o da esami istologici post-mortem.

Induzione EAE: gli animali donatori (in numero uguale alla metà degli animali riceventi) vengono sacrificati tramite CO<sub>2</sub>. Il midollo spinale singenico proveniente dagli animali donatori viene prelevato e conservato a -80°C fino al giorno dell'induzione. Il giorno dell'induzione il midollo spinale viene ridotto in polvere in un mortaio refrigerato con azoto liquido e quindi risospeso in fisiologica in rapporto 300mg midollo/200µl fisiologica. Tale soluzione verrà quindi addizionata con adiuvante incompleto di Freund per ottenere una soluzione

con una concentrazione finale di 0.25mg/100µl. Ratti maschi del ceppo Dark Agouti vengono anestetizzati con isofluorano e la soluzione immunizzante viene somministrata tramite iniezione sottocutanea di 200µl /zampa in entrambe le zampe posteriori.

Il decorso della malattia è piuttosto eterogeneo, tuttavia nei ratti DA i primi segni clinici sono registrabili in 10-11 giorni dopo l'induzione, mentre il primo picco EAE è valutabile attorno ai 14-15 giorni dpi. Gli animali sono quotidianamente valutati per deficit neurologici, definiti su una scala di valutazione da 0 a 4:

- 0= nessun deficit neurologico, animale sano
- 1= segni di flaccidità della coda
- 2= debole – moderata paraparesi delle zampe posteriori
- 3= paraplegia di entrambe le zampe posteriori
- 4= quadriplegia: a questo livello gli animali vengono sacrificati per evitare sofferenze.

MRI e fMRI con stimolazione elettrica della zampa anteriore del ratto DA: Suddivisi in due gruppi, ogni soggetto funge da controllo di sé stesso in quanto vengono eseguiti esperimenti di fMRI prima dell'induzione della malattia. Vengono inoltre acquisite immagini di risonanza magnetica convenzionale (immagini T1W e T2W), al fine di valutare eventuali lesioni cerebrali presenti. Successivamente, un gruppo verrà acquisito durante il picco di malattia (14-15 dpi) e l'altro a 30 e 60 dpi. Ad ogni punto temporale acquisito, un gruppo satellite di soggetti verrà sacrificato per ottenere un riscontro istologico.

Lo scopo principale di questo modello sarà quello di studiare la plasticità neuronale nella corteccia somatosensoriale in ratti DA (Dark Agouti) affetti da EAE in fase acuta e tardiva, ed individuare possibili correlazioni fra il danno cerebrale, osservato all'imaging in vivo e agli esami istologici, e la plasticità cerebrale. Dati di fMRI e istologici verranno raccolti e analizzati su un ampio gruppo di animali affetti da EAE ad un punto temporale precoce (corrispondente al picco della malattia) e tardivo (30 e 60 giorni dpi) dopo l'immunizzazione.

### 3.4.2 Il modello di invecchiamento fisiologico cerebrale

Negli ultimi dieci anni sono stati pubblicati molti studi di invecchiamento cerebrale nell'uomo basati sulle tecniche avanzate di risonanza magnetica. Gli studi clinici sono potenzialmente influenzati da diversi fattori come lo stile di vita (es. esercizio fisico, apporto calorico, stress) e variabilità genetica. Modelli sperimentali di invecchiamento potrebbero essere quindi utili per la distinzione degli eventi fisiologici da quelli patologici, nonché l'impatto dei fattori ambientali e genetici. Potrebbero inoltre essere una valida piattaforma per studiare l'effetto di eventuali terapie farmacologiche e non, nel ritardare l'invecchiamento cerebrale. Scopo di questo lavoro è stato lo studio dell'invecchiamento cerebrale in un modello murino mediante tecniche di risonanza magnetica avanzate e la valutazione del suo potenziale valore traslazionale.

Gli animali utilizzati sono stati forniti dall'Istituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani di Ancona (I.N.R.C.A.).

## 4. Materiali e Metodi

### 4.1 Preparazione e trattamento degli animali

#### 4.1.1 Imaging funzionale (fMRI) e volumetria (VBM)

La principale difficoltà negli studi di imaging funzionale nell'animale è dovuta al fatto che lo stesso deve essere anestetizzato. La prima condizione sperimentale critica riguarda dunque l'anestesia. Dopo una serie di esperimenti preliminari sia su topi che su ratti, che hanno permesso di ottimizzare il protocollo da eseguire, si è giunti alla conclusione che l'anestesia usata per pre-anestetizzare l'animale è sicuramente l'isofluorano gassoso, che permette un'induzione controllata grazie alla possibilità di regolare il contenuto di anestetico nell'aria somministrata. La fase critica successiva è stata quella di trovare un'anestesia che permettesse di ridurre al minimo gli artefatti da movimento durante l'esperimento dando comunque una buona risposta funzionale, e allo stesso tempo che preservi il benessere dell'animale. Una accurata review della letteratura ha mostrato che la riduzione degli artefatti da movimento è massima quando l'animale viene paralizzato con una soluzione 0.075mg/ml di pancuronio bromuro in salina eparinizzata 25UI/ml, per infusione intravenosa al rate di 0.5mg/kg. Questa procedura richiede la ventilazione artificiale tramite intubazione endotracheale con agocanula collegata direttamente all'apparato di ventilazione. Al termine dell'esperimento, l'animale deve essere sacrificato in quanto l'azione paralizzante del pancuronio non è reversibile. È stato riportato in letteratura che studi longitudinali sono invece possibili con l'utilizzo di medetomidina (Domitor® 1mg, Orion Corporation, Finlandia e distribuito da Janssen animal health, Milano) che mostra una potente e selettiva affinità per i recettori alfa2-adrenergici che, a livello dell'encefalo, inibiscono il rilascio di noradrenalina. Il *locus ceruleus* è particolarmente ricco di alfa2-recettori ed è coinvolto nella regolazione del sonno e della veglia: è a questo livello che viene mediato l'effetto sedativo/ipnotico degli alfa2-agonisti. Questi agenti, inoltre, diminuiscono l'ansia, il dolore (analgesici) e causano un rilassamento dei muscoli. È generalmente usato come adiuvante (assieme a chetamine, es. Zoletil, Virbac S.r.l., Milano) per ridurre la quantità richiesta di anestetico per l'intubazione tracheale. È stato invece utilizzato per la

prima volta nell'fMRI come anestetico indipendente (Weber et al, 2006): somministrato per via sottocutanea con infusione continua, non richiede l'intubazione e la ventilazione artificiale, quindi l'animale è mantenuto in uno stato di respirazione spontanea e non viene paralizzato.

Per gli studi sul modello sperimentale di EAE, il protocollo di stimolazione viene eseguito serialmente su 18 ratti sani maschi (baseline: prima dell'induzione della malattia; 30 dpi e 60 dpi) di 8 settimane di età, ceppo Dark Agouti, stabulati in condizioni standard di ciclo luce/buio e in gabbie con libero accesso a cibo e acqua. Inizialmente vengono anestetizzati con una miscela contenente 5% di isofluorano (Isofluorane-Vet, Merial France) e aria medica (30% ossigeno e 70% azoto), in una camera di induzione. L'animale viene successivamente posizionato su un lettino (holder) compatibile con la risonanza magnetica (Fig.4.1), l'anestesia gassosa viene abbassata al 2% e sarà portata all'animale attraverso una maschera posta direttamente sul muso. La testa del ratto viene bloccata nella giusta posizione sia con delle bacchette di plastica per le orecchie, sia con una bacchetta nella quale è presente un foro in cui si incastrano i denti dell'animale. Un sistema di acqua calda circolante nel lettino garantisce il mantenimento della temperatura corporea dell'animale, evitando così fenomeni di ipotermia indotta da una prolungata anestesia. Sul dorso dell'animale viene inserita sottocute un ago per la somministrazione di medetomidina (Domitor® 1mg, Orion Corporation Finlandia e distribuito da Janssen animal health, Milano), diluita 1:5 in soluzione salina e somministrata con una pompa ad infusione (Harvard apparatus, Massachusetts USA) con un rate costante di 0.1ml/100g/h che permette di mantenere l'animale sedato per tutta la durata dell'esperimento. Durante i primi 30 minuti di infusione, la percentuale di isofluorano nell'aria medica viene lentamente diminuita fino ad arrivare a zero, mentre l'animale continua a respirare aria medica al volume iniziale di 1000cc/min. I parametri vitali del ratto vengono monitorati costantemente durante l'esecuzione dell'esperimento: la pressione parziale di CO<sub>2</sub> nel sangue venoso viene misurata con un analizzatore di gas sanguigni (TCM4, Radiometer Copenhagen) attraverso un elettrodo transcutaneo posizionato sulla cute del dorso dell'animale. La pressione parziale di CO<sub>2</sub> deve mantenersi al valore fisiologico minore di circa



40mm/Hg. Questo parametro, essendo l'animale in ventilazione spontanea, non è facilmente controllabile dall'operatore e gli animali in cui la  $pCO_2$  risulta fuori range fisiologico vengono esclusi dall'esperimento. La respirazione e la temperatura corporea vengono monitorati con un sistema di monitoraggio dei parametri fisiologici per piccoli animali, compatibile con la MRI ("PC-SAM Small Animal Monitor", SA Instruments Inc., NY). L'esperimento viene eseguito solo se la respirazione viene mantenuta a valori di 80-90 resp/min, mentre la temperatura ad un intervallo di 36.5-38°C. Al fine di incrementare la sensibilità dell'esperimento, viene utilizzato un mezzo di contrasto a particelle di ossido di ferro super paramagnetiche (Endorem®, Guerbert, France) alla dose di 3.75  $\mu$ l/g, in un unico bolo iniettato attraverso un ago cannula precedentemente posizionato nella vena della coda (Van Bruggen et al, 1998; Van Camp et al, 2005).



Fig. 4.1 Preparazione dell'animale. La foto mostra un animale preparato per gli esperimenti di fMRI; sono visibili gli elettrodi che portano la stimolazione alla zampa anteriore destra, la mascherina per l'anestesia e i blocchi per le orecchie.

Come paradigma di stimolazione per l'imaging funzionale è stata scelta la stimolazione della zampa anteriore su ratti anestetizzati perché costituisce uno dei pochi protocolli di fMRI robusto e stabile, nel ratto. La stimolazione è indotta nella zampa anteriore destra tramite l'inserimento di due elettrodi per stimolazione sottocutanea tra il primo e secondo dito, e tra il terzo e quarto dito.

Un impulso elettrico a onda quadra viene generato da uno stimolatore esterno (S88 GRASS Instrument, West Warwick RI, USA) ed arriva agli elettrodi grazie a dei fili di rame isolati. Gli impulsi hanno una frequenza = 3Hz, corrente = 2mA, durata = 0.5 ms. Questo tipo di stimolazione non provoca alcun danno alla zampa dell'animale in quanto gli elettrodi sono monouso e molto sottili

Al termine dell'acquisizione dell'esperimento, l'animale viene risvegliato tramite un'iniezione intraperitoneale di Atipamezolo (Antisedan®, Orion Corporation Finlandia e distribuito da Janssen Animal Health) che annulla gli effetti dell'anestesia. Il volume del bolo da iniettare è calcolato in cinque volte tanto il volume di medetomidina utilizzato, in accordo con le istruzioni riportate sul foglietto illustrativo.

#### 4.1.2 Diffusion Tensor Imaging (DTI) e spettroscopia protonica localizzata (MRS)

Le immagini di risonanza vengono acquisite con uno strumento Bruker Biospec che opera a 4.7T, equipaggiato con una console Avance II (Bruker Biospin, Germany). Si utilizza una configurazione con due bobine: una di volume con diametro 7.2cm per la trasmissione della radiofrequenza e una di superficie per la sola ricezione, con una caratteristica forma ad elmetto specifica per la testa del ratto. L'anestesia viene applicata tramite una mascherina posta sul muso dell'animale, il quale si trova posizionato su un lettino (holder) compatibile con la risonanza magnetica e dotato di un sistema circolante di acqua calda che garantisce il mantenimento della temperatura corporea dell'animale, evitando così fenomeni di ipotermia indotta da una prolungata anestesia. La temperatura corporea viene costantemente monitorata tramite un termometro rettale, e mantenuta ad un intervallo di 36.5-38°C. La testa del ratto viene bloccata nella giusta posizione sia con delle bacchette di plastica per le orecchie, sia con una bacchetta nella quale è presente un foro in cui si incastrano i denti dell'animale.

DTI: Un totale di 26 ratti Sprague Dawley sono stati utilizzati e divisi in tre gruppi di soggetti "giovani" (n=6, 3-4 mesi di età), adulti (n=10, 12 mesi di età) e vecchi (n=10, 26 mesi di età) al momento dell'inizio dell'esperimento.

MRS: Un totale di 19 ratti Sprague Dawley sono stati utilizzati e divisi in tre gruppi di soggetti “giovani” (n=5 3-4 mesi di età), adulti (n=6, 12 mesi di età) e vecchi (n=8, 26 mesi di età) al momento dell’inizio dell’esperimento.

Gli animali vengono pre-anestetizzati con una miscela contenente 5% di isofluorano (Isofluorane-Vet, Merial France) e aria medica (30% ossigeno e 70% azoto), in una camera di induzione. L’animale viene successivamente posizionato sull’holder compatibile con la risonanza magnetica (Fig.4.1), l’anestesia gassosa viene abbassata al 1.5-2% e sarà portata all’animale come descritto precedentemente. La velocità respiratoria è monitorata tramite un sensore posto sotto l’addome dell’animale. La respirazione e la temperatura corporea vengono controllati con un sistema di monitoraggio dei parametri fisiologici per piccoli animali, compatibile con la MRI (“PC-SAM Small Animal Monitor”, SA Instruments Inc., NY). L’esperimento viene eseguito solo se la respirazione viene mantenuta a valori di 80-90 resp/min, mentre la temperatura ad un intervallo di 36,5-38°C.

Al termine della sessione di acquisizione, gli animali vengono tolti dall’anestesia gassosa e si risvegliano in maniera autonoma entro pochi minuti.

Riguardo l’acquisizione di DTI, al fine di ottenere immagini ad alte risoluzioni, sono state effettuate anche acquisizioni ex-vivo su un totale di 9 animali, 3 per ogni gruppo sperimentale. In questo caso, la procedura prevede l’esecuzione della perfusione transcadiaca, che permette il prelievo dell’organo senza arrecare danni alla struttura: gli animali vengono mantenuti sotto anestesia per permetterne il sacrificio e l’esecuzione della stessa con soluzione fisiologica tamponata (10-15 min) e successivamente paraformaldeide 4% (15-20 min). Una volta fissato, il cranio integro viene prelevato e posizionato nel lettino MRI-compatibile. Terminata l’acquisizione, il cervello viene estratto dalle strutture e tessuti circostanti, post-fissato con lo stesso fissativo overnight alla temperatura di 4°C, disidratato ed incluso in paraffina per le successive analisi istologiche.

#### 4.2 Imaging

Le immagini di risonanza vengono acquisite con uno strumento Bruker Biospec che opera a 4.7T, equipaggiato con una console Avance II (Bruker

Biospin, Germany). Si utilizza una configurazione con due bobine: una di volume con diametro 7.2cm per la trasmissione della radiofrequenza e una di superficie per la sola ricezione, con una caratteristica forma ad elmetto specifica per la testa del ratto.

#### 4.2.1 Imaging funzionale (fMRI)

Il protocollo di imaging prevede prima di tutto l'acquisizione di una immagine "scout" nelle tre direzioni (trasversale, sagittale e coronale) rispetto alla quale posizionare tutte le altre acquisizioni (vedi fig.4.2a). Viene poi acquisita una immagine "morfologica" cioè un'immagine in cui risultino ben delineati i dettagli morfologici del cervello. Tale immagine viene acquisita con pesatura in T2 utilizzando una sequenza T2W-RARE con i seguenti parametri: TR=6712ms, TE=76ms, FOV= 3.5x3.5cm, MTX= 128x128, spessore fetta 1mm, numero fette= 22. Successivamente viene iniziato l'esperimento di fMRI vero e proprio. Le immagini fMRI vengono acquisite utilizzando sequenze di tipo Gradient-echo, Echo-planare multi shot segmentate ("GRE-EPI") con i seguenti parametri: TR=250ms, TE=5.9ms, 8shots, FOV=55,4x40mm, MTX=128x64, spessore fetta 2mm, numero fette: 5, risoluzione spaziale= 0.433mmx0.625mm. Il valore del TE è stato scelto nell'ordine del T2\* del cervello del ratto dopo iniezione del mezzo di contrasto (Van Camp et al, 2006). La geometria di queste sequenze, e quindi la scelta dell'area da acquisire, è fissata in riferimento all'immagine morfologica acquisita subito prima (vedi fig.4.2b). Vengono acquisite cinque fette coronali (geometria sequenza) con uno spessore di 2mm ciascuna, posizionate a partire dal solco rinico in direzione caudale in modo da coprire l'intera area della corteccia somatosensoriale.

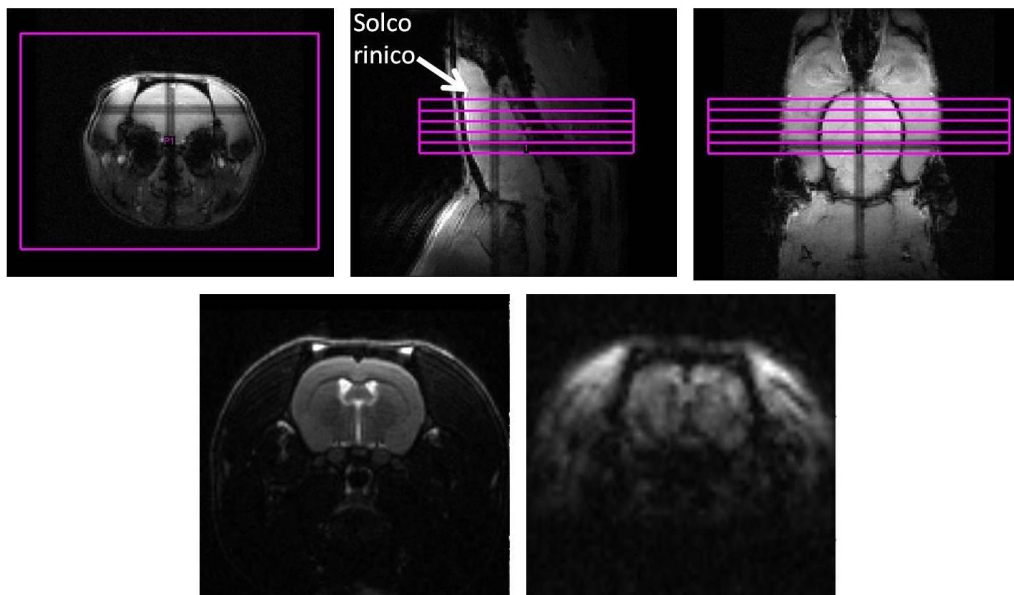


Figura 4.2a-b. In alto (a) posizionamento fette nelle tre direzioni spaziali (x,y,z) per acquisizione immagini EPI. In basso (b) a sinistra l'immagine morfologica T2 pesata, a destra l'immagine EPI.

L'echo-planar imaging (EPI) è una sequenza di acquisizione usata principalmente per la risonanza magnetica funzionale. È caratterizzata da un'elevata risoluzione temporale, in quanto con una sola eccitazione si acquisisce un'immagine completa. Il contrasto di questa immagine risulta pesato in T2\*. La sequenza EPI è stata segmentata per ridurre gli artefatti da distorsione.

La stimolazione è indotta nella zampa anteriore destra tramite l'inserimento di due elettrodi per stimolazione sottocutanea tra il primo e secondo dito, e tra il terzo e quarto dito. Un impulso elettrico a onda quadra viene generato da uno stimolatore esterno (S88 GRASS Instrument, West Warwick RI, USA) ed arriva agli elettrodi grazie a dei fili di rame isolati.

L'impulso è caratterizzato dai seguenti parametri: intensità 2mA, durata 5ms, frequenza 3Hz. Un singolo paradigma di stimolazione comprende 20s di applicazione dell'impulso (ON) e 60s di recupero (OFF). Il tempo di recupero è volutamente più grande, in quanto si cerca di evitare che l'animale acquisisca una certa abitudine alla stimolazione.

Queste caratteristiche permettono di acquisire un totale di 240 immagini per campionare l'evoluzione temporale del segnale CBV durante la stimolazione elettrica: quindi otteniamo 30 immagini in modalità di recupero (OFF) e 10

immagini in modalità di stimolazione (ON). Questo paradigma viene ripetuto sei volte per aumentare la validità statistica dei dati acquisiti (vedi fig.4.3). Il tempo totale di acquisizione è quindi di otto minuti; ogni animale viene sottoposto ad un minimo di tre acquisizioni, con un intervallo tra una e l'altra di 15 minuti.

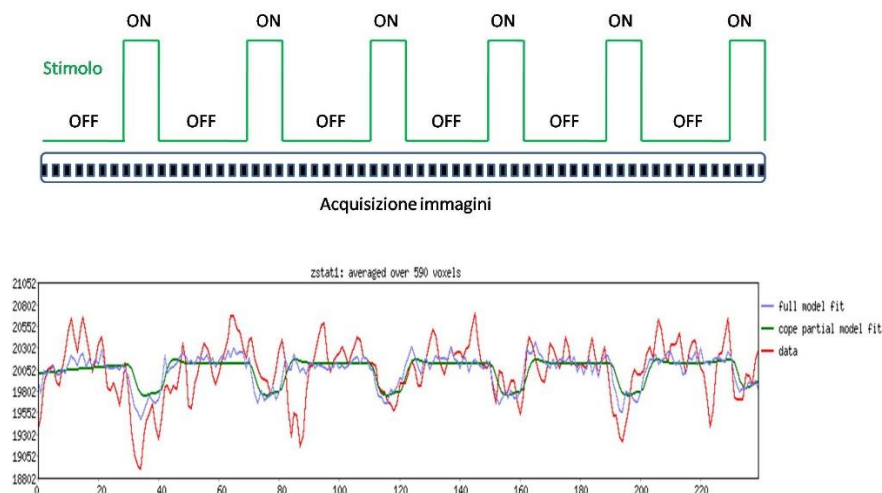


Fig. 4.3 Paradigma di stimolazione (linea verde) composto da sei intervalli, ognuno dei quali comprende 30 immagini OFF di recupero e 10 ON di stimolazione elettrica. In rosso è riportato il segnale misurato. In azzurro, il FIT del segnale misurato sul paradigma (corrispondenza).

#### 4.2.2 Analisi delle immagini fMRI

La risposta CBV alla stimolazione consiste in una variazione di pochi punti percentuale dell'intensità del segnale che spesso viene mascherata dal rumore casuale o da drift del segnale stesso. Per trovare la risposta è quindi fondamentale utilizzare delle opportune tecniche di analisi delle immagini che fortunatamente sono state sviluppate e sono disponibili in pacchetti software, come ad esempio FSL ([fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki](http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki)). Il principio su cui si basano questi software è quello di trovare i pixel nella serie temporale delle immagini, il cui andamento è meglio correlato con la dipendenza temporale dello stimolo. Si utilizza il cosiddetto algoritmo di GLM (General Linear Model) che costruisce un modello della risposta attesa sulla base della forma temporale dello stimolo. Successivamente si vanno a cercare quei pixel in cui l'intensità di segnale è ben correlata con il modello sopra definito. GLM viene utilizzato nel software FSL per

identificare i pixel, la cui dipendenza temporale dell'intensità di segnale è correlata alla dipendenza temporale della stimolazione.

I dati sono stati pre-processati per correggere eventuali artefatti, come per esempio quelli da movimento. I voxel dell'immagine fMRI, la cui significatività statistica supera la soglia  $p=0.01$ , sono stati considerati come positivi per la risposta funzionale. La distribuzione spaziale di questi voxel costituisce la mappa di attivazione corrispondente al soggetto in esame. Queste mappe vengono successivamente co-registrate usando lo strumento FLIRT del pacchetto FSL ad una versione digitale dell'atlante Paxinos-Watson del cervello del ratto (Fig.4.4), come descritto in Schwarz et al (Schwarz et al, 2006). Le aree di attivazione vengono valutate sotto due parametri: il volume dell'area di attivazione e la localizzazione spaziale. È inoltre valutato il rapporto tra il volume delle regioni del cervello (identificate con l'atlante) e il volume della corrispondente mappa di attivazione. Tutte queste misure sono ottenute dall'elaborazione di mappe statistiche in ambiente MATLAB.

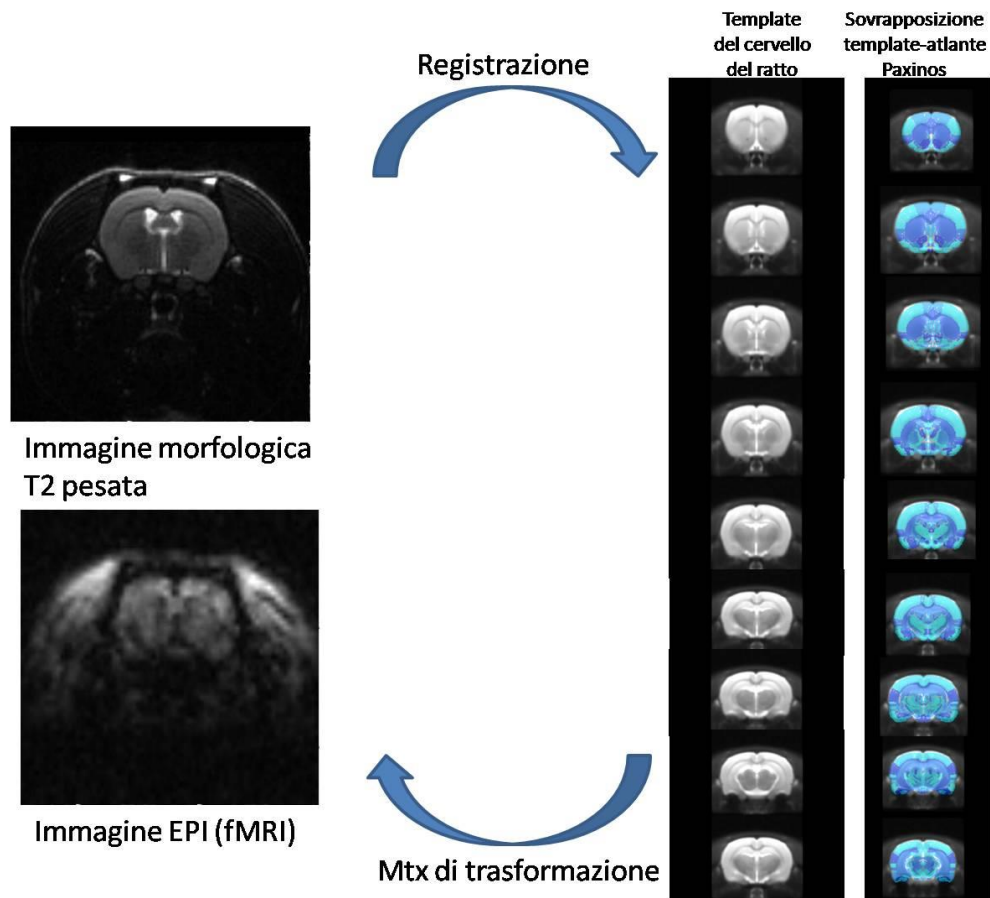


Fig.4.4 Co-registrazione delle immagini: le immagini acquisite T2pesate vengono registrate spazialmente e geometricamente ricampionate sulla base di un template del cervello del ratto attraverso il software FSL/flirt. Da questa operazione si ottiene una matrice di trasformazione che descrive la differenza nello spazio tra le immagini T2W e il template. La matrice di trasformazione viene successivamente applicata alle immagini EPI per orientarle secondo lo stesso sistema di riferimento.

#### 4.2.3 Diffusion Tensor Imaging (DTI)

Il protocollo di imaging prevede prima di tutto l'acquisizione di una immagine scout nelle tre direzioni (trasversale, sagittale e coronale) rispetto alla quale posizionare tutte le altre acquisizioni. Successivamente viene acquisita una sequenza SE Multi-Echo per ottenere mappe quantitative di T2 sul cervello intero. Infine, si acquisisce l'immagine di diffusione con una sequenza "EPI multi-shots" con metodo Stejskal-Tanner, con i seguenti parametri: TR=3800ms, TE=39.5ms, 8 shots, FOV=40x30mm<sup>2</sup> MTX=256x192, 30 direzioni di diffusione non-collineari (Jones method) con b=1000 s/mm<sup>2</sup>, con l'aggiunta di 5 immagini acquisite con b=0 s/mm<sup>2</sup>, AVG=2. Per ridurre gli artefatti da movimento, è stata utilizzata la



tecnica con Eco Navigatore. Il tempo totale di acquisizione è di 35 minuti, per un numero di piani  $n=15$  con 1mm di spessore.

Sui cervelli fissati, vengono inoltre acquisite immagini DTI ad alta risoluzione per un totale di 12 ore, con i seguenti parametri: sequenza spin-echo EPI con TR=10000ms, TE=34,4ms, FOV=40x30mm<sup>2</sup>, MTX=256x192, AVG=16, numero fette=40, spessore fette=0,50mm con un interslice di 0,50mm.

#### 4.2.4 Voxel-based-morphometry (VBM)

La tecnica Voxel-Based-Morphometry (VBM) è una tecnica ampiamente utilizzata in neuroimaging che permette di trovare differenze tra gruppi nel volume cerebrale utilizzando mappe statistiche. Nell'imaging morfologico tradizionale, il volume dell'intero cervello o di alcune regioni viene misurato selezionando una regione di interesse (ROIs) sulle immagini T2w e calcolando il volume racchiuso in quest'area. Tuttavia, questo tipo di analisi richiede tempo e può fornire informazioni solo su aree piuttosto grandi. Differenze più piccole nel volume possono, quindi, venire perse. L'analisi volumetrica tramite VBM prevede la registrazione spaziale e geometrica delle immagini T2w acquisite per ogni cervello ad un template di riferimento, che consente di eliminare la maggior parte delle differenze presenti nell'anatomia del cervello tra i soggetti. Successivamente si procede a segmentare le immagini del cervello in materia bianca, materia grigia e CSF (fluido cerebrospinale) e a confrontare voxel per voxel i volumi di tali componenti in tutti i cervelli dei soggetti che fanno parte dello studio. Il risultato è una mappa statistica che esprime la probabilità che ci siano differenze volumetriche punto per punto.

#### 4.2.5 Spettroscopia protonica localizzata (MRS)

Il protocollo di imaging prevede prima di tutto l'acquisizione di una immagine pilota nelle tre direzioni (trasversale, sagittale e coronale) per localizzare il cervello del ratto, e rispetto alla quale posizionare tutte le successive acquisizioni. La MRS richiede che il campo magnetico sul volume cerebrale sia molto omogeneo; per questo si procede all'operazione di shimming tramite la procedura FASTMAP che permette di ottimizzare l'omogeneità di campo

magnetico su un volume cubico all'interno del cervello. Una volta ottenuto uno shimming soddisfacente (larghezza di riga dell'acqua su tutto il volume minore di circa 40 Hz) viene acquisita una immagine trasversale con pesatura in T2 utilizzando una sequenza T2W-RARE con i seguenti parametri: TR=2600ms TE=20ms, 8 echi in modo che sia possibile posizionare con precisione il voxel per la spettroscopia localizzata. La spettroscopia viene acquisita in tre differenti voxel posizionati sopra la regione ippocampo, la corteccia parietale e prefrontale, aventi rispettivamente le seguenti dimensioni: 36.8  $\mu\text{m}$  (7x1.75x3 mm<sup>3</sup>), 35  $\mu\text{m}$  (3.5x2x5 mm<sup>3</sup>) and 36  $\mu\text{m}$  (3x3x4 mm<sup>3</sup>). In ciascun voxel selezionato, il segnale viene acquisito con e senza soppressione dell'acqua usando una sequenza PRESS (Keevil SF., 2006) con i seguenti parametri: TR/TE = 4000/11 ms, BW = 20.03 ppm. Gli spettri vengono acquisiti senza soppressione dell'acqua con NEX=64 e con soppressione dell'acqua con NEX=128-256. Il tempo di acquisizione è stato al massimo di 17 minuti, per ciascuno spettro. La soppressione dell'acqua è stata ottenuta usando uno schema di impulsi VAPOR. Gli spettri ottenuti senza la soppressione dell'acqua vennero utilizzati per controllare la qualità dello shimming (FWHM del segnale dell'acqua nel range 13-20 Hz) e come riferimento per normalizzare il segnale dei metaboliti.

#### 4.2.6 Istologia

In entrambi i modelli sperimentali (gruppi satelliti EAE: n=4 animali/timepoint; Aging: n=3 animali/gruppo) viene effettuata l'analisi istologica al fine di ottenere un ulteriore confronto con le immagini di risonanza. Gli organi fissati con la tecnica della perfusione spiegata precedentemente, vengono prelevati e post-fissati con lo stesso fissativo (paraformaldeide 4%) overnight a 4°C. Subiscono poi una disidratazione con immersione in EtOH a concentrazioni crescenti (70%-90% e 100%), xilolo ed infine paraffina tramite l'utilizzo di un inclusore (BioOptica, Italia). Le inclusioni in paraffina, una volta induritesi, vengono sezionate con l'ausilio di un microtomo al fine di ottenere fette dello spessore di circa 7  $\mu\text{m}$ . Per ogni cervello incluso, si selezionano 100 sezioni per la successiva colorazione dei vetrini da osservare al microscopio ottico (Olympus, Center Valley, PA).

Si effettuano due colorazioni sui campioni montati sul vetrino: Ematossilina/Eosina per rilevare infiltrati leucocitari o eventuali lesioni (Ematossilina colora in blu i nuclei delle cellule, eosina colora in rosa il citoplasma), Luxol Fast Blue (contro-colorazione con Cresyl violetto) per identificare la struttura neuronale di base e per la presenza/assenza di mielina (mielina con fosfolipidi colorati in blu/verde; neuroni colorati in rosa/violetto). Infine, vengono acquisite delle immagini dei preparati colorati tramite una camera CCD collegata al microscopio ottico Olympus ad ingrandimenti di 2, 4 e 10X per il confronto istologico delle strutture cerebrali tra i vari gruppi sperimentali.

## 5. Risultati

### 5.1 Modello sperimentale di EAE

#### 5.1.1 Evoluzione della malattia e Imaging morfologico (VBM)

Lo score clinico dei ratti DA durante le diverse fasi della malattia è riportato in Fig. 5.1 ed è in accordo con l'andamento temporale riportato in (Giatti et al., 2013). Nella maggior parte degli animali investigati, il primo episodio è stato registrato 9-14 giorni dopo l'induzione (days post induction, dpi), e il picco della malattia a 13-15 dpi. Tutti gli animali hanno avuto una ricaduta tra 20 e 40 dpi, seguita da remissione parziale e accumulo di un moderato deficit cronico persistente fino a 60 dpi.

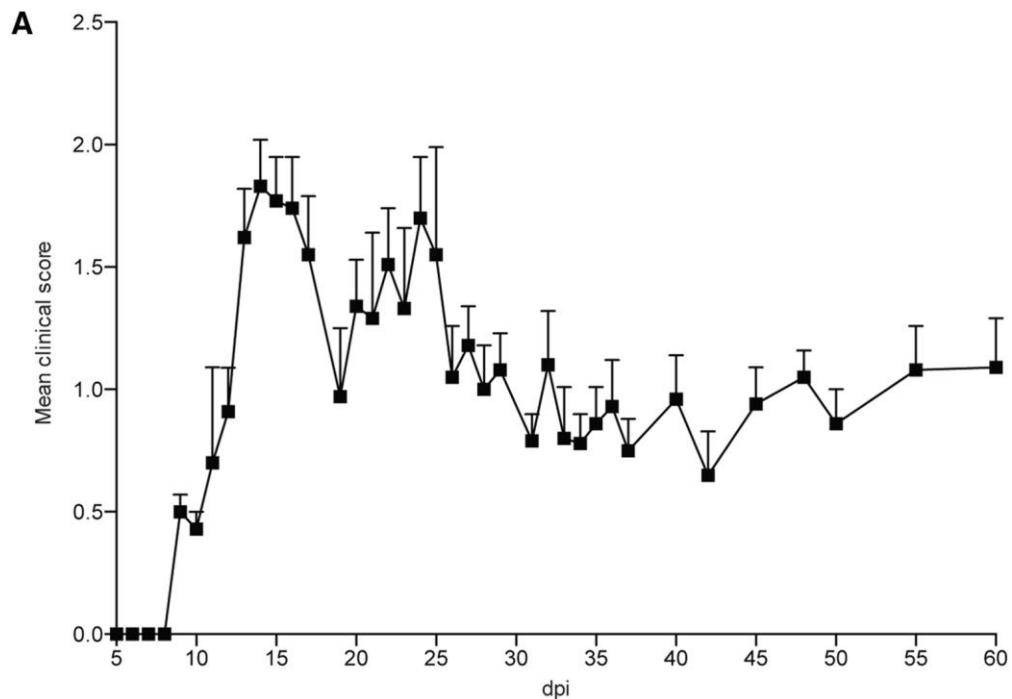


Fig. 5.1 Clinical score medio osservato durante il decorso della malattia. I valori sono riportati come media $\pm$ SEM su almeno 10 ratti.

Per investigare possibili alterazioni morfologiche indotte dalla patologia, le immagini morfologiche pesate in T2 (T2w) sono state analizzate tramite VBM (Voxel-based-morphometry). Le immagini morfologiche sono state co-registrate al template del cervello di ratto basato su immagini T2w e confrontate statisticamente. Nella Fig. 5.2 A e B sono riportate le mappe statistiche di

significatività che mostrano le regioni del cervello in cui il volume cerebrale nel cervello patologico è significativamente diverso dal controllo (gli indici A e B sono riferiti ai punti temporali 30 e 60 dpi). È evidente una notevole atrofia nella zona corticale già a 30 dpi che permane anche dopo 60 giorni. Quantitativamente il volume totale di materia grigia è significativamente diminuito nell'EAE sia 30 che 60 dpi (vedi Fig. 5.2 C-D); tale diminuzione interessa sia l'intero cervello che la corteccia. È interessante notare (Fig.5.2H) che il volume relativo di materia grigia corticale è significativamente correlato allo score clinico cumulativo (CDI). Il volume relativo della materia grigia è stato analizzato in diverse regioni della corteccia, come mostrato in Fig. 5.2 E. L'analisi statistica dei dati riportati in Fig. 5.2 E mostra una diminuzione statisticamente significativa nelle regioni motoria, sensoriale, orbitofrontale e prefrontale mediale, sia a 30 dpi che a 60 dpi.

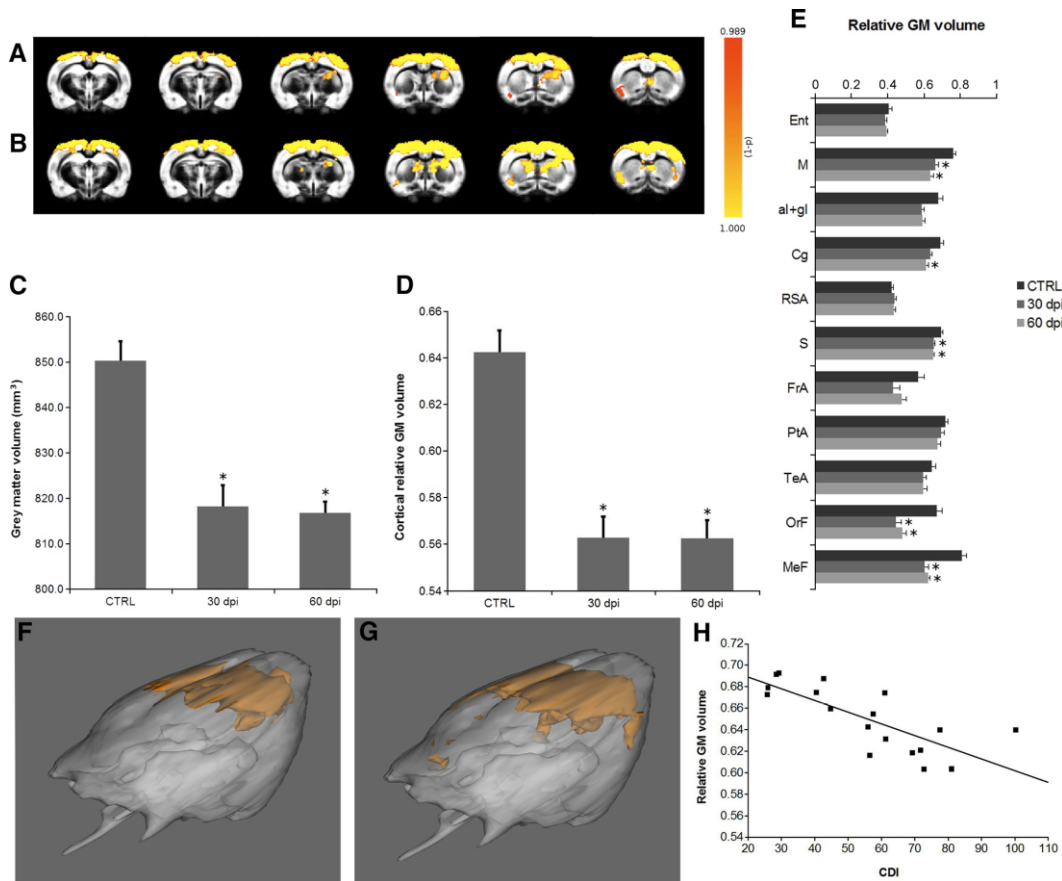


Fig. 5.2 Analisi VBM delle immagini T2W. A: mappa statistica della differenza nel volume di materia grigia tra topi EAE (30 giorni) e controlli. B: mappa statistica della differenza nel volume di materia grigia tra topi EAE (60 giorni) e controlli. C: volume totale di materia grigia. D: volume corticale di materia grigia. E: volume relativo medio di materia grigia in diverse regioni della corteccia. \* $p < 0.01$ . F, G: ricostruzione 3D delle mappe statistiche delle regioni che mostrano volume ridotto della materia grigia in ratti EAE in confronto con i controlli (F, 30dpi; G 60 dpi). H grafico del volume relativo di materia grigia corticale in funzione dello score clinico cumulativo (soggetto per soggetto). Ent, corteccia entorinale; M, corteccia motoria; al+gl, corteccia insulare; Cg, corteccia cingolata; RSA, corteccia retrospleniale; S, corteccia sensoriale; FrA, associazione frontale; OrF, corteccia Orbitofrontale; MeF, corteccia mediale prefrontale.

Successivamente abbiamo verificato i risultati di MRI con tecniche di istologia ex vivo. I risultati sono riportati nella Fig. 5.3 che mostra atrofia nella corteccia sensomotora (in accordo con i dati MRI) e nel corpo calloso. E' anche interessante notare in Fig. 5.3 D un significativo allargamento ventricolare che indica in generale atrofia dell'intero cervello. L'atrofia osservata tramite MRI ha così un chiaro riscontro nei risultati istologici.

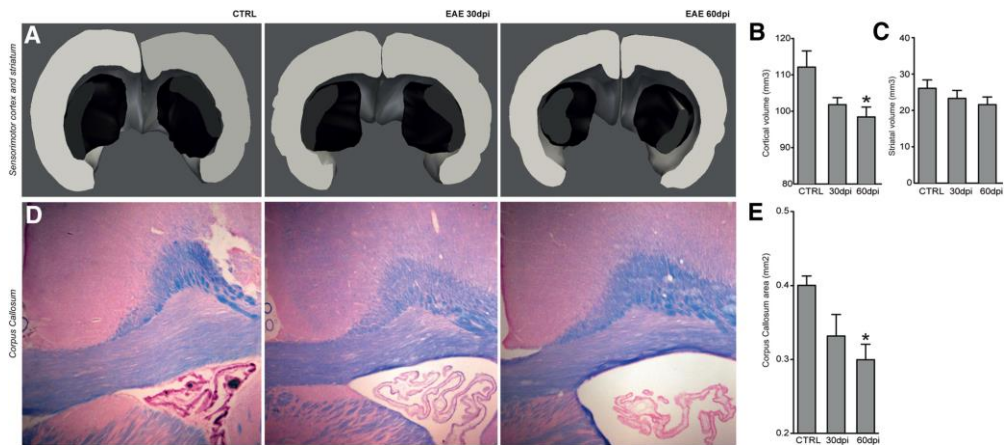


Fig. 5.3 A: Ricostruzioni delle strutture cerebrali da fette istologiche (colorazione Luxol Fast Blue): corteccia sensomotora (grigio), striato (nero) in un ratto di controllo e in due ratti con EAE (30 e 60 giorni). Quantificazione del volume corticale (B), del volume dello striato (C) e del corpo calloso (E).

### 5.1.2 Imaging funzionale

Per valutare se l'osservata atrofia della materia grigia nella corteccia cerebrale possa essere alla base di alterazioni funzionali, abbiamo condotto esperimenti di fMRI utilizzando il protocollo di stimolazione somatosensoriale descritto nei materiali e metodi. In Fig. 5.4 mostriamo le mappe di attivazione funzionale ottenute negli animali di controllo (A) negli animali EAE, 30 dpi, (B) e negli animali EAE, 60 dpi (C). Va menzionato il fatto che queste mappe di attivazione sono state ottenute tramite analisi su tutto il gruppo di animali (group-based analysis). Negli animali di controllo (i.e. prima dell'induzione di EAE) le mappe di attivazione mostrano una zona attivata ben localizzata della corteccia sensomotora controlaterale in accordo con quanto riportato in letteratura (Van Camp N et al., 2005). Quantitativamente abbiamo determinato che la maggior parte del volume attivato si trovava nell'emisfero sinistro e più specificatamente nella corteccia somatosensoriale primaria S1 (61%) con una rilevante percentuale nella corteccia motoria (30%). Nessuna attivazione significativa è stata trovata fuori dalla corteccia o nella parte destra del cervello. Al contrario a 30 dpi, il pattern di attivazione risulta significativamente alterato, come appare chiaramente dalla Fig. 5.4 B. Zone di attivazione vengono rilevate anche nella corteccia controlaterale e coinvolgono altre zone (oltre a S1 e alla corteccia motoria). La differenza è ulteriormente aumentata nei ratti EAE, 60 dpi. Infatti il volume

attivato aumenta ulteriormente e viene coinvolta bilateralmente la regione S2 (somatosensoriale secondaria, come indicato dalla freccia bianca in Fig. 5.4C). Il volume attivato (espresso come numero di pixels) nella corteccia aumenta da  $452 \pm 133$  (CTRL) a  $4476 \pm 1461$  (EAE, 30 dpi) a  $10204 \pm 1541$  (EAE, 60 dpi). Un parametro importante nello studio della risposta funzionale è il laterality index (LI) definito come  $(C-I)/(C+I)$  dove C ed I sono rispettivamente il numero di pixels attivati nella corteccia contro ed ipsi-laterale, rispettivamente. LI diminuisce da  $0.91 \pm 0.09$  (CTRL, risposta fortemente lateralizzata) a  $-0.09 \pm 0.06$  (EAE, 30 dpi) a  $0.05 \pm 0.03$  (EAE, 60 dpi), indicando una sostanziale perdita della lateralizzazione della risposta funzionale con la patologia.



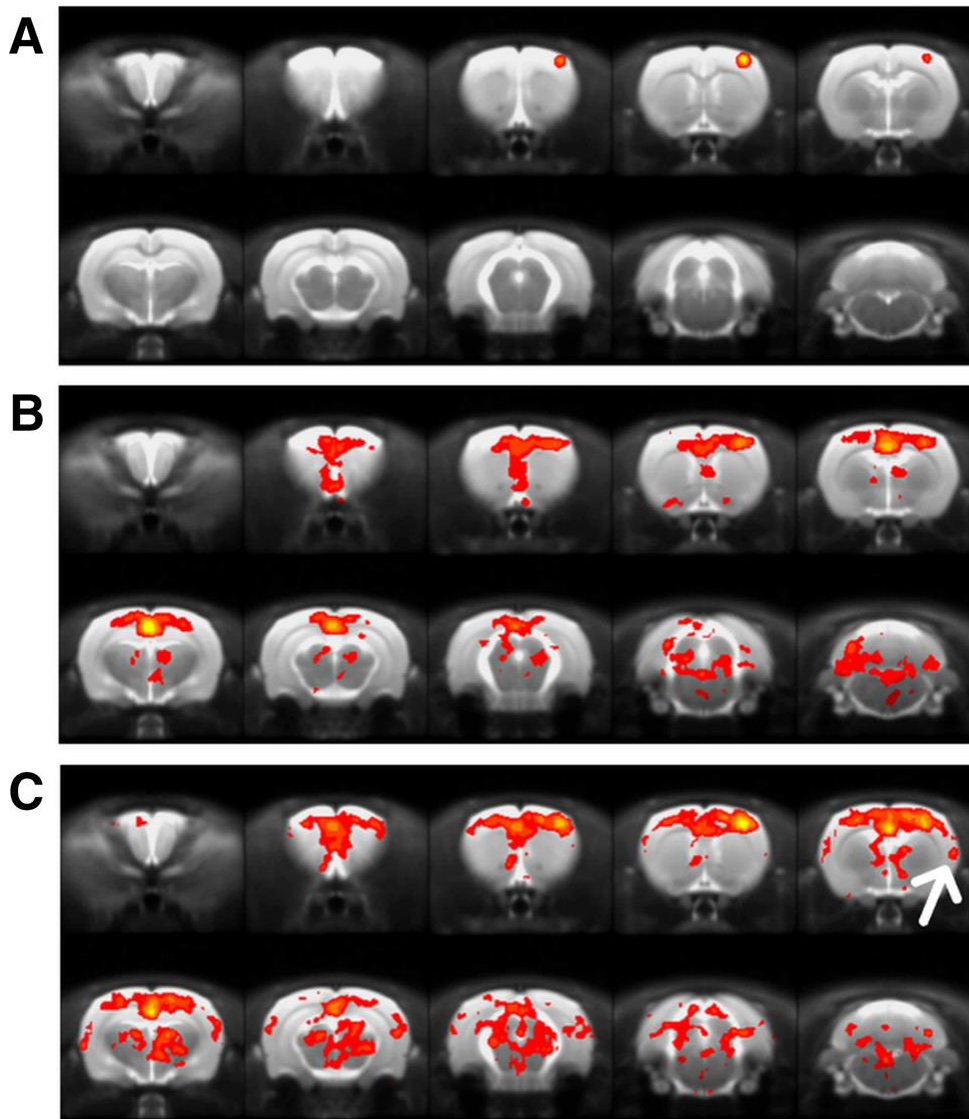


Fig. 5.4 Mappe di attivazione che mostrano la risposta funzionale a stimolazione elettrica della zampa anteriore destra nei ratti di controllo (A) e nei ratti EAE 30 (B) e 60 (C) giorni dopo l'induzione. La freccia bianca indica l'attivazione della regione S2.

## 5.2 Modello di invecchiamento fisiologico

### 5.2.1 Imaging morfologico (VBM)

Per studiare le alterazioni volumetriche indotte dal normale processo di invecchiamento, le immagini T2w sono state analizzate con le tecniche di VBM in maniera simile a quanto fatto precedentemente nel modello sperimentale di EAE. I risultati sono riassunti in Fig. 5.5 da cui si evince una sostanziale conservazione del volume di materia grigia, una diminuzione del volume di materia bianca (negli adulti, rispetto ai giovani) e un aumento del fluido cerebrospinale cioè del volume

ventricolare (negli adulti, rispetto ai giovani e nei vecchi rispetto ai giovani). Un certo grado di allargamento ventricolare con il processo di invecchiamento è stato consistentemente riportato in letteratura negli studi clinici (Pini et Al., 2016).

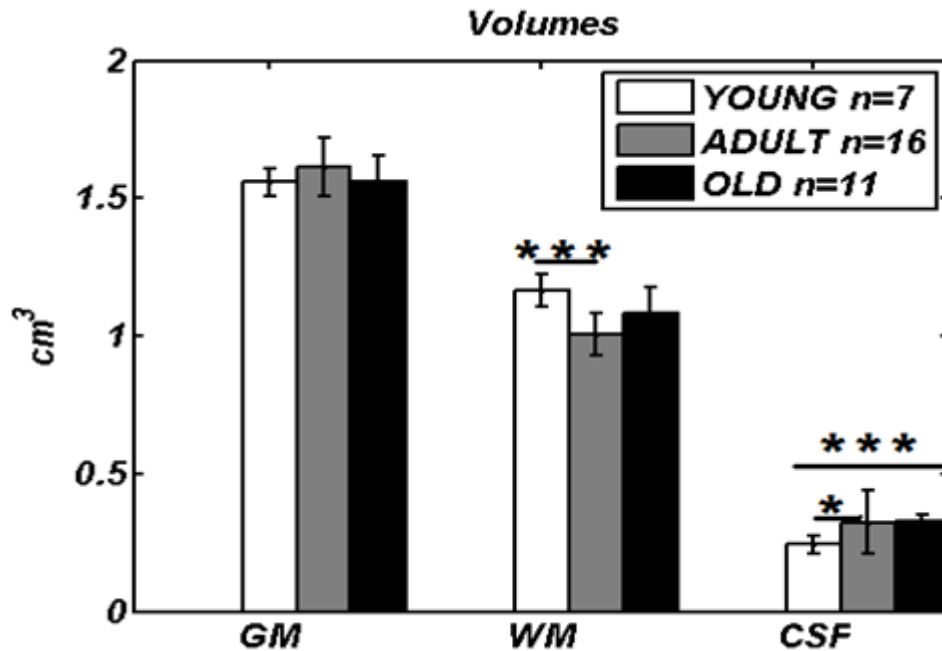


Figura 5.5 Volumi cerebrali (materia bianca WM, materia grigia GM e fluido cerebrospinale CSF) misurato nei tre gruppi sperimentali. I valori indicano chiaramente un aumento del CSF e una diminuzione del volume della WM negli adulti relativamente ai soggetti giovani (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

In maniera qualitativa, il risultato ottenuto tramite MRI è stato verificato istologicamente: in Fig. 5.6 sono riportate alcune fette istologiche rappresentative ottenute nei cervelli di ratti giovani e vecchi; nell'ultimo caso è evidente un allargamento dello spazio ventricolare.

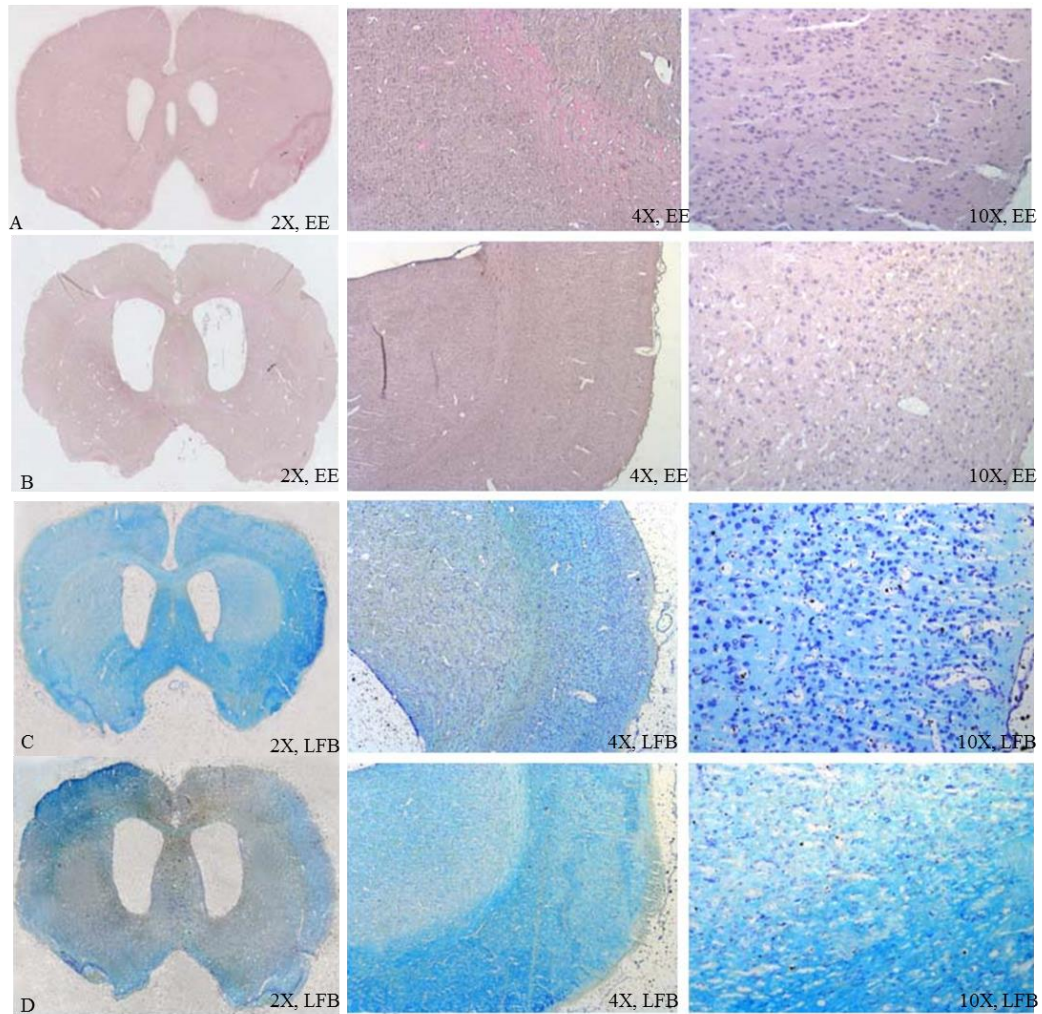


Fig. 5.6 Sezioni istologiche del cervello di ratto giovane e vecchio colorate con Ematossilina e Eosina (A- ratto giovane, B- ratto vecchio) e Luxol Fast Blue (C- ratto giovane, D- ratto vecchio).

### 5.2.2 Diffusion Tensor Imaging (DTI)

Per quanto riguarda lo studio dell'integrità della materia bianca, è stata utilizzata la tecnica DTI. Nello specifico i parametri più rilevanti (FA e ADC) sono stati determinati su tutto il cervello (Tabella 5.1) e, in un secondo momento, sulle diverse regioni anatomiche (Tabella 5.2). In figura 5.7 vengono mostrate delle mappe rappresentative dei parametri FA e ADC e, in forma di istogramma, i relativi valori medi calcolati su tutto il volume cerebrale (media  $\pm$  deviazione standard). Si nota la diminuzione della FA e l'aumento dell'ADC con il progredire dell'età. Questo andamento concorda con quanto riportato in letteratura (Madden et Al., 2012).

	ADC (mm <sup>2</sup> /s)	FA
Giovani	0.861269±0.033805	0.360222±0.050743
Adulti	1.110410±0.322790	0.292007±0.078733
Vecchi	1.597830±0.035020	0.186640±0.035020

Tabella 5.1 Valori medi dei parametri FA e ADC sul volume cerebrale

Macro-Regions	FA			ADC		
	YOUNG	ADULT	AGED	YOUNG	ADULT	AGED
Acc	0,371	0,274	0,171	0,569	1,064	1,376
Amy	0,407	0,319	0,230	0,904	1,417	1,722
BNST	0,362	0,284	0,170	0,850	1,345	1,657
CaudPut	0,364	0,281	0,178	0,808	1,316	1,642
CorCall	0,376	0,311	0,186	0,872	1,362	1,658
Cortex	0,356	0,287	0,176	0,545	1,103	1,396
DiagBand	0,405	0,330	0,201	1,383	1,662	1,919
GlobPallidus	0,453	0,358	0,242	0,838	1,314	1,630
Hippocampus	0,306	0,262	0,174	1,109	1,539	1,722
Hypotalamus	0,367	0,297	0,193	1,227	1,622	1,842
InterpedNucleus	0,314	0,325	0,186	1,435	1,503	1,734
IPAC	0,337	0,297	0,194	0,872	1,400	1,752
MesencRegion	0,394	0,313	0,197	0,894	1,316	1,541
MedialGenic	0,297	0,253	0,175	1,460	1,771	1,906
OlfactNuclei	0,387	0,305	0,173	0,072	0,682	0,990
PeriaqGrey	0,319	0,259	0,174	1,147	1,587	1,642
Pons	0,425	0,369	0,201	0,994	1,353	1,572
Raphe	0,362	0,309	0,200	0,965	1,430	1,583
Septum	0,353	0,291	0,183	0,984	1,453	1,756
Substinnominata	0,361	0,323	0,221	0,989	1,497	1,801
SubstNigra	0,406	0,338	0,223	1,207	1,535	1,717
SupColliculus	0,323	0,265	0,159	0,934	1,396	1,596
Thalamus	0,328	0,272	0,179	0,860	1,352	1,677
VentralPallidum	0,363	0,298	0,200	0,984	1,484	1,787
VTA	0,362	0,347	0,214	1,386	1,482	1,732
Zonalncerta	0,386	0,326	0,227	0,826	1,323	1,664
Range (max-min):	0,155	0,116	0,082	1,388	1,089	0,929
Range compression relative to YOUNG (%)		25,38	46,98		21,56	33,08

Tabella 5.2 Elenco delle regioni cerebrali considerate nello studio dei parametri FA e ADC e relativi valori (regione per regione).

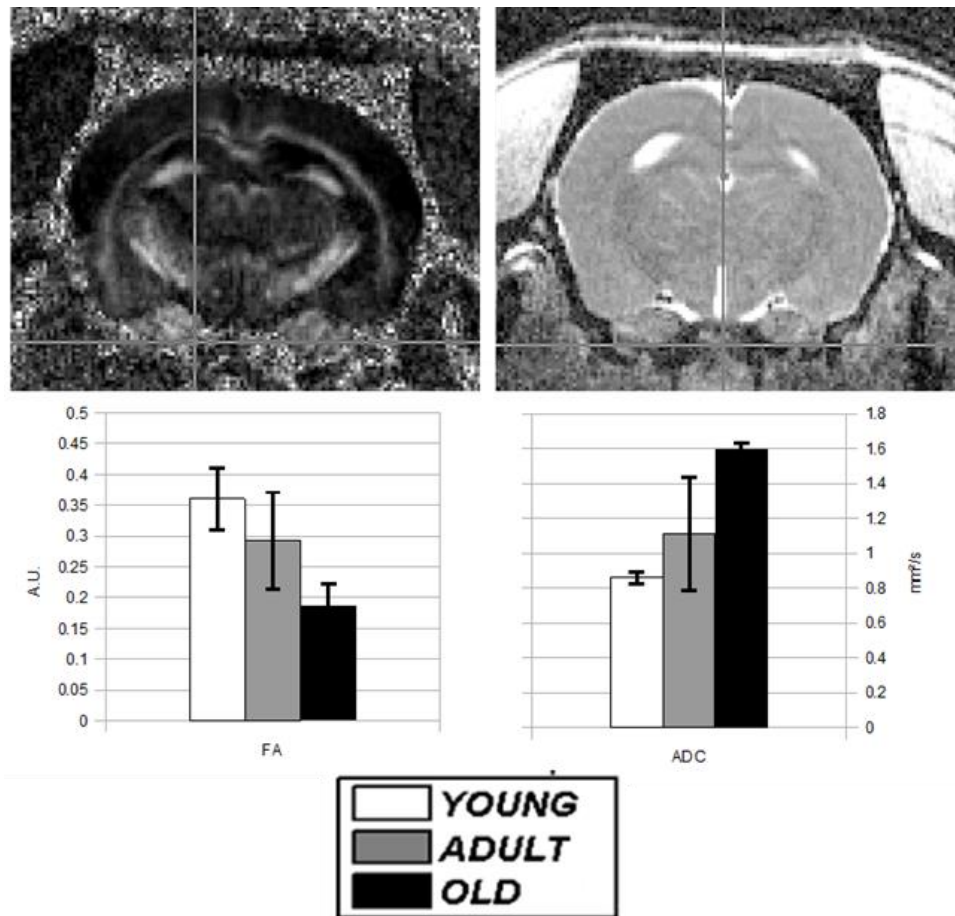


Figura 5.7 Nella parte superiore sono riportate mappe rappresentative dei parametri FA e ADC (in un ratto adulto). Nella parte inferiore sono riportati i valori medi dei due parametri (valore medio  $\pm$  SD).

È interessante determinare se questo andamento nei valori medi riflette una generalizzata alterazione dei parametri su tutto il cervello o se invece riflette alterazioni in regioni specifiche. Per questo scopo abbiamo analizzato le immagini nelle diverse regioni cerebrali. La procedura seguita è schematizzata nella prima parte della figura 5.8: le mappe di FA sono state acquisite con la stessa geometria delle sequenze T2w le quali sono state co-registrate con un template del cervello del ratto, a sua volta co-registrato con l'atlante anatomico. Questa procedura ha permesso di conoscere (regione per regione) il valore di FA. La stessa operazione è stata eseguita con le mappe di ADC.

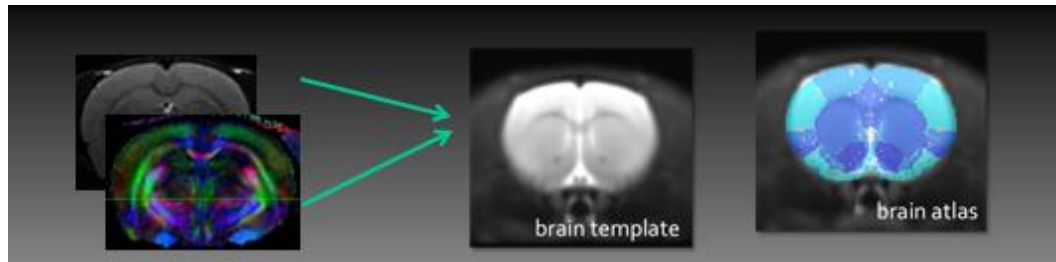


Figura 5.8 Procedura di analisi delle immagini che permette di estrarre i valori dei parametri FA e ADC nelle diverse regioni cerebrali individuate tramite un atlante morfologico (brain atlas).

I risultati sono riportati nella Fig. 5.8 b. Come appare chiaramente dalla figura, l'andamento nei due parametri sembra riguardare tutto il volume cerebrale e non specifiche regioni. L'osservata diminuzione del coefficiente FA trova un chiaro riscontro nella colorazione istologica per la mielina che come chiaramente mostrato nella figura 5.6 diminuisce nei vecchi, rispetto ai giovani.

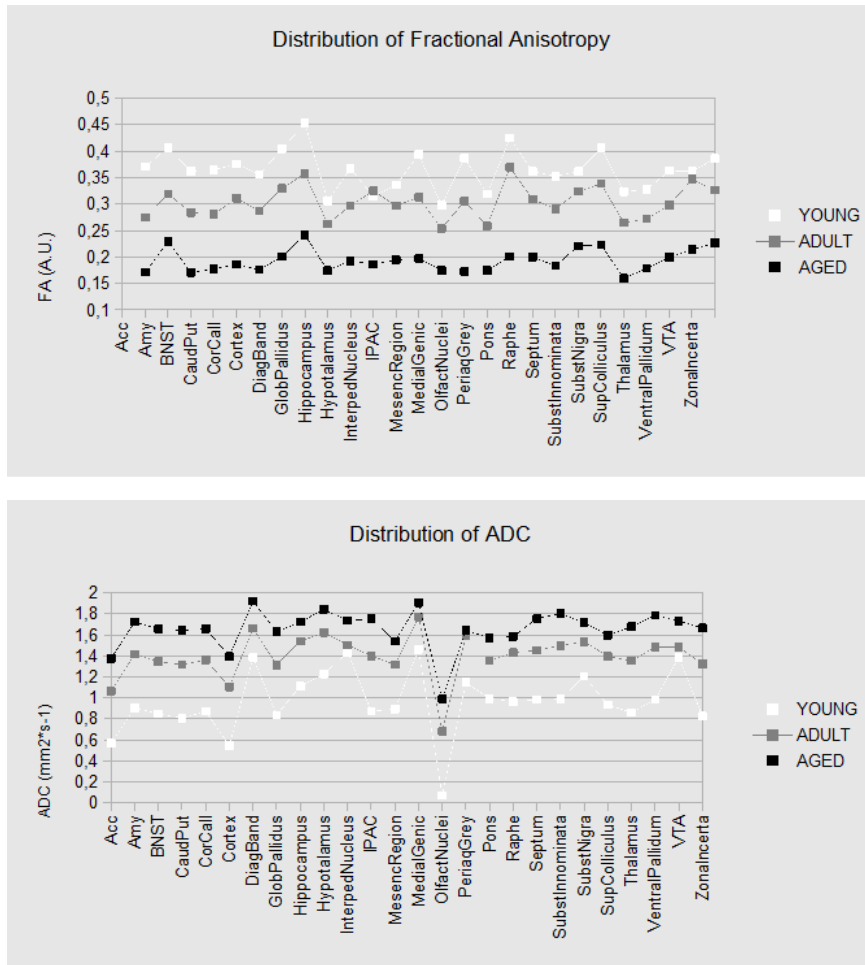


Fig. 5.8b Valori di FA e ADC nelle regioni del cervello dei ratti giovani, adulti e vecchi.

Al fine di confermare i risultati ottenuti, un numero limitato di animali (n=3 per ogni gruppo) sono stati analizzati anche ex vivo. L'analisi ex vivo è stata eseguita al fine di acquisire immagini DTI ad alta risoluzione; tale acquisizione richiede un tempo molto lungo non compatibile con l'esperimento in vivo. Dopo il completamento degli esperimenti in vivo, gli animali sono stati sacrificati e i campioni preparati come descritto nel paragrafo 4. I risultati di questa ultima analisi (Fig.5.9) hanno confermato i dati ottenuti in vivo con una rilevante diminuzione della FA e aumento del parametro ADC.

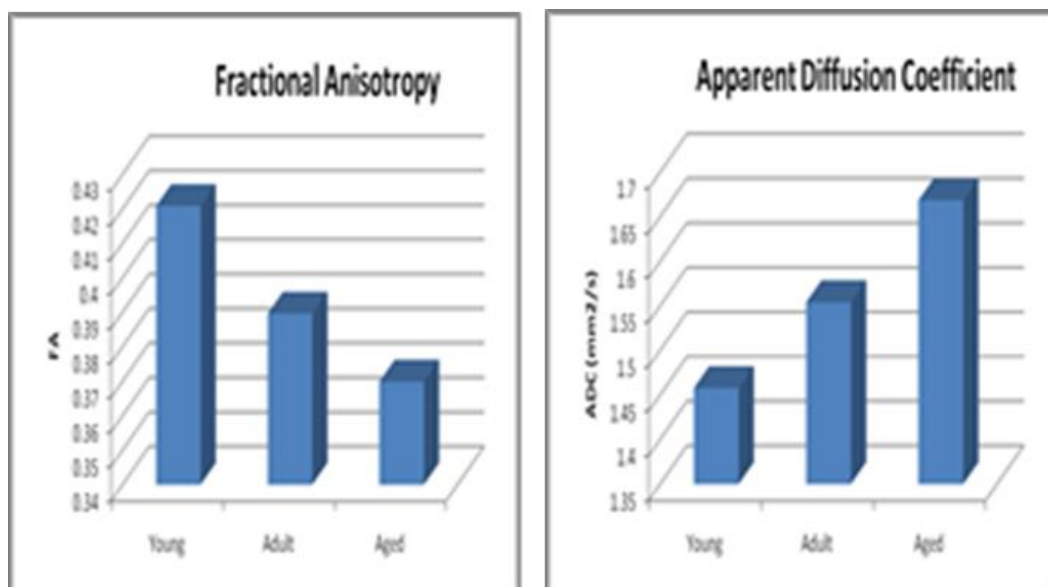


Fig. 5.9 Parametri FA e ADC calcolati sulle acquisizioni DTI ex vivo: entrambi confermano l'andamento riscontrato durante gli studi in vivo.

### 5.2.3 Altri esperimenti: Spettroscopia Localizzata (MRS) e Imaging Funzionale (fMRI)

La Fig.5.10 mostra il posizionamento dei voxels utilizzati nello studio di MRS: i voxels sono stati posizionati nell'ippocampo, nella corteccia prefrontale e nella corteccia parietale. Nella stessa figura sono riportati alcuni spettri rappresentativi e l'analisi degli spettri stessi eseguita con LCModel. Sebbene negli spettri protonici cerebrali siano riconoscibili diversi metaboliti (NAA, Cr, PCr, GPC+PCh, Glu, Lac) mi sono focalizzata sul dato quantitativo relativo al metabolita NAA (N-Acetil aspartato) perché i dati di letteratura nell'umano generalmente indicano una sua diminuzione con l'età. Inoltre il contenuto di NAA è generalmente assunto come un marker della vitalità neuronale. I valori sono stati confrontati (giovani vs vecchi). Abbiamo ottenuto un aumento statisticamente significativo della concentrazione assoluta (i.e. relativamente all'acqua) di NAA con l'aumentare dell'età nella corteccia prefrontale (Tabella 5.3). Questo risultato è sorprendente in quanto la maggior parte dei dati umani indicano l'andamento opposto. Una possibile spiegazione sta nel fatto che la nostra quantificazione è ottenuta tramite il raffronto con il segnale dell'acqua e una possibile diminuzione del contenuto di acqua tissutale con l'età potrebbe aver influenzato questi risultati.



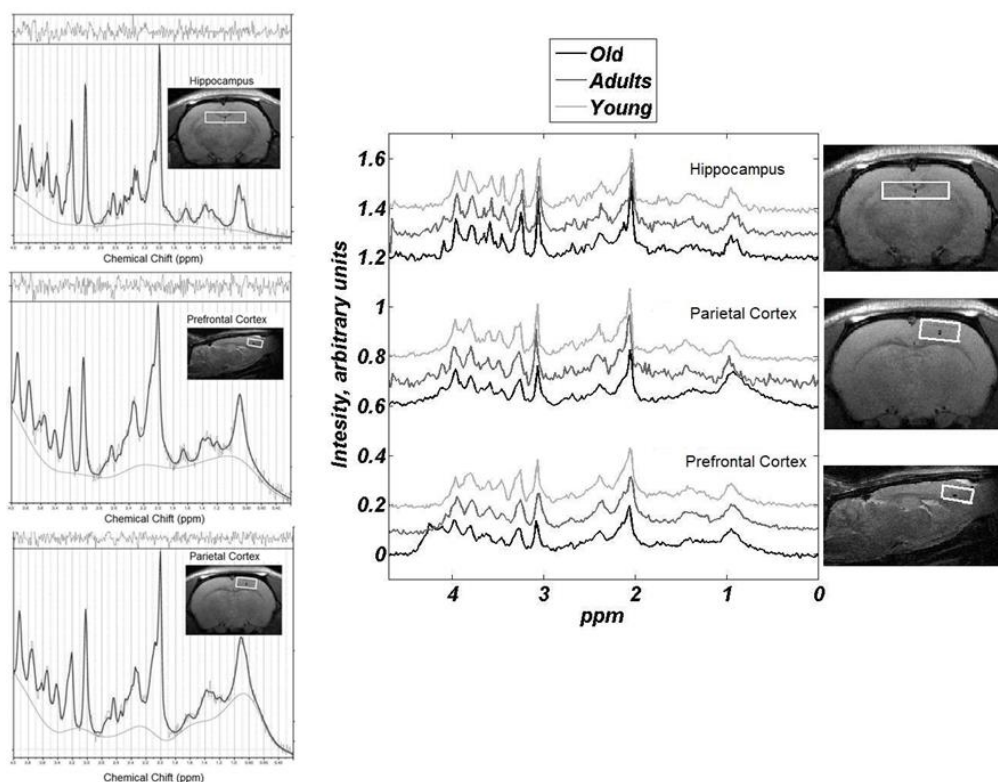


Fig. 5.10 Posizionamento dei voxels e relativi spettri del metabolita NAA (N-Acetil aspartato)

		NAA+NAAG
H	Young	11.20±0.48
	Old	10.84±0.93
TC	Young	11.84±1.30
	Old	10.85±2.02
PC	Young	8.22±1.3*
	Old	9.61±0.81

Tabella 5.3 Concentrazione assoluta del metabolita NAA (mmol/kg) in diverse regioni cerebrali, determinato utilizzando come riferimento il segnale non soppresso dell'acqua. H=hippocampus; TC= temporal cortex; PC=prefrontal cortex.

Lo stesso protocollo di stimolazione somatosensoriale con imaging funzionale, utilizzato per il modello di EAE, è stato applicato al modello di invecchiamento fisiologico nell'animale da laboratorio, al fine di studiare la plasticità cerebrale, cioè la capacità che ha il cervello di riorganizzarsi in seguito a modificazioni fisiologiche che avvengono nel cervello con l'avanzare dell'età.

Il protocollo di stimolazione prevedeva l'utilizzo di 14 ratti sani maschi adulti di 9±1 mesi di età, ceppo Sprague Dawley (400-450g di peso corporeo),

stabulati in condizioni standard di ciclo luce/buio e in gabbie con libero accesso a cibo e acqua, e n=8 animali vecchi dello stesso ceppo degli adulti e stabulati nelle stesse condizioni. Gli animali del gruppo dei vecchi hanno un'età di  $21\pm 1$  mesi e sono stati ottenuti dall'Istituto Nazionale di Riposo e Cura per Anziani di Ancona (I.N.R.C.A.).

Gruppo ratti adulti: su un totale di n= 14 animali adulti (controllo), abbiamo trovato attivazione nella corteccia somatosensoriale in n=8 (corrispondente al 57% dei soggetti). I rimanenti 6 animali non hanno mostrato attivazione misurabile. Questo è stato attribuito al fatto che i parametri fisiologici erano fuori dagli intervalli di riferimento:  $pCO_2 > 40$  mmHg osservata in n=3 animali, rate del respiro  $> 90$  resp/min che origina artefatti da movimento nelle immagini, in n=2 animali, e in n=1 animale la temperatura corporea aveva un valore più basso del limite inferiore accettabile di  $36.5^\circ C$ . Negli animali che hanno mostrato attivazione, il numero dei voxel attivati fu di  $591\pm 99$  (media $\pm$ SE). Dato che la dimensione di un singolo voxel è di  $0.01715$  mm<sup>3</sup>, ne risulta un volume medio di attivazione di  $10.04\pm 1.68$  mm<sup>3</sup> (media $\pm$ SE).

I risultati sono riportati in tabella 5.4 sia come valori per singolo animale sia come valore medio. Nella figura 5.11 viene riportata l'area attivata (in colore) sovrapposta all'immagine morfologica, sia per n=3 singoli animali (Fig.5.11a) rappresentativi sia per la media del gruppo in esame (group analysis, Fig.5.11b). La posizione anatomica dell'area attivata è, come ci si aspetta, nella corteccia somatosensoriale corrispondente alla zona della zampa anteriore contro laterale.

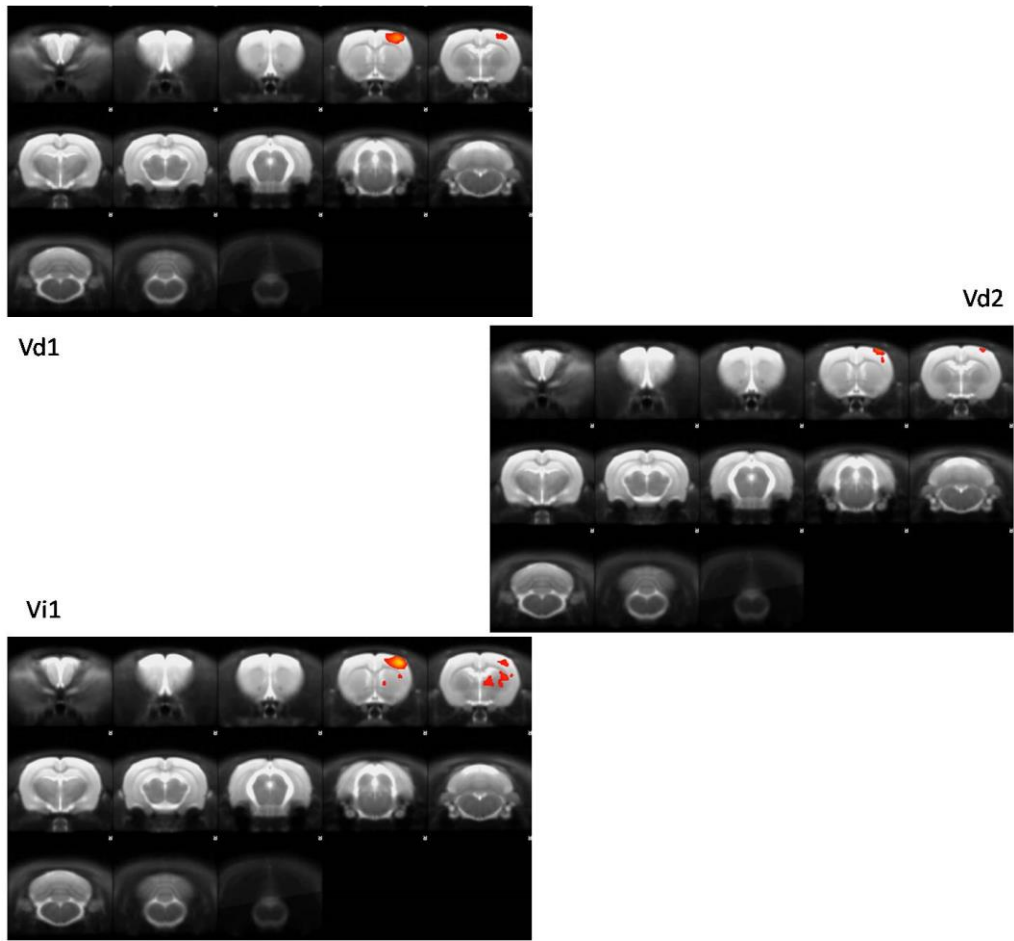


Fig.5.11a Area di attivazione in tre soggetti adulti.

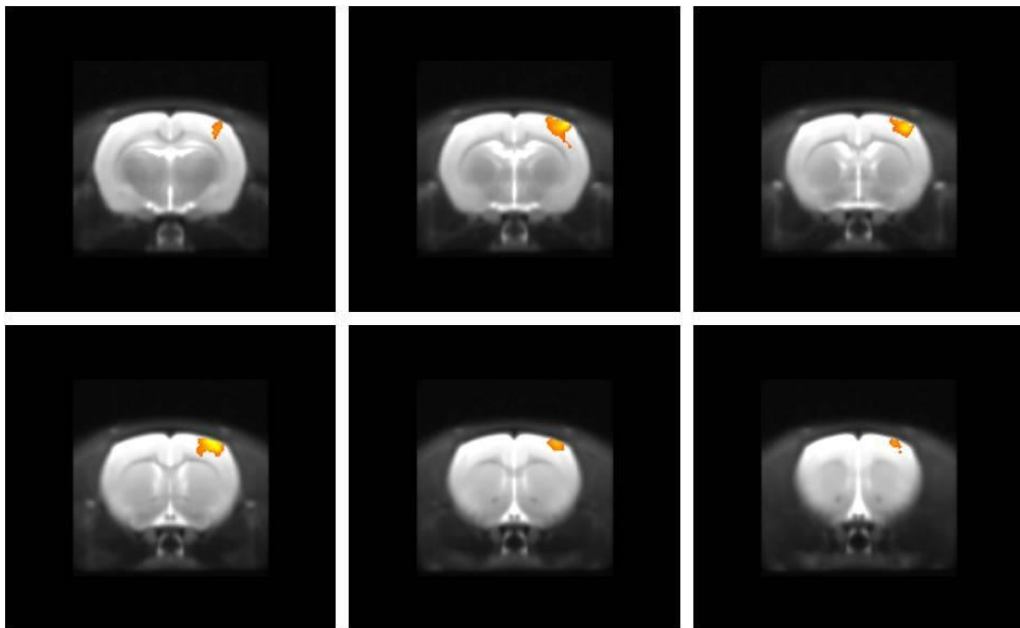


Fig. 5.11b Area di attivazione gruppo ratti adulti.

Gruppo ratti vecchi: su un totale di n=8 animali, abbiamo avuto attivazione nella corteccia somatosensoriale in n=6. In n=2 animali non abbiamo riscontrato attivazione a causa dell'instabilità dei valori respiratori che causavano artefatti da movimento e sono stati scartati dall'esperimento. I risultati sono riportati nella tabella 5.4 come volume della zona attivata. Dalla tabella abbiamo però escluso uno dei soggetti che ha avuto una zona attivata molto più ampia della media. Se infatti lo teniamo in considerazione, il volume medio sui 6 soggetti in cui si è registrata attivazione vale  $35 \pm 26 \text{ mm}^3$  (media $\pm$ SE), mentre l'animale in oggetto presentava un volume della zona attivata di  $165.903 \text{ mm}^3$ . Essendo questo valore distante dalla media per più di 2SD (SD= $64,18 \text{ mm}^3$ ), questo soggetto è stato escluso. In questo modo, nei rimanenti 5 animali abbiamo un valore medio di volume attivato di  $521 \pm 83$  (media $\pm$ SE) voxel corrispondenti a  $8.85 \pm 1.41 \text{ mm}^3$  (media $\pm$ SE). L'area attivata nel caso del gruppo dei vecchi non è significativamente diversa dal gruppo degli adulti. Nella figura 5.12 viene riportata l'area attivata (in colore) sovrapposta all'immagine morfologica, sia per n=3 singoli animali rappresentativi (Fig.5.12a) sia per la media del gruppo in esame (Fig.5.12b).

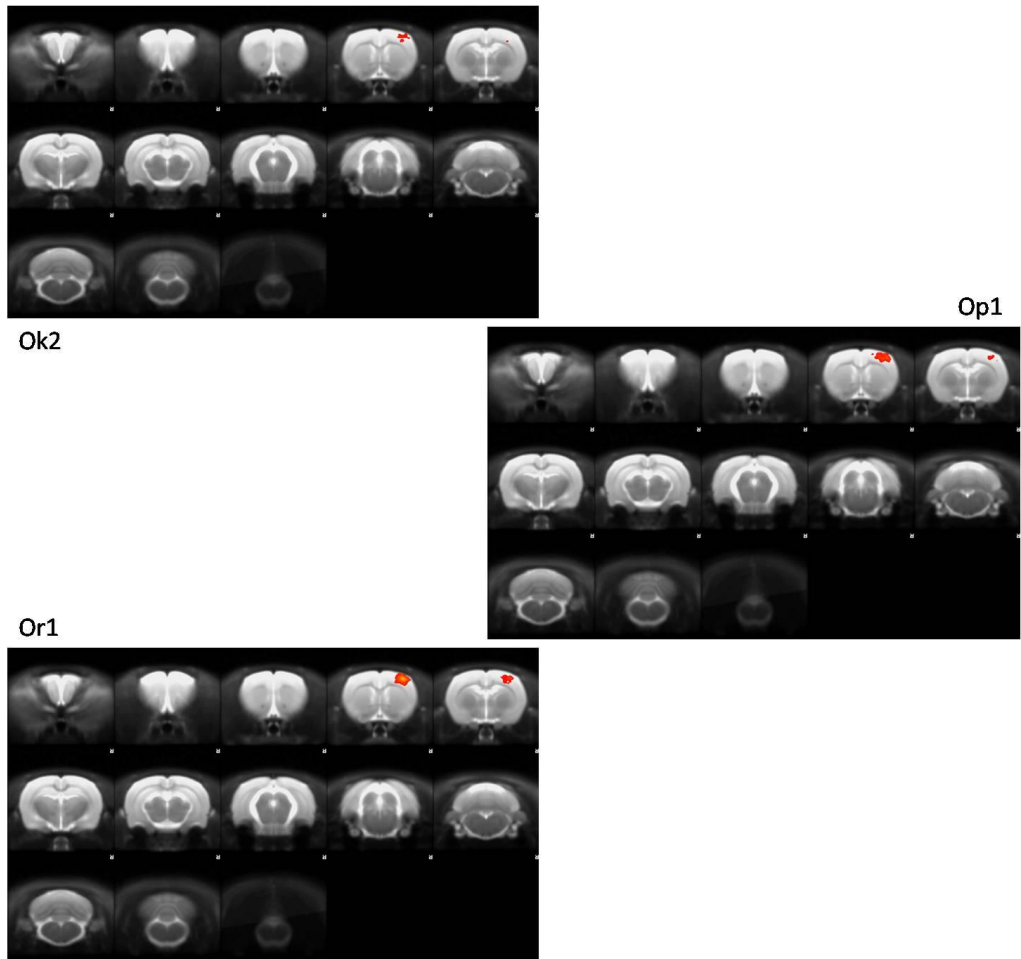


Fig.5.12a Area di attivazione in tre soggetti vecchi.

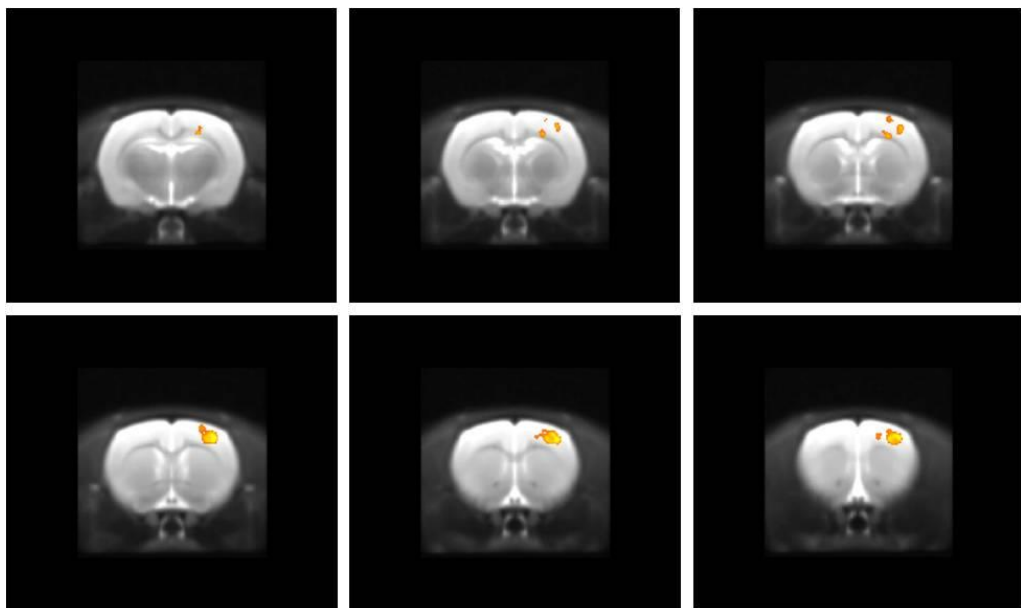


Fig.5.12b Area di attivazione gruppo ratti vecchi

Adulti	SUBJ	N° Voxel	Volume(mm3)	Vecchi	Subj	N° Voxel	Volume(mm3)
1	Vb1	513	8,721	1	Oj1	271	4,607
2	Vd1	1010	17,17	2	Oj2	409	6,953
3	Vd2	775	13,175	3	Ok2	526	8,942
4	Vg1	492	8,364	4	Op1	707	12,019
5	Vh1	284	4,828	5	Or1	690	11,73
6	Vi1	905	15,385	<b>Media</b>		<b>520,60</b>	<b>8,85</b>
7	Vk1	249	4,233	<b>SE</b>		<b>83,13</b>	<b>1,41</b>
8	VS1	498	8,466				
<b>Media</b>		<b>590,75</b>	<b>10,04</b>				
<b>SE</b>		<b>98,54</b>	<b>1,68</b>				

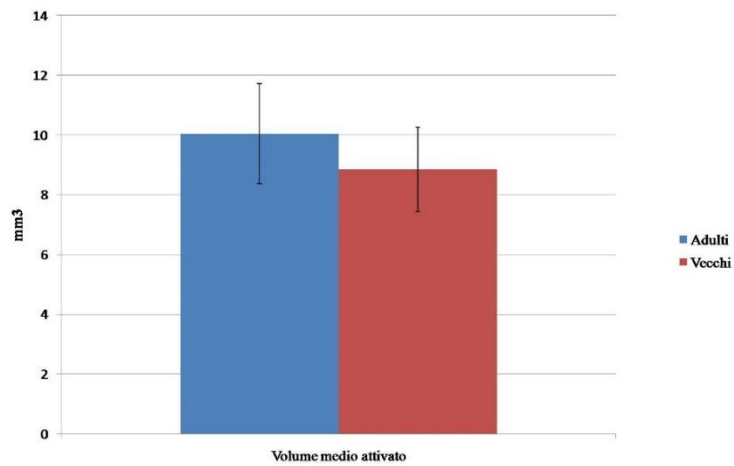
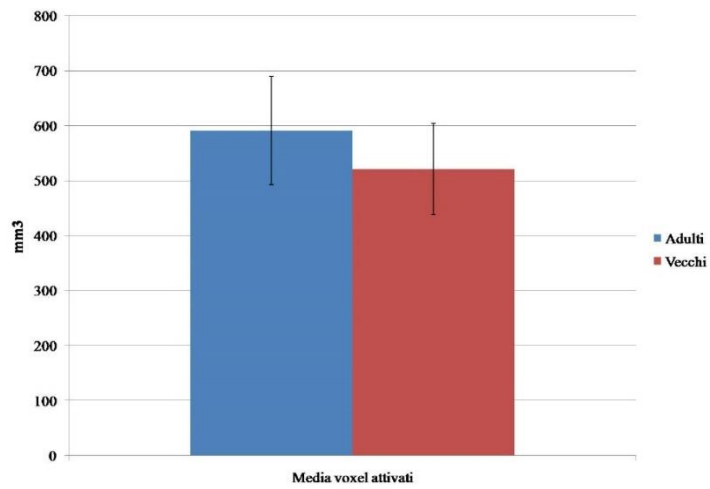


Tabella 5.4: i valori rappresentano il numero di voxel attivati e il volume attivato nei soggetti adulti e vecchi.

Nella tabella 5.5 vengono riportati in corrispondenza a varie regioni cerebrali la percentuale del volume attivato. Per esempio, si vede che nel gruppo degli adulti il volume attivato corrisponde al 59.45% della corteccia sensoriale mentre nel gruppo dei vecchi risulta attivato il 64.46% di questa area.

	ADULT MASK	AGED MASK
CortexEntorhinal	0,00%	0,00%
CortexPiriform	0,00%	0,00%
CortexEntorhinalPiriform	0,00%	0,00%
CortexMotor	33,09%	27,21%
CortexS1	59,45%	64,46%
CortexSomatosensory	59,45%	64,46%
CortexInsular	0,00%	0,00%
CortexAgranularInsular	0,00%	0,00%
CortexCingulate	0,00%	0,00%
CortexRetrosplenial	0,00%	0,00%
CortexVisual	0,00%	0,00%
CortexAuditory	0,00%	0,00%
CortexSensory	59,45%	64,46%
CortexFrontalAssociation	0,00%	0,00%
CortexParietalAssociation	0,00%	0,00%
CortexTemporalAssociation	0,00%	0,00%
CortexOrbitofrontal	0,00%	0,00%
CortexMedialPrefrontal	0,00%	0,00%

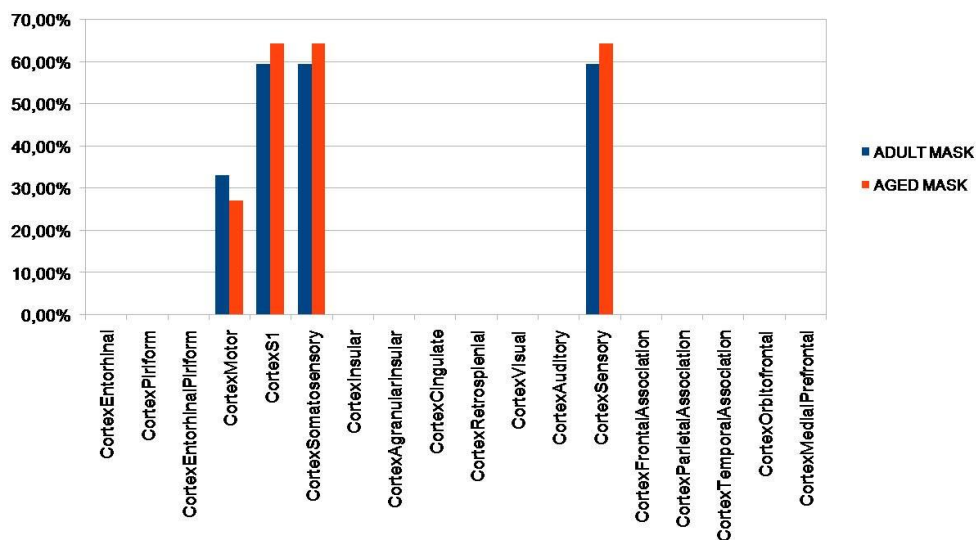


Tabella 5.5 Frazione delle regioni cerebrali contenute dall'area attivata.

In conclusione, l'attivazione è stata riscontrata in oltre il 61% dei soggetti in esame, con una frequenza maggiore nei vecchi rispetto ai giovani, a sostegno del fatto che le procedure sperimentali sono ben tollerate anche in animali di età avanzata. Questa riproducibilità è ottenuta grazie al continuo controllo dei valori fisiologici dell'animale durante l'esecuzione dell'esperimento. Il protocollo, essendo non invasivo, è applicabile anche a studi longitudinali. Nel gruppo dei ratti adulti abbiamo rilevato un volume totale della zona attivata del cervello di ratto di  $10.04 \pm 1.68 \text{ mm}^3$  in buon accordo con i valori riportati in letteratura (Van Camp et al, 2006).

Il volume dell'area attivata sul gruppo dei ratti vecchi non risulta statisticamente diverso da quello dei ratti adulti ( $8.85 \pm 1.41 \text{ mm}^3$ ). Questo risultato si discosta da quanto riportato in letteratura sugli studi dell'invecchiamento cerebrale umano e può avere più motivi di giustificazione, alcuni di ordine sperimentale, altri di ordine fisiologico.



## 6. Discussione e Conclusioni

Questo lavoro di tesi è stato focalizzato sulla messa a punto di tecniche sperimentali avanzate di neuroimaging a risonanza magnetica e sul loro utilizzo in due modelli sperimentali di patologia: un modello sperimentale di sclerosi multipla (EAE) ed un modello di invecchiamento fisiologico entrambi implementati nel ratto. Gli studi sono stati eseguiti con il fine di ottenere dati a supporto dell'utilizzo dei suddetti modelli come modelli traslazionali che avessero quindi un chiaro riscontro negli studi clinici.

Nel modello sperimentale di EAE ci siamo focalizzati principalmente sulla risposta funzionale. Infatti, in generale, meccanismi adattativi e neuroprotettivi compensano la degenerazione neuronale e il declino neurologico nei pazienti con sclerosi multipla. Diversi studi hanno riportato che esiste una riorganizzazione delle aree corticali (in risposta a determinati stimoli o nell'eseguire determinati compiti) che ha lo scopo di limitare l'impatto funzionale delle lesioni cerebrali. (Buckle, 2005; Pantano et al., 2006; Loitfelder et al., 2011). Ad oggi i meccanismi che sono alla base di questa riorganizzazione funzionale non sono conosciuti. I modelli animali delle patologie umane rappresentano utili mezzi per studiare l'evoluzione di un dato evento patologico e i meccanismi che ne sono alla base. (Marzola and Sbarbati, 2004; Nathoo et al., 2014). Per essere utile il modello sperimentale dovrebbe riprodurre il più possibile la patologia umana. Il modello sperimentale di EAE indotto nel ratto DA risulta in una malattia neurologica infiammatoria cronica che ricapitola diversi aspetti della patologia umana (Stosic-Grujicic et al., 2004; Giatti et al., 2013). Tuttavia, in questo modello, non erano disponibili dati sulla risposta funzionale né sulla possibile atrofia corticale. La progressiva perdita di volume cerebrale è una caratteristica importante della sclerosi multipla specialmente nella fase progressiva della malattia (Filippi et al., 2012). In questo studio abbiamo rivelato atrofia sia della materia grigia che della bianca con studi in vivo ed ex vivo. In particolare l'analisi VBM delle immagini morfologiche T2w ha mostrato atrofia della materia grigia sia nella fase precoce (30 dpi) che nella fase cronica (60 dpi). Questo è perfettamente in linea con quanto riportato nei pazienti con sclerosi multipla in cui viene riportata atrofia

della materia grigia già nella fase precoce (Chard et al., 2002). E' interessante notare che l'atrofia riscontrata nel modello sperimentale riguarda principalmente la corteccia motoria e sensoriale, cioè le regioni principalmente coinvolte nella riorganizzazione funzionale.

Nello studio della risposta funzionale con stimolazione somatosensoriale, abbiamo trovato importanti modificazioni sia nella fase acuta che in quella cronica. Un sostanziale aumento del volume di cervello attivato è stato rivelato con attivazioni bilaterali della corteccia (S1, S2, motoria), del talamo e anche di altre regioni corticali e sensoriali (esempio l'area visiva). Questi risultati sono in linea con quanto è stato riportato nell'uomo (Filippi and Rocca, 2009): riorganizzazione corticale e attivazione dei siti di integrazione multimodale generalmente non attivati da stimoli semplici (esempio corteccia visiva e talamo) che vengono reclutati per mantenere la capacità funzionale in risposta al danneggiamento tissutale (Rocca et al., 2005 Cerasa et al., 2006, Ceccarelli et al 2010). Anche il reclutamento della corteccia S2 può avere un ruolo compensatorio di contrasto alla perdita funzionale. In conclusione, i nostri risultati forniscono ulteriore supporto alla validità del modello sperimentale di EAE implementato nei ratti DA e definiscono una piattaforma sperimentale innovativa che può essere fondamentale per la comprensione di meccanismi chiave che determinano l'accumulo di disabilità irreversibile e per testare terapie innovative nella ricerca sulla sclerosi multipla.

Nel modello di invecchiamento fisiologico abbiamo condotto uno studio molto ampio per cercare di valutare quali parametri MRI sono in accordo con i dati umani. I dati morfologici ottenuti in questo lavoro sul modello sperimentale indicano una sostanziale conservazione del volume di materia grigia, una diminuzione del volume di materia bianca (negli adulti, rispetto ai giovani) e un aumento del fluido cerebrospinale cioè del volume ventricolare (negli adulti, rispetto ai giovani e nei vecchi rispetto ai giovani). Questo dato riproduce l'atrofia cerebrale che è ben nota essere presente nell'invecchiamento fisiologico umano (Minati et al, 2007). Anche la diminuzione del volume di materia bianca è stato riportato nell'anziano (Minati et al, 2007) insieme ad una degenerazione della materia bianca stessa che è stata misurata tramite i parametri DTI. Nel nostro

studio osserviamo un chiaro trend di aumento di ADC e un chiaro trend di diminuzione della FA. Questo risultato è in accordo con quanto riportato nella letteratura clinica (Minati et al, 2007; Madden DJ et al 2012). Abbiamo anche osservato che questo trend riguarda l'intero cervello e non specifiche aree. Studi di analisi di immagine più accurati in cui viene definita meglio la materia bianca nel cervello del ratto, potrebbero comunque fornire risultati più informativi.

Per quanto riguarda gli studi spettroscopici, il metabolita N-acetil-aspartato è considerato un marker neuronale, dato che è presente solo all'interno del corpo neuronale e all'interno di assoni e dendriti. Concentrazioni ridotte di NAA possono indicare perdita di cellule neuronali, diminuito metabolismo neuronale, perdita di strutture dendritiche e ridotta mielinazione (Minati et al, *J of Geriatr Psychiatry and Neurol*, 2007). Sebbene ci sia un certo grado di controversia in letteratura, diversi studi clinici hanno riportato riduzioni nella concentrazione assoluta di NAA con l'età (tra la seconda e l'ottava decade di vita è stata riportata una diminuzione del 10%). Come riportato nel paragrafo precedente, tuttavia, i nostri risultati sul cervello di ratto sono in disaccordo: un lieve aumento della concentrazione assoluta di NAA viene osservato con l'età nella corteccia prefrontale. Tale risultato potrebbe anche essere collegato alla normalizzazione utilizzata (il contenuto assoluto di NAA viene determinato in rapporto al segnale dell'acqua assunto costante). Ulteriori studi sono necessari per chiarire meglio questo aspetto.

Per quanto riguarda l'imaging funzionale, il volume dell'area attivata sul gruppo dei ratti vecchi ( $8.85 \pm 1.41 \text{ mm}^3$ ) non risulta statisticamente diverso da quello dei ratti adulti ( $10.04 \pm 1.68 \text{ mm}^3$ ) mentre negli studi di imaging funzionale sull'uomo si osserva una risposta in generale più ampia (spazialmente) ma allo stesso tempo più debole. Il nostro risultato si discosta quindi da quanto riportato in letteratura sugli studi dell'invecchiamento cerebrale umano e può avere più motivi di giustificazione, alcuni di ordine sperimentale, altri di ordine fisiologico. Da un punto di vista sperimentale, questo risultato potrebbe essere dovuto alla sensibilità. Negli studi di imaging funzionale sull'uomo si osserva una risposta in generale più ampia (spazialmente) ma allo stesso tempo più debole. È possibile che questo si verifichi anche nell'animale ma, dati i problemi sperimentali che si

hanno in campo preclinico (anestesia e variabilità dei parametri fisiologici), e dato anche che l'esperimento è stato fatto a campo relativamente basso, potrebbe essere accaduto che una parte dei pixel attivati non siano stati rilevati. Questa ipotesi potrebbe essere verificata in studi futuri acquisendo il segnale a campi più alti.

Un altro aspetto è legato al fatto ben noto che, con l'invecchiamento, il cervello subisce un certo grado di atrofia. In tal caso il volume della regione attivata andrebbe considerato in rapporto al volume totale della corteccia (Minati et Al., 2007). Questo potrebbe cambiare il risultato in confronto con i dati dell'adulto. In futuro l'analisi delle immagini verrà ripetuta in questi termini.

Da un punto di vista fisiologico, la mancata estensione della zona attivata rispetto agli adulti potrebbe essere interpretato come una caratteristica fisiologica che esprima la differenza tra l'invecchiamento nell'uomo e nell'animale da laboratorio.

Nell'uomo il processo di invecchiamento è molto lento e richiede parecchi anni. Questa lentezza è stata giustificata come una caratteristica evolutiva che permette al cervello di riorganizzarsi (Minati et al, 2007). Nel ratto l'invecchiamento si verifica in tempi molto più brevi e quindi non sufficienti per attuare i meccanismi di plasticità.

Una ultima considerazione va fatta sul numero abbastanza basso di soggetti esaminati fino ad ora. Un ulteriore sviluppo sarà quello di aumentare la numerosità del campione. Questo aspetto è però limitato dal notevole costo degli animali vecchi.

I risultati ottenuti fino ad ora nel modello di invecchiamento, quindi, mostrano una certa differenziazione rispetto all'invecchiamento umano, sebbene come discusso in precedenza necessitano di essere ulteriormente validati.

In conclusione durante il mio lavoro di ricerca portato avanti per il conseguimento del titolo di dottorato, ho messo a punto e validato diverse tecniche di neuroimaging avanzate che hanno permesso di ottenere risultati innovativi su due modelli sperimentali, allo scopo anche di ottenere una loro ulteriore validazione.

## 7. Bibliografia

Attwell and Laughlin, An energy budget for signaling in the grey matter of the brain, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2001.

Bandettini et al, Time course EPI of human brain function during task activation, *Magn Reson Med*, 1992.

Basser PJ1, Pierpaoli C, Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI, *J Magn Reson B*. 1996 Jun;111(3):209-19.

Beaulieu, The basis of anisotropic water diffusion in the nervous system - a technical review., *NMR Biomed*. 2002 Nov-Dec;15(7-8):435-55.

Buckle GJ1, Functional magnetic resonance imaging and multiple sclerosis: the evidence for neuronal plasticity., *J Neuroimaging*. 2005;15(4 Suppl):82S-93S.

Ceccarelli A1, Rocca MA, Valsasina P, Rodegher M, Falini A, Comi G, Filippi M, Structural and functional magnetic resonance imaging correlates of motor network dysfunction in primary progressive multiple sclerosis., *Eur J Neurosci*. 2010 Apr;31(7):1273-80. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07147. x. Epub 2010 Mar 19.

Cerasa A1, Fera F, Gioia MC, Liguori M, Passamonti L, Nicoletti G, Vercillo L, Paolillo A, Clodomiro A, Valentino P, Quattrone A., Adaptive cortical changes and the functional correlates of visuo-motor integration in relapsing-remitting multiple sclerosis., *Brain Res Bull*. 2006 May 31;69(6):597-605. Epub 2005 Dec 9.

Chard DT1, Griffin CM, McLean MA, Kapeller P, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH., Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis., *Brain*. 2002 Oct;125(Pt 10):2342-52.

Charles HC1, Lazeyras F, Krishnan KR, Boyko OB, Patterson LJ, Doraiswamy PM, McDonald WM., Proton spectroscopy of human brain: effects of age and sex., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1994 Oct;18(6):995-1004.

Davie CA1, Hawkins CP, Barker GJ, Brennan A, Tofts PS, Miller DH, McDonald WI., Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions., *Brain*. 1994 Feb;117 (Pt 1):49-58.

Dirnagl et al, Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide, *Am J Physiol*, 1994

Filippi M1, Rocca MA., Functional MR imaging in multiple sclerosis., *Neuroimaging Clin N Am*. 2009 Feb;19(1):59-70. doi: 10.1016/j.nic.2008.08.004.

Filippi M1, Rocca MA., New magnetic resonance imaging biomarkers for the diagnosis of multiple sclerosis., *Expert Opin Med Diagn*. 2012 Mar;6(2):109-20. doi: 10.1517/17530059.2012.657624. Epub 2012 Jan 30.

FMRIB Centre “Brief introduction to fMRI physiology”.

Friedman SD, Brooks WM, Jung RE, Hart BL, Yeo RA., Proton MR spectroscopic findings correspond to neuropsychological function in traumatic brain injury., *AJNR Am J Neuroradiol*. 1998 Nov-Dec;19(10):1879-85.

Giatti S1, Boraso M, Abbiati F, Ballarini E, Calabrese D, Santos-Galindo M, Rigolio R, Pesaresi M, Caruso D, Viviani B, Cavaletti G, Garcia-Segura LM, Melcangi RC., Multimodal analysis in acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis., *J Neuroimmune Pharmacol*. 2013 Mar;8(1):238-50. doi: 10.1007/s11481-012-9385-9. Epub 2012 Jun 30.

Gozzi Alessandro, tesi Ph.D “Probing brain function with pharmacological MRI”.

Hornak Joseph P., Ph.D, “The basics of MRI”, III edizione 2011

Hudetz et al, Effects of hypoxia and hypercapnia on capillary flow velocity in the rat cerebral cortex, *Microvasc Res*, 1997.

Iadecola et al, Obligatory role of NO in glutamate-dependent hyperemia evoked from cerebellar parallel fibers, *Am J Physiol*, 1997.

Ibayashi et al, The effects of dipyridamole and theophylline on rat pial vessels during hypocarbia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988.

Keevil SF, Spatial localization in nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Phys Med Biol*. 2006 Aug 21;51(16): R579-636. Epub 2006 Jul 26.

Kwong et al, Magnetic resonance imaging mapping of brain function. Human visual cortex, *Invest Radiol*, 1992.

Kyrtatos et al, Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury, *JACC Cardiovasc Interv*, 2009.

Logothetis et al, Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal, *Nature*, 2001.

Loitfelder M1, Fazekas F, Petrovic K, Fuchs S, Ropele S, Wallner-Blazek M, Jehna M, Aspeck E, Khalil M, Schmidt R, Neuper C, Enzinger C., Reorganization in cognitive networks with progression of multiple sclerosis: insights from fMRI., *Neurology*. 2011 Feb 8;76(6):526-33. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820b75cf.

Lu D1, Pavlakis SG, Frank Y, Bakshi S, Pahwa S, Gould RJ, Sison C, Hsu C, Lesser M, Hoberman M, Barnett T, Hyman RA., Proton MR spectroscopy of the basal ganglia in healthy children and children with AIDS., *Radiology*. 1996 May;199(2):423-8.

Madden DJ1, Bennett IJ, Burzynska A, Potter GG, Chen NK, Song AW., Diffusion tensor imaging of cerebral white matter integrity in cognitive aging., *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1822(3):386-400. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.08.003. Epub 2011 Aug 16.

Malonek and Grinvald, Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping, *Science*, 1996.

Mandeville and Marota, Vascular filters of functional MRI: spatial localization using BOLD and CBV contrast, *Magn Res Med*, 1999.

Mandeville et al, Dynamic functional imaging of relative cerebral blood volume during rat forepaw stimulation, *Magn Reson Med*, 1998.

Mangia et al, Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity: current hypotheses, theoretical predictions and in vivo NMR experimental findings, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2009

Marzola P1, Sbarbati A., Magnetic resonance imaging in animal models of pathologies., *Methods Enzymol.* 2004;386: 177-200.

Minati et al, MR spectroscopy, functional MRI, and diffusion-tensor imaging in the aging brain: a conceptual review, *J of Geriatr Psychiatry and Neurol*, 2007.

Moseley ME1, Cohen Y, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Asgari HS, Wendland MF, Tsuruda J, Norman D., Diffusion-weighted MR imaging of anisotropic water diffusion in cat central nervous system., *Radiology.* 1990 Aug;176(2):439-45.

Nathoo N1, Yong VW2, Dunn JF3., Understanding disease processes in multiple sclerosis through magnetic resonance imaging studies in animal models., *Neuroimage Clin.* 2014 Apr 24; 4:743-56. doi: 10.1016/j.nicl.2014.04.011. eCollection 2014.

Neil JJ1, Shiran SI, McKinstry RC, Schefft GL, Snyder AZ, Almlí CR, Akbudak E, Aronovitz JA, Miller JP, Lee BC, Conturo TE., Normal brain in human newborns: apparent diffusion coefficient and diffusion anisotropy measured by using diffusion tensor MR imaging., *Radiology.* 1998 Oct;209(1):57-66.

Ngai et al, Modulation of cerebral arteriolar diameter by intraluminal flow and pressure, *Circ Res.*, 1995.

Nomura Y1, Sakuma H, Takeda K, Tagami T, Okuda Y, Nakagawa T., Diffusional anisotropy of the human brain assessed with diffusion-weighted MR: relation with normal brain development and aging., *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994 Feb;15(2):231-8.

Ogawa et al, Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990.



Ogawa et al, Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992.

Pantano P1, Mainero C, Caramia F, Functional brain reorganization in multiple sclerosis: evidence from fMRI studies, J Neuroimaging. 2006 Apr;16(2):104-14.

Paulson and Newman, Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow, Science, 1987.

Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates: San Diego: Academic

Pini L, Pievani M, Bocchetta M, Altomare D, Bosco P, Cavedo E, Galluzzi S, Marizzoni M, Frisoni GB. Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. Ageing Res Rev. 2016 Sep; 30:25-48. doi: 10.1016/j.arr.2016.01.002. Review. PubMed PMID: 26827786.).

Rocca MA1, Colombo B, Falini A, Ghezzi A, Martinelli V, Scotti G, Comi G, Filippi M., Cortical adaptation in patients with MS: a cross-sectional functional MRI study of disease phenotypes., Lancet Neurol. 2005 Oct;4(10):618-26.

Rutherford MA1, Cowan FM, Manzur AY, Dubowitz LM, Pennock JM, Hajnal JV, Young IR, Bydder GM., MR imaging of anisotropically restricted diffusion in the brain of neonates and infants., J Comput Assist Tomogr. 1991 Mar-Apr;15(2):188-98.

Sakuma H1, Nomura Y, Takeda K, Tagami T, Nakagawa T, Tamagawa Y, Ishii Y, Tsukamoto T., Adult and neonatal human brain: diffusional anisotropy and myelination with diffusion-weighted MR imaging., Radiology. 1991 Jul;180(1):229-33.

Schwarz et al, A stereotaxic MRI template set for the rat brain with tissue class distribution maps and co-registered anatomical atlas: application to pharmacological MRI, Neuroimage, 2006.

Smirnakis SM<sup>1</sup>, Schmid MC, Weber B, Tolia AS, Augath M, Logothetis NK., Spatial specificity of BOLD versus cerebral blood volume fMRI for mapping cortical organization, J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Jun;27(6):1248-61. Epub 2007 Jan 10.

Stosic-Grujicic S1, Ramic Z, Bumbasirevic V, Harhaji L, Mostarica-Stojkovic M, Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in Dark Agouti rats without adjuvant., *Clin Exp Immunol*. 2004 Apr;136(1):49-55.

Thulborn et al, Oxygenation dependence of the transverse relaxation time of water protons in whole blood at high field, *BBA*, 1982.

Van Bruggen et al, High-resolution functional magnetic resonance imaging of the rat brain: mapping changes in cerebral blood volume using iron oxide contrast media, *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998.

Van Camp et al, A comparison between blood oxygenation level-dependent and cerebral blood volume contrast in the rat cerebral and cerebellar somatosensory cortex during electrical paw stimulation, *J Magn Reson Imaging*, 2005.

Van Camp et al, Stimulation of the rat somatosensory cortex at different frequencies and pulse widths, *NMR biomed*, 2006

Weber et al, A fully noninvasive and robust experimental protocol for longitudinal fMRI studies in the rat, *Neuroimage*, 2006

Westlye LT1, Walhovd KB, Dale AM, Bjørnerud A, Due-Tønnessen P, Engvig A, Grydeland H, Tamnes CK, Ostby Y, Fjell AM., Life-span changes of the human brain white matter: diffusion tensor imaging (DTI) and volumetry., *Cereb Cortex*. 2010 Sep;20(9):2055-68. doi: 10.1093/cercor/bhp280. Epub 2009 Dec 23.

Yang et al, Attenuation of activity-induced increases in cerebellar blood flow in mice lacking neuronal nitric oxide synthase, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003.

Zaharchuk et al, Cerebrovascular dynamics of autoregulation and hypoperfusion. An MRI study of CBF and changes in total and microvascular cerebral blood volume during hemorrhagic hypotension, *Stroke*, 1999.

## Appendice 1: Pubblicazioni

1 Tambalo S, Peruzzotti-Jametti L, Rigolio R, Fiorini S, Bontempi P, Mallucci G, Balzarotti B, Marmiroli P, Sbarbati A, Cavaletti G, Pluchino S, Marzola P. Functional Magnetic Resonance Imaging of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Reveals Brain Cortex Remodeling. *J Neurosci*. 2015 Jul 8;35(27):10088-100.

2 Ritelli R, Ngalani Ngaleu R, Bontempi P, Dandrea M, Nicolato E, Boschi F, Fiorini S, Calderan L, Scarpa A, Marzola P. Pancreatic cancer growth using magnetic resonance and bioluminescence imaging. *Magn Reson Imaging*. 2015 Jun;33(5):592-9.

3: Valero E, Fiorini S, Tambalo S, Busquier H, Callejas-Fernández J, Marzola P, Gálvez N, Domínguez-Vera JM. In vivo long-term magnetic resonance imaging activity of ferritin-based magnetic nanoparticles versus a standard contrast agent. *J Med Chem*. 2014 Jul 10;57(13):5686-92.

4: Daducci A, Tambalo S, Fiorini S, Osculati F, Teti M, Fabene PF, Corsi M, Bifone A, Sbarbati A, Marzola P. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging investigation of the interferon- $\alpha$  model of depression in rats. *Magn Reson Imaging*. 2014 Jun;32(5):529-34.

5: Mosconi E1, Sima DM, Osorio Garcia MI, Fontanella M, Fiorini S, Van Huffel S, Marzola P. Different quantification algorithms may lead to different results: a comparison using proton MRS lipid signals. *NMR Biomed*. 2014 Apr;27(4):431-43. doi: 10.1002/nbm.3079. Epub 2014 Feb 3.

Development/Plasticity/Repair

## Functional Magnetic Resonance Imaging of Rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Reveals Brain Cortex Remodeling

Stefano Tambalo,<sup>1,3\*</sup> Luca Peruzzotti-Jametti,<sup>4\*</sup> Roberta Rigolio,<sup>5\*</sup> Silvia Fiorini,<sup>1</sup> Pietro Bontempi,<sup>2</sup> Giulia Mallucci,<sup>4,6</sup> Beatrice Balzarotti,<sup>4</sup> Paola Marmioli,<sup>5</sup> Andrea Sbarbati,<sup>1</sup> Guido Cavaletti,<sup>5</sup> Stefano Pluchino,<sup>4</sup> and Pasquina Marzola<sup>2,3</sup>

Departments of <sup>1</sup>Neurological and Movement Sciences and <sup>2</sup>Computer Science, University of Verona, I-37134 Verona, Italy, <sup>3</sup>National Interuniversity Consortium of Materials Science and Technology, I-50121 Florence, Italy, <sup>4</sup>Department of Clinical Neurosciences, Wellcome Trust–Medical Research Council Stem Cell Institute and National Institute for Health Research Biomedical Research Centre, University of Cambridge, Cambridge CB2 0PY, United Kingdom, <sup>5</sup>Experimental Neurology Unit, Department of Surgery and Translational Medicine and Center for Neuroscience of Milan, University of Milan-Bicocca, I-20900 Monza, Italy, and <sup>6</sup>Department of Brain and Behavioural Sciences, National Neurological Institute C. Mondino, University of Pavia, I-27100 Pavia, Italy

Cortical reorganization occurring in multiple sclerosis (MS) patients is thought to play a key role in limiting the effect of structural tissue damage. Conversely, its exhaustion may contribute to the irreversible disability that accumulates with disease progression. Several aspects of MS-related cortical reorganization, including the overall functional effect and likely modulation by therapies, still remain to be elucidated. The aim of this work was to assess the extent of functional cortical reorganization and its brain structural/pathological correlates in Dark Agouti rats with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a widely accepted preclinical model of chronic MS. Morphological and functional MRI (fMRI) were performed before disease induction and during the relapsing and chronic phases of EAE. During somatosensory stimulation of the right forepaw, fMRI demonstrated that cortical reorganization occurs in both relapsing and chronic phases of EAE with increased activated volume and decreased laterality index versus baseline values. Voxel-based morphometry demonstrated gray matter (GM) atrophy in the cerebral cortex, and both GM and white matter atrophy were assessed by *ex vivo* pathology of the sensorimotor cortex and corpus callosum. Neuroinflammation persisted in the relapsing and chronic phases, with dendritic spine density in the layer IV sensory neurons inversely correlating with the number of cluster of differentiation 45-positive inflammatory lesions. Our work provides an innovative experimental platform that may be pivotal for the comprehension of key mechanisms responsible for the accumulation of irreversible brain damage and for the development of innovative therapies to reduce disability in EAE/MS.

**Key words:** brain plasticity; cortical reorganization; experimental autoimmune encephalomyelitis; functional magnetic resonance imaging; multiple sclerosis; neuroimmunology

### Significance Statement

Since the early 2000s, functional MRI (fMRI) has demonstrated profound modifications in the recruitment of cortical areas during motor, cognitive, and sensory tasks in multiple sclerosis (MS) patients. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) represents a reliable model of the chronic-progressive variant of MS. fMRI studies in EAE have not been performed extensively up to now. This paper reports fMRI studies in a rat model of MS with somatosensory stimulation of the forepaw. We demonstrated modifications in the recruitment of cortical areas consistent with data from MS patients. To the best of our knowledge, this is the first report of cortical remodeling in a preclinical *in vivo* model of MS.

## In Vivo Long-Term Magnetic Resonance Imaging Activity of Ferritin-Based Magnetic Nanoparticles versus a Standard Contrast Agent

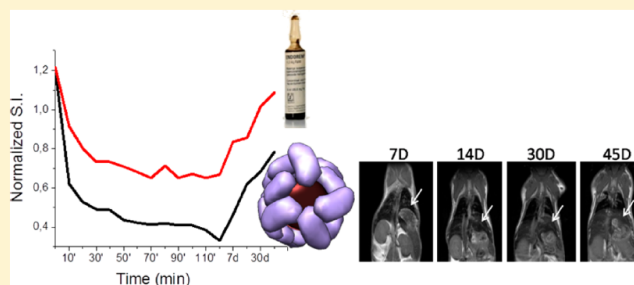
Elsa Valero,<sup>†</sup> Silvia Fiorini,<sup>‡</sup> Stefano Tambalo,<sup>‡</sup> Heriberto Busquier,<sup>§</sup> José Callejas-Fernández,<sup>||</sup> Pasquina Marzola,<sup>\*,‡</sup> Natividad Gálvez,<sup>\*,†</sup> and José M. Domínguez-Vera<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Química Inorgánica, Instituto de Biotecnología, and <sup>||</sup>Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada 18071, Spain

<sup>‡</sup>Dipartimento di Informatica, Università degli Studi di Verona, Verona I-37134, Italy

<sup>§</sup>Sección de Neurroradiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada 18014, Spain

### 5 Supporting Information



**ABSTRACT:** New long-circulating maghemite nanoparticles of 4 and 6 nm, coated with an apoferritin protein capsid, exhibit useful properties to act as magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents. A full in vivo study of the so-called apomaghemites reveals that their long-term MRI properties are better than those of a standard superparamagnetic iron oxide (SPIO) widely used in biomedical applications. The biodistribution of apomaghemites and standard SPIO was investigated by MRI in mice at two different concentrations, 6 and 2.5 mg of Fe·kg<sup>-1</sup>, over 60 days. Significant differences are found at low dose (2.5 mg of Fe·kg<sup>-1</sup>). Thus, whereas apomaghemites are active for MR bioimaging of liver for 45 days, standard SPIO is not effective beyond 7 days. On the basis of our data, we may concluded that apomaghemites can act as new long-term MRI liver contrast agents, allowing first the diagnosis of a liver pathology and then monitoring after treatment without the need for a second injection.

### ■ INTRODUCTION

In recent decades, there has been a growing interest to develop contrast agents for use in biomedical imaging modalities. Magnetic resonance imaging (MRI) ranks among the best noninvasive methodologies today available in clinical medicine, thanks to its superb soft tissue contrast and high spatial resolution. It provides information to the clinician about anatomy and function of tissues. MRI provides good contrast between the different soft tissues of the body. However, sometimes intravenous injection of contrast agents is required to enhance the appearance of blood vessels, tumors, inflamed tissues, or other pathologies. Thus, there is a need for development of better diagnostic probes in order to enhance in vivo MRI performance.<sup>1–7</sup>

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIO) are used in medicine because of their magnetic properties and biocompatibility.<sup>7–16</sup> They are specifically uptake by the monocyte–macrophage system, and therefore they are good candidates to be MRI probes for tissues with high macrophage

phagocytic activity, such as liver or spleen.<sup>2–4</sup> In fact, common clinical targets of SPIOs have been liver diseases.<sup>13–15</sup>

On the other hand, Kupffer cells and macrophages in the liver, spleen, lymph, and bone marrow sequester a great amount of SPIOs, which are phagocytosed, producing a drop in  $T_2$  relaxation times. Primary liver tumors and liver metastases lack Kupffer cells and therefore do not retain SPIOs and do not exhibit a change in MRI signal. This difference produces a strong contrast between tumor and normal tissues, thereby enabling a more precise MRI detection. Nevertheless, SPIOs are rapidly excreted by the liver to the blood plasma, leading to a limitation in SPIO's ability for assessing anatomical and biological functions by MRI.<sup>2</sup>

In this sense, design and preparation of MRI diagnostic agents capable of exhibiting long-term activity is a very important step in expansion of their applications in medicine. These long-term

Received: March 21, 2014

Published: June 5, 2014



## Manganese-enhanced magnetic resonance imaging investigation of the interferon- $\alpha$ model of depression in rats

Alessandro Daducci <sup>a,1</sup>, Stefano Tambalo <sup>a</sup>, Silvia Fiorini <sup>a</sup>, Francesco Osculati <sup>a</sup>, Manuela Teti <sup>a</sup>, Paolo F. Fabene <sup>a</sup>, Mauro Corsi <sup>b</sup>, Angelo Bifone <sup>c</sup>, Andrea Sbarbati <sup>a</sup>, Pasquina Marzola <sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurological, Neuropsychological, Morphological and Motor Sciences, University of Verona, Italy

<sup>b</sup> Aptuit S.r.l. Center for Drug Discovery & Development, Verona, Italy

<sup>c</sup> Center for Neuroscience and Cognitive Systems, Istituto Italiano di Tecnologia, Rovereto, Italy

<sup>d</sup> Department of Computer Science, University of Verona, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2012

Revised 3 February 2014

Accepted 3 February 2014

#### Keywords:

Manganese  
MRI  
Depression  
Interferon- $\alpha$   
Pituitary Gland

### ABSTRACT

Therapeutic effects of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) are known to be associated with CNS toxicity in humans, and in particular with depression symptoms. Animal models of IFN- $\alpha$ -induced depression (sickness behaviour) have been developed in rodents using various preparations, dosing schedules or routes of administrations. In this work, Manganese Enhanced MRI (MEMRI) has been applied to investigate an experimental model of sickness behaviour induced by administration of IFN- $\alpha$  in rats. IFN- $\alpha$  ( $3.10^5$  U/kg), or vehicle, was daily administered i.p., for 7 days in rats ( $n = 20$  IFN- $\alpha$  treated and  $n = 20$  controls). After treatment, animals were assigned to behavioural ( $n = 10$  treated,  $n = 10$  control) or MRI ( $n = 10$  treated and  $n = 10$  control) studies. Animals assigned to the MRI study received two repeated i.p. injections of  $MnCl_2$ , before image acquisition. Images were acquired at 4.7 T using  $T_1$  mapping for determination of Mn concentration in brain. After co-registration of  $T_1$  maps to a digital brain atlas, differences between brains of treated and untreated animals were assessed pixel-to-pixel by statistical analysis.

Behavioural tests showed alterations in freezing and struggling parameters, as expected in an experimental model of sickness behaviour. MRI showed a well defined brain region, mainly contained in the visual cortex, in which Mn uptake was significantly lower in treated than in control animals, indicating probably altered functionality. No significant difference was detected in other brain regions. In addition, a statistically significant decrease in the volume of the pituitary gland, paralleled by a slight increase in its Mn content, was detected in treated animals. MEMRI provides both morphological and functional information in the brain of small laboratory animals and can constitute a valuable tool in the investigation of experimental models of psychiatric diseases.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Recombinant human interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) is widely used clinically for the treatment of hepatitis C viral infection and certain types of cancer. Unfortunately the therapeutic effects of IFN- $\alpha$  are associated with CNS side effects in humans, and in particular with the manifestation of depression symptoms. Quinolinic acid and kynurenic acid may contribute to the behavioral changes experienced by patients during exposure to inflammatory stimuli such as

IFN- $\alpha$  and relationship between depressive symptoms and peripheral blood tryptophan, kynurenate and kynurenic acid during treatment with IFN- $\alpha$  has been indeed described [1]. After recognition of the effects of IFN- $\alpha$  in CNS, several animal models of IFN- $\alpha$ -induced depression-like behaviour, also called sickness behaviour, have been developed in rodents using various preparations, dosing schedules or routes of administrations [2]. Neurochemical and/or behavioural effects of IFN- $\alpha$  administration have been reported, although sometimes difficult to replicate [3]. At the best of our knowledge, no attempt to investigate possible functional/morphological alterations in rodent brain after an IFN- $\alpha$  administration, inducing depression like behaviour, by non-invasive neuroimaging has been reported. Nowadays, psychiatry is the only medical specialty in which diagnoses are made based solely on a clinical interview with the resulting effect that both diagnoses and treatment responses are often inconsistent [4]. Brain imaging has

\* Corresponding author at: Department of Computer Science, University of Verona, Strada Le Grazie 15, I-37134 Verona. Tel.: +39 045 8027614; fax: +39 045 8027163. E-mail address: [pasquina.marzola@univr.it](mailto:pasquina.marzola@univr.it) (P. Marzola).

<sup>1</sup> This work was performed while A. Daducci was with the Department of Neurological, Neuropsychological, Morphological and Motor Sciences, University of Verona. He is now with the Signal Processing Laboratory (LTS5), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland.



## Pancreatic cancer growth using magnetic resonance and bioluminescence imaging



Rossana Ritelli<sup>a</sup>, Raphael Ngalani Ngaleu<sup>b</sup>, Pietro Bontempi<sup>c</sup>, Mario Dandrea<sup>a</sup>, Elena Nicolato<sup>b</sup>, Federico Boschi<sup>d</sup>, Silvia Fiorini<sup>b</sup>, Laura Calderan<sup>b</sup>, Aldo Scarpa<sup>a</sup>, Pasquina Marzola<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology and Diagnostics, University of Verona, Piazzale A. Scuro 10-37134, Italy

<sup>b</sup> Department of Neurological and Movement Sciences, University of Verona, Piazzale A. Scuro 10-37134, Italy

<sup>c</sup> Department of Biotechnology, University of Verona, Strada Le Grazie 15, 37134 Verona, Italy

<sup>d</sup> Department of Computer Science, University of Verona, Strada Le Grazie 15, 37134 Verona, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 August 2014

Revised 19 January 2015

Accepted 16 February 2015

#### Keywords:

Pancreas

Tumor

MRI

Optical imaging

### ABSTRACT

**Object:** Pancreatic cancer is one of the most lethal human cancer and appropriate experimental tumor models are needed for the development of innovative therapeutic approaches. This paper describes an experimental model of human pancreatic cancer and a related non invasive imaging technique suitable for monitoring tumor growth and metastatization. The aim of the work was the implementation of an experimental platform suitable for assessing the efficacy of new therapeutic agents.

**Materials and methods:** Human pancreatic cancer cells (PANC-1-Luc+) were injected into the pancreas of female athymic CD1 mice. Magnetic Resonance Imaging (MRI) at 4.7 T and Bioluminescence Imaging (BLI) were performed in each mouse at three time points after cell inoculation (1, 2 and 3 months). Two groups of mice were studied: the first group of  $n = 13$  mice in which  $5 \times 10^6$  cells were injected and the second group of  $n = 10$  mice in which  $2 \times 10^6$  cells were injected. MRI examination included T2w acquisitions and (at the last time point) Dynamic-contrast-enhanced-MRI (DCE-MRI).

**Results:** Each mouse underwent three longitudinal MRI and BLI examinations. BLI was more sensitive than MRI producing higher detection rate at early time points. Moreover in one case of abdominal dissemination of pancreatic tumor cells, small tumoral masses were detected by BLI and not detected by MRI. However BLI appears more prone to experimental error most likely due to photon attenuation. In 4 mice BLI produced false negative results. DCE-MRI experiments providing information on tumor perfusion were conducted successfully in this anatomical district and demonstrated that the tumor tissues from the second experimental group are more vascularized compared to the first group.

**Conclusion:** The present study performed on the experimental model of pancreatic cancer here described shows that MRI and BLI are complementary techniques and that synergistic application of both can overcome the intrinsic limitations of each.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pancreatic cancer is one of the most lethal human cancers with an overall survival rate of 3%–5% and a median survival of less than 6 months. The short median survival is explained by the absence of early symptoms and the lack of appropriate diagnostic tools for early detection. The cancer's lethal nature results from its propensity to

rapidly disseminate to the lymphatic system and distant organs, which occurs in more than 80% of cases. Metastasis to loco-regional lymph nodes or distant organs is one of the major features of pancreatic cancer and is typically already present at the time of diagnosis. This aggressive biology and resistance to conventional and targeted therapeutic agents lead to a typical clinical presentation of incurable disease at the time of diagnosis, even nowadays. Despite great efforts in recent years, conventional treatment approaches have little impact on the course of this aggressive neoplasm [1]. Therefore, reproducible preclinical models are required to study the underlying causes of tumor development, and the growth and dissemination of pancreatic cancer. These models, as well as the development of diagnostic imaging techniques to monitor tumor growth and metastasis formation, would also be crucial for the development of new and effective treatment modalities.

\* Corresponding author. Tel.: +39 0458027614; fax: +39 0458027613.

E-mail addresses: [rossanaritelli@libero.it](mailto:rossanaritelli@libero.it) (R. Ritelli),

[ngalaningaleu.raphael@univr.it](mailto:ngalaningaleu.raphael@univr.it) (R. Ngalani Ngaleu), [pietro.bontempi@univr.it](mailto:pietro.bontempi@univr.it) (P. Bontempi), [mario.dandrea@univr.it](mailto:mario.dandrea@univr.it) (M. Dandrea), [elena.nicolato@univr.it](mailto:elena.nicolato@univr.it) (E. Nicolato), [federico.boschi@univr.it](mailto:federico.boschi@univr.it) (F. Boschi), [silvia.fiorini@univr.it](mailto:silvia.fiorini@univr.it) (S. Fiorini), [laura.calderan@univr.it](mailto:laura.calderan@univr.it) (L. Calderan), [aldo.scarpa@univr.it](mailto:aldo.scarpa@univr.it) (A. Scarpa), [pasquina.marzola@univr.it](mailto:pasquina.marzola@univr.it) (P. Marzola).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mri.2015.02.017>

0730-725X/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

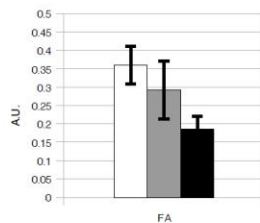
**Investigation of normal brain aging in rodent experimental model by DTI, Volumetry and localized proton spectroscopy**Stefano Tambalo<sup>1</sup>, Alessandro Daducci<sup>2</sup>, Elisa Mosconi<sup>1</sup>, Silvia Fiorini<sup>1</sup>, Nicolo' Sonato<sup>1</sup>, Marta Bahietti<sup>3</sup>, Patrizia Fattoretti<sup>1</sup>, Andrea Sbarbati<sup>4</sup>, and Pasquina Marzola<sup>5</sup><sup>1</sup>Dept. of Neurological and Movement Science, Università di Verona, Verona, Italy, <sup>2</sup>STI IEL LTS5, EPFL, Lausanne, Switzerland, <sup>3</sup>Neurobiology of Aging Laboratory and Cellular Bioenergetics Laboratory, I.N.R.C.A. (Italian National Centres on Aging), Ancona, Italy, <sup>4</sup>Dept. of Neurological and Movement Science, INSTM Firenze, Verona, Italy, <sup>5</sup>Dept. of Computer Science, University of Verona, Verona, Italy**Target Audience:** This work can be of relevance to scientists/neurologists with interest in brain aging both at the clinical and translational level.**Purpose:** In the last decade many studies of human brain aging based on MRI advanced techniques have been published<sup>1-3</sup>. Clinical studies are potentially affected by several confounding factors, such as life-style (e.g. physical exercise, caloric intake, stress) or genetic variability. Experimental models of aging could be useful in dissecting physiological from pathophysiological events as well as the impact of environmental or genetic factors. In addition they could represent a valuable platform to study the effect of pharmacological and non-pharmacological "therapies" in delaying brain aging. Aim of present work was the investigation of brain aging in a rodent experimental model by advanced MRI techniques and the assessment of its potential translational value.**Methods:** Rats were provided by INRCA (Italian National Center on Aging), Ancona, Italy. MR data were acquired using a Bruker Biospec scanner operating at 4.7 T and a double coil configuration. A total of n=24 male SD rats divided in young (n=8, 3-4 months old), adult (n=8, 12 months old) and old (n=8, 26 months old) were used for the DTI study. Images were acquired using a Spin-Echo EPI sequence with 30 non-collinear diffusion directions with b=1000 s/mm<sup>2</sup>, 5 additional images acquired with b=0 s/mm<sup>2</sup>. A total of n=20 male SD rats divided young (n=6, 3-4 months old), adult (n=8, 12-13 months old) and old (n=6, 24-26 months old) were used for the localized spectroscopy study. T2w RARE images were acquired for voxel positioning. MRS was performed in three voxels placed over hippocampus, parietal and prefrontal cortex and having sizes of 36.8 µl, 35 µl and 36 µl, respectively. Spectra with and without water suppression were obtained by using a PRESS sequence. Water suppression was obtained by using the VAPOR pulses scheme. Unsuppressed water spectra were used as a reference to normalize the metabolite signal. FA and ADC maps were calculated using ParaVision 5.0 and then co-registered to T2w-based rat brain template. Volumes of GM, WM, and CSF were obtained by analyzing T2w images using the FSL software. Localized spectra were quantitatively analyzed using LCModel.**Results:** Mean FA, calculated over the whole brain for the young, adult and old groups showed a decreasing trend which was paralleled by an increasing trend in ADC (Fig. 1a, b). The observed trends reflected a generalized alteration encompassing the whole brain rather than alterations in specific regions (data not shown). We also analyzed, from T2w RARE images, the volumes of Gray Matter (GM), White Matter (WM) and CSF in order to assess whether the well-documented cerebral atrophy found in elderly subjects is common to the experimental model. Data showed that white matter volume decreases in young compared to adult, while CSF volume increases in adult or old versus young. No alteration was detected in the GM or in the total brain volume. Proton magnetic resonance spectra were acquired in Hippocampus, Prefrontal and Parietal Cortex. In hippocampus (adult versus young) and in the prefrontal cortex (old vs adult), a statistically significant increase in absolute concentrations of NAA (quantified with respect to the signal of water) was found.**Discussion:** Normal brain aging has been studied by DTI, MRI volumetry and localized spectroscopy. Significant increase in ADC and decrease in FA was observed as age increased, in agreement with what observed in human studies, reflecting degradation of neural connections. These findings reflect a generalized brain alteration. Considering brain volumetry, the observed increase in the CSF volume (adult vs young and old vs adult) reflects the well documented shrinkage of brain observed in humans with aging<sup>4</sup>. Localized spectroscopy data indicate a tendency of increasing NAA in hippocampus and prefrontal cortex with aging, that is surprising since most of human data reported in the literature indicate the opposite trend. The possible role of a decrease of water content with aging on the quantification of NAA signal may explain our finding. Other quantification methods are currently under investigation.**Conclusions:** Quantitative data on DTI, volumetry and proton localized spectroscopy had been acquired in a rat experimental model of aging. DTI and volumetry data well reproduce data reported in humans highlighting the potential role of rodent experimental models of aging in translational research. Localized spectroscopy data deserve further analysis.**References:**Watanabe M et al.: Multispectral quantitative MR imaging of the human brain: lifetime age-related effects. Radiographics. 2013 Sep-Oct;33(5):1305-19.  
Minati L et al.: MR spectroscopy, functional MRI, and diffusion-tensor imaging in the aging brain: a conceptual review. J Geriatr Psychiatry Neurol. 2007 Mar;20(1):3-21.

Figure 1a: Mean FA values calculated over the whole brain.

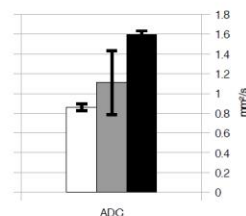


Figure 1b: Mean ADC values calculated over the whole brain

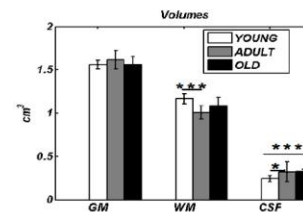


Figure 2: Volume based morphometry for gray matter, white matter and CSF.