

## Contents

<b>I</b>	<b>Biochimica e Neurobiologia del ferro nel Sistema Nervoso Centrale (SNC)</b>	<b>4</b>
1	Il ferro contenuto nel SNC	4
2	Ferro NonHeme[2]	4
3	Distribuzione macroscopica del ferro,ferritina e transferrina nel SNC [2]	6
3.1	Ferro . . . . .	6
3.2	Ferritina . . . . .	8
3.3	Transferrina . . . . .	8
4	Distribuzione microscopica del ferro,ferritina e transferrina nel SNC [2]	8
5	Trasporto del ferro [3]	11
6	Tossicità del ferro [3]	12
<b>II</b>	<b>Tecniche di Imaging e quantificazione del ferro tramite MRI</b>	<b>14</b>
7	Introduzione sull'Imaging a Risonanza Magnetica [15]	14
7.1	Sequenze di eccitazione . . . . .	15
7.1.1	Imaging . . . . .	16
7.1.2	Sequenze di base . . . . .	17
7.1.3	Dai segnali alle immagini . . . . .	18
8	Quali molecole influiscono il segnale MR [2]	19
8.1	Proprietà magnetiche della ferritina [16] . . . . .	19
8.2	Meccanismi di rilassamento della ferritina . . . . .	21
8.2.1	Relassività e profili NMRD . . . . .	21
8.2.2	Modelli teorici del decadimento della ferritina [17] . . . . .	25
9	Dipendenza dei tempi di decadimento, sequenze di impulso e metodi di contrasto dal ferro nelle immagini MRI	28
9.1	Studi in vitro e vivo su soggetti sani:correlazione tra ferro e il tempo di rilassamento $R_2$ [2] . . . . .	28
9.1.1	FDRI: field-dependent rate increase [18] . . . . .	29
9.2	Studi su $R_2'$ e $R_2^*$ . . . . .	30
9.2.1	Prime(Partially refocused interleaved multiple echo)[4] . . . . .	31
9.2.2	Gesfide(Gradient echo sampling of free induction decay and echo)[6] . . . . .	31
9.2.3	GESSE(gradient echo sampling of spin echo)[8] . . . . .	32
9.3	$T_{2\rho}$ Weighted Contrast[9] . . . . .	33
9.4	SWI:Susceptibility-weighted imaging [10] . . . . .	36
9.5	MCF:Magnetic field correlation [19] . . . . .	41
9.6	DTI: Diffusion Tensor Imaging [11] . . . . .	41

9.7	Risonanza Magnetica Quantitativa Q-MRI [12]	42
9.8	Magnetization transfer (MT) MRI e Direct Saturation MRI (DS)[20]	45
9.8.1	Direct Saturation MRI (DSR) [14]	48
<b>III</b>	<b>Ferro e malattie neurodegenerative [3]</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>Morbo di Alzheimer(AD)</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>Morbo di Parkinson (PD)</b>	<b>52</b>
<b>12</b>	<b>SCLEROSI MULTIPLA(MS)</b>	<b>53</b>
<b>13</b>	<b>Altre malattie croniche neurodegenerative</b>	<b>55</b>

# INTRODUZIONE

Nell'ultimo secolo diversi ricercatori hanno iniziato a nutrire un forte interesse per ferro contenuto nel sistema nervoso centrale, per il suo ruolo nelle funzioni svolte dal cervello ed in diverse malattie. E' ormai noto che diverse malattie neurodegenerative incluse Alzheimer, Parkinson, Sclerosi Multipla ecc..., presentano un aumento e accumolo di ferro nel SNC. La quantificazione e misura dell'ammontare del ferro (non-eme) potrebbe permettere non solo una migliore comprensione della progressione delle malattie ma anche la capacità di prevederne la comparsa. Il ferro è una sostanza vitale per il normale metabolismo neuronale. Esso interviene in moltissimi processi come il trasporto dell'ossigeno, il trasferimento di elettroni, la sintesi di neurotrasmettitori e la produzione mielinica. D'altro canto diversi studi in vitro ne dimostrano la potenziale tossicità: accumuli di ferro provocano la formazione di radicali liberi e l'influenza in vivo al danneggiamento dei tessuti. La comunità generale di ricerca crede che l'abilità nella valutazione quantitativa del ferro contenuto nel SNC possa avere un ruolo importante e decisivo nella diagnosi di queste patologie, nel controllarne la progressione e monitorarne il trattamento.

Di conseguenza vi è un crescente interesse nel migliorare e ottimizzare le tecniche che permettono la stima delle concentrazioni di ferro in vivo. Grazie all'introduzione della Risonanza Magnetica, ciò è stato in parte possibile e le svariate tecniche sono in continua evoluzione.

In questo lavoro analizzo in primo luogo gli aspetti biochimici e fisiologici del ferro nel SNC, la sua distribuzione, metabolismo ecc. Nella seconda parte passo in rassegna svariati studi fatti sulle varie tecniche di imaging tramite MRI nella quale si è cercato di migliorare il contrasto e l'individuazione del ferro. Nella terza parte analizzo vari studi che prendono in esame diverse malattie neurodegenerative e la loro correlazione con le concentrazioni di ferro.

# Part I

## Biochimica e Neurobiologia del ferro nel Sistema Nervoso Centrale (SNC)

### 1 Il ferro contenuto nel SNC

Il ferro gioca un ruolo principale nell'emoglobina (fig. 1), che trasporta l'ossigeno dai polmoni ai tessuti. Ad ogni modo, il ferro non-eme è anch'esso molto importante nella fisiologia del SNC poiché è coinvolto nel trasporto degli elettroni facilitando il metabolismo aerobico cellulare: esso svolge un ruolo chiave nella produzione dell'adenosintrifosfato (ATP). Se il ferro non è regolato in modo appropriato può permettere lo stress ossidativo e la produzione di radicali liberi. L'accumolo di ferro porta ad una reazione con l'idrogeno perossido e la formazione di radicali Hydroxyl aggressivi per mezzo di reazioni Fenton, o persossinitrati, e la conseguente morte per apoptosi dei neuroni.

### 2 Ferro NonHeme[2]

Vi sono due categorie di ferro nel SNC: il ferro legato all'emoglobina e a qualche enzima come la perossidasi, ed il ferro nonheme. Le tipologie di ferro nonheme includono:

- complessi a basso peso molecolare
- metalloproteine come transferrina, melanotrasferrina e lactoferrina
- proteine di immagazzinamento come ferritina ed hemosiderina
- ioni ferro

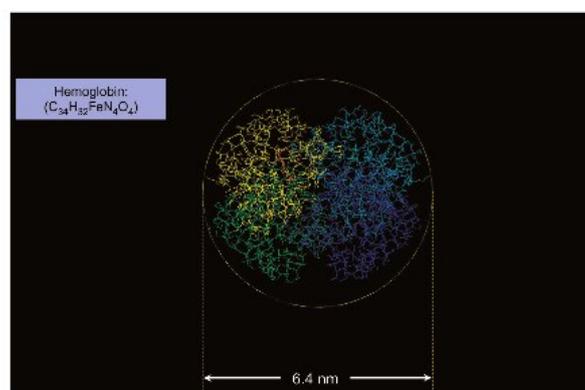


Figure 1: Struttura molecolare emoglobina

Vi sono anche materiali ferromagnetici, nella forma di magnetite biogenica. Di questi componenti, i due più importanti nella regolazione del ferro sono la transferrina (trasporto del ferro) e la ferritina (immagazzinamento del ferro).

**Transferrina** trasporta il ferro dal sangue al tessuto nervoso attraverso i recettori per la transferrina localizzati nel sistema microvascolare del SNC. È composta da una singola catena di amminoacidi e due gruppi glucidici. Un singolo atomo di ferro  $Fe^{3+}$  può legarsi ad ogni gruppo glucidico. Il peso molecolare della transferrina è di 79.6 kg/mol.

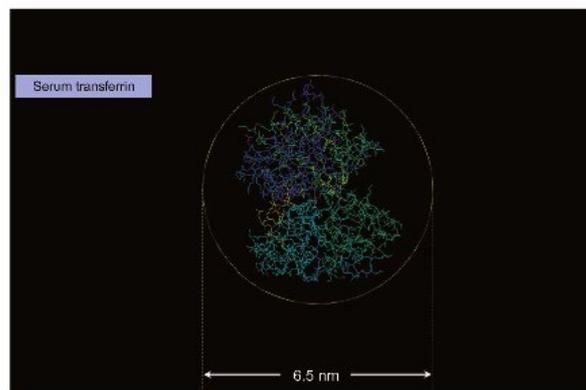


Figure 2: Struttura molecolare Transferrina

**Ferritina** Immagazzina gli atomi di ferro in eccesso, che non sono immediatamente impiegati in attività metaboliche. Uno strato sferico, largo circa 12 nm di diametro circonda il cuore cristallino di ferridrite ( $5Fe_2O_3 - 9H_2O$ ). Nella cavità interna della ferritina (circa 8 nm di diametro) possono essere immagazzinati fino a 4500 atomi di ferro. Il ferro(II) passa nel cuore attraverso 6 canali dello strato proteico esterno ossidandosi a ferro(III) per essere immagazzinato. Il peso della ferritina è di 474 kg/mol

Lo strato di apoferritina (la ferritina senza il cuore interno di ferro) è composto da 24 sub-unità contenenti varie combinazioni di proteine omologhe, derivate da geni separati, riferite alla L-ferritina (chiara) e H-ferritina (densa). Variazioni in composizioni delle due tipologie (H e L) producono isoforme di ferritina che conferiscono specifiche proprietà fisicochimiche perfettamente adatte a cellule e tessuti particolari. La ferritina ricca di H-f p è efficiente nell'isolamento del ferro ed è predominante in organi con un alto utilizzo di ferro e basso immagazzinamento. Al contrario la ferritina ricca della L-f è efficiente nella nucleazione del ferro e associata al suo immagazzinamento.

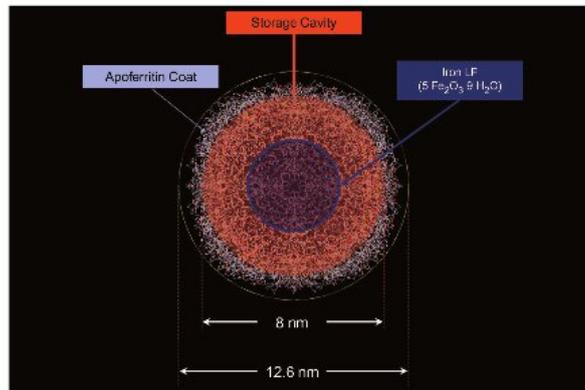


Figure 3: Struttura molecolare Ferritina

**Hemosiderina** Considerata essere un prodotto di degradazione della ferritina, è legata a materiali di immagazzinamento del ferro insolubili nell'acqua. Sembra essere associata a malattie con accumulo di ferro e emorragie.[21]

### 3 Distribuzione macroscopica del ferro, ferritina e transferrina nel SNC [2]

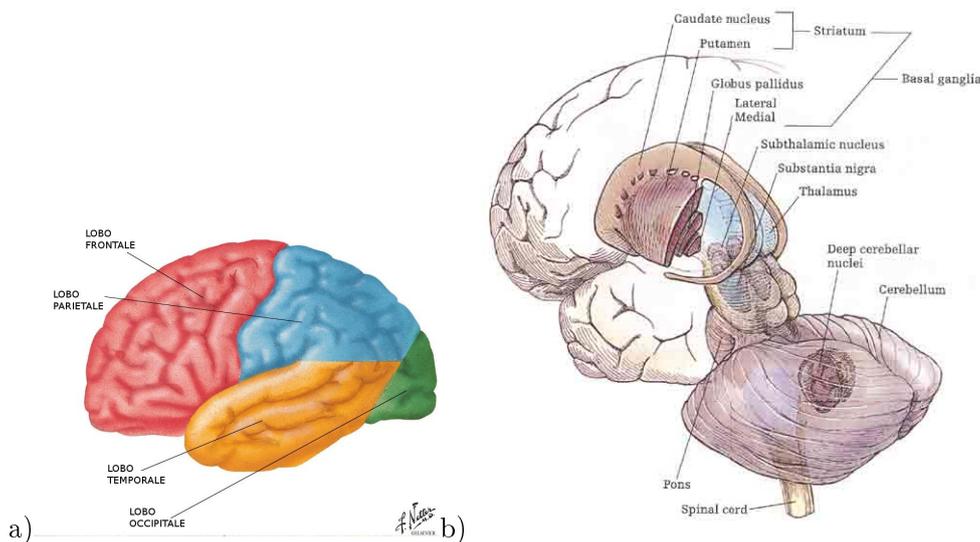
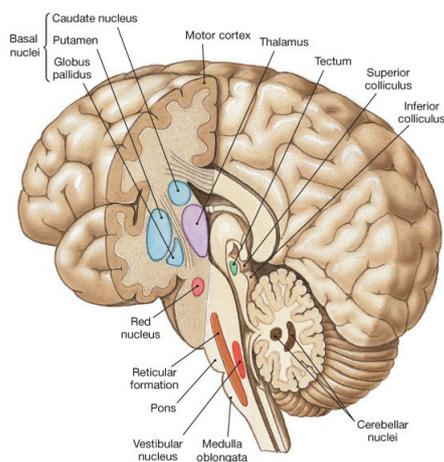


Figure 4: a) Suddivisione dei lobi cerebrali b) Posizione anatomica nuclei della base

#### 3.1 Ferro

La distribuzione eterogenea del ferro nel cervello è stata in principio dimostrata attraverso tecniche istologiche (blu di prussia o Perl's stain) che mostrarono una colorazione intensa di ferro nella parte del sistema extrapiramidale, una debole colorazione della corteccia piramidale e nessuna colorazione percettibile nella materia bianca[22]. Gelman commentò: "Rispetto

ai gangli della base vi è più ferro trattabile nella materia bianca e nella corteccia dell'emisfero cerebrale". Drayer, usando la stessa tecnica non trovò tracce di ferro nella porzione più posteriore della capsula interna e della radiazione ottica, ma ne trovò di più nella regione frontale rispetto a quella occipitale della materia bianca. Essi trovarono anche livelli pronunciati di ferro nei lobi temporali (fibre subcorticali "U").



Analisi biochimiche postmortem [23, 24, 25, 26, 27, 28] di tessuti nervosi hanno poi quantificato l'ammontare totale di ferro in diverse regioni del SNC, confermando che la più alta concentrazione di ferro (peso del tessuto umido di più di  $200 \mu\text{g/g}$ ) può essere trovata nelle regioni del globus pallidus, red nucleus, substantia nigra e putamen. Al contrario dei risultati istochimici, le analisi biochimiche indicano che la materia bianca, in generale, ha livelli simili di ferro alla materia grigia corticale (il peso del tessuto idratato si aggira tipicamente intorno ai  $30\text{-}40 \mu\text{g/g}$ ) e in alcune regioni (come la corteccia motoria) sembra esserci più ferro nella materia bianca che nella materia grigia corticale adiacente.

I risultati delle determinazioni biochimiche del ferro nel SNC, le quali usano una varietà di tecniche d'analisi (spettroscopia di assorbimento atomico (AAS), spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP), Analisi per Attivazione Neutronica (INAA), colorimetria), sono generalmente in buon accordo nei casi in cui è possibile provare un campione integrale, in opposizione alle frazioni fluttuanti del tessuto omogeneizzato, utilizzate nelle analisi. Un fattore che contribuisce alla variabilità del ferro misurato è la preparazione del tessuto nervoso. Per esempio, un'immersione prolungata nella formalina dilava il ferro fuori dal tessuto e questo può spiegare i bassi risultati ottenuti da Thomas et al. Qualche ricercatore esprime l'ammontare del ferro in termini di contenuto proteico (vedi Tabella). Mentre questi risultati non potevano essere direttamente confrontati con gli altri gruppi, il rapporto tra il ferro nei gangli della base con quello corticale misurato da Connor et al. e Loeffler et al. è coerente con questi studi. Il lavoro di Hallgren e Sourander, che effettuarono una delle più grandi indagini quantitative sul ferro contenuto nel SNC rispetto all'età, indicò che il ferro tipicamente incrementa rapidamente dalla nascita fino all'età di circa 20 anni per quasi tutte le regioni del cervello. Successivamente, dopo questa età, il ferro aumenta meno velocemente, ed in alcune regioni i livelli si stabilizzano intorno alla mezza età.

### 3.2 Ferritina

I pochi studi quantitativi sulla ferritina nel cervello umano mostrano una variazione considerevole dell'ammontare del ferro misurato (Tabella 2). I risultati di Dexter et al. e Reiderer et al. sono simili, ma 5-10 volte più bassi rispetto alle concentrazioni misurate da Connor et al. e 100 volte più grandi delle misurazioni di Chen et al. Alcune di queste discrepanze derivano dall'utilizzo di anticorpi policlonali non specifici per l'isoferritina, che possono sottovalutare la concentrazione della ferritina. Nonostante queste controversie, studi individuali indicano che la distribuzione della ferritina, strettamente legata alla distribuzione del ferro, nei gangli della base si hanno concentrazioni due o tre volte più grandi della corteccia cerebrale (tab 2). I livelli di ferritina nella materia grigia e nella materia bianca adiacente sono simili. Nello studio di Connor et al., le misure dell'ammontare di entrambe le isoforme di H-ferritina e L-ferritina indicò che l'H-ferritina è l'isoforma dominante nel cervello e la sua concentrazione incrementa con l'età. Nella vecchiaia il rapporto tra l'H e L-ferritina è tra 1.5:1 e 3:1, in dipendenza della regione considerata.

### 3.3 Transferrina

Analisi quantitative [30] che misurano la distribuzione regionale della transferrina nel SNC sono rare. Uno studio suggerì che la transferrina è maggiormente distribuita nella materia grigia, se confrontata con la ferritina ed il ferro, con livelli simili nella corteccia e i gangli della base. Ad ogni modo, i livelli di transferrina sono tipicamente tra le 10-50 volte più bassi delle concentrazioni di ferritina per unità proteica. La materia bianca ha circa 2.5-3.5 volte più transferrina rispetto alla corrispondente materia grigia.

## 4 Distribuzione microscopica del ferro, ferritina e transferrina nel SNC [2]

Nelle prime ricerche sul ferro, il suo deposito è stato osservato nelle cellule oligodendrogliali, endoteliali dei capillari e nei neuroni piramidali giganti (cellule Betz) della corteccia motoria, ma è nei oligodendrociti, sia nella materia bianca che in quella grigia, che si concentrano maggiormente il ferro, la ferritina e la transferrina. Gli oligodendrociti sono comuni nella materia bianca, essendo responsabili della produzione di mielina, ma oligodendrociti ferro-positivi sono stati trovati anche attraverso i gangli della base (ricchi di ferro). Nella materia bianca, gli oligodendrociti ferro-positivi hanno una distribuzione non uniforme. Tecniche di Immunostaining indicano che, oltre agli oligodendrociti, la microglia nella corteccia cerebrale e gli astrociti, particolarmente nei gangli della base, contengono ferritina. Le due isoforme di ferritina sembrano avere differenti distribuzioni cellulari nel cervello in relazione alla richiesta di utilizzazione di ferro. H-ferritina è predominante nei neuroni, favorendo un assorbimento del ferro e mostrando attività perossidasi. L-ferritina è predominante nei macrofagi e nella microglia e suggerisce che queste cellule sono associate all'immagazzinamento a lungo termine del ferro. Gli oligodendrociti contengono entrambe le isoforme di ferritina.

Come menzionato, la transferrina è predominantemente associata agli oligodendrociti, ma con l'età, gli astrociti sembrano accumulare transferrina, particolarmente nella materia bianca. I neuroni possono essere colorati per la transferrina, ma tecniche di immunostaining hanno evidenziato che la transferrina non è comune in queste cellule. È stato di-

Table 1  
Iron concentrations in brain tissue

Brain Region	Iron µg Fe/g ww	Ratio to GM cortex	No. of samples	Analysis technique	Sample analyzed	Ref. No.	Reference
<i>Gray matter</i>							
Globus pallidus	213.0	4.2	55	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Globus pallidus	175.3	3.8	10	AAS	Whole	[22]	Chen et al. (1989)
Globus pallidus	182.0		6	AAS	Whole	[23]	Chen et al. (1993)
Globus pallidus lateral	159.4		24	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Globus pallidus lateral	207.0		6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Globus pallidus medial	141.2		23	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Globus pallidus medial	163.8		6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Globus pallidus total	300.6	5.0	23	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Globus pallidus total	370.8	7.4	6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Globus pallidus	108.0		4	AAS	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Globus pallidus	81.0	2.9	8	Colorimetry	Supernatant	[98]	Riederer et al. (1989)
Substantia nigra	185.0	3.7	52	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Substantia nigra ZC	159.4	2.6	59	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Substantia nigra	139.8	2.8	6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Substantia nigra oral	65.0		4	AAS	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Substantia nigra caudal	45.0		4	AAS	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Substantia nigra	48.0	1.7	8	Colorimetry	Supernatant	[98]	Riederer et al. (1989)
Substantia nigra ZC	63.0		9	Colorimetry	Supernatant	[109]	Sofic et al. (1991)
Substantia nigra ZR	94.0		9	Colorimetry	Supernatant	[109]	Sofic et al. (1991)
Substantia nigra ZC+ZR	157.0		9	Colorimetry	Supernatant	[109]	Sofic et al. (1991)
Substantia nigra	84.0		6	Colorimetry	Uncertain	[113]	Thomas et al. (1993)
Putamen	130.0	2.6	56	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Putamen	120.8	2.6	10	AAS	Whole	[22]	Chen et al. (1989)
Putamen	110.0		6	AAS	Whole	[23]	Chen et al. (1993)
Putamen	164.8	2.7	31	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Putamen	119.8	2.4	6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Putamen	76.0		4	AAS	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Putamen	96.0	3.4	8	Colorimetry	Supernatant	[98]	Riederer et al. (1989)
Putamen	78.0		6	Colorimetry	Uncertain	[113]	Thomas et al. (1993)
Caudate	93.0	1.8	58	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Caudate	115.6	2.2	4	INAA	Whole	[18]	Brooks et al. (1989)
Caudate	92.5	2.0	10	AAS	Whole	[22]	Chen et al. (1989)
Caudate	117.4	1.9	59	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Caudate	99.6	2.0	6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Caudate	76.0		4	AAS	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Caudate	56.0		6	Colorimetry	Uncertain	[113]	Thomas et al. (1993)
Hippocampus	52.0		21	INAA	Whole	[39]	Cornett et al. (1998)
Hippocampus	43.2		11	INAA	Whole	[43]	Deibel et al. (1996)
Hippocampus	42.1		15	INAA	Whole	[114]	Thompson et al. (1988)
Hippocampus	24.0	0.9	8	Colorimetry	Supernatant	[98]	Riederer et al. (1989)
Amygdala	49.0		21	INAA	Whole	[39]	Cornett et al. (1998)
Amygdala	48.6		11	INAA	Whole	[43]	Deibel et al. (1996)
Amygdala	48.9		15	INAA	Whole	[114]	Thompson et al. (1988)
Amygdala	20.0		4	AAS	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Parietal cortex	38.0		37	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Inferior parietal	56.0		21	INAA	Whole	[39]	Cornett et al. (1998)
Inferior parietal	54.4		11	INAA	Whole	[43]	Deibel et al. (1996)
Parietal cortex	30.2		6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Prefrontal cortex	29.2		52	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Frontal cortex	53.6		4	INAA	Whole	[18]	Brooks et al. (1989)
Frontal lobe	46.0		10	AAS	Whole	[22]	Chen et al. (1989)
Frontal cortex	52.0		21	INAA	Whole	[39]	Cornett et al. (1998)
Frontal cortex	41.8		6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Temporal cortex	31.3		38	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Temporal pole	51.0		21	INAA	Whole	[39]	Cornett et al. (1998)
Temporal gyrus	53.2		11	INAA	Whole	[43]	Deibel et al. (1996)
Temporal cortex	50.1		6	AAS	Whole	[68]	Griffiths and Crossman (1993)
Temporal cortex	28.0		8	Colorimetry	Supernatant	[98]	Riederer et al. (1989)
Motor cortex	50.3		46	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Occipital cortex	45.5		38	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Cerebral cortex	60.4		58	ICP	Whole	[44]	Dexter et al. (1991)
Cerebral cortex	60.0		6	PIXE	Whole	[73]	Hebbrecht et al. (1999)
<i>White matter</i>							
Frontal white matter	42.4	1.5	38	Colorimetry	Whole	[69]	Hallgren and Sourander (1958)
Frontal lobe white	38.3	0.8	10	AAS	Whole	[22]	Chen et al. (1989)
Optic radiation	35.8	0.8	10	AAS	Whole	[22]	Chen et al. (1989)
Central white	30.2		4	INAA	Whole	[18]	Brooks et al. (1989)
Cerebral white matter	35.0	0.6	6	PIXE	Whole	[73]	Hebbrecht et al. (1999)
Corpus callosum	15.0		6	Colorimetry	Uncertain	[113]	Thomas et al. (1993)
Brain Region	Iron mg Fe/g protein	Ratio to GM cortex	No. of samples	Analysis technique	Sample analyzed	Ref. No.	Reference
<i>Gray matter<sup>a</sup></i>							
Motor cortex	0.89		11	Colorimetry	Uncertain	[30]	Connor et al. (1992)
Occipital cortex	1.12		11	Colorimetry	Uncertain	[30]	Connor et al. (1992)
Superior temporal	0.70		11	Colorimetry	Uncertain	[30]	Connor et al. (1992)
Parietal cortex	0.29		11	Colorimetry	Whole	[42]	Dedman et al. (1992)
Substantia nigra	5.60	3.5	8	Colorimetry	Supernatant	[82]	Loeffler et al. (1995)
Putamen	4.50	2.8	8	Colorimetry	Supernatant	[82]	Loeffler et al. (1995)
Globus pallidus	4.00	2.5	8	Colorimetry	Supernatant	[82]	Loeffler et al. (1995)
Caudate	3.20	2.0	8	Colorimetry	Supernatant	[82]	Loeffler et al. (1995)
Frontal cortex	1.60		8	Colorimetry	Supernatant	[82]	Loeffler et al. (1995)
<i>White matter<sup>a</sup></i>							
Motor cortex	1.26	1.4	11	Colorimetry	Uncertain	[30]	Connor et al. (1992)
Occipital cortex	0.89	0.8	11	Colorimetry	Uncertain	[30]	Connor et al. (1992)
Superior temporal	0.74	1.1	11	Colorimetry	Uncertain	[30]	Connor et al. (1992)

GM, gray matter; PIXE, particle-induced X-ray emission; ZC, zona compacta; ZR, zona reticulata.

<sup>a</sup> These results are quoted per gram of protein rather than per gram of tissue.

Table 2  
Ferritin and transferrin concentrations in brain tissue

Brain Region	Ferritin $\mu\text{g/g}$ tissue ww	Ratio to GM cortex	No. of samples	Samples	Ref. No.	Reference
<i>Gray matter</i>						
Globus pallidus	1.6	0.5	10	Supernatant	[22]	Chen et al. (1989)
Globus pallidus	1440	2.5	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Globus pallidus medial	262	7.5	24	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
Globus pallidus lateral	250		26	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
Substantia nigra	1535	2.7	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Substantia nigra	292	8.3	17	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
Substantia nigra ZC	218	6.2	19	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
Substantia nigra	223		5	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Putamen	1.9	0.7	10	Supernatant	[22]	Chen et al. (1989)
Putamen	1125	2.0	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Putamen	237	6.8	38	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
Putamen	240		5	Uncertain	[98]	Riederer et al. (1989)
Caudate nucleus	2.5	0.9	10	Supernatant	[22]	Chen et al. (1989)
Caudate nucleus	1080	1.9	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Caudate nucleus	168	4.8	62	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
Frontal lobe	2.91		10	Supernatant	[22]	Chen et al. (1989)
Frontal cortex	575		8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Cerebral cortex	35		58	Supernatant	[44]	Dexter et al. (1991)
<i>White matter</i>						
Frontal lobe	1.93	0.7	10	Supernatant	[22]	Chen et al. (1989)
Optic radiation	1.84	0.6	10	Supernatant	[22]	Chen et al. (1989)
Brain Region	Ferritin ng/ $\mu\text{g}$ protein	Ratio to GM cortex	No. of Samples	Sample	Ref. no.	Reference
<i>Gray matter</i>						
Globus pallidus	208	2.4	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Substantia nigra	132	1.5	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Putamen	121	1.4	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Caudate nucleus	131	1.5	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Frontal cortex	86		8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Motor cortex	23		11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Occipital cortex	34.5		11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Superior temporal	25		11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Parietal cortex	1.445		11	Supernatant	[42]	Dedman et al. (1992)
<i>White matter</i>						
Motor cortex	22.5	1.0	11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Occipital cortex	32	0.9	11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Superior temporal	34	1.4	11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Brain region	Transferrin ng/ $\mu\text{g}$ protein	Ratio to GM cortex	No. of samples	Sample	Ref. no.	Reference
<i>Gray matter</i>						
Globus pallidus	4.8	1.2	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Substantia nigra	3.4	0.9	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Putamen	4.4	1.1	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Caudate nucleus	4.4	1.1	8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Frontal cortex	4.0		8	Supernatant	[35]	Connor et al. (1995)
Motor cortex	3.0		11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Occipital cortex	1.8		11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Superior temporal	1.0		11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
<i>White matter</i>						
Motor cortex	7.4	2.5	11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Occipital cortex	6.2	3.4	11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)
Superior temporal	2.5	2.5	11	Supernatant	[30]	Connor et al. (1992)

mostrato che la distribuzione della transferrina non sembra sovrapporsi a quella della ferritina/ferro. Questo comportamento è particolarmente evidente nella materia bianca dove il ferro/ferritina ha una distribuzione non uniforme se comparata all'uniformità della transferrina[31, 32]. Un altro esempio della non sovrapposizione di distribuzione può essere trovato negli astrociti, che tendono ad essere positivi alla transferrina nella materia bianca, ma positivi alla ferritina quasi esclusivamente nella materia grigia.

## 5 Trasporto del ferro [3]

La serie di reazioni chimiche attraverso la quale la dieta prende il ferro per raggiungere il SNC inizia nell'intestino dove il  $Fe^{3+}$  (ione ferrico) è ridotto dal citocromo b duodenale a  $Fe^{2+}$  (ione ferroso). In questa forma ridotta il metallo trasportatore bivalente può portare il ferro attraverso l'epitelio duodenale fino al sangue. Proteine multiple regolano l'assorbimento intestinale per aiutare la realizzazione dell'omeostasi (hepcidina e IREG1). Nel sangue,  $Fe^{2+}$  è ossidato a  $Fe^{3+}$  dalla ceruloplasmina o eferastina così che può accoppiarsi con la transferrina, che è la proteina predominante per trasportare il ferro.

In quella forma, il ferro non può attraversare la barriera emato-encefalica (blood brain barrier BBB) e raggiungere così il SNC. Per essere trasportato attraverso la BBB vi sono diverse reazioni. A prima, probabilmente la più comune via, è attraverso i recettori per la transferrina sulle cellule endoteliali del cervello che si legano al ferro in forma di transferrina circolante nel sangue. Il complesso transferrina-recettore entra nel cervello per endocitosi. Diversi altri sistemi di trasporto liberano il ferro attraverso la BBB, come il metallo trasportatore bivalente e i recettori per la lactoferrina. Queste vie, specialmente quella mediata dalla transferrina-recettore, sono le condotture principali per il trasporto di ferro nel SNC.

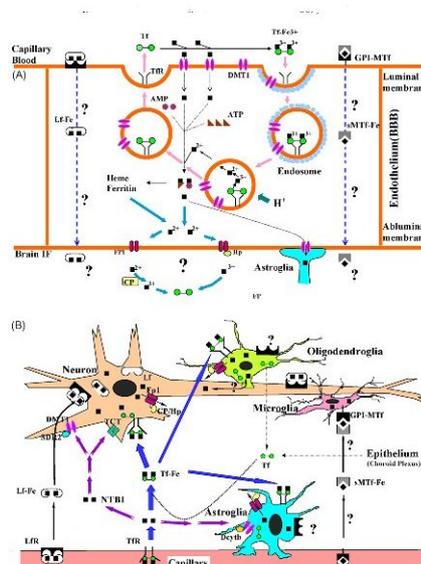


Figure 5: A) Schema ipotetico per il possibile ruolo di alcune proteine ferro-trasportatrici nel metabolismo del ferro nel cervello B) Trasporto del ferro nel cervello

L'ammontare di ferro assorbito e immagazzinato nelle cellule è funzione dell'abbondanza

dei recettori per la transferrina ed dei suoi ligandi. Questo può essere controllato al livello post-trascrizionale delle proteine che regolano il ferro che interagiscono con elementi sensibili al ferro sul RNA per alterare l'espressione della ferritina e recettori per la transferrina nelle cellule endoteliali cerebrali, neuroni, glia e oligodendrociti. Quando non c'è abbastanza ferro nell'ambiente, le proteine che regolano il ferro si legano agli elementi ferro-sensibili per incrementare la stabilità dei recettori della transferrina e diminuire l'espressione della ferritina.

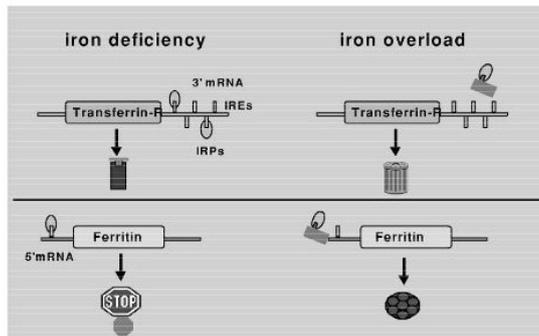


Figure 6: Regolazione e controllo post-trascrizionale della produzione dei recettori della transferrina e della ferritina sui geni del mRNA da proteine regolate dal ferro.

Questo essenzialmente permette alle cellule di assorbire più ferro e usarlo efficientemente senza che venga prima legato alla proteina di immagazzinamento, la ferritina. Le due subunità di cui è composta, la catena pesante e leggera, lavorano in maniera complementare per immagazzinare il ferro intracellularmente. La ferritina densa isola in modo efficace il ferro e si trova negli organi con un alto utilizzo del ferro e basso deposito. Invece quella chiara è associata all'immagazzinamento del ferro. Un altro ferro isolante, la neuromelanina, è stato trovato in alte concentrazioni nella substantia nigra e nel locus ceruleus. Questa è la prova che suggerisce che la neuromelanina agisca per ridurre la potenziale tossicità del ferro con una reazione di chelazione del ferro trovato nel cytosol dei neuroni. Interstizi nel cervello probabilmente contengono ferro extracellulare non legato, che solitamente forma un complesso con il citrato e viene assorbito attraverso le cellule con un meccanismo mediato da recettori non-transferrina. Infine, dopo che il cervello ha usato il ferro che ha immagazzinato, lascia la cellula. Esso lascia il corpo con il sangue o attraverso la perdita di cellule morte della pelle o di altre cellule.

## 6 Tossicità del ferro [3]

E' stato dimostrato in vitro che l'accumolo di ferro causa il danneggiamento della cellula [33, 34]. Il ferro legato alla ferritina è considerato "sicuro" poiché il ferro contenuto in esso non reagisce con le molecole intorno in modo dannoso. Ma una rottura della molecola protettiva o un surplus di ferro libero dovuto alla scarsità di ferritina nella cellula è altamente tossico. Il rilascio di ferro libero nel cervello può risultare dalla rottura di heme da parte dell'heme ossigenasi-1 che può promuovere lo stress ossidativo. Il ferro libero (diversamente dalla ferritina stabile e solubile) quando convertito nell'hemosiderina e in altri ossi idrossidi derivati diventa più propenso allo scambio protonico con le molecole circostanti. Questa

hemosiderina e composti ossidrossidi potrebbero iniziare e propagare la produzione di radicali liberi, permettendo la perossidazione lipidica. La neurotossicità potrebbe risultare da reazioni biochimiche che coinvolgono specie ossigeno reattive attraverso ossidazione ferro-indotta di perossidi d'idrogeno. Specificamente, attraverso reazioni Fenton,  $Fe^{2+}$  dona un elettrone al perossido d'idrogeno. Il prodotto risultante è  $Fe^{3+}$ ,  $OH^-$ , e radicali liberi OH.

Grassi polinsaturi nel cervello, come nelle membrane cellulari possono anche donare un elettrone a questi radicali liberi altamente reattivi. I prodotti di questa reazione, radicali liberi organici, possono interagire con ossigeno per creare radicali di ossigeno che possono continuare il ciclo di creazione di radicali liberi organici, creando un "ciclo viscoso" che perpetua se stesso. Dopo che le specie reattive di ossigeno sono generate, queste possono partecipare alla distruzione ossidativa dei lipidi, che sono una parte importante della citostruttura, come nelle membrane cellulari. Questa serie di reazioni distruttive è continuamente propagata dall'eccesso di ferro reattivo e è una potenziale causa dell'apoptosi cellulare. Di conseguenza, questa ipotesi contende che il deposito di ferro risulta dannoso nei tessuti a causa sia del danneggiamento cellulare diretto sia per il cambiamento dell'ambiente cellulare così da renderlo più suscettibile a tossine o altri processi patologici.

# Part II

## Tecniche di Imaging e quantificazione del ferro tramite MRI

Per i principi fisici su cui si basa, l'imaging a Risonanza magnetica si rivela essere la metodologia d'elezione nella caratterizzazione in vivo della concentrazione di ferro nel SNC. Dopo un' introduzione sul funzionamento della risonanza magnetica, in questa parte si riassumono le caratteristiche magnetiche della ferritina e le principali tecniche MR (sequenze d'impulso e metodi di contrasto) utilizzate fino ad ora per quantificare il ferro.

### 7 Introduzione sull'Imaging a Risonanza Magnetica [15]

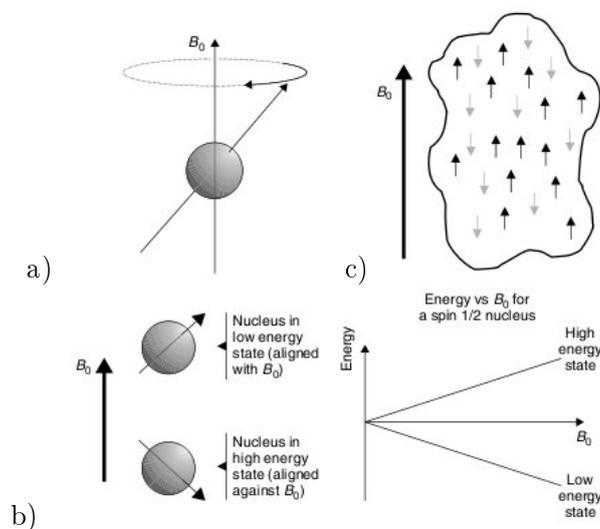


Figure 7: a) Precessione di una particella all'interno di un campo magnetico b) Gli stati di energia parallelo e antiparallelo c) popolazione di particelle immerse in un campo

Particelle cariche in rotazione possiedono un momento magnetico e, quando vengono poste all'interno di un campo magnetico esterno, tendono ad allinearsi con il campo. Il comportamento normale richiederebbe che il campo delle particelle cariche si allineasse con N verso S, dove N si riferisce al polo nord del campo della particella e S si riferisce al polo sud del campo esterno. E' tuttavia possibile che le particelle si orientino invece con N verso N e abbiano la caratteristica che una piccola perturbazione possa causare il passaggio della particella allo stato di energia inferiore N verso S, e quindi restituisca energia al sistema. Lo stato N-verso-N è uno stato ad alta energia; corrisponde allo stato ionizzato (o altro stato eccitato) di altre particelle. In un istante qualunque, ci saranno particelle allo stato normale, o di riposo, e particelle allo stato eccitato. Questi due stati sono denominati stato spin up, o

parallelo, e stato spin down, o antiparallelo. Il rapporto tra particelle eccitate e particelle a riposo è funzione della differenza di energia tra gli stati e della temperatura. La differenza quantica di energia è  $\Delta E = hf$ , dove  $h$  è la costante di Planck e  $f$  è la frequenza. Il rapporto tra le popolazioni di particelle normali ed eccitate è  $N_n/N_e = e^{hf/kT}$ , dove  $k$  è la costante di Boltzmann e  $T$  la temperatura. In effetti, gli assi di rotazione delle particelle non rimangono fissi nel campo magnetico, ma piuttosto precedono, o si spostano lungo la circonferenza, proprio come fanno le trottole nel campo gravitazionale (vedi Fig7.a). La frequenza di precessione può essere determinata dalla relazione di Larmor,  $\omega = \gamma B$ , in cui  $\omega$  è  $2\pi$  volte la frequenza di precessione,  $B$  è il campo magnetico e  $\gamma$  è una proprietà della particella chiamata rapporto giromagnetico. La risonanza-assorbimento di energia avviene quando l'energia a radiofrequenza è applicata alla frequenza di Larmor e induce le particelle a cambiare stato e diventare eccitate.

Le particelle esistono in uno spazio tridimensionale e si può assumere che il campo magnetico esterno sia rappresentabile con un vettore diretto lungo l'asse  $z$ . La precessione avviene anch'essa lungo l'asse  $z$ . Se viene applicato al sistema un impulso di energia a radiofrequenza (RF) alla frequenza di precessione, o di Larmor, le particelle assorbono energia e i loro assi di precessione ruotano. Possono ruotare di  $90^\circ$  oppure fino al punto in cui invertono esattamente la direzione di allineamento ( $180^\circ$ ). Dato che l'energia a RF e la durata dell'impulso determinano questo sfasamento angolare, gli impulsi sono chiamati semplicemente impulsi a  $90^\circ$  o  $180^\circ$ . Dopo l'impulso, le particelle ritornano al rapporto numerico che avevano all'equilibrio con una velocità determinata dall'accoppiamento termico con il lattice e dallo scambio di energia magnetica tra particelle eccitate e non eccitate. I due tipi di decadimento energetico sono chiamati decadimento spin-lattice (con costante di tempo  $T_1$ ) e decadimento spin-spin (con costante di tempo  $T_2$ ). Queste costanti di tempo sono piuttosto elevate, con valori che vanno da svariati milisecondi fino a secondi, e dipendono dal tipo di particella e dal materiale circostante. Variando il tempo tra gli impulsi RF, il loro tipo ( $90^\circ$  o  $180^\circ$ ) e la disposizione delle bobine di ricezione, è possibile determinare i valori di  $T_1$  e  $T_2$ .

## Suscettività Magnetica

La suscettività magnetica è definita come la risposta magnetica di una sostanza quando è posta in un campo magnetico esterno. Quando un oggetto è posto all'interno di un campo magnetico uniforme, la magnetizzazione indotta ( $M$ ) è data da

$M = \chi H$ , dove  $H = B/\mu_0 - M$  e  $\chi$  è la suscettività magnetica che mette in relazione  $M$  e  $H$ . Inoltre possiamo scrivere  $B = \mu H$  dove  $\mu = \mu_0 \mu_r$  è la permeabilità. La permeabilità magnetica relativa può essere scritta come  $\mu_r = 1 + \chi$  trovando

$$M = \chi B / \mu_0 / (1 + \chi).$$

Per materiali lineari con  $\chi \ll 1$  troviamo  $M = \chi B / \mu_0$  e diventa chiaro che l'induzione magnetica è direttamente proporzionale al campo e alla suscettività magnetica.

Ogni tessuto o sostanza hanno un comportamento differente all'interno di un campo magnetico.

## 7.1 Sequenze di eccitazione

Una successione di impulsi a radiofrequenza e di applicazione di gradienti costituisce le cosiddette sequenze di impulsi o sequenze di eccitazione. Gli impulsi a radiofrequenza hanno la funzione di perturbare l'equilibrio degli spin e di generare il segnale, mentre gli

impulsi di gradiente influenzano la frequenza e la fase del segnale ricevuto, e sono necessari a l'ottenimento dell'immagine.

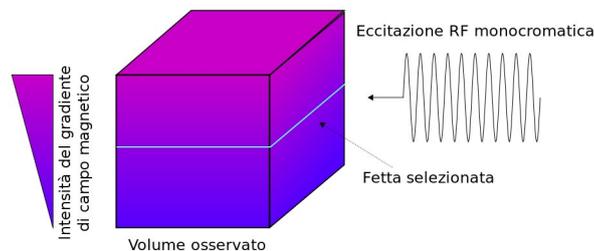
### 7.1.1 Imaging

La generazione di immagini avviene attraverso la ripetuta acquisizione di segnali provenienti dal corpo, e attraverso l'opportuna modulazione delle bobine di gradiente. Facendo in modo che ogni voxel dell'immagine abbia una frequenza e/o una fase diversa rispetto a tutti gli altri, si riescono a separare i segnali provenienti da una singola porzione.

L'imaging avviene attraverso tre processi separati:

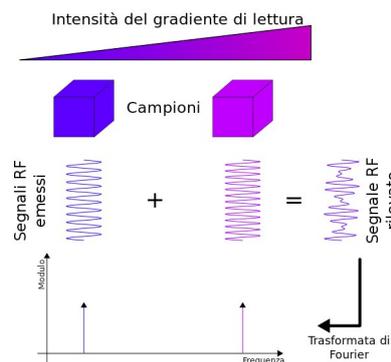
1. la selezione di una "fetta" (slice);
2. la codifica in frequenza;
3. la codifica di fase.

#### Selezione della "fetta" (slice)



L'applicazione di un gradiente lungo una direzione, fa sì che la frequenza di Larmor degli atomi vari linearmente lungo quella direzione. Come conseguenza, il corpo all'interno del magnete viene suddiviso in piani isofrequenziali paralleli. Un impulso radio ad una specifica frequenza (monocromatico) applicato mentre il gradiente è attivo, ecciterà un solo piano, lasciando in condizione di equilibrio tutti gli altri.

#### Codifica in frequenza



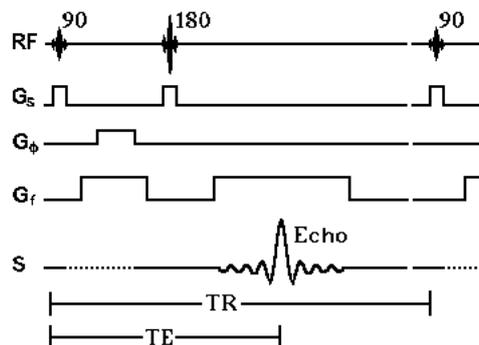
Applicando un gradiente dopo l'impulso a radiofrequenza e durante l'acquisizione del segnale emesso, si varia linearmente lungo lo spazio la frequenza di emissione da parte dei protoni. Il segnale acquisito è la somma di segnali a frequenze diverse, le quali possono essere ottenute tramite la trasformata di Fourier. Facendo corrispondere ad ogni frequenza una posizione spaziale, si ottiene una localizzazione in una dimensione. Per localizzare gli spin anche nella seconda direzione spaziale, è necessario utilizzare la codifica di fase.

**Codifica di fase** Il gradiente nella seconda direzione spaziale viene applicato dopo l'impulso a radiofrequenza ma prima dell'acquisizione. Gli spin lungo quella direzione al momento dell'acquisizione avranno acquistato una fase pari a  $f_L G_y y t$  dove  $f_L$  è la frequenza di Larmor,  $y$  è la coordinata lungo l'asse della codifica e  $t$  è il tempo di applicazione del gradiente. Una sola codifica di fase non è sufficiente per ottenere informazioni spaziali, per questo è necessario che la sequenza venga ripetuta un certo numero di volte per ottenere un campionamento significativo lungo la direzione della fase.

### 7.1.2 Sequenze di base

**Free Induction Decay** 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  $Z$ ) indurrà una corrente nella bobina posizionata attorno all'asse  $X$ . Ponendo in grafico la corrente in funzione del tempo si ottiene un'onda sinusoidale. 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 è chiamato FID (Free Induction Decay).

### Sequenza Spin Echo



Nel diagramma temporale per una sequenza di imaging spin-echo sono riportati gli impulsi RF, i gradienti di campo magnetico e il segnale. Un impulso RF a  $90^\circ$  di selezione della fetta viene applicato insieme con un gradiente di selezione della fetta. Passa un periodo di tempo uguale a  $TE/2$  e viene applicato un impulso a  $180^\circ$  in congiunzione con il gradiente di selezione della fetta.

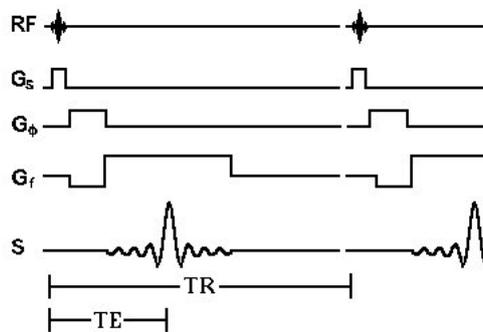
Un gradiente di codifica di fase viene applicato tra gli impulsi a  $90^\circ$  e  $180^\circ$  anche se potrebbe essere applicato dopo l'impulso a  $180^\circ$ . Però, se vogliamo minimizzare il periodo TE, il gradiente va applicato tra gli impulsi RF di  $90^\circ$  e  $180^\circ$ .

Il gradiente di codifica in frequenza viene applicato dopo l'impulso a  $180^\circ$  durante il tempo in cui viene raccolto l'echo. L'echo è il segnale registrato; il FID, che si genera dopo ogni impulso a  $90^\circ$ , non viene usato. Un ulteriore gradiente viene applicato tra gli impulsi a  $90^\circ$  e  $180^\circ$ . Questo gradiente agisce lungo la stessa direzione del gradiente di codifica in frequenza e sfasa gli spin in modo che tornino in fase al centro dell'echo.

L'intera sequenza viene ripetuta ogni TR secondi fino al completamento di tutti i passi della codifica di fase.

**Gradient echo** Le sequenze di imaging menzionate finora hanno un grande svantaggio. Per ottenere il massimo segnale richiedono tutte che la magnetizzazione riacquisti la sua posizione di equilibrio lungo l'asse Z prima che venga ripetuta la sequenza. Quando il T1 e' lungo, questo puo' prolungare significativamente la sequenza di imaging. Se la magnetizzazione non riacquista completamente l'equilibrio, il segnale e' minore di quello che si avrebbe nel caso del completo recupero. Se la magnetizzazione viene ruotata di un angolo  $\theta$  minore di  $90^\circ$  la sua componente Mz riacquistera' l'equilibrio molto piu' rapidamente, ma ci sara' un minor segnale dal momento che il segnale e' proporzionale al  $\text{Sen}\theta$ . Cosi' perdiamo segnale a vantaggio del tempo di imaging. In alcuni casi, per recuperare segnale possono essere raccolte e mediate insieme piu' immagini.

La sequenza di imaging gradient echo e' l'applicazione di questi principi.



Nella sequenza di imaging gradient echo viene applicato all'oggetto da esaminare un impulso RF di selezione dello strato. Questo impulso RF produce tipicamente un angolo di rotazione tra  $10^\circ$  e  $90^\circ$ . Insieme all'impulso RF viene applicato un gradiente di selezione dello strato.

Poi viene applicato un gradiente di codifica di fase. Un gradiente di defasamento e di codifica in frequenza viene applicato contemporaneamente al gradiente di codifica di fase per far si' che gli spin siano in fase al centro del periodo di acquisizione. Questo gradiente e' di segno negativo rispetto al gradiente di codifica in frequenza acceso durante l'acquisizione del segnale. Quest'ultimo, quando attivato, produce un echo perche' consente il recupero della perdita di fase avvenuta a causa del gradiente di defasamento.

Il tempo di echo (TE) e' definito come il tempo che intercorre tra l'inizio dell'impulso RF ed il valore massimo nel segnale. La sequenza viene ripetuta ogni TR secondi. Il periodo TR e' dell'ordine delle decine di millisecondi.

Vengono qui sottolineate le differenze tra una sequenza gradient echo e una sequenza spin echo. In una sequenza gradient echo il rifasamento degli spin viene ottenuto usando un gradiente di campo magnetico invece che un impulso RF a  $180^\circ$ . L'uso di un gradiente di rifasamento rende l'imaging gradient echo intrinsecamente piu' sensibile alle disomogeneita' di campo magnetico. D'altro canto, l'uso di un angolo di rotazione minore di  $90^\circ$  e di un gradiente di rifasamento conferiscono a questa sequenza un vantaggio in termini di tempo. Viene infatti largamente utilizzata per acquisizioni veloci, incluse quelle 3D.

### 7.1.3 Dai segnali alle immagini

Al fine di ottenere un'immagine o mappa di localizzazione degli spin, i FID o i segnali sopra descritti devono essere trasformati secondo Fourier. I segnali sono prima trasformati

secondo Fourier nella direzione della codifica di frequenza (solitamente l'asse X) per estrarre le informazioni nel dominio delle frequenze e poi nella direzione della codifica di fase per estrarre le informazioni circa la localizzazione nella direzione di applicazione del gradiente di codifica di fase (asse Y).

## 8 Quali molecole influiscono il segnale MR [2]

Come abbiamo visto ci son diverse forme di ferro e per prima cosa bisogna capire quali molecole possono influire il segnale MR.

Nel cervello umano, il segnale MR è generato principalmente dai protoni delle molecole d'acqua. Il contrasto delle immagini è ottenuto grazie ai diversi valori di densità protonica, di tempo di rilassamento longitudinale(T1) e trasversale(T2) che caratterizzano i diversi tessuti.

Questi tempi di rilassamento sono determinati dall'ammontare dell'acqua in un tessuto, ma anche dalla distribuzione microscopica e macroscopica dell'acqua in diversi siti e dalle interazioni macromolecolari. Per esempio, in acqua pura, T1 e T2 sono molto simili, ma nel tessuto nervoso T1 è tipicamente 10-20 volte più lungo di T2 a causa della forte interazione magnetica tra i protoni dell'acqua, le proteine e altre macromolecole.

Le interazioni macromolecolari ,che solitamente coinvolgono piccole concentrazioni di materiali paramagnetici(i cui atomi hanno un momento magnetico dipolare permanente) sono importanti nella determinazione del tempo di rilassamento a causa del grande momento magnetico che hanno tali molecole se confrontato con quello dei protoni.

In generale gli ioni magnetici e paramagnetici diminuiscono il tempo di rilassamento longitudinale e trasversale dei protoni nel SNC.

Le forme di ferro non-eme che si presentano in quantità sufficiente per essere rilevate dal contrasto MR sono la ferritina e la Emosiderina. Le prime analisi biochimiche [5] suggerirono che un terzo del ferro non-eme contenuto nel SNC si trova nella forma di ferritina, ma le concentrazioni possono essere maggiori nella materia grigia. Per esempio, Mossbauer attraverso la misura spettroscopica su cervelli di scimmia indicò che almeno l'80% di ferro non-eme nei globi pallidi si trovava nella forma di ferritina; Dedman suggerì che l'85-88% di ferro non-eme nella corteccia parietale si trova sottoforma di ferritina. La transferrina, oltre ad essere almeno dieci volte in quantità minore rispetto alla ferritina ,può legarsi solamente a 2 atomi di ferro, al contrario delle migliaia di atomi di ferro a cui si lega l'altra molecola.

Le concentrazioni delle altre specie ioniche, come gli ioni ferro liberi nell'acqua e altre molecole legate al ferro, si trovano in concentrazioni troppo basse per influire il segnale MR.

Vi sono però altri ioni paramagnetici, come il manganese ed il rame, che possono potenzialmente influire sui tempi di rilassamento se si trovano in concentrazioni sufficienti.

Schenck et al. verificò che le concentrazioni nonpatologiche di rame e manganese sono troppo piccole per produrre qualche interferenza nel segnale MR.

### 8.1 Proprietà magnetiche della ferritina [16]

Il composto ferridrato è antiferromagnetico: è composto da due sottoreticoli magnetici equivalenti i cui momenti magnetici hanno direzioni opposte. Il momento risultante di un cristallo antiferromagnetico ideale non sottoposto a campo magnetico è nullo. Ad ogni modo, a causa dell'influenza dei difetti nel cristallo ferridrato dovuta al piegamento("canting")

dei momenti dei due sottoreticoli in un campo magnetico non nullo, la compensazione del momento magnetico non è completa: ogni particella nanometrica ha un momento magnetico risultante non nullo. La temperatura di Néel della ferritina, la temperatura della transizione tra antiferromagnetismo e semplice paramagnetismo, è stata stimata da diversi gruppi di ricerca. Il valore è stato calcolato essere tra i 20K e 500K, ma quest'ultima temperatura, basata su nuove misure di dati magnetometrici usando un modello più completo, sembra essere più attendibile[38].

Diversi studi magnetometrici compiuti da Mossbauer hanno mostrato il superparamagnetismo del cuore di ferro della ferritina. Questa proprietà è tipica dei materiali ferromagnetici e ferrimagnetici: quando le dimensioni del cristallo sono abbastanza piccole, la relazione di Néel diventa osservabile insieme al momento magnetico risultante dai salti delle particelle da una direzione di facile magnetizzazione ad un'altra. Il tempo di rilassamento di Néel, il tempo tra due salti successivi, è dato dalla seguente:

$$\tau_B = \tau_0 e^{\frac{KV}{kT}}$$

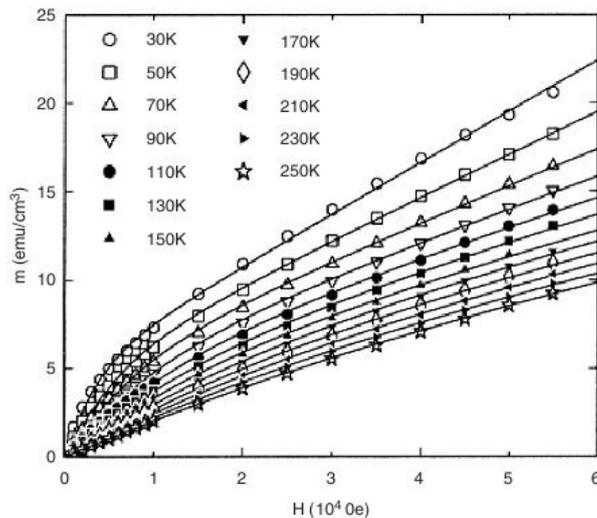
dove  $\tau_0$  il tempo di rilassamento di Néel a temperatura infinita,  $K$  è l'energia anisotropica costante e  $V$  il volume del cristallo. A basse temperature, lo spettro di Mossbauer della ferritina è un dipolo, tipico di un momento magnetico immobile, mentre alle alte temperature è un sestetto tipico dei momenti magnetici sottoposti a rilassamento superparamagnetico. Il transitorio tra il dipolo e sestetto avviene alla temperatura di blocco  $T_b$ . Per  $T > T_b$ ,  $\tau_N$  è più piccolo del tempo caratteristico misurato da Mossbauer. Per  $T < T_b$ ,  $\tau_N$  è più grande del  $\tau_{MES}$  e la magnetizzazione del cristallo sembra ghiacciata. Calcolando  $\tau_{MES}$  uguale a 2.5 ns, si ottiene dalla spettroscopia di Mossbauer una temperatura di blocco pari a 30-40K. Ad ogni modo, questi valori dipendono dalla tecnica di misurazione: il metodo del decadimento termico residuo, misura di suscettività AC forniranno gli altri valori di  $T_B$ . Kilcoyne et al.() dedusse i valori di  $\tau_0$  e di  $K$  da due differenti determinazioni di  $T_B$  ottenuti da due differenti metodi sperimentali. Gli stessi parametri possono essere calcolati dal risultato di Dickson et al.() che mostra i valori corrispondenti di  $\tau_0$  e  $K$ . Da questi, possiamo stimare il tempo di rilassamento di Néel di un cristallo di ferridrato di 7nm di diametro a temperatura ambiente:  $\tau_N = 0.1$  ns.

TABLE II  
 $\tau_0$  AND  $K$  VALUES OBTAINED FOR FERRITIN

	Pre-exponential factor $\tau_0$	Anisotropy energy constant $K$
Kilcoyne et al. (40)	$10^{-11}$ s	37,000 J/m <sup>3</sup>
Dickson et al. (41)	$10^{-12}$ s	34,000 J/m <sup>3</sup>

Le curve magnetometriche di campioni di ferritina sono mostrati nella figura che segue.

Possono essere notati due contributi: il primo satura in corrispondenza di alti valori di campo magnetico, mentre il secondo aumenta linearmente con il campo. A temperatura ambiente, la curva magnetometrica è quasi lineare in relazione al campo magnetico: la magnetizzazione della ferritina non mostra saturazione sopra i 5 T e rimane semplicemente proporzionale al campo applicato, allo stesso modo di un semplice sistema paramagnetico. Differenti teorie [17] sono state proposte per descrivere il contributo di saturazione di queste curve.



Magnetization curves of reconstituted horse spleen ferritin. The solid lines are fits to expression (14). Reproduced with permission from Ref. (35).

Figure 8: Curve magnetometriche della ferritina

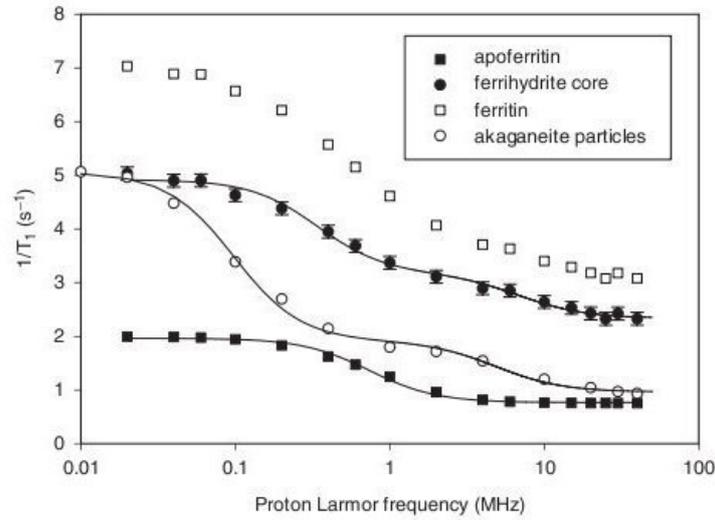
## 8.2 Meccanismi di rilassamento della ferritina

La ferritina accelera il tempo di rilassamento protonico nelle soluzioni acquose. La sua presenza nei tessuti oscura le corrispondenti immagini T2-pesate, a causa dell'aumento del rilassamento trasversale dell'acqua. Questo accorciamento di T2 si presenta dall'accoppiamento degli spin dei protoni dell'acqua con il cuore di ferro della proteina, costituito da un cristallo nanometrico ferrittrato ( $5Fe_2O_3 - 9H_2O$ ). Esso è un ossido idrato di ferro antiferromagnetico e le nanoparticelle di ferrittrato sono supermagnetiche. Sebbene la ferritina sia molto più complicata di una semplice sostanza paramagnetica, a temperatura ambiente essa produce una magnetizzazione proporzionale al campo applicato  $B_0$ . Diversi studi [35, 36, 37] hanno investigato il rilassamento di soluzioni acquose di ferritina e particelle di ossidi idrati di ferro, chiamati particelle ferritrate e akaganeite. I vari parametri sono stati confrontati analizzando anche la dipendenza di altri fattori come il pH e il LF.

### 8.2.1 Relassività e profili NMRD

**Relassività** La relassività della ferritina, ossia l'aumento del tasso di decadimento causato da un incremento di 1 mM nella concentrazione di ferro della soluzione, dipende leggermente dal loading factor (numero di atomi di ferro contenuti nella molecola di ferritina). A 40 MHz, 37 °C e per LF=2650, Vymazal et al. i parametri di relassività misurati sono  $r_1=0.027 \text{ smM}^{-1}$  e  $r_2=0.22 \text{ smM}^{-1}$ . Questi valori sono 100 volte più piccoli rispetto alla relassività delle particelle di magnetite in soluzione utilizzate come agenti di contrasto. Anche i corrispondenti valori per le soluzioni di particelle di akaganeite sono piccoli:  $r_1=0.0083$  e  $r_2=0.049$ . Questa differenza tra le particelle di magnetite e gli ossidi idrati di ferro può essere in parte dovuta alla differenza di suscettibilità di entrambi i composti: le particelle di magnetite e maghemite sono 100 volte più magnetizzate rispetto alle particelle di ferrihydrite e akaganeite.

**NMRD longitudinale** Il profilo longitudinale della ferritina e apoferritina in soluzioni acquose è mostrato nella figura qui sotto .Essi son stati misurati per la prima volta da Koenig , Brooks e altri collaboratori ad alti campi magnetici(partendo da 0.05 T).Il centro di dispersione della apoferritina corrisponde all'inverso del tempo di rotazione della proteina.Per isolare il contributo dato dal cuore magnetico della ferritina, il contributo dell'apoferritina deve essere sottratto dal profilo NMRD globale.Entrambi i profili del cuore di ferro della ferritina e delle particelle akaganeite mostrano una doppia dispersione. Il tempo di decadimento calcolato grazie al metodo di Halle è dato nella tabella.Per entrambe le particelle ,il primo punto di inflessione è considerato relativo agli elettroni ed il secondo ai protoni.



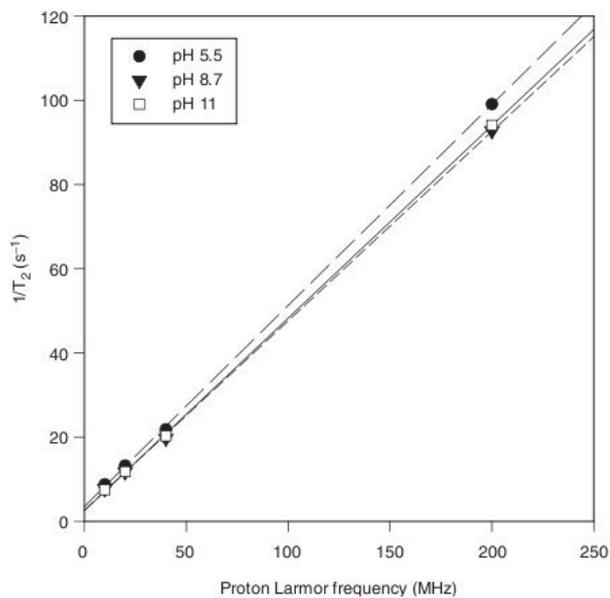
Longitudinal NMRD profile of ferritin ( $\square$ ) and apoferritin ( $\blacksquare$ ) aqueous solutions at 37°C. The contribution of the ferrihydrite core to the relaxation ( $\bullet$ ) is obtained by the subtraction of the profiles. Ferritin solution has an iron concentration of 100 mM, while the protein concentration of both samples is 0.058 mM. Longitudinal NMRD profile of akaganeite particles ( $\circ$ ) with an iron concentration of 100 mM.

TABLE III

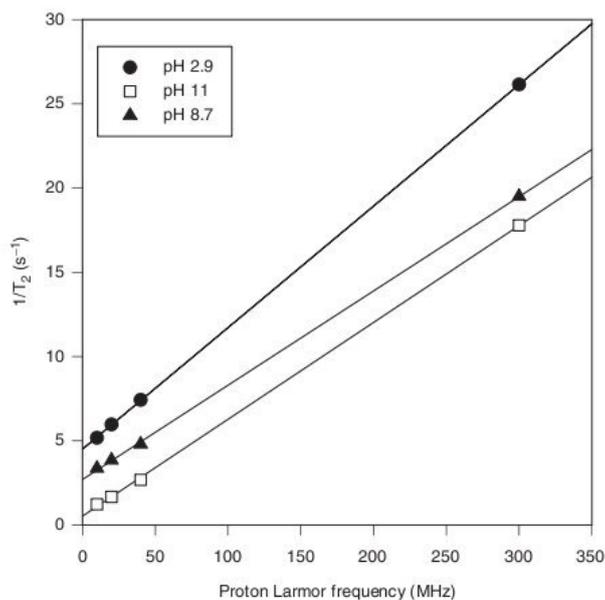
CORRELATION TIMES CALCULATED FROM THE FITTINGS OF THE LONGITUDINAL NMRD PROFILES OF APOFERRITIN, FERRITIN, AND AKAGANEITE PARTICLES SOLUTIONS

APOFERRITIN		
1 <sup>st</sup> dispersion	5°C	$\tau_1 = 0.5 \mu\text{s}$
	37°C	$\tau_1 = 0.21 \mu\text{s}$
FERRIHYDRITE CORE		
1 <sup>st</sup> dispersion	5°C	$\tau_1 = 1.95 \text{ ns}$
	37°C	$\tau_1 = 0.71 \text{ ns}$
2 <sup>nd</sup> dispersion	5°C	$\tau_2 = 0.039 \mu\text{s}$
	37°C	$\tau_2 = 0.023 \mu\text{s}$
AKAGANEITE NANOPARTICLES		
1 <sup>st</sup> dispersion	5°C	$\tau_1 = 1.76 \text{ ns}$
	37°C	$\tau_1 = 2.28 \text{ ns}$
2 <sup>nd</sup> dispersion	5°C	$\tau_2 = 0.0403 \mu\text{s}$
	37°C	$\tau_2 = 0.0266 \mu\text{s}$

**NMRD Trasversale** Diversi studi [35, 37] hanno mostrato che il tasso di decadimento trasversale dei protoni di soluzioni acquose di ferritina e particelle akaganeite è proporzionale al campo applicato. Risultato inaspettato perchè varie teorie



Transverse NMRD profile of ferritin aqueous solutions at 40°C for different pH values. The iron concentration is 100 mM.



Transverse NMRD profile of akaganeite particles solutions at 40°C for different pH values. The iron concentration is 100 mM.

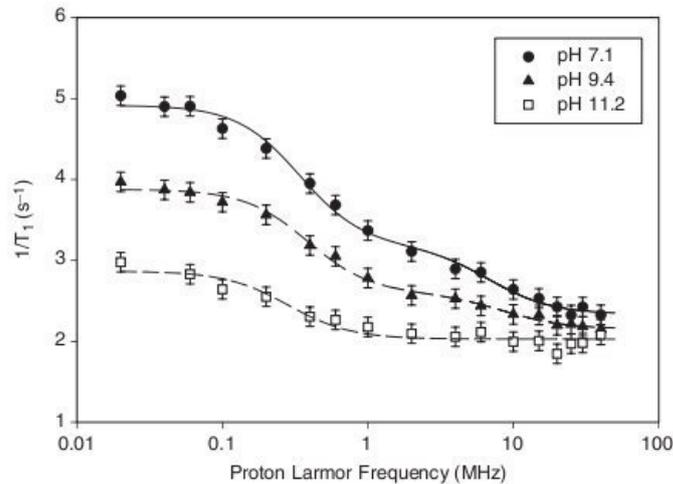
proposte(vedi par.8.2.2) prevedevano una relazione quadratica del tempo di rilassamento con il campo. Per di più, il tempo di rilassamento misurato con la sequenza CPMG( Carr-Purcell-Meiboom-Gill) è mostrato essere indipendente dal tempo echo,  $ilt_{CP}$ . Un parametro di rilassamento importante è  $\alpha$ , la pendenza del profilo NMRD lineare normalizzato della concentrazione di ferro.

TABLE IV  
COMPARISON OF  $\alpha$  VALUES (CALCULATED FROM THE TRANSVERSE NMRD  
PROFILE) FOR DIFFERENT SAMPLES AT 40°C

	$\alpha$ (s <sup>-1</sup> MHz <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
Ferritin solution (46)	0.0039
Akaganeite particles solution (46)	0.0011
Ferritin in marmoset liver (50)	0.011
Ferritin in human brain (51) (52)	0.0082 0.018

La tabella mostra i valori di questo parametro per soluzioni acquose di ferritina e akaganeite e per il ferro contenuto nei tessuti. Il valore di alfa dei tessuti è più grande rispetto a quello delle soluzioni acquose di nanoparticelle di ossidi idrati di ferro. Una possibile interpretazione potrebbe essere la disposizione agglomerata delle molecole di ferritina in vivo. Ad ogni modo, non vi è ancora nessuna dimostrazione sperimentale degli effetti dell'agglomerazione della ferritina sul rilassamento.

**Dipendenza dal pH** Il tempo di decadimento longitudinale non è significamente influenzato dal pH. Tuttavia, dopo la sottrazione del contributo dell'apoferritina, l'effetto si è mostrato molto più evidente. Il tempo di rilassamento trasversale invece è essenzialmente pH indipendente (vedi il profilo NMRD più indietro). Per le particelle di Akaganeite invece entrambi i tassi di decadimento sono fortemente dipendenti dal pH.



Contribution of the ferrihydrite core to the longitudinal NMRD profile of ferritin solutions for different pH values at 37°C. The iron concentration is 100 mM.

**Influenza del Loading Factor** Vymazal studiò l'effetto del LF sul rilassamento delle soluzioni di ferritina. A concentrazione costante, il rilassamento indotto dalla ferritina sembra essere essenzialmente proporzionale al loading factor. La misurazione di T2 è così sufficiente a determinare la concentrazione di ferro nei campioni di ferritina, senza dover stimare il LF. Questa condizione è necessaria per lo sviluppo di metodi MRI per la determinazione del contenuto di ferro in vivo.

## 8.2.2 Modelli teorici del decadimento della ferritina [17]

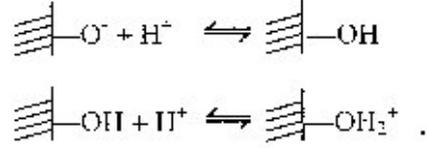
Negli anni son stati presentati diversi modelli per cercare di spiegare il meccanismo di rilassamento della ferritina. Dopo varie teorie, ognuna delle quali presentava limitazioni, Guissin formulò una nuova teoria che spiega in modo molto esaustivo il comportamento della ferritina: la proton exchange dephasing model (PEDM). Prima di spiegare in cosa consiste tale teoria riassumerò le caratteristiche dei modelli precedenti sottolineando le restrizioni di ognuno.

**Outer Sphere Model** Il decadimento dell'acqua in presenza di particelle magnetizzate è solitamente ben descritto dalla OST, specialmente per le particelle di magnetite. Questa teoria è stata estesa alla ferritina in diversi studi. Secondo questo modello, il rilassamento è causato dalla diffusione dei protoni dell'acqua attraverso il campo disomogeneo creato dalle particelle magnetiche. Esso prevede, ad intensità di campo elevate, una dipendenza quadratica di  $1/T_2$  sul momento magnetico delle particelle (assumendole sferiche a raggio  $R$ ), attraverso  $\Delta\omega_r^2$ :

$\frac{1}{T_2} = (4/9)v\Delta\omega_r^2\tau_D$  dove  $v$  è la frazione volumetrica occupata dalle particelle,  $\Delta\omega_r$  è il valore efficace dello spostamento di fase sulla superficie delle particelle e  $\tau_D = \frac{R^2}{D}$  ( $D$  è il coefficiente di diffusione dell'acqua). Il tasso di decadimento misurato tramite l'equazione è più piccolo rispetto a quella misurata ad una forza debole di campo, mentre è più grande per alti valori di campo magnetico. OST è di conseguenza incapace di accertare i risultati sperimentali. Questo contributo non è osservato probabilmente perchè il coefficiente di dipendenza quadratica con il campo è più piccolo di quello predetto. Questo potrebbe essere spiegato da un errore nella lunghezza di correlazione: nell'OST questa lunghezza è il raggio delle particelle, mentre nella giusta definizione dovrebbe significare la distanza tra difetti casuali del cristallo. Questo tempo di correlazione viene quindi significativamente ridotto, così come il contributo al tempo di decadimento.

**The static dephasing regime** Il modello di sfasamento di regime statico prevede una dipendenza lineare di  $1/T_2$  sul momento magnetico delle particelle in soluzione. Questo modello descrive il decadimento trasversale di protoni statici distribuiti in modo disomogeneo in presenza di punti bipolari statici distribuiti casualmente. Il free induction decay rate,  $1/T_2^*$ , è proporzionale alla parte del campione di magnetizzazione dovuto ai dipoli ( $\mu$ ),  $M = n\mu$  dove  $n$  è la concentrazione dei dipoli. Il modello SDR è stato successivamente mostrato essere rilevante non solo per i protoni statici, ma anche per la lenta diffusione dei protoni attraverso la sfera con raggio  $R$ , a condizione che  $\lambda\mu/(RD) > 3.4$ , dove  $D$  è il coefficiente di diffusione dell'acqua. Per le soluzioni considerate, la condizione non è chiaramente soddisfatta (a 1 T,  $\lambda\mu/R^3 = 3 \times 10^6 \text{ rad/s}$  e  $R^2/D = 2.2 \text{ ns}$ , così  $\lambda\mu/(RD) = 0.007$ )

**Inner sphere model** Gli ossidi idrati di ferro possono assorbire metalli pesanti. Questa proprietà risulta dalla presenza di gruppi strutturali idrossigenati sulla loro superficie, che presenta anfoterismo



Recenti lavori di risonanza magnetica nucleare hanno confermato l'occorrenza di uno scambio protonico nel meccanismo di rilassamento di soluzioni di nanoparticelle di ossidi idrati di ferro, con una stima del tempo di scambio protonico di 33 ns per le particelle akaganeite ad un pH=6 e 37°C. Ciò nonostante questo modello non provvede alla soluzione del problema: nella inner sphere theory, che descrive il rilassamento dei protoni legati, prevede una dipendenza quadratica del tasso rispetto a  $B_o$ . La risoluzione di questo problema richiede un nuovo approccio teorico.

### Proton exchange dephasing model (PEDM)

**Dinamiche di rilassamento** I protoni che si legano alle particelle magnetiche con siti di assorbimento caratterizzati da differenti frequenze di spostamento angolari di Larmor( $\omega$ ) si sfasano progressivamente ed il segnale  $S(t)$  decade in accordo con

$$S(t)/S(0) = \int_{-\infty}^{\infty} d\Phi (\cos\Phi) P_t(\Phi) = \text{Re}[\tilde{P}_t(k=1)]$$

Dove  $P_t(\Phi)$  è la distribuzione dello sfasamento al tempo  $t$ ,  $\tilde{P}_t(\Phi)$  è la trasformata di Fourier, e  $\text{Re}$  sta per "parte reale di". Il decadimento e il conseguente tasso di rilassamento è così determinato dall'evoluzione della distribuzione dello sfasamento di fase. Se ogni protone è assunto saltare in modo casuale da un sito all'altro, lo sfasamento accumulato dopo  $l$  salti sarà  $\Phi_l = \sum_{i=1}^l \partial\Phi_i$ , con  $\partial\Phi_i = \partial\omega_i t_i$  e dove  $t_i$  è il tempo speso nel sito  $i$ . Quando una variabile causale è definita come la somma di diverse variabili casuali, la distribuzione più probabile è il prodotto di convoluzione della distribuzione dei termini della somma. La trasformazione di Fourier della funzione distribuzione somma è anche uguale al prodotto algebrico della trasformazione di Fourier della funzione distribuzione di ogni termine individuale della somma. Abbiamo così  $\tilde{P}_t(k) = \prod_{i=1}^l \tilde{P}_{t_i}(k)$ . Dopo un tempo  $\tau$  nel sito  $i$  in una situazione statica (tra due salti), la distribuzione dello sfasamento è direttamente detotta da  $\Psi(\partial\omega)$  dove la distribuzione del frequenza di spostamento angolare di Larmor del sito è:  $P_\tau(\partial\Phi) = \Psi(\partial\Phi/\tau)/\tau$ .

Ora, la linearità tra  $1/T_2$  e  $B_o$  è predetta dalla suddetta SDR dove nell'articolo originale di Brown viene mostrato il risultato da una distribuzione Lorenziana dello sfasamento, con una deviazione che risulta direttamente dalla distribuzione Lorentzian della componente longitudinale del campo magnetico indotto dai dipoli magnetici. Introduciamo in tal modo una un assunto dalla form. Che premette la dipendenza lineare: i salti casuali non cambiano la forma analitica della distribuzione di sfasamento iniziale, determinata dalla distribuzione delle frequenze angolari di Larmor delle aree:  $\Psi(\partial\omega) = K/[\pi(\delta\omega^2 + K^2)]$  dove  $K$  (la metà della larghezza e metà altezza della distribuzione di Lorentz) è proporzionale a  $B_o$ . Effettivamente, ricordando che la trasformata di Fourier di una funzione di Lorentz è esponenziale otteniamo:

$$\tilde{P}_t(k) = \prod_{i=1}^l e^{-kKt_i} = e^{-kK \sum_{i=1}^l t_i} = e^{-kKt}$$

che introducendola nell'altra form si ottiene il tempo di rilassamento  $K$  (che, per definizione, è proporzionale a  $B_o$ )

Questo semplice modello trascurava la maggior parte dell'acqua (il solvente), focalizzandosi solo sull'assorbimento dei protoni. Di fatto, tra due visite in un sito di assorbimento, i protoni d'acqua diffondono nel solvente (nell'intorno delle particelle), con l'aumento del loro sfasamento e la profusione del rilassamento  $OST(1/T_2)_{diff}$ . Questa diffusione senza il solvente giustifica un'importante assunzione del modello: l'indipendenza statistica del cambiamento di fase accumulata durante periodi successivi di assorbimento. La stima dei tassi di decadimento nel complesso del sistema conta in questo modo per il solvente solo considerando che i protoni vengono sottoposti ad uno scambio veloce tra il solvente ed i siti di assorbimento. Questo scambio risulta semplicemente nel peso che ha la frazione dei protoni assorbiti sul tasso di rilassamento.

$$1/T_2 = (cq/111)K + (1/T_2)_{diff}$$

dove  $c$  rappresenta la concentrazione delle particelle (in moli per litro),  $q$  il numero di protoni scambiabili per particella e  $111$  (moli per litro) è la concentrazione protonica nell'acqua.

Questo modello è vicino alla teoria SDR. Ad ogni modo, SDR si occupa soltanto degli spins statici, così che il rilassamento, più specificamente il primo effetto investigato, è automaticamente cancellato dall'impulso di rifocalizzazione. Al contrario il PEDM considera le dinamiche irreversibili: la casualità d'ordine dei salti da un posto ad un altro previene il ristabilimento del segnale appena occorrono salti diversi tra due impulsi di rifocalizzazione (se il  $\tau_{CP} \gg \tau_M$ )

Quanto sono validi i presupposti di questo modello? L'avvenimento di uno scambio è stato provato, le variabili stimate sono disponibili e sono senza limiti ( $\tau_M \sim 33$  ns che è più grande di  $\tau_{De}$  più piccolo di  $\tau_{CP}$ ). Ad ogni modo, la forma Lorentziana della distribuzione del sfasamento al sito di assorbimento non è ancora stata verificata. È stato dedotta questa forma tramite la simulazione al computer dove si ha puntato a calcolare il campo magnetico generato da particelle antiferromagnetiche a differenti posizioni della superficie. Considerando le particelle come entità magnetizzate in modo omogeneo (come una sfera) è troppo difficile una approssimazione per ottenere ogni informazione riguardante la distribuzione del sito di assorbimento e sfasamento. Il calcolo è perciò basato su una rappresentazione delle strutture magnetiche delle particelle ferridrate e akaganeite ben più dettagliata, prese da una recente pubblicazione di Mossbauer e data magnetometric. La distribuzione del sito di assorbimento e sfasamento per le particelle ferridrate e akaganeite è calcolato grazie ad un modello stimato per la natura antiferromagnetica e supermagnetica del cristallo. Questa caratteristica permette di considerare la magnetizzazione del cristallo dovuta a sia al "canting" (piegamento) dei subreticoli in opposizione e sia al momento non compensato risultante dai difetti del cristallo. La distribuzione calcolata è chiaramente Lorentziana. Il modello sfasamento con scambio protonico è così convalidato.

## 9 Dipendenza dei tempi di decadimento, sequenze di impulso e metodi di contrasto dal ferro nelle immagini MRI

Table 3 (continued)

Tissue	T2 (ms)	T2* (ms)	T2' (ms)	Subject	B <sub>0</sub> field (T)	Ref no.	Reference
Putamen	68 ± 1.3				1.5	[47]	Dnayer et al. (1986)
	-62				1.5	[112]	Taylor et al. (1991)
	79.07 ± 2.1			60 patients aged from newborn to 85 years	0.5	[4]	Bartzokis et al. (1993)
	69.09 ± 2.5			Six subjects aged 21-30	1.5		
	77.3 ± 4.7			18 healthy age-matched control subjects	1.5	[124]	Vymazal et al. (1997)
	76.1 ± 7.5			Eight patients with multiple system atrophy	1.5		
	77.8 ± 5.7			23 patients with PD	1.5		
	51.7 ± 2.2		153.4 ± 26.5		3.0	[56]	Gelman et al. (1999)
	63.65 ± 3.38			20 healthy adult male volunteers aged 20-81 years	1.5	[5]	Bartzokis et al. (1994)
	75.59 ± 1.86				0.5		
	67 ± 9.2			19 patients, various echo sets	1.5	[182]	Darwin et al. (1986)
	65 ± 11.9				1.5		
	69 ± 7.5				1.5		
	68 ± 8.3			Subgroup (13 of 19), various echo sets	1.5		
	68 ± 9.8				1.5		
	70 ± 7.1				1.5		
	71			Mean T2 of five healthy individuals	1.5		
	51-52			Averaged from 151 volunteers aged 5-90 years	1.5	[181]	Breger et al. (1991)
	-69.9-76.9			13 normal adult male volunteers	0.5	[8]	Bartzokis et al. (1997)
	-52.6-69.9				1.5		
Globus pallidus	72.7 ± 10.9			10 subjects, all were neurologically intact before death	1.5	[22]	Chen et al. (1989)
	60 ± 2.5			Six subjects aged 21-30	1.5	[47]	Dnayer et al. (1986)
	70.31 ± 1.3				0.5	[4]	Bartzokis et al. (1993)
	54.77 ± 3.0			18 healthy age-matched control subjects	1.5	[124]	Vymazal et al. (1997)
	70.1 ± 4.0			Eight patients with multiple system atrophy	1.5		
	65.6 ± 4.2			23 patients with PD	1.5		
	70.9 ± 6.1				1.5		
	38.8 ± 1.6		85.1 ± 13.6		3.0	[56]	Gelman et al. (1999)
	49.90 ± 3.26			20 healthy adult male volunteers aged 20-81 years	1.5	[8]	Bartzokis et al. (1997)
	67.75 ± 2.97				0.5		

E.M. Haacke et al. / Magnetic Resonance Imaging 23 (2005) 1-25

Table 3 (continued)

Tissue	T2 (ms)	T2* (ms)	T2' (ms)	Subject	B <sub>0</sub> field (T)	Ref no.	Reference
Putamen	68 ± 1.3				1.5	[47]	Dnayer et al. (1986)
	-62				1.5	[112]	Taylor et al. (1991)
	79.07 ± 2.1			60 patients aged from newborn to 85 years	0.5	[4]	Bartzokis et al. (1993)
	69.09 ± 2.5			Six subjects aged 21-30	1.5		
	77.3 ± 4.7			18 healthy age-matched control subjects	1.5	[124]	Vymazal et al. (1997)
	76.1 ± 7.5			Eight patients with multiple system atrophy	1.5		
	77.8 ± 5.7			23 patients with PD	1.5		
	51.7 ± 2.2		153.4 ± 26.5		3.0	[56]	Gelman et al. (1999)
	63.65 ± 3.38			20 healthy adult male volunteers aged 20-81 years	1.5	[5]	Bartzokis et al. (1994)
	75.59 ± 1.86				0.5		
	67 ± 9.2			19 patients, various echo sets	1.5	[182]	Darwin et al. (1986)
	65 ± 11.9				1.5		
	69 ± 7.5				1.5		
	68 ± 8.3			Subgroup (13 of 19), various echo sets	1.5		
	68 ± 9.8				1.5		
	70 ± 7.1				1.5		
	71			Mean T2 of five healthy individuals	1.5		
	51-52			Averaged from 151 volunteers aged 5-90 years	1.5	[181]	Breger et al. (1991)
	-69.9-76.9			13 normal adult male volunteers	0.5	[8]	Bartzokis et al. (1997)
	-52.6-69.9				1.5		
Globus pallidus	72.7 ± 10.9			10 subjects, all were neurologically intact before death	1.5	[22]	Chen et al. (1989)
	60 ± 2.5			Six subjects aged 21-30	1.5	[47]	Dnayer et al. (1986)
	70.31 ± 1.3				0.5	[4]	Bartzokis et al. (1993)
	54.77 ± 3.0			18 healthy age-matched control subjects	1.5	[124]	Vymazal et al. (1997)
	70.1 ± 4.0			Eight patients with multiple system atrophy	1.5		
	65.6 ± 4.2			23 patients with PD	1.5		
	70.9 ± 6.1				1.5		
	38.8 ± 1.6		85.1 ± 13.6		3.0	[56]	Gelman et al. (1999)
	49.90 ± 3.26			20 healthy adult male volunteers aged 20-81 years	1.5	[8]	Bartzokis et al. (1997)
	67.75 ± 2.97				0.5		

E.M. Haacke et al. / Magnetic Resonance Imaging 23 (2005) 1-25

### 9.1 Studi in vitro e vivo su soggetti sani: correlazione tra ferro e il tempo di rilassamento $R_2$ [2]

Studi in vitro ed in vivo su soggetti sani mostrano una forte correlazione lineare tra  $R_2$  nelle regioni di materia grigia e le concentrazioni derivate dalla letteratura o misurate direttamente dei campioni di tessuti. Schenker et al. dimostrò anche la correlazione tra  $R_2$  e l'età in soggetti sani seguendo la stessa relazione tra ferro e l'età. Ciò nonostante, le opinioni del rapporto tra ferro ed  $R_2$  divergono quando sono considerate sia la materia grigia che quella bianca in soggetti sani ed anche in alcune malattie neurodegenerative.

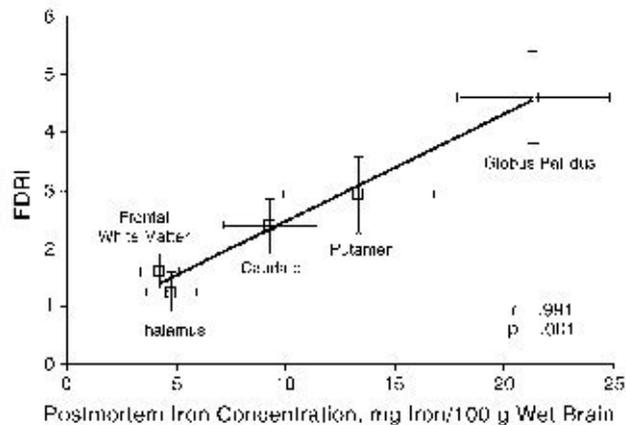
Queste discrepanze si presentano perché, sebbene  $R_2$  sia fortemente influenzato dalla concentrazione di ferro, anche il contenuto d'acqua condiziona il tempo di rilassamento. In media, c'è una differenza del 12% tra l'acqua contenuta nella materia bianca (circa 72%), con il suo alto contenuto lipidico, e quella contenuta nella materia grigia (circa 84%). Il basso contenuto d'acqua a cui corrisponde un alto valore di  $R_2$  nella materia bianca confrontato con le regioni di materia grigia con la stessa concentrazione di ferro può spiegare perché alcuni studi non ottengono una forte correlazione con il ferro.

Curnes osservò che le forti fibre compatte mielinizzate, come nella Commessura anteriore, la capsula anteriore e la fornice, mostrano una rilevante diminuzione del segnale nelle immagini  $T_2$  pesate, in accordo con il basso contenuto d'acqua ed alto contenuto di proteine di queste zone tipicamente povere di ferro.

Inoltre, Whittall et al. ha misurato una breve componente di  $T_2$  (15 ms confrontati al tipico intervallo di 50-150 ns) nel tessuto nervoso attribuito alla compartimentalizzazione dell'acqua nelle membrane mieliniche, chiamate acqua mielinica. La loro ricerca indicò che la materia bianca contiene una media dell'11% di acqua mielinica contro il 3% contenuto nella materia grigia. Nei tessuti nervosi malati (sostanza nera di Sömmering nel PD e il putamen nel HD) i neuroni danneggiati tendono ad aumentare il contenuto d'acqua locale (dovuta alla riduzione nei lipidi), diminuendo  $R_2$ , opponendosi e potenzialmente riducendo l'effetto del ferro. Si pensa che l'effetto di riduzione del segnale sia dovuto allo sfasamento addizionale degli spin protonici dalle disomogeneità del campo indotto dal ferro. Questo sfasamento addizionale è compreso nel segnale a causa dell'incapacità di compensazione della rifocalizzazione a radiofrequenza. Per superare le limitazioni di  $R_2$  nelle malattie, il gruppo Bartzokis adotta la tecnica del tasso di incremento campo dipendente (FDRI) che misura la differenza di  $R_2$  a 1.5 e 0.5 T ed è affermata essere una misura specifica del contenuto di ferritina. La correlazione tra FDRI e la concentrazione di ferro in soggetti sani è anch'essa molto forte.

### 9.1.1 FDRI: field-dependent rate increase [18]

Attraverso l'applicazione di questo metodo è possibile ottenere misure specifiche del contenuto di ferro delle molecole di ferritina. Il FDRI prende vantaggio dal fatto che la ferritina incrementa  $R_2$  linearmente con la forza del campo dello strumento MRI e produce una misura altamente specifica e riproducibile del ferro immagazzinato nel tessuto. In breve, FDRI è la differenza delle misure di  $R_2$  del cervello ottenute con due forze di campo differenti. L'incremento del  $R_2$ -campo-dipendente è specificamente associato con il totale di ferro contenuto nelle molecole di ferritina ed è stato mostrato essere indipendente dal loading factor. Questo metodo permette così di ottenere una misura specifica del ferro totale contenuto nelle particelle che formano il cuore minerale della ferritina. Bartzokis in uno studio in vivo tramite la tecnica FDRI trova una corrispondenza quasi perfetta con le misurazioni post-mortem delle concentrazioni di ferro trovate da Hallgreen and Sourander (1958). Essi misurarono il contenuto istologico di ferro non-heme in campioni umani di individui normali in età comprese tra i 30-100 anni e una età media stimata intorno ai 62, provvedendo a riferire i valori di regioni multiple del SNC [media  $\pm$  incertezza: caudate ( $9.28 \pm 2.14$ ,  $N=58$ ), globus pallidus ( $21.3 \pm 3.49$ ,  $N=55$ ), putamen ( $13.32 \pm 3.43$ ,  $N=56$ ), talamo ( $4.76 \pm 1.16$ ,  $N=52$ ), materia bianca frontale ( $4.24 \pm 0.88$ ,  $N=59$ )]. Questi valori sono stati confrontati con quelli trovati in vivo tramite la tecnica FDRI su soggetti con età media e intervallo simili (vedi figura).



Field-dependent relaxation rate ( $R_2$ ) increase (FDRI)\* vs. post-mortem iron concentrations in normal subjects. \*FDRI is the difference in the  $R_2$  values of each region on high (1.5-T) and low (0.5-T) field-strength MRI and is an in vivo measure of ferritin iron levels. FDRI data are means from 133 healthy subjects 30–82 years of age. The postmortem data are mean iron concentrations from 55 to 59 normal subjects aged 30–100 years (from Hallgren and Sourander [60]).

Nonostante ciò, le misure tramite FDRI quantificano solo il ferro contenuto nella ferritina e non l'ammontare del ferro libero e altri metalli di transizione che potrebbero essere associati anch'essi ad effetti di tossicità.

## 9.2 Studi su $R_2'$ e $R_2^*$

Il segnale anomalo (il fenomeno di riduzione di  $R_2$ ) dovuto ai cambiamenti del contenuto d'acqua nei tessuti danneggiati, malgrado l'aumento locale del ferro, ha permesso ai ricercatori di investigare altri protocolli MR e parametri per quantificare il ferro contenuto nel SNC. Diversi ricercatori (Gelman N, Gorell, Graham et al.) suggeriscono che l'informazione chiave per quantificare il ferro nel SNC giace nel tempo  $R_2'$  ( $R_2' = R_2^* - R_2$ ).

Ordidge et al. sviluppò un metodo per misurare  $R_2'$  nonostante la presenza di variazioni del campo di fondo che sfasano il segnale e producono un falso alto valore di  $R_2'$ . Egli misurò un incremento significativo di  $R_2'$ , ma non di  $R_2$  (tipicamente ridotto), nella substantia nigral di pazienti PD, coerente con diversi studi post-mortem su PD in cui son stati misurati elevati livelli di ferro nella regione substantia nigral.

L'approccio utilizzato da Ordidge consiste nell'utilizzo di una sequenza chiamata gradient-recalled echo MRI piuttosto della sequenza standar spin-echo. Le immagini Gradient-echo son governate dagli effetti su  $T_2^*$  che riflettono in modo più accurato il deposito di ferro poichè l'impulso a radiofrequenza non viene rifocalizzato. Questa sequenza produce le informazione per ottenere  $T_2^*$  e  $T_2$  può essere calcolato mediante modelli matematici. La differenza tra questi valori ( $T_2'$ ) riflette i cambiamenti dovuti solamente alle disomogeneità di campo indotte dal ferro.

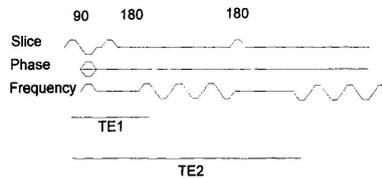
Graham et al. e Gorrel et al. confermarono che  $R_2'$  è incrementato nella medesima regione. I dati ottenuti da Graham e Gorrel dimostrano la forte correlazione tra  $R_2'$  e la concentrazione di ferro nel SNC.

Studi su  $R_2^*$  hanno riportato limitazioni attribuite a sorgenti locali di fondo che variano il campo magnetico e riducono la specificità del ferro([1]).

### 9.2.1 Prime(Partially refocused interleaved multiple echo)[4]

Questa sequenza è stata utilizzata da Graham et al. per investigare il ferro depositato nei gangli della base in pazienti malati di Parkinson.

La sequenza PRIME consiste in un spin-echo e cinque gradient-recalled echoes acquisiti ciascuno con un impulso a radiofrequenza con fase di  $180^\circ$ . I due spin-echoes son rifocalizzati al tempo di 20 e 160 ms. I gradient-echoes invece son rifocalizzati a 31,42,53,64 e 75 ms per il primo impulso a radiofrequenza ed a 171,182,193, 204 e 215 ms per il secondo impulso. Nella figura sottostante è rappresentato il diagramma temporale della sequenza.

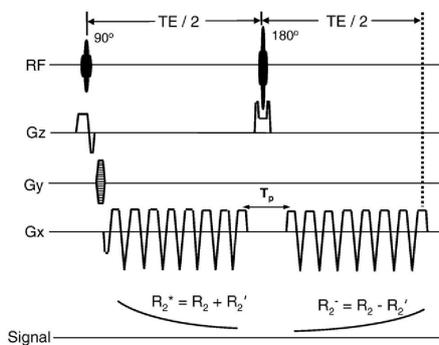


A diagrammatic representation of the PRIME (Partially Refocussed Interleaved Multiple Echo) sequence.

Questa sequenza produce le informazione per ottenere sia  $T_2^*$  che  $T_2$  direttamente, da cui può essere ottenuto il tempo di decadimento  $T_2'$ , misura pura delle disomogeneità del campo.

### 9.2.2 Gesfide(Gradient echo sampling of free induction decay and echo)[6]

Questo metodo permette di misurare sia  $R_2$  che  $R_2'$  (come pure  $R_2^*$ ) attraverso una singola scansione. Essa consiste di due serie di echo: uno immediatamente seguente all'impulso di eccitazione ed il secondo successivamente all'impulso di rifocalizzazione di  $180^\circ$ . Il segnale nella prima serie di echoes decade esponenzialmente con una velocità costante  $R_2^* (=R_2 + R_2')$ , mentre nella seconda serie, il segnale evolve con un tasso costante  $R_2^- (=R_2 - R_2^*)$ . Dopo aver calcolato i valori di  $R_2^*$  e  $R_2^-$ ,  $R_2$  e  $R_2'$  possono essere ottenuti attraverso la loro combinazione lineare.



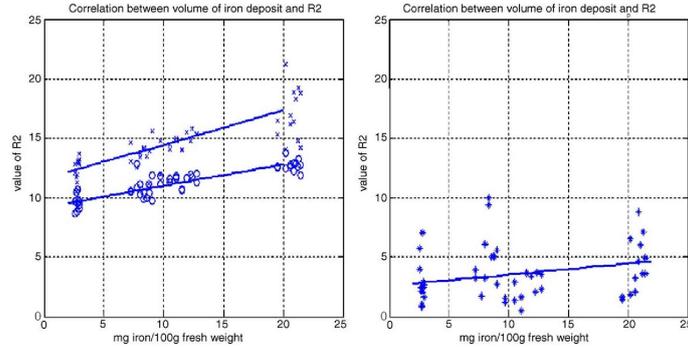
The GESFIDE pulse sequence consists of two trains of gradient echoes: the first train samples the signal decaying with rate constant  $R_2^*$  after initial excitation; the second train samples the signal evolving with rate constant  $R_2^-$  following the refocusing pulse. Parameters of interest ( $R_2$  and  $R_2'$ ) can be directly computed from the sum and the difference of  $R_2^*$  and  $R_2^-$ .

Hikita et al. ([7]) studiò varie sequenze MRI per vedere quale misura in modo più accurato il ferro nel SNC. Egli confrontò la sequenza GESFIDE per quantificare  $R_2^*$  e  $R_2$  e la sequenza multiple spin echoes (MSE) per la quantificazione di  $R_2$ . Quest'ultima consiste in una serie di impulsi  $180^\circ$  da 5 a 115 ms ogni 10 ms, e il segnale da 10 a 120 ms acquisito ogni 10 ms. Tutti gli echi sono interpolati per costruire una curva esponenziale ottenendo il tempo di rilassamento  $R_2$ . I risultati ottenuti da questo gruppo di studio sono raccolti nella tabella seguente.

Table  
Figures show mean  $\pm$  S.D.

	Cortex	WM	Caudate	Putamen	Gp
$R_2$ (MSE)	$9.38 \pm 0.93$	$12.06 \pm 0.43$	$10.75 \pm 0.87$	$11.49 \pm 0.44$	$12.71 \pm 0.46$
$R_2$ (GESFIDE)	$12.14 \pm 1.4$	$14.58 \pm 0.95$	$14.39 \pm 2.22$	$14.62 \pm 1.00$	$16.99 \pm 2.16$
$R_2'$ (GESFIDE)	$3.66 \pm 3.274$	$3.85 \pm 1.86$	$6.08 \pm 4.35$	$2.43 \pm 1.11$	$4.27 \pm 2.33$
Iron deposits	$2.92 \pm 0.41$ (2.80)	$4.24 \pm 0.88$ (4.14)	$9.28 \pm 2.14$ (8.31)	$13.32 \pm 3.43$ (11.47)	$21.3 \pm 3.49$ (20.86)

WM, frontal white matter; gp, globus pallidus. The values on the last row were obtained from Hallgren and Sourander (1958) postmortem study. Data for iron deposits were obtained from subjects (40–100 years of age) and are shown as milligrams of iron per 100 g fresh weight. The values in parentheses indicate the estimated amount of iron deposits of our volunteers (25–46 years of age).



The horizontal axis shows the concentrations of iron deposits (in milligrams of iron per 100 g fresh weight) as calculated from the regression lines of post mortem data (Hallgren and Sourander, 1958) and the vertical axis shows those measured using  $R_2$  or  $R_2'$ . Left: (○)  $R_2$  (MSE); (×)  $R_2$  (GESFIDE). Right: (\*)  $R_2'$  based on GESFIDE sequence.

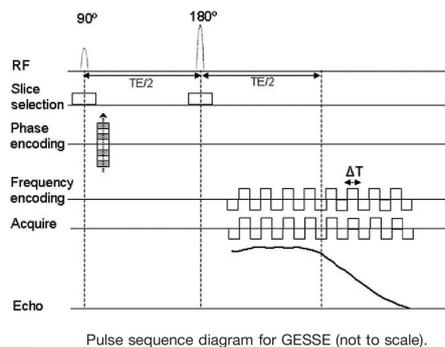
La figura 2 mostra la regressione lineare tra il presunto ammontare di ferro depositato basato sullo studio di Hallgren and Sourander ([5]) e i tempi di rilassamento misurati  $R_2$  (parte sinistra) e  $R_2'$  (parte destra).

La pendenza della regressione lineare di  $R_2$  (GESFIDE) è la più alta. Ad ogni modo, sembra che la relazione tra  $R_2$  (MSE) come pure  $R_2$  (GESFIDE) e l'ammontare del ferro depositato sia sufficientemente robusta se confrontata con quella di  $R_2'$  (GESFIDE). Un confronto tra i coefficienti di correlazione degli andamenti delle regressioni lineari mostra che  $R_2$  (MSE) ha un alto coefficiente e riesce a trovare una piccola variazione dell'ammontare del ferro depositato rispetto a  $R_2$  (GESFIDE). D'altro canto  $R_2'$  (GESFIDE) non può individuare le differenze tra l'ammontare del ferro depositato nella corteccia ed il putamen ed è facilmente affetto da artefatti di suscettività magnetica. Hikita et al. concluse quindi che  $R_2'$  (GESFIDE) non è adatto per stimare l'ammontare del ferro nei gangli della base.

### 9.2.3 GESSE (gradient echo sampling of spin echo) [8]

Considerando la tecnica basata sulla sequenza GESFIDE, essa risulta essere molto efficace e migliore delle altre tecniche quando i cambiamenti del segnale reversibile dovuti alle disomogeneità del campo possono essere descritti in termini di un comportamento esponenziale lineare. La parte reversibile del segnale però non è sempre esponenziale. Per

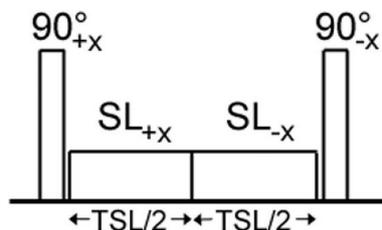
esempio, il decadimento del segnale potrebbe avere un andamento gaussiano nel caso in cui vi siano sorgenti multiple di disomogeneità di campo nei singoli voxel. Yablonskiy et al. propone una modifica di tale sequenza, la gradient echo sampling of spin echo (GESSE), che si basa sull'incorporazione di una serie di gradient echoes una sequenza standard spin echo soltanto durante la parte di rifasamento e sfasamento del segnale spin-echo (la porzione di segnale che segue l'impulso  $180^\circ$ ).



Questo approccio, per calcolare  $T_2$ , confronta le immagini che non sono separate da alcun impulso RF, e come risultato, è insensibile alle imperfezioni dei profili delle fette. Seconda cosa, non deve essere fatta nessuna assunzione per quanto riguarda il comportamento del campo magnetico statico disomogeneo, perciò questo metodo è indifferente alle disomogeneità del campo magnetico statico. Questo metodo ha però un rapporto segnale-rumore più basso rispetto alla tecnica GESFIDE.

### 9.3 $T_{2\rho}$ Weighted Contrast [9]

Il parametro  $T_{2\rho}$  descrive il decadimento della magnetizzazione trasversa nella struttura rotante che si presenta sotto l'influenza della risonanza di un impulso a radiofrequenza spin-lock. Durante il corso dell'impulso di spin-lock, TSL, il segnale decade esponenzialmente in accordo con la costante di decadimento  $T_{2\rho}$ .  $T_{2\rho}$  weighting può essere aggiunto vicino a qualsiasi sequenza usando un spin-lock rf pulse cluster.



Schematic of the  $T_{2\rho}$ -weighting spin-lock rf pulse cluster consisting of a pair of  $90^\circ$  pulses surrounding a phase-alternating spin-lock pulse with amplitude  $B_1$ .

In quest'ultimo, un impulso non selettivo di  $90^\circ$  è inizialmente applicato lungo l'asse x per spostare la magnetizzazione longitudinale nel piano trasverso lungo l'asse y. Un impulso spin-lock (SL) viene applicato immediatamente lungo l'asse x in modo ortogonale all'oscillazione del vettore di magnetizzazione. Durante la prima metà della durata

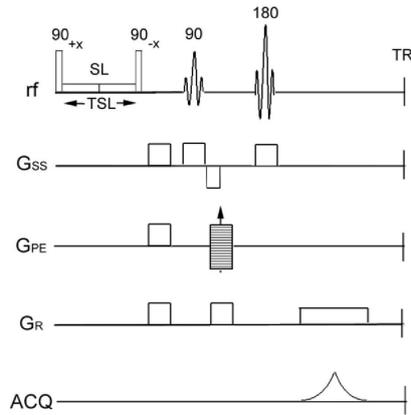
dell'impulso SL(TSL/2), l'asse rotante della magnetizzazione oscilla lungo la direzione positiva del piano y-z e decade in accordo ai processi  $T_1$  e  $T_2$ . La velocità del decadimento esponenziale durante questo tempo è descritto dal parametro  $T_{2\rho}$ . A metà strada attraverso l'impulso SL, la fase è ruotata di  $180^\circ$  per la nutazione del vettore di magnetizzazione verso l'asse y durante il tempo restante di TSL/2 così formando un eco rotatorio. Alla fine dell'impulso SL, un secondo impulso a rf  $90^\circ$  è applicato lungo l'asse x per nutare indietro la magnetizzazione  $T_{2\rho}$  fino all'asse longitudinale dove è di conseguenza eccitato e codificato spazialmente.

Poichè, durante l'oscillazione dell'asse di magnetizzazione, si presentano entrambi i processi  $T_1$  e  $T_2$ , per una piccola ampiezza dell'impulso SL minore della frequenza di Larmor ( $\gamma B_1/2\pi$  dell'ordine dei kilohertz) e assumendo come sorgente predominante del decadimento  $T_{2\rho}$  provenire dai contributi dipolari,  $1/T_{2\rho}$  può essere descritto come la media dei reciproci di  $T_1$  e  $T_2$  come segue:

$$\frac{1}{T_{2\rho}} \approx \frac{1}{2} \left( \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \right)$$

Per molti tessuti  $T_1 \gg T_2$  e per questo  $T_{2\rho}$  è vicino al doppio di  $T_2$ . In pratica, la disomogeneità di  $B_0$  e  $B_1$  e gli effetti della diffusione e dei processi di scambio protonico rendono  $T_2$  più breve e quindi risultando da una misura sperimentale di  $T_{2\rho}$  che è più piccola del doppio di  $T_2$ . Poichè  $T_{2\rho}$  è affetto in prevalenza da  $T_2$ , le immagini  $T_{2\rho}$  pesate produrranno un contrasto simile alle immagini  $T_2$ . Dato dal fatto che  $T_{2\rho}$  è sempre maggiore di  $T_2$ , il rapporto segnale-rumore (SNR) di una immagine  $T_{2\rho}$  pesata è maggiore rispetto ad una immagine  $T_2$  pesata con la stessa evoluzione di durata del contrasto (TSL nel caso di  $T_{2\rho}$  o TE nel caso di  $T_2$ ).

$T_{2\rho}$  non deve essere confuso con il relativo meccanismo di contrasto spin-lock  $T_{1\rho}$ , che rappresenta il decadimento spin-lattice dell'asse di rotazione durante un impulso spin-lock. La pesatura tramite  $T_{1\rho}$  può essere applicata usando lo stesso cluster di impulso spin-lock usato per rivelare  $T_{2\rho}$  con l'importante distinzione che la fase dell'impulso spin-lock deve essere impostata in modo tale da applicare l'impulso parallelamente al vettore di magnetizzazione piuttosto che ortogonalmente. La differenza nella pesatura  $T_{1\rho}$ , come per  $T_1$ , sta nel fatto che  $T_{1\rho}$  mostra dispersione in funzione di  $\gamma B_1/2\pi$ , mentre  $T_{2\rho}$  è debolmente affetto da  $\gamma B_1/2\pi$ . Con  $\gamma B_1/2\pi$  vicino allo zero,  $T_{1\rho} \sim T_2$  e  $\gamma B_1/2\pi$  aumenta,  $T_{1\rho}$  incrementa intorno al massimo di  $T_1$ . È stato mostrato che il parametro  $T_{1\rho}$  è sensibile ai processi molecolari che si presentano nel range di frequenze vicine a  $\gamma B_1/2\pi$  e per questo  $T_{1\rho}$  è stato utilizzato come meccanismo per generare contrasti basati sui contenuti macromolecolari.



Pulse sequence schematic for the single-slice  $T_{2\rho}$ -weighting spin-lock rf pulse sequence with spin-echo readout. The  $T_{2\rho}$ -preparation spin-lock pulse cluster is preencoded to a conventional spin-echo readout scheme. A crusher gradient is applied following the spin-lock pulse cluster to destroy any transverse magnetization that is not nutated back into the longitudinal axis by the second  $90^\circ$  pulse.

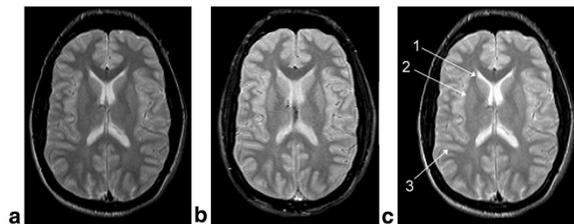
Wheaton et al. dimostrò un incremento del contrasto relativo al ferro confrontando le immagini create con il  $T_{2\rho}$  rispetto a quelle convenzionali  $T_2$ . Il potenziale vantaggio della pesatura  $T_{2\rho}$  ha molte sfaccettature. Per esempio (vedi tabella) sebbene nel putamen e nella materia grigia i valori di  $T_2$  siano quasi identici, di possono misurare dei diversi valori di  $T_{2\rho}$ .

Table  
Average  $T_2$  and  $T_{2\rho}$  Measurements of Structures in the Human Brain at 1.5 T

Structure	$T_2$ (ms)	$T_{2\rho}$ (ms)	$\Delta$ (%)
White matter	77	106	+38
Gray matter	96	147	+53
Putamen	97	135	+39
Caudate nucleus	84	140	+67

Note. The percentage increase in  $T_{2\rho}$  compared to  $T_2$  is listed in the  $\Delta$  category.

L'incremento del contrasto tra i diversi tipi generali di tessuti può essere usato per migliorare l'accuratezza della quantificazione volumetrica del cervello.



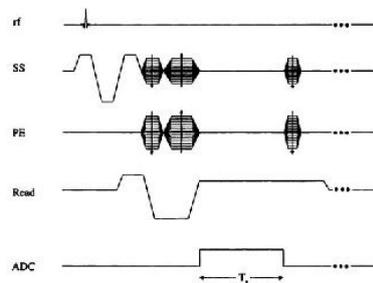
$T_2$ - and  $T_{2\rho}$ -weighted images of an axial slice of a human brain. (a)  $T_2$ -weighted image displayed with identical window and level parameters as in panel B. (b)  $T_{2\rho}$ -weighted image displayed with window and level parameters chosen to optimize WM-GM contrast. (c)  $T_2$ -weighted image displayed with window and level parameters chosen to optimize WM-GM contrast.

## 9.4 SWI: Susceptibility-weighted imaging [10]

Susceptibility-weighted imaging (SWI) è una nuova tecnica di neuroimaging, che utilizza la differenza di suscettività magnetica nei tessuti per generare un unico contrasto, differente da quelli tradizionali di densità di spin,  $T_1$ ,  $T_2$  ecc.

Questa tecnica dà la possibilità di migliorare il contrasto nell'imaging MR. Fino a poco tempo fa la maggior parte delle immagini MR diagnostiche dipendevano soltanto dalla lettura delle informazioni relative al modulo. Le informazioni di fase venivano ignorate e spesso scartate perfino prima di arrivare alla vista nel terminale. Le immagini di fase, ad ogni modo, contengono ricche informazioni riguardanti i cambiamenti locali di suscettività tra i tessuti, che possono essere molto utili per la misura del contenuto di ferro e di altre sostanze che influenzano il campo locale. Gli effetti di altri campi magnetici di fondo rappresentano il principale problema poiché coprono le informazioni di fase utili. Nel 1997 Haacke et al. sviluppò un metodo per rimuovere la maggior parte degli artefatti non voluti e tenere soltanto la fase locale d'interesse. Questo aprì le porte per la scoperta di altri aspetti sulle immagini di suscettività e mostrò la futura direzione del mappaggio basato sulla suscettività. Essi iniziarono a vedere differenti tipi di contrasto nelle immagini di fase SWI filtrate per differenti patologie. Per rendere le informazioni più accessibili ai radiologi, anche se le immagini di modulo e fase prese separatamente sono pezzi cruciali d'informazione, essi combinarono le due immagini e crearono una nuova susceptibility-weighted magnitude image.

Questa tecnica si basa sull'utilizzo di una sequenza chiamata gradient-echo (vedi diagramma temporale sotto). Questa sequenza è stata utilizzata dopo la comparsa dei sistemi superconduttori che permettono una maggiore uniformità di campo.



Gradient-echo sequence design.  $T_s$  refers to the sampling time interval. The gradient pulses are designed to give first-order flow compensation. SS indicates the slice-select gradient, PE, the phase-encoding gradient. ADC, analog-to-digital conversion.

La fase, ricavata dal segnale ottenuto dalla RM, è data dalla seguente formula:

$$\Delta\varphi = -\gamma\Delta Bt$$

dove  $\gamma$  è pari al rapporto giromagnetico,  $\Delta B$  al campo indotto nel tessuto, e  $t$  il tempo durante la quale sono registrati i dati (solitamente pari a TE nelle sequenze gradient-echo).  $\Delta B$  essere sostituito con il prodotto tra  $g$ , che rappresenta un fattore geometrico,  $\Delta X$ , che rappresenta la differenza della suscettività magnetica locale nel tessuto d'interesse rispetto a quello che lo circonda e  $B_0$  che rappresenta la forza del campo. Ecco che la fase può essere riscritta come

$$\Delta\varphi = -\gamma g \Delta\chi B_0 t$$

Tutte queste variabili dipendono dalla suscettività locale del tessuto.

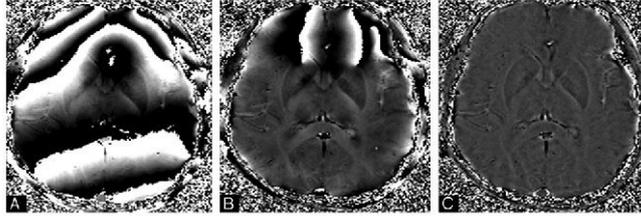


Figure 9: A, Immagine di fase grezza. B, immagine HP-filtrata con un filtro centrale di 32x32. C Immagine di fase filtrata con un filtro centrale grande 64x64

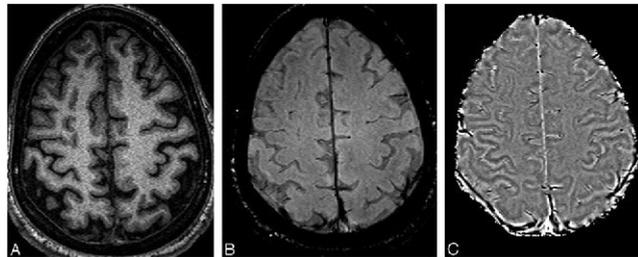


Figure 10: Immagine Short-echo T1-pesata(A) confrontata con il modulo(B) e Fase filtrata HP(C) di SWI long-echo gradient echo

### Creazione della Susceptibility-Weighted Filtered-phase images

Inizialmente, viene applicato un filtro per rimuovere le basse frequenze componenti del campo di fondo. Questo usualmente viene fatto utilizzando un filtro passa-basso 64x64 diviso per l'immagine di fase originale (una immagine con matrice di grandezza 512x512) per creare l'effetto di filtro H-P. Specificamente, l'immagine HP filtrata è ottenuta prendendo l'immagine originale  $\rho(r)$ , troncadola nell'immagine complessa  $n \times n \rho_n(r)$ , creando una immagine con intensità nulla negli elementi al di fuori della zona centrale di  $n \times n$  elementi, e la divisione complessa  $\rho(r)$  su  $\rho_n(r)$  per ottenere una nuova immagine,

$$\rho'(r) = \rho(r) / \rho_n(r),$$

in cui sono state rimosse la maggior parte delle componenti fastidiose.

Dopo aver rimosso i cambiamenti di fondo dall'immagine di fase originale, si aprono le porte per differenziare un tipo di tessuto da un'altro, in dipendenza dalla loro suscettività. Questo potrebbe essere particolarmente utile a campi elevati poiché la differenza di  $T_1$  tra i tessuti inizia a diminuire al contrario della differenza di suscettività che rimane la stessa. La figura qui sotto mostra un esempio di immagine  $T_1$ -pesata confrontata con gradient-echo modulo e fase. Possiamo vedere che la materia grigia, soprattutto nell'area della corteccia motoria, nel solco centrale, è delineata chiaramente nell'immagine di fase a causa del contenuto di ferro.

## Combinare le immagini di fase e modulo per creare la Magnitude SWI Data

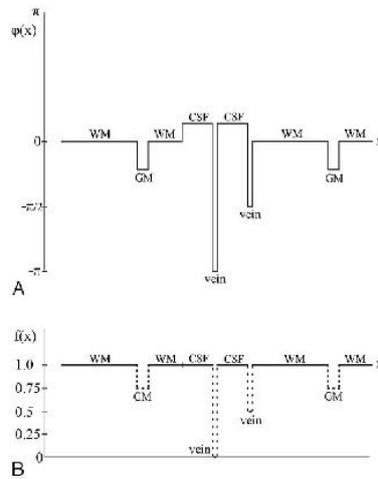
Sebbene le immagini di fase filtrate di per sé stesse illustrano discretamente il contrasto di suscettività, sono influenzate sia dalla fase intratissutale e sia dalla fase extratissutale, che possono danneggiare la differenziazione di tessuti adiacenti con differenti suscettività. Perciò, la “maschera di fase” è progettata per migliorare il contrasto nella immagine originale del modulo sopprimendo i pixel che hanno un certo valore di fase. I dati relativi al modulo e alla fase son considerati assieme per produrre i dati finali di magnitude SWI moltiplicando una maschera di fase con l'immagine originale del modulo.

La maschera di fase è modellata per contenere numeri tra zero ed uno. Dove non ci son caratteristiche di fase che devono essere intensificate la maschera di fase è impostata su 1. In altre circostanze, la maschera di fase è modellata per sopprimere l'intensità di segnale nelle aree dove la fase assume certi valori. Per esempio, se la fase d'interesse è negativa, la maschera è modellata come:

$$f(x) = \begin{cases} [\pi + \varphi(x)] / \pi & \text{for } -\pi < \varphi(x) < 0 \\ 1 & \text{otherwise} \end{cases}$$

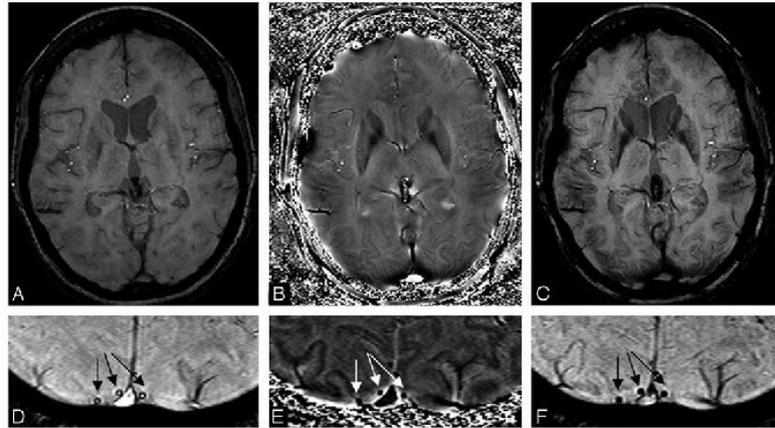
dove  $\varphi(x)$  è la fase nella posizione  $x$ . La maschera di fase può essere applicata un certo numero di volte all'immagine del modulo originale  $\rho(x)$  per creare una nuova immagine,  $\rho''(x) = f^m(x)\rho(x)$

con un contrasto differente. Il numero di moltiplicazione di maschere di fase è scelto per ottimizzare il rapporto contrasto-rumore dell'immagine SWI. Questo processo matematico di maschera è illustrato nella figura seguente:



Pictorial depiction of the phase-masking process. A. Phase profile in a filtered-phase image. B. Corresponding profile of the mask created from A. Once the mask is raised to the fourth power, the vein that has a phase of  $-\pi/2$  and a mask value of 0.5 will become  $1/16$  and, therefore, this vein will be almost as well suppressed as the vein with a phase of  $-\pi$  and  $f(x) = 0$ . GM indicates grey matter, WM, white matter.

con un esempio specifico di un set di dati ottenuto a 1.5 T:



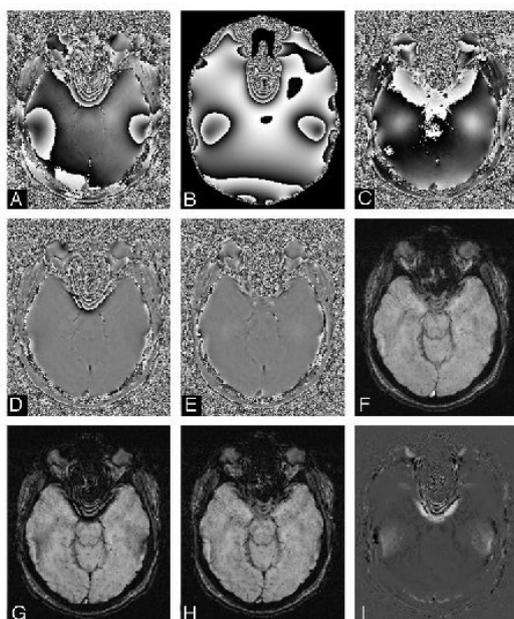
A, Unprocessed original SWI magnitude image. B, HP-filtered phase image. C, Processed SWI magnitude image (i.e. after phase-mask multiplication with  $m = 4$ ). D, Unprocessed original SWI magnitude image showing the dark hypointense ring around vein cross-sections (arrows). E, HP-filtered phase image showing the veins have low signal intensity (arrows). F, Processed SWI magnitude image showing that the veins now appear with uniform low signal intensity (arrows).

Un semplice modello matematico può essere costruito per stimare il valore di  $m$ . Il numero di moltiplicazioni necessario per una fase  $\geq 0.3\pi$  è  $\leq 4$ . Per una fase  $< 0.3\pi$  dovrebbe essere usato un valore  $m \geq 4$ . Comunque, scegliendo  $m=4$  per una fase di  $0.1\pi$  or  $\pi$  causa una riduzione  $< 25\%$  della visibilità in entrambi i casi, suggerendo che  $m=4$  è un buon compromesso. Naturalmente,  $m$  può essere variato per produrre una serie di dati SWI che possono essere usati nella diagnosi.

La combinazione delle informazioni di fase e modulo assicura l'individuazione di cambiamenti nell'intensità di segnale provenienti sia da T2 che dalla differenza di suscettività tra i tessuti. Sia il modulo che la fase sono essenziali per una buona caratterizzazione dei tessuti, così come la loro unione nella creazione di Immagini processate SWI.

### Elaborazione avanzata di fase

Il metodo di filtraggio-HP descritto in precedenza ha un discreto successo nel rimuovere i lenti effetti spaziali di variazione di fase che compromono le differenze d'interesse della fase locale tra i tessuti -Ad ogni modo, oltre a rimuovere gli effetti degli artefatti del campo di fondo, il filtro HP (a seconda della grandezza) rimuove alcune informazioni fisiologiche o patofisiologiche di fase rilevanti dalle grandi truitture anatomiche. Per questo motivo è raro l'utilizzo di un filtro grande  $64 \times 64$  se si è interessati a misurare il contenuto di ferro. Più grande è il filtro, più gli effetti del campo vengono rimossi ma la concomitante perdita di informazioni di fase dai tessuti più grandi è maggiormente probabile. Idealmente, gli effetti del campo di fondo possono essere rimossi predicendo la fase aspettata per una data geometria individuale del capo. Questo vuole lasciare solo un piccolo e basso errore dello spazio di frequenza di fase, permettendo ad un piccolo filtro di essere utilizzato per creare il risultato HP finale. Un esempio di questo nuovo approccio è mostrato nell'immagine seguente:



Results of the improved processing methodology. A. Original SWI phase image. B. Simulated phase due to air/tissue geometry at 40 ms. C. Result of subtracting A from B through the complex division. D. Result of HP filtering of A. E. Result of HP filtering of C. F. Corresponding unprocessed magnitude SWI image. G. Processed SWI magnitude image by using a phase mask from D. H. Processed SWI magnitude by using a phase mask from E. I. Result of subtracting G from H. Corresponding magnitude and phase images have been adjusted to the same, but appropriate, contrast levels. The size of the central filter in the HP process is  $64 \times 64$ .

Sebbene questo processo richieda del tempo, non è così difficile vedere questo metodo implementato come modello pratico, poichè rende SWI più robusto agli effetti dell'interfaccia aria/tessuti.

**Misurazione del contenuto di ferro** Al momento, la fase, misurata da immagini MR filtrate, è lo strumento più sensibile per la misura relativa ai cambiamenti del contenuto di ferro nelle strutture subcorticali del cervello. La misura del contenuto di ferro dipende dall'assegnazione di una dato cambiamento di fase nel tessuto conosciuto all'ammontare di ferro in quel tessuto. Nello studio di Haake et al. ([2]), questo è stato fatto associando il cambiamento di fase nella corteccia motoria con  $60 \mu\text{g}$  di noneme Fe/g di tessuto. Questo ignora il fatto che alcuni degli spostamenti di fase, se non per la maggior parte, dovrebbero provenire dal ferro eme e non dalla ferritina. Se è veramente così, lo stesso spostamento di fase osservato nel globus pallidus privo di qualsiasi effetto dovuto al ferro eme dovrebbe avere un andamento ridotto di 5 volte. In ogni caso, il lettore necessita di essere consapevole che la relazione assoluta tra i cambiamenti nella fase ed il ferro non è stata ancora stabilita e che i relativi contributi tra ferro eme e noneme non sono ancora stati classificati. In ogni caso, se il livello del sangue rimane costante e le concentrazioni di ferritina cambiano, così che i valori relativi dei cambiamenti di ferro in percentuale siano accurati, questo cambiamento è indipendente dalla presenza o meno del fattore 5.

Un problema nel tentativo di confronto dell'informazioni di fase tra una persona ed un'altra è la dipendenza geometrica della fase proveniente dalla forma dell'oggetto locale d'interesse. Se si assume che la geometria della struttura d'interesse sia grossolanamente la stessa da persona a persona, allora questo non dovrebbe essere una preoccupazione, ma è un problema potenziale quando si cerca di misurare il contenuto assoluto di ferro. La suscettività di una struttura è indipendente da orientazione, grandezza, e forma della stessa. Quindi,

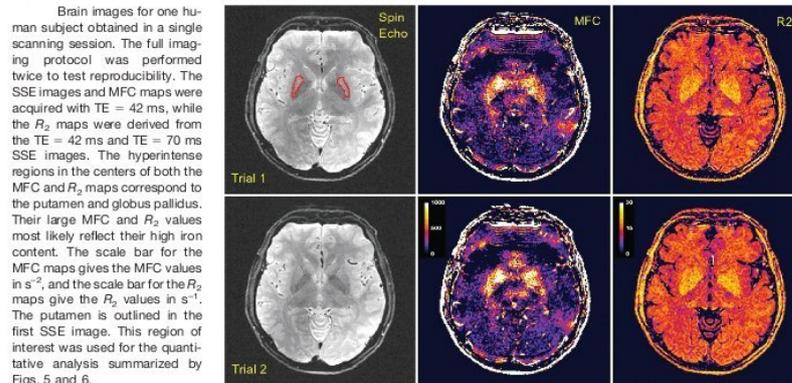


Figure 11:

un metodo per quantificare la suscettività del tessuto potrebbe essere estremamente importante perchè potrebbe essere una misura precisa del contenuto di ferro. La suscettività dei tessuti sarà un metodo importante per quantificare il ferro ed è un argomento di considerevole interesse dei nostri giorni.

## 9.5 MFC: Magnetic field correlation [19]

Jensen et al. ha sviluppato una nuova tecnica conosciuta come “magnetic field correlation (MFC)” che usa una sequenza asimmetrica di spin echoes per quantizzare il ferro nel SNC. Questa tecnica è basata sull’influenza del segnale di risonanza magnetica delle disomogeneità del campo magnetico (dovuto alle variazioni spaziali di suscettività magnetica). Questi cambiamenti possono essere dovuti a strutture macroscopiche come cavità, ossa o vasi, o strutture microscopiche come i capillari, e alla presenza di sostanze paramagnetiche (metalli e agenti di contrasto). La magnetic field correlation è basata su un modello teorico di rilassamento della risonanza magnetica in presenza di disomogeneità del campo magnetico ed utilizza curve di decadimento non-mono-esponenziali. Jensen et al. riportò che le mappe MFC mostrano un maggior contrasto tra i gangli della base e i tessuti adiacenti rispetto alle mappe  $R_2$  corrispondenti (vedi figura seguente).

Questo permise agli investigatori di concludere che l’imaging MFC può fornire un metodo più sensibile per quantizzare il ferro rispetto a  $R_2$ , sebbene non vi siano confronti con  $R_2^*$  o  $R_2'$ . Poiché MFC cresce con il quadrato della forza di campo applicato, è stato suggerito che gli scanner ad alte forze di campo (3T o maggiori) sono i più adeguati per l’imaging tramite MFC.

MFC è però affetta dalla diffusione non uniforme dell’acqua, come si può vedere nei tessuti edematosi, e questo può introdurre errori. E’ molto probabile che attraverso la MFC si misurino le disomogeneità del campo magnetico, che dovrebbero essere dovute da qualsiasi tipo di sostanza magnetica, come altri metalli di transizione trovati nei tessuti.

## 9.6 DTI: Diffusion Tensor Imaging [11]

L’imaging tensore di diffusione è una tecnica sviluppata nella metà degli anni novanta. Questa tecnica acquisisce immagini anatomiche delle connessioni delle fibre neuronali tra queste strutture tramite la misura della diffusione delle molecole d’acqua, all’interno degli assoni della materia bianca. La diffusione può essere isotropica (libera e uguale in tutte le

direzioni) o anisotropica, ristretta da barriere come le membrane. I fattori che permettono all'acqua di fluire lungo le direzioni dei fasci delle fibre promuovono una maggiore diffusione anisotropica.

Le informazioni delle caratteristiche microstrutturali si possono basare su diversi tipi di dati quantitativi: uno è la diffusività, che incrementa con l'accumulo di fluido extracellulare, diminuisce con i gliosis, e può essere espresso come metodo di diffusività(MD); un'altra misura è la anisotropia frazionaria(FA) che per ogni pixel i valori assunti possono variare tra 0(isotropico) a 1 (anisotropico). Questa permette ai ricercatori di quantizzare i livelli di anisotropia per il confronto dei risultati. Durante l'imaging, gradienti sono applicati in sei direzioni, permettendo la produzione di mappe FA dove i tratti di diverso colore indicano la differente direzione di diffusività.

Una terza misura ricavata dalla DTI è il coefficiente apparente di diffusione(ADC) che rappresenta la distanza delle molecole d'acqua per diffondere liberamente. Incrementi del ADC sono stati collegati a demielinizzazione, emema localizzati e altri tipi di danno. In circostanze normali, comunque, i valori dell'ADC( diversamente dalle misure FA) decrementano dalla nascita alla maturità diventano incrementalmente omogenee al di sopra di tale periodo di tempo. In contrasto, il valori di FA, che incrementano dalla nascita alla maturità, sono piuttosto eterogenei nel cervello maturo, più alti nel corpo calloso e più bassi nella materia bianca peripheral subcortical. Questo dovrebbe spiegare perchè la maggior parte degli studi trovi l'analisi dei valori FA maggiormente utile rispetto a quelli ricavati dall'ADC.

Pfefferbaum et al.([11]) ha studiato l'influenza dell'accumulo di ferro e dell'età sulle immagini DWI(diffusio-weighted image) ottenute con la tecnica DTI. Egli osservò che diversi cambiamenti nel cervello che si presentano con l'avanzare dell'età son incrementate dalla presenza di ferro, osservabile in strutture selettive profonde della materia grigia. Egli studiò i cambiamenti nella misurazione tramite DTI dovuti all'influenza dell'accumulo di ferro nelle profonde strutture della materia grigia.

## 9.7 Risonanza Magnetica Quantitativa Q-MRI [12]

Le sequenze d'impulso MRI consistono un un esperimento di induzione tramite un segnale NMR e un esperimento di localizzazione spaziale. Lo scopo del primo è il segnale di generazione-manipolazione-individuazione, ed il fine del secondo è di copartimentalizzare la magnetizzazione del tessuto per l'intento di formare i voxel dell'immagine. Il valore del pixel risultante di un voxel generico centrato per esempio nella posizione di coordinate (i,j,k) nella griglia d'immagine è dato da:

$$pV_{(i,j,k)} = \Omega_{(i,j,k)} \rho V \left( \frac{\gamma^2 h^2 B_0}{4kT} \right) \langle PD \rangle_{(i,j,k)} PSw$$

Il primo fattore, che dovrebbe essere dipendente dalla posizione, è relativo alle specifiche hardware e alle condizioni sperimentali come la forza del campo magnetico  $B_0$ , la forma geometrica ed il profilo sensibilità della bobina di ricezione. Il secondo fattore è il volume del voxel. Questo fattore può dipendere dalla posizione come risultato delle imperfezioni di individuazione del segnale. Il terzo fattore deriva dalle basi fisiche NMR e si riferisce alla magnetizzazione della densità protonica. Esso è inversamente proporzionale alla temperatura e direttamente proporzionale alla forza del campo magnetico.

Il terzo e quarto fattore sono importanti per la caratterizzazione dei tessuti e per la quantificazione dei minerali depositati. La media del voxel PD può essere diminuita se il materiale depositato non contribuisce al segnale MR. Il più importante è il fattore di

peso della sequenza d'impulso (PSw) che è in funzione del tipo di sequenza, per esempio, gradient echo, spin echo ecc, e i valori specifici della sequenza d'impulso come TR, TE e così via, usati per l'acquisizione. Essp è anche funzione dei parametri fisici, come per esempio  $T_1, T_2, T_2^*, D$ , e così via che influenzano il segnale MR dei tessuti quando sta per ritornare all'equilibrio magnetico dopo l'eccitazione. Il mappaggio di questi parametri è l'obiettivo del Q-MRI. Gli aspetti che definiscono le informazioni quantitative delle immagini, in opposizione alle informazioni qualitative, sono che i valori dei pixel quantitativi sono privi di informazioni sperimentali estranee e sono altamente specifiche per il tessuto.

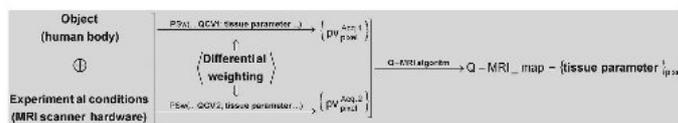
Q-MRI deve essere vista come una collezione di tecniche MRI attraverso la quale le informazioni specifiche di un tessuto contenute nelle immagini acquisite direttamente possono essere separate dalle condizioni empiriche.

La generazione delle immagini MR quantitative del corpo umano è compiuta in due fasi. Nella prima, una sequenza di impulso Q-MRI è utilizzata per l'acquisizione per generare direttamente le immagini. Per ogni fetta, vi sono due o più immagini che sono identiche per ogni condizione sperimentale, eccetto per il pesaggio dei parametri fisici ( $T_1, T_2, etc$ ). Nella seconda fase, queste immagini pesate in modo differente sono elaborate mediante un algoritmo Q-MRI usato per calcolare i parametri delle mappe dei tessuti bersaglio.

Il fattore PSw può essere espresso simbolicamente come il seguente:

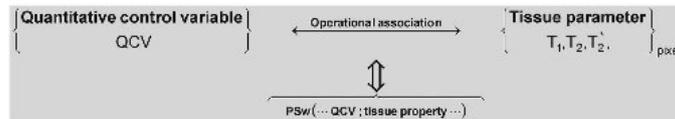
$$PSw = PSw(TE, TR, TI, FA, other.. || T_1, T_2, T_2^*, D, other..) \exp[i\Phi]$$

Tutte le tecniche di Q-MRI sono basate su un comune principio, che dovrebbe essere logicamente chiamato "Principio Q-MRI di pesaggio differenziale, descritto dal diagramma seguente:



Le differenze nel pesaggio tra 2 (o più) immagini acquisite direttamente p utilizzata per calcolare il parametro tissutale di distribuzione che è responsabile del pesaggio differenziale osservato. L'algoritmo matematico usanto in questa elaborazione è fortemente semplificato per sfruttare la struttura moltiplicativa dei valori dei pixel (vedi prima equazione), il quale implica che il rapporto Pixel-su- Pixel tra il pesaggio differenziale delle immagini è dipendente soltanto dal fattore PSw. Perciò, la pratica utilità del principio di differenziazione modellando il fattore PSw con il parametri fisici MR, le proprietà del tessuto desiderato possono essere mappate.

Il principio di pesaggio differenziale stabilisce anche il criterio per progettare la sequenza d'impulso Q-MRI ad essere utilizzata per l'acquisizione di immagini acquisite direttamente. Specificamente, la sequenza d'impulso Q-MRI, potrebbe essere progettata in modo tale che il livello di pesatura del parametro tissutale possa essere controllato agendo sul valore di una variabile della sequenza d'impulso, che dovrebbe essere pensata come variabile di controllo quantitativa (QCV). Questa variabile è data a priori ad un valore differente per ogni acquisizione. In tal modo, la sequenza d'impulso Q-MRI progettata coinvolge la determinazione di un operazione di associazione tra il parametro del tessuto desiderato e il QCV attraverso il fattore PSw, che è funzione delle leggi fisiche su qui si basa la MRI. Questa operazione di associazione è stata descritta usando l'etichetta "pixel" per denotare esplicitamente tutte le posizioni discrete attraverso il volume di immagine.



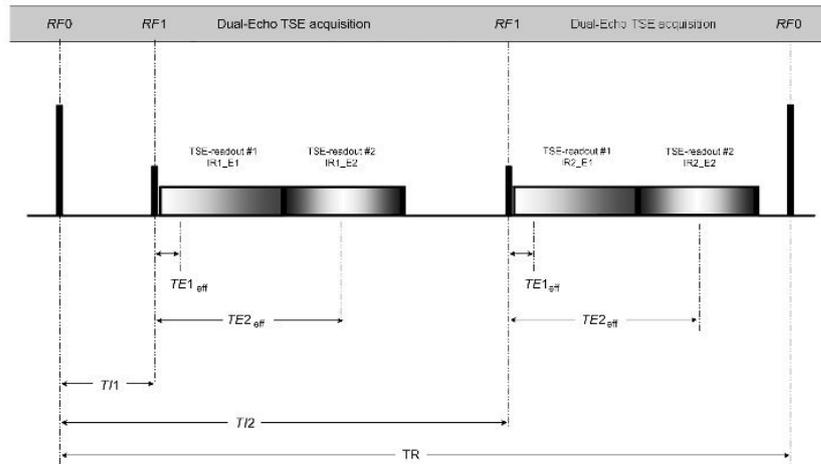
Il più comune parametro di associazione QCV-tissue intorno alla quale la sequenza d'impulso è sensibile al ferro è progettato come: tempo d'inversione (TI) per mappare  $T_1$ , spin echo (TE) per mappare  $T_2$ , gradient echo time (TE) per mappare  $T_2^*$  e lo spostamento di fase.

Alcuni di questi parametri Q-MRI, includendo  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_2'$ ,  $T_2^*$  e lo spostamento di fase sono stati correlati in vivo con le concentrazioni di ferro nel cervello. L'abilità di uno ione magnetico di essere affetto dal rapporto del rilassamento protonico dipende sia dalla sua concentrazione sia dal suo decadimento. Quest'ultimo è dipendente dalla composizione chimica dell'ambiente in cui si trova lo ione. Per questo, la concentrazione di un solo ione non è sufficiente a determinare la sua abilità di influenzare il contrasto MRI.

Ad ogni modo, gli ioni magnetici sono previsti incidere sul contrasto solo se la loro concentrazione supera 0.1 mmol/L.

In alcune regioni del cervello, come nel globus pallidus, le concentrazioni di ferro immagazzinato possono raggiungere livelli di circa  $200 \mu\text{g/g}$  di tessuto idratato il che corrisponde a 3.6 mmol/L ( $1 \text{mg ferro/g} = 17.9 \text{ mmol/L}$ ).

Herma jara et. ([12]) hanno studiato 27 soggetti con una sequenza mixed turbo spin echo, multispettrale per PD,  $T_1$ , e  $T_2$ . Sono state generate le mappe Q-MRI per PD,  $T_1$ ,  $T_2$ , e  $T_1/T_2$  con regione d'interesse localizzata in 5 regioni del cervello (materia bianca frontale, corpo genicolato calloso, caudate nucleus, putamen e globus pallidus). I tempi di decadimento misurati sono consistenti con i risultati precedenti di altri studi e forniscono una ulteriore conferma negli effetti sul decadimento da parte del ferro immagazzinato nel cervello. Specificamente, hanno trovato che il globus -pallidus (ricco di ferro) esibisce un aumento dei tempi di decadimento  $T_1$  e  $T_2$  relativi al ferro povero del tessuto della materia grigia (caudate nucleus e putamen) e anche relativi al tessuto della materia bianca. Hanno anche osservato che l'aumento del decadimento dovuto al ferro suggerisce che il tessuto nervoso diventa più idratato con l'aumentare dell'età. Essi hanno notato inoltre che la rimozione virtuale della dipendenza dall'età per il rapporto  $T_1/T_2$  nei tessuti della materia bianca, suggerisce ulteriormente che questo rapporto diventerà di notevole importanza clinica nella diagnosi di processi neoplastici così pure per la quantificazione del ferro nei tessuti.



**FIGURE** Mixed-TSE pulse sequence diagram. The pulse sequence begins a slice selective inversion pulse. After a recovery time, a slice selective excitation pulse is applied for generating signals that are read and encoded in the form of 2 echoes by dual-echo TSE readout. Then, after additional time delay, at a second recovery time, a second excitation pulse is applied for signal generation, read and encoded with second dual-echo TSE readout. *RF0* indicates slice-selective inversion pulse; *RF1*, a slice-selective excitation pulse; *RF2*, second excitation pulse; *T1*, recovery time; *T2*, second recovery time.

Figure 12:

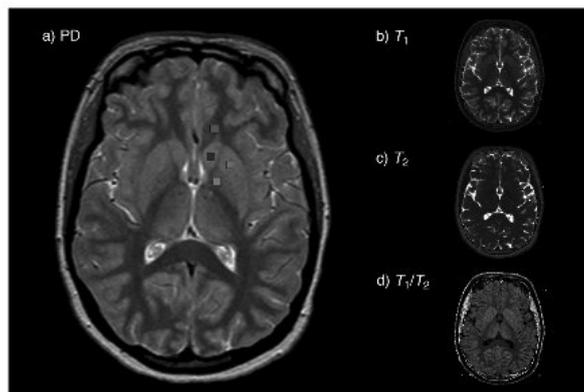


Figure 13: Mappa Q-MRI rappresentativa del cervello: PD, T1, T2, and T1/T2 ratio

## 9.8 Magnetization transfer (MT) MRI e Direct Saturation MRI (DS)[20]

Il segnale protonico individuato dalla MRI proviene solamente dai protoni che hanno un tempo di decadimento  $T_2$  sufficientemente lungo (i.e. maggiore di 10 ms) così che il gradiente di codifica spaziale possa essere portato a termine tra l'eccitazione e l'acquisizione prima che il segnale sia completamente decaduto. Il  $T_2$  dei protoni meno mobili associati con le macromolecole e le membrane dei tessuti biologici è molto breve per essere individuato direttamente con la MRI. Comunque, l'accoppiamento tra i protoni macromolecolari e quelli mobili o protoni "liquidi" permette allo stato di spin dei protoni macromolecolari di influenzare lo spin dei protoni liquidi attraverso il processo di scambio. Come mostrato nella fig.9.8, è possibile saturare lo spin macromolecolare usando preferibilmente una off-resonanza ad impulso a radiofrequenza (RF). Lo spin macromolecolare ha una linea di assorbimento maggiore rispetto agli spin liquidi, rendendo loro più sensibili di  $10^6$  volte ad una appropriata irradiazione. Questa saturazione preferenziale degli spin macromolecolari

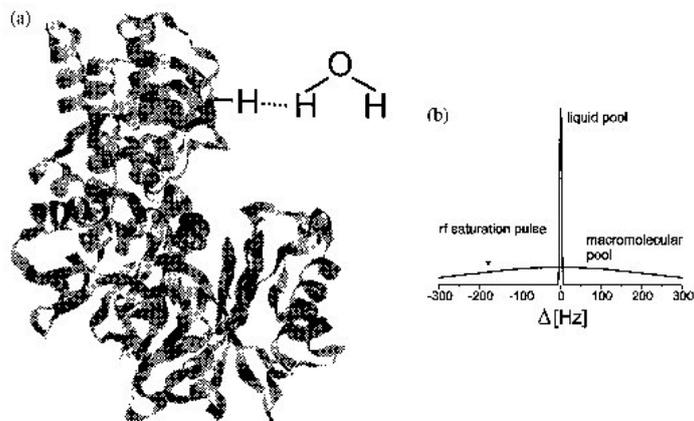


Figure 14: a) Scambio del trasferimento di magnetizzazione tra protoni macromolecolari e acqua (b) lo spins macromolecolare, che mostra una più vasta linea di assorbimento rispetto ai protoni liquidi, che può essere preferenzialmente saturata usando una off-risonanza ad impulso RF

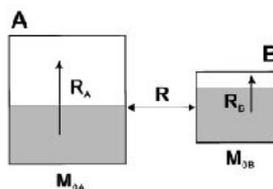


Figure 15: Modello a blocchi dello scambio del trasferimento di magnetizzazione. Le regioni scure rappresentano gli spin saturati.  $R_A$  e  $R_B$  rappresentano il valore del rilassamento longitudinale nel blocco liquidi e macromolecolare rispettivamente.  $R$  denota il trasferimento di magnetizzazione tra i due blocchi.

può essere trasferita agli spin liquidi, in dipendenza del valore dello scambio tra le due popolazioni di spin, e così può essere individuata con la MRI.

La fig 9.8 mostra un modello semplificato sufficiente per una interpretazione quantitativa del MT. Il blocco A rappresenta gli spin liquidi. Il numero di spin in questo compartimento  $p$  convenzionalmente normalizzato all'unità ( $M_{0A}=1$ ). Il blocco B rappresenta gli spin macromolecolari. Nei tessuti, il numero di spin macromolecolari è di gran lunga minore degli spin liquidi e la frazione relativa è data da  $M_{0B}$ . In ogni blocco, ad ogni istante di tempo, alcuni spins sono orientati longitudinalmente rappresentati dalla porzione superiore chiara del blocco ed altri sono saturati, rappresentati dalla porzione scura. La partizione in spin longitudinali e saturi dipende dalla storia precedente all'irradiazione. Quando l'irradiazione è spenta, i cambiamenti tempo-dipendenti nel modello sono rappresentati da tre valori costanti:  $R_A$  e  $R_B$  sono i tempi di decadimento longitudinali del blocco A e B rispettivamente ed  $R$  è il valore dello scambio tra i due blocchi.

Poiché  $M_{0A}=1$ ,  $k_{AB}$  è un valore pseudo-first-order costante e il valore del trasferimento di spin da A a B è  $RM_{0B}$ . Il valore da B ad A è come corrispettivo  $R$  per conservare la grandezza dei compartimenti. Il semplice modello descritto nella fig.9.8 può essere espresso tramite una serie di coppie di equazioni differenziali.

L'effetto del spegnimento della risonanza di irradiazione nel sistema è differente per i due blocchi. Per B, i protoni delle macromolecole sono fortemente accoppiati l'uno con l'altro risultando di una omogenea linea di assorbimento mostrata nella fig. 9.8(b). Di conseguenza, l'irradiazione di off-risonanza risulta una progressiva saturazione degli spin d'insieme, con valore di effettiva saturazione inizialmente dato dalla probabilità di assorbimento al tempo di offset della corrispondente frequenza, media del potere RF alla frequenza di offset.

Negli esperimenti MT, l'intento è manipolare il blocco liquido indirettamente saturando il blocco macromolecolare. Ad ogni modo alcune saturazioni dirette del blocco liquido sono inevitabili in questo processo e deve essere incluso in una qualsiasi analisi quantitativa dell'effetto MT. Poiché gli spin del blocco liquido sono solo debolmente accoppiati a causa della limitazione del movimento, l'effetto di una irradiazione di off-risonanza è governata dalle equazioni di Bloch. Nel caso di un'onda continua (CW) di irradiazione alla singola frequenza di off-risonanza, le dinamiche di magnetizzazione del blocco liquido sono più facilmente considerate nella rotazione rf, mostrata nella fig 9.8. In questa immagine, il campo effettivo  $B_{eff}$  consiste nella somma vettoriale del campo trasversale  $B_1$  e il campo residuo longitudinale uguale a  $\Delta/\gamma$  dove  $\Delta$  è la differenza tra la frequenza di risonanza di Larmor ( $\omega_0$ ) e la frequenza di rotazione RF ( $\omega_{RF}$ ) come mostrato in figura. Negli esperimenti di MT imaging, la frequenza di offset  $\Delta = \omega_{RF} - \omega_0$  è tipicamente nell'ordine dei 2kHz ed il campo  $B_1$  raramente supera la frequenza di rotazione di 0.5 kHz dovuta alle limitazioni del tasso di assorbimento specifico (SAR) e dei limiti Hardware, a patto che  $B_{eff}$  non devii dal  $B_0$  di più di 15°. Ciò nonostante, l'irradiazione di off-risonanza CW inizialmente risulta dalla precessione degli spin liquidi intorno al campo effettivo e permette alle oscillazioni transitorie della magnetizzazione trasversale conosciute come le oscillazioni Rabi di decadere con un tempo costante  $T_{2\rho}$ . La magnetizzazione risultante lungo  $B_{eff}$  decade con un tempo costante  $T_{1\rho}$ . Per portare questa immagine in accordo con il leplice compartimento longitudinale e saturo della fig. 9.8, è necessario sopprimere la magnetizzazione trasversale con un gradiente od una fase ciclica. Questo non è un procedimento usuale nell'imaging MT poiché l'impulso di saturazione è sufficientemente uniforme da ripetersi con frequenze sufficienti da sfasare incoerentemente la componente trasversa. Irrispettivamente a questo problema tecnico, l'irradiazione di off-risonanza inevitabilmente produce alcune saturazioni della magnetizzazione longitudinale nel blocco liquido.

L'irradiazione di off-risonanza nella MRI può essere applicata nella modalità CW o in quella ad impulsi. Gli esperimenti tramite CW sono i migliori per caratterizzare il meccanismo del process MT poiché provvedono alla separazione pulita tra l'ammontare della saturazione tra i due blocchi. Per esperimenti pratici di imaging, comunque, impulsi ripetitivi d'irradiazione di off-risonanza di breve durata sono necessari per concedere il tempo di intervallare l'esperimento di imaging, per mantenere il SAR entro certi limiti, e perché il trasmettitore RF è progettato per produrre impulsi. L'impulso RF di off-risonanza è solitamente trasmesso con una modulazione in ampiezza che varia in modo uniforme nel tempo, come un andamento Gaussiano. La forma esatta non è importante a condizione che la trasformata di Fourier dell'impulso non abbia nessuna ampiezza nell'intorno della frequenza di Larmor del blocco liquido. Alternativamente, una composizione di impulsi di risonanza può essere utilizzata per saturare il blocco macromolecolare, ma ruotando la magnetizzazione del blocco liquido al suo orientamento longitudinale iniziale. Sebbene questo sia un concetto interessante, questi impulsi possono produrre un grande numero di saturazioni dirette degli spin liquidi, in dipendenza dal loro  $T_2$ , che possono coprire l'effetto MT voluto. In fine si potrebbe notare che ogni impulso RF di off-risonanza in una sequenza

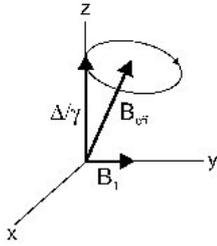


Figure 16: Eccitazione della magnetizzazione del blocco liquido con un impulso di saturazione di ampiezza  $B_1$  e frequenza di offset  $\Delta$ , risultante in una precessione ad un campo effettivo  $B_{eff}$

di imaging satura il blocco macromolecolare di alcuni gradi.

Il processo più importante è lo scambio tra il blocco macromolecolare ed il blocco liquido. È questo scambio che trasferisce la saturazione macromolecolare al blocco liquido, risultando in un decremento della magnetizzazione longitudinale. Lo scambio degli spin può avvenire per accoppiamento dipolare o attraverso lo scambio chimico diretto. Il modello e l'algebra non possono distinguere queste due opzioni né può farlo un esperimento MT. Esperimenti che usano sostituti isotopici dei protoni hanno mostrato in pochi modelli che lo scambio non è chimico. Altri esperimenti nei tessuti e loro modelli hanno mostrato un significativo effetto del pH, suggerendo lo scambio chimico, ma questo effetto è troppo piccolo per far sì che lo scambio MT intero sia solamente chimico.

Usualmente nell'imaging MT viene calcolato il tasso di magnetizzazione di trasferimento (MTR) che consiste di due contributi:  $M_{dir}$ , l'effetto diretto e  $M_{MT}$ , il vero contributo MT,

$$MTR = \frac{M_0 - M_{SAT}}{M_0} = 1 - \left( \frac{M_{dir}}{M_0} + \frac{M_{MT}}{M_0} \right)$$

In dipendenza al tipo di sequenza d'impulso usata, questa equazione è leggermente modificata per sostituire la magnetizzazione di equilibrio per l'effetto di recupero longitudinale incompleto prodotto dai brevi tempi di ripetizione. Sebbene sia importante distinguere entrambi i contributi negli studi che provano di quantizzare MT, nelle qualitative image può essere più appropriato generare il contrasto da entrambi i contributi (MT e DS).

### 9.8.1 Direct Saturation MRI (DSR) [14]

Il gruppo di Smith et al. si è accorto che l'effetto diretto, solitamente considerato una seccatura, può essere utilizzato per distinguere regioni della materia grigia con differenti concentrazioni di ferro. Gli effetti della saturazione diretta sono stati selezionati riducendo il modulo e la durata dell'irradiazione RF per minimizzare l'effetto MT. Contrariamente allo spettro di saturazione MT, lo spettro della saturazione diretta dell'acqua è caratterizzato da una dipendenza simmetrica di forma Lorentziana della frequenza che può essere spessa come una soluzione analitica delle equazioni di Bloch. L'effetto di incremento del decadimento trasversale, e.g. dovuto alla presenza di ferro, può essere esteso allo spettro di saturazione. Come prima applicazione, è stato acquisito il tasso di saturazione diretta (DSR) per le strutture della materia grigia del cervello umano. Similmente alle immagini  $T_2^*$  pesate, la qualità delle immagini DSR è affetta dalle disomogeneità del campo locale, ma queste possono essere facilmente corrette centrando lo spettro di saturazioni in una base di rapporto

voxel-voxel. I risultati ottenuti mostrano che, al contrario delle immagini comunemente usate  $T_2^*$  e  $R_2$  assoluto, le immagini DSR mostrano tutte le strutture della materia grigia includendo la corteccia. Una diretta correlazione tra il DSR ed il contenuto di ferro è stata confermata per queste strutture.

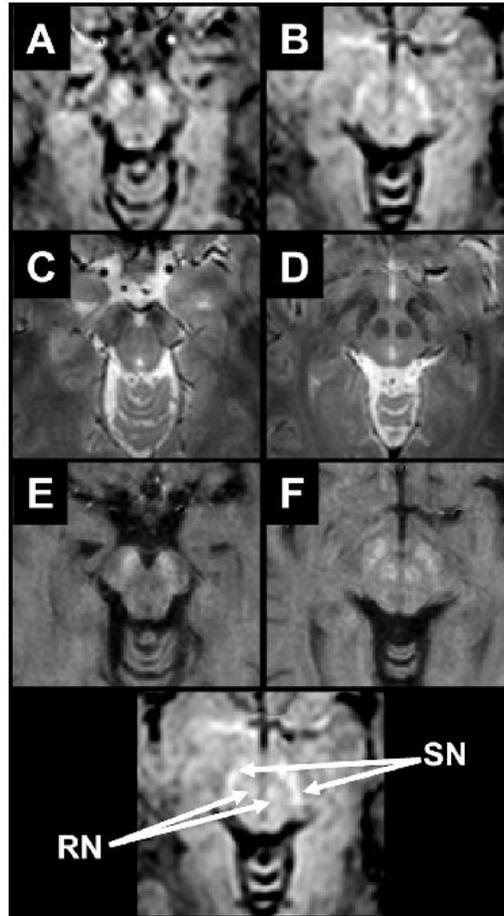


Figure 17: Confronto tra DSR(A-B),  $T_2^*$ -pesate,  $R_2$ . Una chiave spaziale è data sul fondo. Per le DSR, il contrasto è simile a  $R_2$  in quelle regioni dove alte concentrazioni di ferro mostrano un'incrementata intensità.

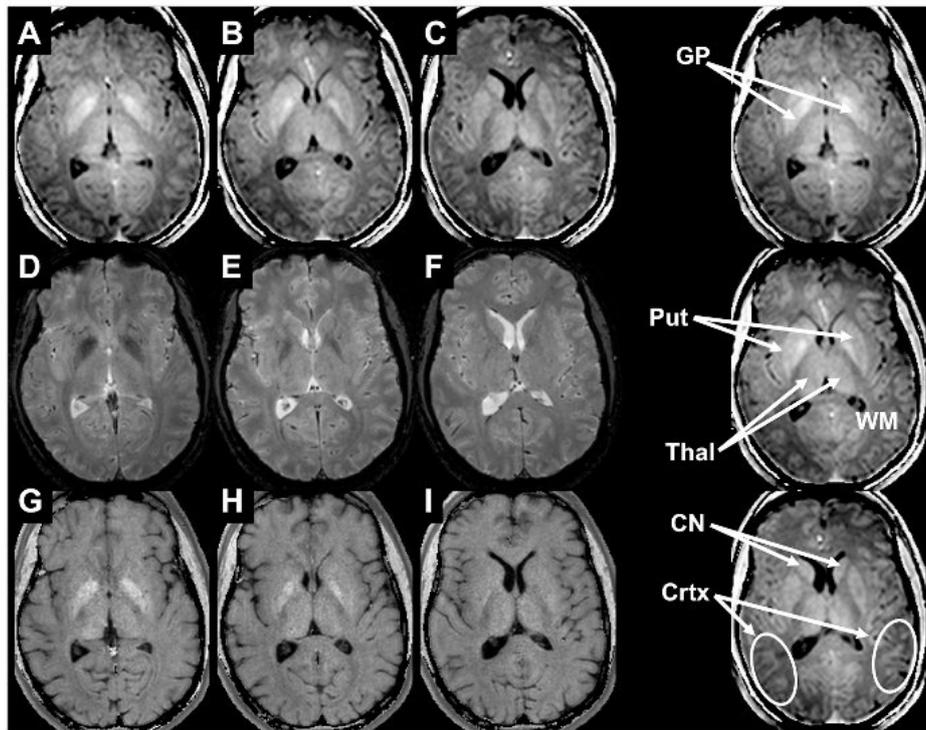


Figure 18: Confronto tra DSR(A-C),  $T_2^*$ -pesate(D-F),  $R_2$ (G-I) a livello dei gangli della base.

## Part III

# Ferro e malattie neurodegenerative [3]

La visione riguardante il ruolo della deposizione di ferro nelle malattie neurodegenerative è stata sottoposta ad un notevole progresso durante l'ultimo decennio. Ora è diventato chiaro di come avviene la deposizione di ferro nel cervello adulto in diverse malattie croniche come il parkinson, l'alzheimer e la sclerosi multipla. Ad ogni modo non è ancora chiaro se l'incremento del contenuto di ferro sia puramente un epifenomeno o se in realtà contribuisce al danneggiamento dei tessuti in questi disordini. In questa terza parte fornirò una visione generale istologica, sperimentale, e i risultati tramite MRI che aiutano a mettere in luce il ruolo del ferro nel SNC in diverse malattie neurodegenerative.

### 10 Morbo di Alzheimer(AD)

L'incremento del deposito di ferro è riconosciuto come un presunto fattore nella patogenesi dell'AD. Modelli animali, studi patologici, e MRI hanno collegato il ferro all'AD. Studi animali suggeriscono che l'eccesso di ferro contribuisce allo stress ossidativo e danni neuronali attraverso la produzione di radicali liberi. Inoltre questi modelli suggeriscono che l'incremento di ferro dovrebbe sia peggiorare il corso della malattia sia incrementare i rischi di sviluppo di AD. E' anche stato stabilito da studi patologici postmortem che il deposito di ferro si presenta nei neuroni, nei grovigli neurofibrillari e nelle placche dei pazienti affetti da AD. E' stato fatto del progresso nell'identificare il ruolo del ferro nell'AD usando modelli sperimentali in vivo ed in vitro. Per esempio, il ferro aggrava le ferite neuronali amiloide-indotte nel linea di cellule M17 del neuro-blastoma umano e può aumentare l'aggregazione delle proteine beta-amiloide in vitro. Bishop e Robinson utilizzarono un modello in vivo sui topi malati di AD per mostrare che il ferro accresce la neurotossicità del beta amiloide.

Il deposito di questa molecola è un segno distintivo delle persone malate di Alzheimer. In aggiunta, studi genetici hanno indicato che mutazioni dei geni coinvolti nella manipolazione del ferro possono incrementare il rischio di AD. Mutazioni nella transferrina e nel gene ereditario hemocromatosi permette di sconvolgere il metabolismo del ferro e conferisce i rischi per lo sviluppo di AD.

I ricercatori hanno usato la risonanza magnetica per individuare il contenuto di ferro incrementato nel cervello in vivo in pazienti affetti da AD. Usando la tecnica del field dependent rate increase(FDRI), Bartzokis et al. dimostrò l'incremento dei livelli di ferro nel caudate e putamen in pazienti malati di Alzheimer confrontati con controlli sani. La cosa interessante, è che i livelli di ferro trovati in pazienti in cui i primi sintomi si presentano in giovane età son più alti rispetto ai pazienti in cui la malattia si presenta in età avanzata, e questo sostiene l'idea che alti livelli di ferritina potrebbero essere un fattore di rischio per la comparsa dell'AD in giovane età.

Uno studio fatto da House et al. misurò R2 in 14 regioni del cervello in pazienti che soffrono di disfunzioni alla memoria e mostrò un incremento del ferro nella materia grigia temporale( maggiormente visibile nell'ippocampo) quando confrontata con quella di soggetti sani. In uno studio separato, utilizzando MRI 4T ad alta risoluzione, lo stesso

gruppo di ricercatori mostro una correlazione diretta tra R2 e le concentrazioni di ferro in tessuti cerebrali postmortem ottenuti da pazienti affetti da AD. Questo studio confermo anche una ricerca precedente dove si dimostrava l'incremento dei livelli di ferro in pazienti AD. Collettivamente questi studi suggeriscono che il deposito di ferro nella materia grigia faciliti alcuni dei primi cambiamenti neurodegenerativi visti nell'AD. Investigazioni future necessitano di essere fatte per stabilire nel miglior modo possibile il collegamento tra la tossicità mediata dal ferro e la patogenesi dell'alzheimer per determinare infine se questo legame possa procurare nuovi traguardi terapeutici. L'inibizione della produzione del beta-amiloide nei pazienti AD dovrebbe rallentare o fermare la progressione della malattia. Il decremento di ferro, rame e il danno zinco-mediato dovrebbe distruggere la produzione del beta amiloide ed il suo effetto potenzialmente tossico. E' stato dimostrato in vitro che i neuroni pretrattati con la deferoxamina (DES), un composto che si lega al ferro, rivelano una minor tossicità al beta-amiloide rispetto ai neuroni non trattati. Piccoli studi clinici sul DES e altre terapie relative al ferro son state condotte su pazienti AD. In questi esperimenti, 48 pazienti con probabile AD son stati casualmente scelti per ricevere il DES (125 mg intramuscolarmente 2 volte al giorno, 5 volte a settimana per 24 mesi), placebo orale (Lecitina) e nessun trattamento. Il trattamento con il DES permette una significativa riduzione nel rapporto del declino delle abilità giornaliere, stimato per mezzo di entrambi i gruppi ( $p=0.03$ ). E' interessante che questo effetto si realizza nonostante l'incapacità del DES di attraversare la BBB. Son state fatte congetture sul fatto che la BBB potrebbe essere danneggiata nell'AD, permettendo l'osservazione dell'effetto del trattamento. Il chelato clioquinol si pensa che agisca non soltanto sul ferro ma che inibisca il legame degli ioni di zinco e rame con il beta-amiloide. In modelli di topo affetti da AD, il clioquinol diminuisce la deposizione del beta-amiloide. Basato sulla forza di questi dati, è stato realizzato uno studio pilota sul clioquinol in pazienti con AD. I pazienti ( $n=18$ ) che ricevevano il clioquinol mostravano un decremento nel plasma dei livelli di beta-amiloide quando confrontati con i 18 pazienti che ricevevano il placebo. Dopo 36 settimane di trattamenti c'era un miglioramento cognitivo nel gruppo clioquinol che si avvicinò ad un andamento d'importanza statistica significativa ( $p<0.07$ ). Sebbene le medicine son state ben tollerate in questi studi, le aziende hanno recentemente bloccato la sintesi del clioquinol a causa delle difficoltà dei processi di fabbricazione.

## 11 Morbo di Parkinson (PD)

Molti, ma non tutti gli studi [40, 39], hanno riportato un deposito eccessivo di ferro nella substantia nigra di pazienti con PD. Anni di ricerca con tecniche postmortem e in vivo MRI, metodi istochimici, e ultrasuoni transcranici hanno permesso diversi progressi nel migliorare la conoscenza del deposito di ferro in soggetti malati di parkinson. Studi quantitativi hanno mostrato un incremento dal 25% al 100% nella substantia nigra dei livelli di ferro in soggetti malati rispetto a quelli sani di controllo. Inoltre, le proteine ferro-associate e i recettori vengono sovraregolati (processo mediante la quale la cellula espone i propri recettori in modo da captare più ligandi possibili) nel striatum e substantia nigra dei pazienti affetti da PD. Si pensa che livelli aumentati di ferro producano radicali liberi e predispongano i neuroni striatonigrali al danno ossidativo. Lo stress ossidativo compromette lipidi, proteine e l'integrità delle molecole di DNA, permettendo la lesione neuronale. Dexter et al, non è stato capace di dimostrare un incremento significativo dei livelli di ferro nel corpo intracellulare Lewy trovato nella substantia nigra. Vi sono controversie sul fatto dell'incremento

o meno del ferro nei corpi di Lewy. Usando in vivo la sonografia transcranica, Zecca et al. recentemente mostrò un incremento dei livelli di ferro in soggetti con corpi di Lewy e suggerì che il ferro deve essere coinvolto nella inizializzazione e promozione della cascata neurogenerativa nel PD. Sebbene questo evidenzi che l'aumento del ferro ha un ruolo nella patogenesi del PD, può rimanere possibile che il ferro sia semplicemente un epifenomeno.

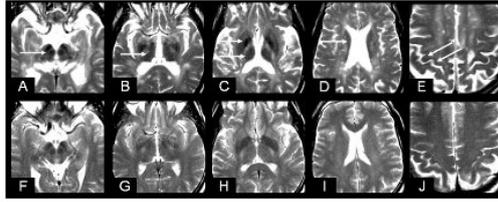
Imaging tramite risonanza magnetica è emerso essere uno strumento potente per l'individuazione di una anormale deposizione del ferro in vivo in pazienti con il PD. Questi mostrano ipointensità  $T_2$  in diverse aree anatomiche confrontati con quelle dei soggetti sani di controllo, aree che includono la substantia nigra pars compacta, dentate nucleus, subthalamic nucleus, basal ganglia, e probabilmente questo riflette un contenuto eccessivo di ferro. Usando il metodo FDRI, Bartzokis et al. mostrò un incremento del deposito di ferro nei pazienti in cui i primi sintomi compaiono in giovane età confrontati ai soggetti sani. In uno studio che coinvolse 20 pazienti con PD, Atasoy et al. dimostrò una correlazione tra le  $T_2$  ipointensità della substantia nigra e la gravità clinica. In uno studio di 13 pazienti, usando 3T MRI e tecniche rilassometriche, Gorrel et al. dimostrò livelli elevati di ferro nella substantia nigra rispetto a quelli dei soggetti sani. Usando la sequenza PRIME, Graham et al. mostrò un incremento del tempo di decadimento  $R2'$  e  $R2^*$  nella substantia nigra di pazienti PD quando confrontati con i soggetti sani. Ad ogni modo,  $R2'$  e  $R2^*$  non sono stati correlati con il danneggiamento clinico.

In altri studi, usando il metodo  $T_{2\rho}$  MRI, Michaeli et al. mostrò un incremento nei livelli di ferro nella substantia nigra in soggetti malati di PD. Kosta et al. confrontò l'intensità  $T_2$  nella substantia nigra pars compacta e i subthalamic nucleus in 40 pazienti con PD e 40 soggetti sani. L'autore dimostrò che pazienti con PD hanno una intensità  $T_2$  significativamente più bassa in tali aree. Il grado di ipointensità nel subthalamic nucleus è stato correlato con la durata della malattia.

Sebbene nessun ricerca sugli umani è stata completata fino ad oggi, diversi tipi di ferro-chelati sono stati usati in modelli di ratti e topi affetti da PD. Animali indotti con malattie simili al PD sviluppano ferro pesante accumulato nella substantia nigra pars compacta, area dove è stato dimostrato si accumula normalmente il ferro nel PD umano. In maniera interessante, una riduzione nutrizionale del ferro in modelli di ratto kainate è stata mostrata ridurre il danno cellulare nella corteccia piriforme ed entorinale, thalamo e nei hippocampal layers CA1-3. Vi sono anche gliosi attenuate quando confrontati con i soggetti di controllo. Il ferro-chelato, DES, è stato studiato estensivamente in modelli animali con PD. Nonostante alcune preoccupazioni riguardanti l'uso negli umani dovuto ad un non favorevole profilo di effetti collaterali, ha avuto successo in modelli PD indotti 6-hydroxydopamine, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Il DES quando viene iniettato periventricolarmente prima della somministrazione del 6-hydroxydopamine, risulta una significativa protezione dalla dopamina striatale e normalizza il comportamento che danneggiava nel gruppo di ratti di controllo. Un effetto simile è stato mostrato nel modello MPTP.

## 12 SCLEROSI MULTIPLA (MS)

Vi è un crescente interesse riguardando il significato e l'impatto del ferro nella patofisiologia della MS. È stato generalmente trovato che pazienti con MS mostrano solitamente ipointensità  $T_2$  o altri cambiamenti MRI indicativi della deposizione di ferro nelle aree della materia grigia, includendo i red nuclei, il thalamus, il dentate nucleus, lentiform nucleus, caudate, e Rolandic cortex confrontati con soggetti di controllo con diverse età (fig 19).



**FIG. 3.** Gray matter T2 hypointensity and brain atrophy in multiple sclerosis (MS). Fast spin-echo axial T2-weighted images of a 43-year-old man with relapsing-remitting MS (disease duration of 4 years with mild-to-moderate physical disability; Expanded Disability Status Scale score 3.5; images A–E) and an age-matched healthy subject (images F–J). In the patient with MS, note the bilateral hypointensity of various gray matter areas (arrows), including the red nucleus (A), thalamus (B, C), lentiform nucleus (B, C), caudate (D), and Rolandic cortex (E) compared to the healthy subject. The patient also has brain volume loss compared to the control; note prominence of ventricular and subarachnoid spaces. The T2 hypointensity most likely represents pathological iron deposition. Reprinted with permission from Pirko I, Lucchinetti CF, Sriram S, Bakshi R. *Neurology* 2007;68:634–642.

Figure 19:

Il ruolo del ferro nella SM è sostenuto in diversi studi che coinvolgono l'istologia post-mortem di cervelli umani, Mri in vivo, esperimenti encefalomieliti autoimmuni(EAE), modelli animali di MS.Studi bastati su autopsia, Craelius et al. trovò un accumulo anormale di ferro nei neuroni e negli oligodendrociti di cinque pazienti affetti da MS.Drayer e colleghi dimostrarono l'incremento del contenuto di ferro nel putamen e nel thalamus in autopsie di cervelli malati di MS.LeVine mostrò accumulo di ferro nei macrofagi e microglia in tessuti postmortem MS cerebrali. Mehindate et al. mostrò la sovraregolazione del heme ossigenasi-1)una proteina che aiuta a regolare il metabolismo del ferro) negli astrociti della spina dorsale e suggerì che il metabolismo del ferro è sconvolto nei pazienti malati di MS.Chakrabarty et al. dimostrò che il deficit motori visto soffrire dai topi dal EAE può essere migliorato sopprimendo l'attività dell'heme ossigenasi.

Il deposito di ferro è stato trovato intracellularmente(all'interno dei macrofagi ed astrociti) ed extracellularmente in aree del SNC.

Dal momento che studi in laboratorio suggeriscono un ruolo nel MS, studi basati sulla MRI suggeriscono un collegamento tra il deposito di ferro, la materia grigia danneggiata, e lo stato clinico.Ipointensità  $T_2$  nella materia grigia può essere trovata in pazienti con MS(fig 19 ) e con maggior gravità in pazienti con MS secondariamente progressiva rispetto alla Recidivante-Remittente e confrontate con i soggetti di controllo.In uno studio che coinvolge 68 pazienti con una iniziale forma Recidivante-Remittente Ms, Bermel et al. dimostrò che la linea di base  $T_2$  di ipointensita nella materia grigia è la miglior predizione per la complessa atrofia del cervello rispetto ai risultati convenzionali MRI.Questi risultati in aggiunta alle analisi trasversali-sezionali collega la  $T_2$  ipointensità all'atrofia del cervello.Numerosi studi hanno mostrato un collegamento tra l'ipointensita di  $T_2$  nella materia grigia e le manifestazioni cliniche del MS.Tjoa et al. mostrò una correlazione tra il dentate nucleus  $T_2$  ipointenso e la funzione ambulatoria misurata dal tempo per percorrere 25 passi di cammino( $r=-0.355;p=0.007$ ) ed il risultato di disabilità fisica ( $r=-0.463;p=0.004$ ) in 47 pazienti malati di MS.Brass et al. dimostrò una correlazione tra l'ipointensità  $T_2$  nella materia grigia ed il danneggiamento cognitivo in pazienti con la MS.In ognuno di questi studi, la  $T_2$  ipointensità nella materia grigia è associata con grande attenzione con lo stato neurologico rispetto alle misure convenzionali MRI delle lesioni.Dati aggiuntivi che sostengono il ruolo per l'eccesso di deposito di ferro nella materia grigia nella MS provengono da lavori recenti che usano tecniche avanzate di MRI, come la misura dell'intensità di  $T_2$  con 3T MRI e MFC.Altri hanno misurato  $R_2, R_2^*$  e  $R_2'$  con 3T MRI per valutare il potenziale di ferro depositato nel cervello in pazienti con MS.

Ci sono pochi studi riguardanti gli effetti di terapie di ferro chelation per la MS.Esperimenti

con DES e dexrazoxane ( un chelato simile al DES) son stati fatti su animali. Ratti con EAE trattati con il DES prima dello sviluppo dei sintomi presentano una totale soppressione di questi, mentre quelli trattati dopo la manifestazione dei sintomi hanno una marcata e rapida diminuzione. Uno studio con proteine basate su mielina in modelli di ratti EAE non è riuscito a mostrare l'effetto del trattamento con il DES somministrato in una fase preclinica. Postulando che il DES ossida e previene la formazione di radicali liberi, e conseguentemente sarà efficace solamente durante l'attività della malattia, Pedchenko et al. trattò i ratti nello stadio attivo dell' EAE ed osservò una significativa riduzione dei segni clinici.

Soltanto un esperimento basato sulla terapia relativa al ferro è stato fatto su umani MS. Dopo 2 anni non vi sono stati significanti miglioramenti nei risultati di disabilità seguendo 8 cordi del DES. Questa mancanza di effetto nel trattamento potrebbe potenzialmente essere attribuita all'avanzare della malattia nella popolazione dei pazienti ed il piccolo numero dei partecipanti studiati (n=9)

E' evidente da questi studi precedentemente studiati che il deposito di ferro avviene nella MS e che la terapia con composti ferro-chelati effettivamente migliora i sintomi nei modelli animali. Non è chiaro, comunque, il ruolo preciso assunto dalla deposizione del ferro negli umani e dove terapie chelation o altre terapie collegate alla tossicità del ferro possano giovare ai pazienti MS. Studi addizionali saranno giustificati per definire il ruolo del ferro nella MS

### 13 Altre malattie croniche neurodegenerative

Il deposito di ferro nel SNC è stato implicato nell'aver un ruolo in altri disagi neurologici.

**Neuroferritinopathy** è una malattia caratterizzata a sintomi extrapiramidali, si pensa sia dovuta a mutazioni nel gene che codifica per la catena della ferritina chiara (L). I livelli di ferritina sono di conseguenza tipicamente bassi. Al contrario però, l'accumulo di ferro e ferritina nel cervello è stato dimostrato. L'accumolo di ferro è probabilmente causa direttamente i sintomi clinici e la neurodegenerazione dovuta alla presenza dei radicali liberi tossici e discussa precedentemente. MRI ha evidenziato deposito di ferro nei gangli della base. Al progredire della malattia, T2\* gradient echo MRI rivelano un peggioramento dell'ipointensità nel dentate, thalamus, globus pallidus, lentiform e caudate nuclei.

**Atassia di Friedrich (FA)** , una malattia autosomiale recessiva che si presenta neurologicamente con una progressiva atassia, areflessia, perdita dei sensi, si pensa sia originata dalla deficienza della proteina mitocondriale fratassina. Nei modelli privati di fratassina sono stati osservati elevati livelli di ferro e danno ossidativo. Pazienti con un anormale FRDA, il gene che permette l'espressione della fratassina, mostra incrementi nel danno ossidativo. Questo dovrebbe accelerare la progressione della malattia. Indagini tramite MRI mostrano incrementi significativi nelle concentrazioni di ferro nel cerebellar dentate nucleus di pazienti con FA quando confrontati con soggetti sani.

Pazienti con neurodegenerazione con accumulo di ferro nel cervello tipicamente sviluppano retinopatia, distonia, disturbi del linguaggio, e manifestazioni psichiatriche.

## References

- [1] Jurgen R. Reichenbach Ramesh Venkatesan Dmitriy A. Yablonskiy Michael R. Thompson Song Lai E. Mark Haacke Theory and Application of Static Field Inhomogeneity Effects in Gradient- Echo Imaging
- [2] Haacke EM, Cheng NY, House MJ, et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 2005;23:1–25.
- [3] James Stankiewicz,\* S. Scott Panter, et al. Iron in Chronic Brain Disorders: Imaging and Neurotherapeutic Implications. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics* Vol. 4, 371–386, July 2007
- [4] Jacqueline M. Graham, Martyn N. J. Paley, et al. Brain iron deposition in Parkinson's disease imaged using the PRIME magnetic resonance sequence. *Brain* (2000), 123, 2423–2431
- [5] Hallgren B, Sourander P. The effect of age on the non-haemin iron in the human brain. *J Neurochem* 1958; 3: 41–51.
- [6] Ruitian Song et al. Echo-spacing optimization for the simultaneous measurement of reversible (R2V) and irreversible (R2) transverse relaxation rates. *Magnetic Resonance Imaging* 25 (2007) 63–68
- [7] Tachio Hikita et al. Determination of transverse relaxation rate for estimating iron deposits in central nervous system. *Neuroscience Research* 51 (2005) 67–71
- [8] Dmitriy A. Yablonskiy, E. Mark Haacke An MRI Method for Measuring T<sub>1</sub> in the Presence of Static and RF Magnetic Field Inhomogeneities *MRM* 37~872-876 (1997)
- [9] Andrew J. Wheaton et al. T<sub>2ρ</sub>-Weighted Contrast in MR Images of the Human Brain *Magnetic Resonance in Medicine* 52:1223–1227 (2004)
- [10] E.M. Haacke S. Mittal Z. et al. Susceptibility-Weighted Imaging: Technical Aspects and Clinical Applications *AJNR Am J Neuroradiol* 30:19 –30
- [11] Adolf Pfefferbaum a,b, Elfar Adalsteinsson et al. Diffusion tensor imaging of deep gray matter brain structures: Effects of age and iron concentration *Neurobiology of Aging* 31 (2010) 482–493
- [12] Herna ´n Jara, PhD, Osamu Sakai Multispectral Quantitative Magnetic Resonance Imaging of Brain Iron Stores A Theoretical Perspective *Top Magn Reson Imaging* 2006;17:19Y30
- [14] Seth A. Smith et al. Direct Saturation MRI: Theory and Application to Imaging Brain Iron *Magn Reson Med.* 2009 August ; 62(2): 384–393
- [15] John G. Webster *Strumentazione Biomedica progetto ed applicazioni* ediz. EdiSES
- [16] R. N. Muller, L. Vander Elst et al. RELAXATION BY METAL-CONTAINING NANOSYSTEMS *ADVANCES IN INORGANIC CHEMISTRY* 2005 Elsevier Inc. VOLUME 57

- [17] Yves Gossuin,<sup>1\*</sup> Alain Roch et al. Anomalous Nuclear Magnetic Relaxation of Aqueous Solutions of Ferritin: An Unprecedented First-Order Mechanism *Magnetic Resonance in Medicine* 48:959–964 (2002)
- [18] George Bartzokis et al. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration *Neurobiology of Aging* 28 (2007) 414–423
- [19] Jens H. Jensen *Magnetic Field Correlation Imaging Magnetic Resonance in Medicine* 55:1350–1361 (2006)
- [20] Seth Smith et al. Pulsed Magnetization Transfer Imaging With Body Coil Transmission at 3 Tesla: Feasibility and Application *Magnetic Resonance in Medicine* 56:866–875 (2006)
- [21] Bizzi A, Brooks RA, Brunetti A, et al. Role of iron and ferritin in MR imaging: a study of primates at different field strengths. *Radiology* 1990;177:59– 65
- [22] Spatz H. Uber Den Eisennachweis im Gehrin, besonders in Zentren des extrapyrimidal-motorischen systems. *Z Ges Neuronal Psychiat Berl* 1922;77:261
- [23] Chen CJ, Hardy PA, Clauberg M, et al. T2 values in the human brain: comparison with quantitative assays of iron and ferritin. *Radiology* 1989;173:521– 6.
- [24] Chen JC, Hardy PA, Kucharczyk W, Clauberg M, Joshi JG, Vourlas A, et al. MR of human postmortem brain tissue: correlative study between T2 and assays of iron and ferritin in Parkinson and Huntington Disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 1993;14:275– 81.
- [25] Cornett CR, Markesbery WR, Ehmann WD. Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer’s disease brain. *Neurotoxicology* 1998;19:339– 46.
- [26] Deibel MA, Ehmann WD, Markesbery WD. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer’s disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci* 1996;143: 137–42.
- [27] Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, et al. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson’s disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 1991;114:1953– 75.
- [28] Sofic E, Paulus W, Jellinger K, Riederer P, Youdim MB. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J Neurochem* 1991;56:978–82
- [29] Thompson CM, Markesbery WR, Ehmann WD, Mao Y-M, Vance DE. Regional brain trace element studies in Alzheimer’s disease. *Neurotoxicology* 1988;9:1– 8.
- [30] Connor JR, Snyder BS, Arosio P, Loeffler DA, LeWitt P. A quantitative analysis of iso-ferritins in selected regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer’s diseased brains. *J Neurochem* 1995;65:717– 24.
- [31] Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* 1990;27:595–611.

- [32] Connor JR. Proteins of iron regulation in the brain in Alzheimer's disease. In: Lauffer RB, editor. *Iron and Human Disease*. Boca Raton7 CRC Press; 1992. p. 365–93.
- [33] Gutteridge JM. Iron and oxygen radicals in brain. *Ann Neurol* 1992;32:S16 –S21.
- [34] Curtis AR, Fey C, Morris CM, et al. Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* 2001;28:350 –354.
- [35] Vymazal J, Brooks RA, Zak O, McRill C, Shen C, Di Chiro G. T1 and T2 of ferritin at different field strengths: effect on MRI. *Magn Reson Med* 1992;27:368–374.
- [36] Gossuin Y, Roch A, Muller RN, Gillis P. Relaxation induced by ferritin and ferritin-like magnetic particles: the role of proton exchange. *Magn Reson Med* 2000;43:237–243.
- [37] Gossuin Y, Roch A, Lo Bue F, Muller RN, Gillis P. Nuclear magnetic relaxation dispersion of ferritin and ferritin-like magnetic particle solutions: a pH-effect study. *Magn Reson Med* 2001;46:476–481
- [38] Gilles, C.; Bonville, P.; Wong, K. K. W.; Mann, S. *Eur. Phys. J. B* 2000, 17, 417-427.
- [39] Uitti RJ, Rajput AH, Rozdilsky B, et al. Regional metal concentrations in Parkinson's disease, other chronic neurological diseases, and control brains. *Can J Neurol Sci* 1989;16:310 –314. 93.
- [40] Galazka-Friedman J, Bauminger ER, Friedman A, et al. Iron in parkinsonian and control substantia nigra: a Mossbauer spectroscopy study. *Mov Disord* 1996;11:8 –16.