

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Scuola di Scienze
Dipartimento di Fisica e Astronomia
Corso di Laurea in Fisica

**Metodi di quantificazione assoluta dei
metaboliti cerebrali attraverso
spettroscopia di risonanza magnetica**

Relatore:
Dott.ssa Claudia Testa

Presentata da:
Laura Soprani

Anno Accademico 2019/2020

Abstract

La spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) è un metodo non invasivo utile per la diagnosi di alcune patologie legate a variazioni del metabolismo che interessano il sistema nervoso centrale, poiché consente di quantificare i metaboliti presenti nel cervello. La MRS *in vivo* misura i segnali di molecole presenti in concentrazioni superiori a 1-2 mM per limiti di sensibilità della metodica. Inoltre, per avere un buon rapporto segnale rumore solitamente è necessario utilizzare lunghe procedure di acquisizione. Le concentrazioni dei metaboliti possono essere ricavate in rapporto relativo oppure in valore assoluto.

In questo elaborato si riportano alcuni protocolli sviluppati per la determinazione delle concentrazioni metaboliche assolute *in vivo*, che necessitano di uno standard a concentrazione nota, interno o esterno. In particolare, come riferimento interno si considera il segnale dell'acqua presente all'interno del *voxel* analizzato; mentre il riferimento esterno consiste in una soluzione campione a concentrazione nota, funzionale all'analisi d'interesse. Nella tesi vengono descritti metodi di calibrazione e correzione dei tempi di rilassamento per la quantificazione dei metaboliti *in vivo*. Nell'ultimo capitolo, si riportano due studi come esempio di protocolli per la quantificazione dei metaboliti nella diagnosi di tumori al cervello quali il glioma e nello studio di malattie metaboliche, in particolare la malattia di Canavan.

Indice

Introduzione	1
1 Metodi di quantificazione assoluta con riferimento interno	4
1.1 Valutazione dei tempi di rilassamento dell'acqua attraverso acquisizioni multiple	7
1.2 Utilizzo di qMRI per la valutazione dei tempi di rilassamento dell'acqua .	10
2 Metodi di quantificazione assoluta con riferimento esterno	15
3 Esempi di utilizzo di spettroscopia di MR quantitativa per tecniche diagnostiche	22
3.1 Esempio di utilizzo di spettroscopia di MR quantitativa per la diagnosi dei tumori cerebrali	22
3.2 Esempio di utilizzo di spettroscopia di MR quantitativa per la diagnosi di malattie metaboliche	26
4 Conclusioni	29
Bibliografia	31

Introduzione

La spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) è un metodo non invasivo utile per gli studi del metabolismo *in vivo* e può essere applicata in modo complementare all'imaging di risonanza magnetica (MRI) per la diagnosi di alcune patologie che interessano il sistema nervoso centrale. In particolare permette di quantificare i metaboliti presenti nel cervello in quantità superiore a qualche millimole, e valutarne le variazioni conseguenti a disfunzioni di varia natura. I principali metaboliti presenti nel tessuto cerebrale e visibili *in vivo* includono l'N-acetilaspargato (NAA), il complesso creatina-fosfocreatina (Cr), il complesso relativo ai metaboliti colinici indicato *in vivo* come colina (Cho), il lattato (Lac), il mio-inositolo (mI), il glutammato e la glutammina (Glx) e l'acido γ -amminobutirrico (GABA).

Le concentrazioni dei metaboliti possono essere ricavate in rapporto relativo oppure in valore assoluto. Il primo prevede di calcolare l'intensità del segnale prodotto dal metabolita di interesse in rapporto a quella di un metabolita di riferimento. Le concentrazioni vengono misurate simultaneamente all'interno dello stesso *voxel*. Come segnale di riferimento si prende generalmente quello del complesso creatina-fosfocreatina, in quanto risulta stabile nelle varie regioni del cervello e presente in tutti i tipi di tessuti: sostanza bianca, sostanza grigia e liquido cerebro spinale. Questo metodo è molto utilizzato in campo clinico poiché il rapporto permette di semplificare il fattore di scala, incognito ed insito in ogni acquisizione. Tuttavia, il principale problema legato alla quantificazione relativa è una difficile valutazione delle variazioni; ad esempio, una riduzione del rapporto NAA/Cr potrebbe essere data da una minore concentrazione di NAA oppure da un aumento di creatina. Una possibile alternativa per ovviare tale ambiguità è la quantificazione della concentrazione assoluta dei metaboliti. Per la valutazione di tali quantità sono state sviluppate diverse tecniche che hanno lo scopo di risolvere criticità, quali i lunghi tempi di scansione e l'accuratezza delle misure. Infatti, se la valutazione delle concentrazioni *in vitro* non presenta problematiche legate ai tempi di acquisizione, lo stesso non si può dire per la quantificazione assoluta *in vivo*, che deve produrre risultati accurati riducendo al minimo la durata della scansione.

L'obiettivo di questo elaborato è mettere in evidenza alcuni metodi sviluppati per la determinazione delle concentrazioni metaboliche assolute *in vivo*. Tali metodi necessitano di uno standard a concentrazione nota, che può essere interno o esterno. Generalmente

si considera come riferimento interno il segnale dell'acqua presente nel *voxel* analizzato, mentre il riferimento esterno consiste in un campione opportunamente preparato, chiamato fantoccio, all'interno del quale viene posta una soluzione a concentrazioni note, funzionali all'analisi d'interesse.

È noto che il segnale in risonanza magnetica nucleare (NMR) dipende dalla concentrazione dei nuclei e dai tempi di rilassamento longitudinale e trasversale (rispettivamente T_1 e T_2) [1, 2]. Pertanto, al fine di valutare la concentrazione dell'acqua interna ai tessuti è necessario conoscere T_1 e T_2 . In determinate condizioni fisiche e fisiologiche, la variazione di concentrazione dell'acqua può considerarsi trascurabile, dunque è possibile considerare i tempi di rilassamento dell'acqua come costanti e noti in letteratura. A causa di certe patologie, tuttavia, la concentrazione dell'acqua nei tessuti varia in maniera non più trascurabile ed è quindi necessario valutare i tempi di rilassamento dell'acqua nel singolo volume di interesse (VOI) prima di utilizzare il segnale dell'acqua come standard interno. Di seguito (sezioni 1.1 e 1.2) vengono descritte due metodologie utilizzate per valutare i tempi di rilassamento dell'acqua. Nella prima [1], T_2 si ottiene dal fit multi-esponenziale dei segnali di H_2O totale acquisiti a diversi tempi di eco (TE). Sebbene questo protocollo abbia come svantaggio lunghi tempi di acquisizione dovuti all'elevato numero di spettri necessari, permette di ricavare valori di T_2 e, di conseguenza, concentrazioni metaboliche, molto accurati. Infatti, questi risultati possono essere utilizzati come riferimento per implementare protocolli più rapidi, seppur meno precisi. Per quanto riguarda il tempo di rilassamento longitudinale relativo all'acqua e ai metaboliti, si scelgono tempi di ripetizione (TR) molto più lunghi rispetto ai valori di T_1 noti in letteratura. La seconda metodologia descritta, invece, ricava i tempi di rilassamento dell'acqua per mezzo della risonanza magnetica per immagini [2]. I valori ottenuti vengono utilizzati per ricavare la concentrazione di H_2O nei vari tessuti cerebrali, in seguito impiegata come valore di riferimento interno per il calcolo delle concentrazioni assolute dei metaboliti.

In alternativa ai precedenti protocolli è possibile usare come riferimento i segnali acquisiti da un fantoccio [3] (Capitolo 2), all'interno del quale si creano delle concentrazioni *ad hoc* per le analisi da condurre. Il rilevamento del segnale MR avviene per mezzo di un campo B_1 che genera una magnetizzazione trasversale degli spin, che induce una forza elettromotrice nella bobina di radiofrequenza, la quale generalmente funge sia da trasmettitore che da ricevitore, che si traduce in un segnale rilevabile. La magnetizzazione dipende dall'intensità di B_1 , dalla distribuzione prodotta dalla bobina di radiofrequenza utilizzata durante la trasmissione (B_{1t}^+), dai tempi di rilassamento degli spin misurati, dalla temperatura del campione e dal campo B_0 . La forza elettromotrice generata nella bobina dipende dalla sensibilità alla ricezione della stessa e produce un segnale la cui intensità dipende dal carico della bobina che va a sommarsi all'impedenza totale. La conoscenza di questi fattori è necessaria per ricavare le concentrazioni metaboliche assolute. Sfortunatamente gli effetti sui fantocci possono risultare differenti rispetto da quelli *in vivo*, in particolare per quanto riguarda B_{1t}^+ , la sensibilità e il carico della bobina. Quindi se si vuole utilizzare questo metodo all'interno dei protocolli clinici è necessario

sviluppare una procedura di calibrazione. I vantaggi risiedono nella possibilità che tale procedura sia completamente automatizzata e riduca i tempi di acquisizione sul paziente.

Nell'ultimo capitolo della tesi, si riportano due studi come esempio di protocolli di quantificazione assoluta dei metaboliti attraverso spettroscopia di risonanza magnetica per la diagnosi di tumori al cervello quali il glioma e di malattie metaboliche, in particolare la malattia di Canavan.

Capitolo 1

Metodi di quantificazione assoluta con riferimento interno

Idealmente, per determinare le concentrazioni metaboliche assolute *in vivo* la concentrazione dello standard interno, a cui si fa riferimento, dovrebbe essere nota e dovrebbe rimanere costante indipendentemente dalle condizioni fisiologiche e fisiopatologiche. Inoltre, la misurazione del segnale di riferimento dovrebbe essere accurata e riproducibile al fine di evitare errori sistematici nel calcolo delle concentrazioni dei metaboliti [4]. Tuttavia, diversi fattori influenzano il valore di una determinata concentrazione. Essi possono essere di natura strutturale, per esempio la disomogeneità del campo B_1 , la potenza di amplificazione della radiofrequenza e le variazioni temporali, oppure relative al soggetto, come sua la posizione relativa rispetto alla bobina e le differenze di rilassamento [2].

Lo standard interno più largamente utilizzato in campo clinico per la quantificazione assoluta dei metaboliti è il segnale dell'acqua. In questo modo la concentrazione assoluta è proporzionale al rapporto tra l'ampiezza del segnale del metabolita e quella dell'acqua. La differenza rispetto alla quantificazione relativa, che generalmente utilizza come riferimento il segnale prodotto dalla creatina, risiede nel fatto che l'alto rapporto segnale-rumore dell'acqua permette di attribuire direttamente una variazione del rapporto alla variazione nella concentrazione del metabolita.

È noto che, sia per i metaboliti che per l'acqua, il segnale NMR dipende da vari fattori [1, 2].

- Tempi di rilassamento T_1 e T_2 : esso è in relazione esponenziale con i tempi di rilassamento T_1 e T_2 . Infatti i nuclei sottoposti a un campo magnetico \mathbf{B} , dipendente dalla frequenza di Larmor, acquisiscono energia e il vettore di magnetizzazione \mathbf{M} , responsabile del segnale NMR, comincia a ruotare, compiendo un moto di precessione, attorno all'asse z . Si hanno due componenti principali per il vettore di magnetizzazione, la componente z che è anche detta longitudinale e la componente che giace sul piano xy detta componente trasversale; in condizioni di equilibrio

queste valgono rispettivamente M_0 e 0. In seguito alla magnetizzazione ha luogo il fenomeno di rilassamento, durante il quale i nuclei ritornano alla configurazione di equilibrio secondo due processi fisici differenti. Il primo prevede il rilascio di energia dagli spin agli atomi del reticolo e dipende da una grandezza caratteristica detta tempo di rilassamento longitudinale T_1 . Il secondo dipende invece dalla perdita di coerenza di fase degli spin dei nuclei che attraverso un fenomeno tipicamente entropico tenderanno a recuperare una configurazione disordinata. Questo processo ha luogo con un tempo caratteristico detto tempo di rilassamento trasversale T_2 che risulta minore di T_1 . È possibile esplicitare la dipendenza della magnetizzazione dai tempi di rilassamento attraverso le equazioni di Bloch, che in forma vettoriale si scrivono

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = -\gamma \mathbf{M} \times \mathbf{B} - \mathbf{R}(M - M_0) \quad (1.1)$$

dove γ è il fattore giromagnetico e dipende dalla natura dei nuclei e \mathbf{R} è la matrice di rilassamento, i cui elementi rappresentano l'inverso dei tempi di rilassamento. Le soluzioni per l'equazione di Bloch, se si considera $\mathbf{B} = B_0 \hat{\mathbf{k}}$, sono le seguenti

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2}, \quad (1.2)$$

$$M_z = M_0 (1 - e^{-t/T_1}). \quad (1.3)$$

Si osserva che la magnetizzazione trasversale a \mathbf{B} diminuisce esponenzialmente con costante T_2 , mentre la magnetizzazione lungo z recupera il suo valore con costante T_1 [5].

- Numero di protoni che contribuiscono al segnale: la spettroscopia di risonanza magnetica indaga i nuclei, in particolare la tecnica più diffusa è quella che rileva il segnale dei nuclei di ^1H . Per questo motivo il segnale NMR è legato al numero di protoni che contribuiscono, in quanto a parità di volume analizzato, tempi di rilassamento e concentrazione lo spettro dipenderà dal numero di protoni presenti nella molecola.
- Concentrazione dei nuclei: il segnale NMR dipende inoltre dalla concentrazione dei nuclei, è quindi necessario considerare composizione del *voxel* analizzato, poiché la frazione di acqua cambia in base alla natura tessuto che vi è contenuto (per la sostanza bianca è 0.65, per la sostanza grigia è 0.78) [1] e alle condizioni fisiopatologiche del paziente.

Per acquisire gli spettri necessari per ricavare le quantità sopra citate si effettuano da due fino a decine di scansioni del VOI in base al metodo che si utilizza.

Il rilevamento del segnale NMR per l'analisi spettroscopica può essere fatto con varie sequenze di selezione del VOI. Le più diffuse per l'utilizzo clinico sono la sequenza STEAM e la sequenza PRESS (figura 1.1).

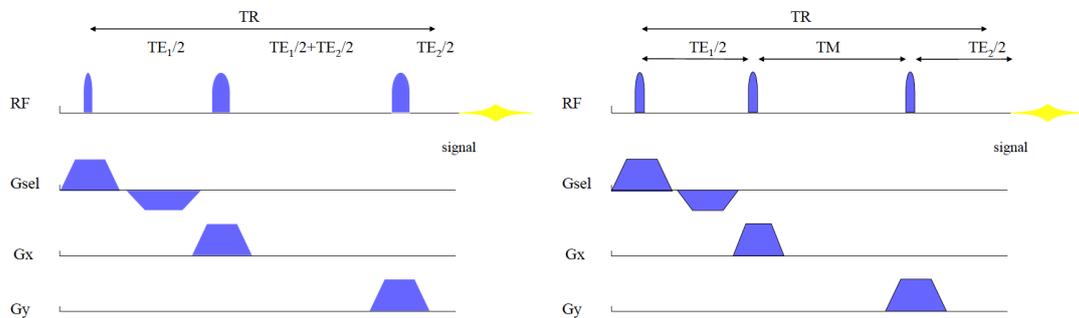


Figura 1.1: A sinistra: schema di acquisizione della sequenza PRESS. A destra: schema di acquisizione della sequenza STEAM.

La sequenza PRESS consiste in una serie di impulsi di radiofrequenza (RF) in congiunzione con un gradiente di campo magnetico che definiscono il *voxel* attraverso la selezione di tre sezioni perpendicolari. In principio sono applicati simultaneamente un impulso RF a 90° con il gradiente X per selezionare una sezione nel piano yz . Successivamente, viene applicato un impulso RF a 180° con il gradiente Y che crea una sezione di magnetizzazione trasversale parallela al piano xz . Infine, si applicano un impulso RF a 180° con il gradiente Z che seleziona una sezione di magnetizzazione eccitata parallela al piano xy creando così un volume cubico di magnetizzazione definito dall'intersezione delle tre sezioni [6].

La sequenza STEAM è simile alla PRESS: consiste in tre impulsi RF con angoli di rotazione di 90° ciascuno. Oltre a questo con la sequenza STEAM è possibile fare acquisizioni a TE corti mentre per TE lunghi è preferibile scegliere una sequenza PRESS.

È inoltre necessario per entrambe le sequenze utilizzare altri impulsi per l'acquisizione di spettri con soppressione del segnale dell'acqua, al fine di avere una maggiore risoluzione sui segnali prodotti dai metaboliti. Un metodo molto diffuso di soppressione dell'acqua è il modulo CHESSE. Esso consiste nell'applicazione di tre impulsi RF selettivi in frequenza e un gradiente di campo magnetico progettati per ridurre il segnale prodotto dai protoni dell'acqua, senza avere effetto sul segnale prodotto dai metaboliti. Gli impulsi RF sono centrati sul segnale dell'acqua a 4.7 ppm e, con gli impulsi di gradiente, hanno una banda di frequenze di eccitazione limitata in modo che i segnali dei metaboliti non siano modificati. Il modulo CHESSE può essere incluso con qualsiasi sequenza di impulsi MRS. L'effettiva larghezza spettrale di questo modulo è impostata a 75 Hz, equivalente a circa 1.2 ppm a 1.5 T, di conseguenza non influisce sui picchi minori di 4.1 ppm e maggiori di 5.3 ppm. Quindi, la sequenza di acquisizione dei dati che segue gli impulsi di soppressione dell'acqua fornisce il segnale dei metaboliti, mentre i momenti magnetici dei protoni nell'acqua non danno alcun contributo [7].

In conclusione, per ottenere il profilo neurometabolico cerebrale attraverso la spettroscopia di risonanza magnetica si devono elaborare metodi di acquisizione e correzione

sia dei tempi di rilassamento che della concentrazione dell'acqua, che tengano presente contemporaneamente dell'accuratezza dei risultati e dell'applicabilità in campo clinico, che quindi producano risultati facili da analizzare, accurati e in tempi di scansione il più brevi possibile.

1.1 Valutazione dei tempi di rilassamento dell'acqua attraverso acquisizioni multiple

La quantificazione assoluta dei metaboliti dipende dai tempi di rilassamento, e un errore nella loro rilevazione può portare a bias nelle concentrazioni metaboliche. Da quanto visto nella sezione precedente (1.2), dato il fenomeno di rilassamento della magnetizzazione longitudinale, per rendere trascurabili gli effetti del T_1 sul segnale di NMR è necessario che la magnetizzazione abbia recuperato il valore di equilibrio, perché ciò avvenga si acquisiscono gli spettri con tempi di ripetizione della sequenza spin-eco (TR) pari a circa 3-4 volte i T_1 riportati in letteratura. È noto che, per campi magnetici di 1.5 T, il valore di T_1 per i metaboliti è all'incirca 1 s [8], mentre l'acqua, poiché è una molecola piccola rispetto a essi, ha tempi di rilassamento più lunghi (T_1 circa 5 s [1]). In particolare, Malucelli et al. [1] utilizzano un $TR = 4000$ ms per le acquisizioni degli spettri con soppressione dell'acqua e $TR=15000$ ms per l'acquisizione senza la soppressione del segnale dell'acqua.

Una tra le possibili strategie per valutare il tempo di rilassamento trasversale consiste nell'acquisire un insieme di spettri a diversi tempi di eco (TE) per costruire una curva di rilassamento di T_2 . Il tempo di eco è il parametro di acquisizione che indica quanto tempo dopo la stimolazione viene acquisito il segnale e corrisponde a due volte l'intervallo di tempo dopo il quale si applica l'impulso di rifocalizzazione del segnale. Come si è detto nella sezione precedente eq.(1.1),(1.2) il segnale NMR decade in maniera esponenziale rispetto a T_2 . Si consideri uno spettro acquisito con soppressione del segnale dell'acqua, i T_2 dei singoli metaboliti sono legati alle ampiezze di segnale secondo la seguente relazione mono-esponenziale

$$S_{\text{met}}(TE) = S_{\text{met}}(0)e^{-TE/T_2} \quad (1.4)$$

dove $S_{\text{met}}(TE)$ indica l'ampiezza di segnale del metabolita a un dato TE e $S_{\text{met}}(0)$ è l'ampiezza ottenuta per $TE = 0$ ms. Se si considera invece lo spettro acquisito senza soppressione dell'acqua è più corretto considerare una dipendenza multi-esponenziale [9], perché l'acqua del tessuto cerebrale è presente in vari compartimenti a concentrazione diversa. I tempi di rilassamento trasversale dell'acqua sono diversi in base al tessuto in cui si trova, infatti le molecole presenti all'interno delle cellule del tessuto cerebrale avranno una mobilità ridotta rispetto a quelle nel liquido extracellulare o nel liquido cefalorachidiano. Una mobilità maggiore riduce la perdita di coerenza e quindi allunga i tempi di rilassamento trasversale. Quanto appena detto comporta che lo spettro dipenderà dalla

composizione del *voxel* analizzato. Le ampiezze del segnale acquisite senza soppressione dell'acqua a diversi TE ($W(TE)$) vengono quindi fittate utilizzando la somma di due componenti, una relativa all'acqua cerebrale (BW) e una relativa all'acqua del liquido cerebrospinale (CSF); si trascura in questo caso l'acqua extra tissutale [1].

$$W(TE) = S_{\text{BW}}(0)e^{-TE/T_2 \text{ BW}} + S_{\text{CSF}}(0)e^{-TE/T_2 \text{ CSF}} \quad (1.5)$$

$S_{\text{BW}}(0)$ e $S_{\text{CSF}}(0)$ sono rispettivamente i segnali dell'acqua cerebrale e del liquido cerebrospinale per $TE = 0$ ms.

Una volta ricavati i parametri necessari la concentrazione dei metaboliti in mM (C_{met}) si calcola utilizzando come standard interno $S_{\text{BW}}(0)$, e risulta dalla seguente relazione:

$$C_{\text{met}} = \frac{S_{\text{met}}(0)}{S_{\text{BW}}(0)} \frac{2}{N_{\text{met}}} R M. \quad (1.6)$$

N_{met} è il numero di protoni dei metaboliti, R è la frazione di acqua per grammo del tessuto cerebrale misurata precedentemente *ex vivo* (0.65 per la sostanza bianca; 0.78 per la sostanza grigia) e M la concentrazione in acqua (55.500 mM) [1].

Per ottenere i valori di T_2 dei metaboliti secondo quanto appena riportato lo studio condotto da Malucelli et al. [1] propone di acquisire cinque spettri, rispettivamente a $TE = 35, 70, 100, 144, 288$ ms e $TR = 4000$ ms ottenuti attraverso una sequenza PRESS, con metodo di soppressione dell'acqua CHESS a 1.5 T. Per la valutazione del T_2 dell'acqua, invece, si acquisiscono undici spettri rispettivamente a $TE = 25, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 300, 900$ e 1000 ms e $TR = 15000$ ms. Come si può osservare i tempi di eco dei metaboliti risultano più corti rispetto a quelli dell'acqua per quanto detto in precedenza.

Questo metodo di quantificazione è stato testato su un gruppo di soggetti sani (37) prendendo in analisi due regioni differenti, la sostanza grigia nella corteccia occipito-parietale e la sostanza bianca nella regione occipito-parietale sinistra. Inoltre gli spettri dei metaboliti sono stati trattati utilizzando due diversi set di basi per i metaboliti, WhoM creata simulando il segnale dell'intero spettro di metaboliti e MSM creata separando i segnali singoletto dei gruppi metilici di Cr e NAA e il gruppo tri-metilico di Cho (figura 1.2) dagli altri segnali accoppiati. In figura 1.3 si possono osservare due spettri fittati rispettivamente con WhoM e MSM. In tabella 1.1 si riportano le concentrazioni assolute dei metaboliti analizzati utilizzando le due diverse basi.

Questo protocollo ottiene concentrazioni e tempi di rilassamento trasversale che risultano in accordo con la letteratura e molto accurati, ma prevede l'acquisizione di 16 spettri per ogni VOI e di conseguenza un tempo di acquisizione cumulativo di circa 25 minuti, che varia in base alla regione del cervello analizzata. È quindi auspicabile trovare strategie alternative più semplici e che richiedano minor tempo. Per questo Malucelli et al. [1] prendono come standard di riferimento il protocollo appena descritto (IP) ed elaborano un metodo (MP) che utilizza come T_2 di ciascun metabolita il valore medio

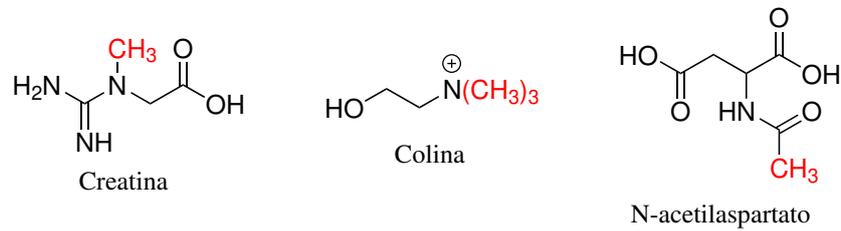


Figura 1.2: Formule di struttura di creatina, colina e NAA con cui si mettono in evidenza i gruppi metilici al loro interno.

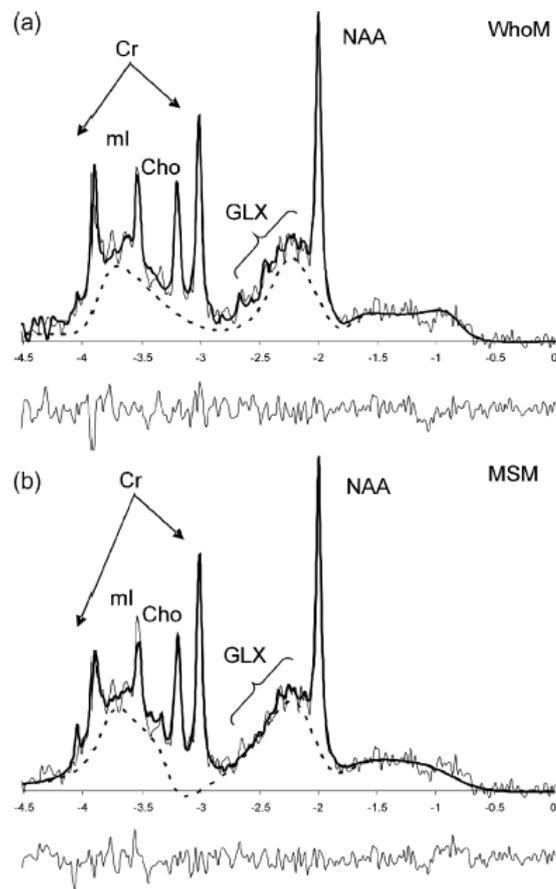


Figura 1.3: Spettro acquisito nella sostanza grigia ($TE = 35$ ms, $TR = 4000$ ms) fittato con (a) il set WhoM e (b) il set MSM riportato da Malucelli et al. [1].

ottenuto dal set di dati del corrispondente metabolita nel protocollo IP. Questo permette di ridurre il numero di spettri con soppressione del segnale dell'acqua da cinque a uno. Per quanto riguarda la valutazione del segnale dell'acqua $S_{BW}(0)$ (equazione (1.6))

		Cho [mM]	Cr [mM]	NAA [mM]
sostanza bianca	MSM	2.4±0.3	7.6±0.8	11.2±0.9
	WhoM	2.3±0.3	6.6±0.6	11.7±0.9
sostanza grigia	MSM	1.7±0.2	9.9±1.1	12.4±0.9
	WhoM	1.7±0.2	9.1±1.0	12.8±1.0

Tabella 1.1: Sono riportate le concentrazioni dei metaboliti nella sostanza bianca e nella sostanza grigia.

sono presentate due possibilità, nella prima il T_2 dell'acqua viene valutato utilizzando l'equazione (1.5) per fittare la curva di rilassamento ottenuta con l'acquisizione di undici spettri. La seconda prevede invece l'acquisizione di un unico spettro a $TE = 30$ ms che va corretto con i valori medi di $T_{2\text{BW}}$ e $T_{2\text{CSF}}$ ottenuti dal precedente protocollo. Quest'ultimo, poiché prevede l'acquisizione di due soli spettri risulta avere tempi molto brevi (3 min 8 s per la sostanza grigia e 5 min 16 s per la sostanza bianca [1]), ma anche se riporta risultati simili al primo ha un'accuratezza e una precisione ridotte, poiché presenta una maggiore variabilità di concentrazioni normalizzate.

In conclusione è interessante sottolineare che il protocollo MP con valutazione individuale del tempo di rilassamento trasversale dell'acqua risulta un buon compromesso tra accuratezza e tempi di acquisizione. Infatti, questo sotto protocollo dà risultati buoni soprattutto per $TE = 35$ ms con deviazione standard rispetto al metodo IP più bassa per tutti i metaboliti. Questo è un risultato degno di nota perché suggerisce che una volta stabiliti i T_2 medi dei metaboliti della popolazione, è possibile eseguire la quantificazione assoluta del metabolita acquisendo un solo spettro metabolico, riducendo drasticamente il tempo di acquisizione (13 min 8 s per la sostanza grigia e 15 min 16 s per la sostanza bianca [1]).

1.2 Utilizzo di qMRI per la valutazione dei tempi di rilassamento dell'acqua

La criticità principale dei metodi di quantificazione assoluta dei metaboliti, ottenuta mediante spettroscopia di risonanza magnetica, che rilevano il segnale interno dell'acqua come riferimento, è la lunga durata dovuta all'acquisizione di un numero elevato di spettri. Tisell et al. [2] propongono l'utilizzo combinato della quantificazione con MRS e della tecnica neuroimaging quantitativo (qMRI) per valutare il tempo di rilassamento e la concentrazione dell'acqua.

Il calcolo della concentrazione dei metaboliti è affidato al programma di analisi LC-Model, il quale quantifica i segnali MRS attraverso dei fit che utilizzano basi di funzioni che possono rappresentare o l'intero spettro o i singoli picchi. In LCModel è possibile uti-

lizzare il segnale senza soppressione dell'acqua come riferimento interno per calcolare la concentrazione dei metaboliti "ri-scalata" rispetto all'acqua $C_{\text{met,WS}}$ secondo la seguente relazione

$$C_{\text{met,WS}} = \frac{\Theta_{\text{met}}}{\Theta_{\text{H}_2\text{O}} C_{\text{H}_2\text{O}}} C_{\text{met}}, \quad (1.7)$$

in cui

$$\Theta_{\text{met}} = \frac{\left(1 - e^{-\frac{TR_{\text{invivo}}}{T_{1,\text{met,invivo}}}}\right) e^{-\frac{TE}{T_{2,\text{met,invivo}}}}}{\left(1 - e^{-\frac{TR_{\text{invitro}}}{T_{1,\text{met,invitro}}}}\right) e^{-\frac{TE}{T_{2,\text{met,invitro}}}}}, \quad (1.8)$$

$$\Theta_{\text{H}_2\text{O}} = \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_{1,\text{H}_2\text{O}}}}\right) e^{-\frac{TE}{T_{2,\text{H}_2\text{O}}}}. \quad (1.9)$$

Le funzioni Θ dipendono dai valori dei tempi di rilassamento *in vivo* e *in vitro*, e $T_{1,\text{met,invivo}}$, $T_{1,\text{met,invitro}}$, $T_{2,\text{met,invivo}}$ e $T_{2,\text{met,invitro}}$ sono rispettivamente i tempi di rilassamento longitudinali e trasversali *in vivo* e *in vitro* caratteristici dei metaboliti reperibili in letteratura, TR_{invivo} e TR_{invitro} sono i tempi di ripetizione che *in vitro* vengono scelti più lunghi possibile mentre *in vivo* si impostano più brevi per ridurre i tempi di scansione, infine il tempo di eco TE è scelto uguale per entrambi i casi. Per l'acqua (eq.(1.9)) i tempi $T_{1,\text{H}_2\text{O}}$, $T_{2,\text{H}_2\text{O}}$, TR e TE sono relativi soltanto alle misurazioni *in vivo*.

Come metodo di qMRI viene usato QRAPMASTER ("Quantification of Relaxation Times and Proton Density by Multiecho acquisition of a saturation-recovery using Turbo spin-Echo Readout") che utilizza una sequenza multistrato con un lungo tempo di ripetizione tra le acquisizioni successive, senza limitazione dell'angolo di inversione. Il metodo presentato permette la quantificazione del rilassamento T_1 e T_2 , della densità protonica e del campo B_1 sul volume completo del cervello ad alta risoluzione in un tempo di scansione di soli 5 minuti. La sequenza di acquisizione è divisa in blocchi e per ogni blocco si hanno due fasi. Nella prima un impulso di saturazione seleziona una sezione con un angolo di 120° , che ruota lo spin attorno all'asse y, nella seconda viene eseguita un'acquisizione spin eco (un impulso di eccitazione a 90° e impulsi di *refocusing* di 180° attorno all'asse x) con eco multipli che serviranno per valutare il tempo di rilassamento trasversale T_2 (figura 1.4). Il numero di eco e la spaziatura possono essere scelti liberamente per adattarsi a qualsiasi gamma dinamica per la misurazione di T_2 . Inoltre può essere impostato anche un tempo di ritardo T_D tra la saturazione e l'acquisizione permettendo di scegliere anche la gamma dinamica di T_1 . Ciò che risulta è che le mappe T_1 e T_2 vengono misurate indipendentemente l'una dall'altra e quindi non è possibile che tra le due vi sia propagazione di errore. La presenza nella sequenza dell'impulso di saturazione, invece che una semplice inversione, permette di valutare localmente il campo B_1 . Una volta acquisiti T_1 , T_2 e B_1 è possibile ricavare la densità protonica. La valutazione dei parametri viene fatta utilizzando il sistema Synthetic MRI assumendo per i tempi di rilassamento un decadimento mono-esponenziale. Questo aspetto è da tenere in

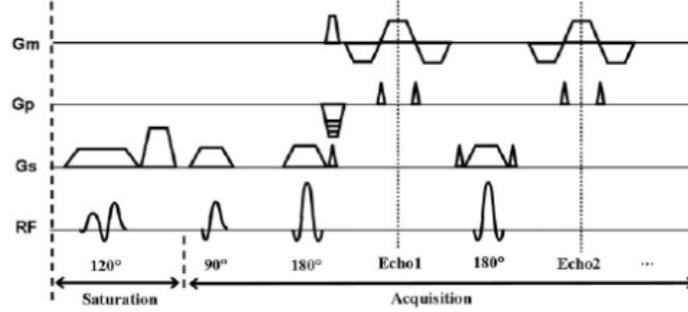


Figura 1.4: Rappresentazione schematica di un blocco di sequenza QRAPMASTER riportata da Warntjes et al. [10].

considerazione in quanto, come si è visto precedentemente (sezione 1.1), la distribuzione dell'acqua negli ambienti microscopici è più propriamente descritta da un decadimento multi esponenziale [10].

Il protocollo di qMRS proposto da Tisell et al. [2] è stato implementato su uno scanner MR clinico a 1.5 T e testato un gruppo di soggetti sani (47) prendendo in analisi due diverse zone, un *voxel* della sostanza bianca e uno di talamo entrambi con VOI di lato 12-15 mM. Il protocollo prevede l'acquisizione di due spettri in un'unica scansione utilizzando la sequenza PRESS con $TE = 30$ ms e $TR = 3$ s, uno con soppressione del segnale dell'acqua e uno senza. Nella stessa sessione, inoltre, si acquisiscono i dati qMRI relativi al volume dell'intero cervello utilizzando il metodo QRAPMASTER con TE variato tra 21 e 83 ms e TR pari a 3.7 s. Questi ultimi vengono elaborati dal sistema SyMRI che fornisce le mappe di \hat{T}_{1,H_2O} , \hat{T}_{2,H_2O} e \hat{C}_{H_2O} . Utilizzando un programma sviluppato in Matlab si combinano i VOI e i dati qMRI e, infine, si calcolano i fattori di scala che andranno poi applicati a $C_{met,WS}$ eq.(1.7). In particolare è possibile calcolare le concentrazioni assolute dei metaboliti ($C_{met,ABS}$) utilizzando il fattore

$$F_{ABS} = \frac{1}{N_{VOI}} \sum_{j=1}^{N_{VOI}} \hat{C}_{H_2O,j} \left(1 - e^{-\frac{TR}{\hat{T}_{1,H_2O,j}}} \right) e^{-\frac{TE}{\hat{T}_{2,H_2O,j}}}, \quad (1.10)$$

oppure le concentrazioni acquose ($C_{met,AQ}$) in mM aq. scalando $C_{met,WS}$ di un fattore che non prevede la correzione per C_{H_2O}

$$F_{AQ} = \frac{\sum_{j=1}^{N_{VOI}} \hat{C}_{H_2O,j} \left(1 - e^{-\frac{TR}{\hat{T}_{1,H_2O,j}}} \right) e^{-\frac{TE}{\hat{T}_{2,H_2O,j}}}}{\sum_{j=1}^{N_{VOI}} \hat{C}_{H_2O,j}}. \quad (1.11)$$

N_{VOI} rappresenta il numero di *voxel* di qMRI all'interno di un volume di interesse spettroscopico, TR e TE sono rispettivamente il tempo di ripetizione e il tempo di eco

	tCr	mIns	tCho	tNAA	Glx
sostanza bianca					
ABS [mM]	4.20±0.34	3.69±0.70	1.66±0.19	7.76±0.91	7.20±1.38
AQ [mM aq.]	6.34±0.44	5.57±1.01	2.51±0.30	11.71±1.30	10.88±2.10
Talamo					
ABS [mM]	5.58±0.45	3.95±0.70	1.67±0.20	8.73±0.57	10.89±1.67
AQ [mM aq.]	7.52±0.60	5.53±1.02	2.34±0.28	12.20±0.77	15.22±2.27

Tabella 1.2: Sono riportate le concentrazioni dei metaboliti nella sostanza bianca e nel talamo come media \pm deviazione standard dei soggetti sani analizzati in [2].

spettroscopici, $\hat{C}_{\text{H}_2\text{O},j}$, $\hat{T}_{1,\text{H}_2\text{O},j}$ e $\hat{T}_{2,\text{H}_2\text{O},j}$ sono la frazione di H_2O e i tempi di rilassamento misurati all'interno del j -esimo *voxel* di qMRI, con j indice dei *voxel* all'interno del VOI. Infine il programma LCMoDel combinato con un set di metaboliti sperimentale calcola le concentrazioni assolute $C_{\text{met,ABS}}$ e la frazione acquosa $C_{\text{met,AQ}}$ impostando come valore di riferimento per $C_{\text{H}_2\text{O}}$ 55.047 mM.

In tabella 1.2 si riportano i valori ottenuti per le concentrazioni dei metaboliti. Il protocollo presentato non include alcuna correzione per gli effetti di rilassamento relativi ai metaboliti. Come si osserva nell'equazione (1.8) e (1.9) il rilassamento del metabolita influenza la concentrazione dello stesso, quindi l'accuratezza delle concentrazioni di metaboliti stimate e riportate in tabella 1.2 sarà distorta a causa degli effetti di rilassamento dei metaboliti. Infatti, se si confrontano le concentrazioni assolute ottenute da Tisell et al. [2] con quelle ottenute da Malucelli et al. [1] nel protocollo IP, per la sostanza bianca le prime risultano minori rispetto alle seconde. Questa differenza, in parte, può anche essere attribuita alla stima approssimativa dei tempi di rilassamento dell'acqua dovuta al numero limitato di TE usati per T_2 e di soli due TR per T_1 .

Una cosa interessante da notare è che i fattori di scala che si ottengono nella sostanza bianca ($F_{\text{ABS}} = 0.461 \pm 0.015$ e $F_{\text{AQ}} = 0.696 \pm 0.019$) e nel talamo ($F_{\text{ABS}} = 0.489 \pm 0.020$ e $F_{\text{AQ}} = 0.684 \pm 0.022$) sono significativamente differenti e questo sottolinea l'importanza dell'utilizzo di fattori di scala tessuto-specifici. Tuttavia, il metodo non riporta una correzione per il volume parziale di liquido cerebrospinale, in quanto la localizzazione dei VOI non la richiede. Invece, è necessario tenerne conto quando si analizzano tessuti patologici o eterogenei. West et al. [11] hanno dimostrato che utilizzando il metodo QRAPMASTER [10] è possibile classificare i tessuti in sostanza bianca, sostanza grigia e CSF attraverso una segmentazione con relativa stima del volume. In questo modo, il volume parziale di CSF in ogni VOI spettroscopico può essere calcolato e, combinandolo con le misurazioni del volume parziale nell'insieme di *voxel* di qMRI corrispondenti, il VOI può essere corretto in base al contenuto di tessuto.

In conclusione, la quantificazione condotta attraverso la combinazione di qMRI e qMRS si basa interamente su protocolli standard per gli scanner MR e questo la rende di semplice applicazione in ambito clinico. Inoltre, la quantificazione risulta indipendente dall'utente, potenzialmente automatizzabile in maniera completa e, cosa più importante, non richiede alcuna conoscenza preliminare del tessuto analizzato. Un altro vantaggio è quello di poter posizionare all'interno dello stesso volume di qMRI un numero arbitrario di volumi di interesse acquisiti con spettroscopia di risonanza magnetica con altrettanto arbitraria angolazione, e ciò permette di poter calibrare nello stesso modo anche le tecniche MRS *multi-voxel*. Questo metodo è molto utile perché permette, attraverso l'acquisizione di due soli spettri e di un'immagine del volume completo, di limitare i tempi di acquisizione a circa 7 minuti [2], ottenendo però oltre ai parametri di correzione per i dati MRS anche la caratterizzazione del tessuto analizzato.

Capitolo 2

Metodi di quantificazione assoluta con riferimento esterno

Il rilevamento del segnale MR avviene attraverso l'utilizzo di un campo B_1 , che genera una magnetizzazione trasversale degli spin precedentemente allineati dalla presenza di un campo magnetico statico B_0 . Tale magnetizzazione induce una forza elettromotrice nella bobina di radiofrequenza, la quale generalmente funge sia da trasmettitore che da ricevitore, che si traduce in un segnale rilevabile. La magnetizzazione dipende dalla distribuzione prodotta dalla bobina di radiofrequenza utilizzata durante la trasmissione (B_{1t}^+), dai tempi di rilassamento degli spin misurati, dalla temperatura del campione e dal campo B_0 . La forza elettromotrice generata nella bobina dipende dalla sensibilità alla ricezione della stessa e produce un segnale la cui intensità dipende dal carico della bobina che va a sommarsi all'impedenza totale [3]. La conoscenza di questi fattori è necessaria per ricavare le concentrazioni metaboliche assolute, le quali, come visto in precedenza, dipendono sia dalle caratteristiche di rilassamento che dalla concentrazione dei nuclei, quindi degli spin. Per ottenere le concentrazioni assolute non note a priori è necessario utilizzare un segnale di riferimento.

L'uso del riferimento interno dell'acqua ha un vantaggio significativo rispetto ad altri metodi di calibrazione, infatti, la rilevazione del segnale prodotto dall'acqua interna e quella del segnale del metabolita si ottengono a parità di condizioni sperimentali con lo stesso campo di trasmissione a radiofrequenza (B_1^+) e la stessa sensibilità di ricezione. La concentrazione ottenuta determinata dal rapporto dei due segnali è quindi pressoché indipendente da queste grandezze. Tale metodo si basa generalmente sul presupposto che la concentrazione nel volume localizzato e il comportamento di rilassamento del segnale dell'acqua possano essere stimati in modo affidabile. Tuttavia, la densità relativa dell'acqua potrebbe cambiare a causa di malattie, variare durante il giorno o con l'età, quindi, in particolare nei casi clinicamente rilevanti, l'acqua potrebbe non essere un riferimento affidabile.

In alternativa può essere utilizzato come segnale di riferimento quello acquisito in un

fantoccio, ovvero in un contenitore di forma geometrica (cilindrico o sferico) all'interno del quale è posta una soluzione (creatina, acqua, ...) a concentrazione nota. Tuttavia, questo metodo di quantificazione è affetto da una mancata corrispondenza delle condizioni di carico della bobina tra le misurazioni *in vivo* e nel fantoccio. Infatti, le perdite induttive nel campione, che scalano i segnali indotti nella bobina, risultano differenti. L'altro fattore che inficia la coerenza di segnale delle due misurazioni è la sensibilità della bobina di ricezione, la quale risente della disomogeneità del campo B_1^+ . Per questo è necessario sviluppare protocolli di calibrazione per l'acquisizione del segnale nel riferimento esterno.

Esistono due approcci di misurazione delle concentrazioni nel fantoccio denominati “*in place*” e “*in time*”. L'approccio “*in time*” richiede uno o più piccoli fantocci che vengono posizionati accanto alla testa del paziente durante la scansione spettroscopica. Questo metodo è poco utilizzato perché il *voxel* acquisito *in vivo* e quello acquisito nel fantoccio sono diversi e possono fornire valori compromessi per quanto riguarda la corrispondenza tra i due segnali, poiché la sensibilità di ricezione della bobina dipende dalla localizzazione del VOI. Questo problema si risolve con l'approccio “*in place*”, poiché i segnali del fantoccio vengono acquisiti successivamente alla scansione spettroscopica sul paziente in modo da utilizzare lo stesso *voxel* [7]. Tuttavia, è comunque necessario utilizzare dei protocolli di calibrazione adeguati alla configurazione di misura che si utilizza (intensità di campo magnetico, caratteristiche della bobina, ...).

Zoelch et al. [3] propongono un approccio di quantificazione che utilizza il principio di reciprocità in campi magnetici di intensità 3 T per valutare i cambiamenti della sensibilità di ricezione. Una bobina ricetrasmittente di volume che interagisce con il sistema di spin può essere modellata come un circuito elettrico con una sorgente di tensione V_{MR} e un'impedenza totale $Z_{coil,tot}$, data dalla somma dell'impedenza totale della bobina e della resistenza dovuta al campione. Per reciprocità, la tensione indotta nella bobina dai momenti magnetici di precessione aventi frequenza ω nel campione, V_{MR} , dipende dal vettore di magnetizzazione trasversale M^+ e da B_{1r}^- che è il campo generato nella bobina di ricezione di verso opposto a quello della precessione nucleare. Se B_{1r}^- può essere considerato omogeneo all'interno del VOI e M^+ nullo all'esterno allora risulta che

$$|V_{MR}| = 2\omega|M_{VOI}^+||B_{1r}^-|. \quad (2.1)$$

B_{1r}^- a basse intensità di campo magnetico e nel caso di una bobina ricetrasmittente è uguale a B_{1t}^+ in modulo. Tuttavia, aumentando l'intensità del campo magnetico di trasmissione l'eguaglianza non sussiste più a causa dell'interazione con il campione. A 3 T si considera la relazione

$$|B_{1r}^-| = |B_{1t}^+|C_p \quad (2.2)$$

C_p è il fattore di correzione che tiene conto della differenza tra la sensibilità di trasmissione e di ricezione. Nel lavoro di Zoelch et al. [3] C_p viene stimato, per ogni VOI acquisito *in vivo*, utilizzando mappe di sensibilità alla ricezione (RX_{map}). Esse sono prodotte da

un'immagine spin-eco, ottenuta con TE e TR ottimali per minimizzare il contrasto e corretta con una mappa *gradient-echo* con spostamento Bloch-Siegert relativa a $|B_{1t}^+|$. In questo modo le RX_{map} forniscono informazioni sulla variazione spaziale della sensibilità di ricezione all'interno della bobina. C_p di calibrazione nel fantoccio ($C_{p,\text{cal}}$) si assume circa 1 poiché la misurazione è fatta al centro della bobina.

Il segnale NMR rilevato si suppone proporzionale alla corrente che scorre lungo la catena di ricezione collegata alla bobina, I_{rchain} , che viene considerata come un'impedenza Z_{rchain}

$$S_m \propto I_{\text{rchain}} = \frac{|V_{\text{MR}}|}{Z_{\text{coil,tot}} + Z_{\text{rchain}}} = \frac{2\omega|M_{\text{VOI}}^+||B_{1t}^+|C_p}{Z_{\text{coil,tot}} + Z_{\text{rchain}}}. \quad (2.3)$$

$|B_{1t}^+|$ può essere stimato misurando la corrente $|I_t|$ che deve scorrere nella bobina affinché si ottenga un angolo di rotazione $\phi = \gamma|B_{1t}^+|\tau$, con γ fattore giromagnetico e τ durata dell'impulso di eccitazione. Poiché gli scanner misurano la tensione in uscita, controllata da un parametro, detto *drive scale* (DS), che permette di gestire l'angolo di rotazione ϕ , è possibile scrivere $|B_{1t}^+|$ come

$$|B_{1t}^+| = \frac{\phi}{\gamma\tau} \frac{Z_{\text{coil,tot}} + Z_{\text{amp}}}{DS} \quad (2.4)$$

dove Z_{amp} è l'impedenza dell'amplificatore. Il fattore DS viene scelto attraverso un processo di ottimizzazione della potenza selettiva del volume, grazie al quale aggiustando l'angolo di rotazione si ottiene il guadagno ottimale per il trasmettitore RF. Questo è determinato automaticamente all'interno del VOI e non necessita di altre calibrazioni tra una scansione e l'altra [12].

$|M_{\text{VOI}}^+|$ (eq.(2.3)) è dato dalla magnetizzazione all'equilibrio del VOI modulata da una funzione di $|B_{1t}^+|$ che quantifica localmente la proiezione sul piano trasversale. La magnetizzazione all'equilibrio dipende dal numero totale dei nuclei N_m con numero quantico di spin j , dal campo di magnetizzazione statica B_0 da alcune costanti fisiche come \hbar e k costante di Boltzmann

$$|M_{\text{VOI}}^+| = \frac{N_m\gamma^2\hbar^2j(j+1)B_0}{3kT} f(|B_{1t}^+|). \quad (2.5)$$

N_m nel VOI può essere calcolato confrontando il segnale S_m con il segnale di calibrazione $S_{\text{ref,cal}}$ rilevato nella soluzione di riferimento all'interno del fantoccio nel seguente modo

$$N_m = \frac{S_m}{S_{\text{ref,cal}}} \frac{DS}{DS_{\text{cal}}} \frac{C_{p,\text{cal}}}{C_p} \frac{f(|B_{1t,\text{cal}}^+|)}{f(|B_{1t}^+|)} \frac{T}{T_{\text{cal}}} N_{\text{ref,cal}} \quad (2.6)$$

dove pedice "cal" si riferisce alle quantità ottenute dalla misurazione del fantoccio, invece "ref" è apposto al composto di riferimento in esso contenuto. È importante che DS_{cal} sia determinato in corrispondenza dello stesso angolo e con il medesimo tempo di eccitazione

della misurazione *in vivo*. Inoltre, i nuclei del metabolita e quelli del campione devono avere lo stesso numero di spin e la stessa frequenza. $N_{\text{ref,cal}}$ è determinata poiché si conosce la concentrazione del campione di riferimento all'interno del volume del fantoccio e il numero di nuclei ^1H della molecola. Sostituendo le equazioni (2.4) e (2.5) nella (2.3) e scrivendo $\omega = \gamma B_0$ il segnale prodotto dal metabolita può essere scritto in funzione di parametri noti o misurabili:

$$S_m \propto N_m \frac{2\omega^2 \gamma \hbar^2 j(j+1) f(|B_{1t}^+|)}{3kT(Z_{\text{coil,tot}} + Z_{\text{rchain}})} \frac{Z_{\text{coil,tot}} + Z_{\text{amp}}}{DS} \frac{\phi C_p}{\gamma \tau}. \quad (2.7)$$

Inoltre, supponendo che sia l'amplificatore che la catena di ricezione abbiano un'impedenza di 50Ω , come risulta nella maggior parte degli scanner, i fattori di impedenza possono essere trascurati.

A questo punto è possibile calcolare la concentrazione del metabolita includendo il numero di nuclei ^1H della molecola, I_m , gli effetti di rilassamento noti in letteratura per il metabolita R_m e quelli del campione $R_{\text{ref,cal}}$ misurati nel fantoccio. Infine si determina la frazione di volume di liquido cerebrospinale f_{CSF} nel volume localizzato V che va sottratta allo stesso; la misura viene fatta con un metodo di risonanza magnetica funzionale [13].

$$c_m^{DS} = \frac{S_m}{S_{\text{ref,cal}}} \frac{R_{\text{ref,cal}}}{R_m} \frac{DS}{DS_{\text{cal}}} \frac{C_{p,\text{cal}}}{C_p} \frac{f(|B_{1t,\text{cal}}^+|)}{f(|B_{1t}^+|)} \frac{T}{T_{\text{cal}}} \frac{N_{\text{ref,cal}}}{I_m V (1 - f_{\text{CSF}})} \quad (2.8)$$

Si riporta in figura 2.1 lo schema di acquisizione per ottenere la concentrazione del metabolita.

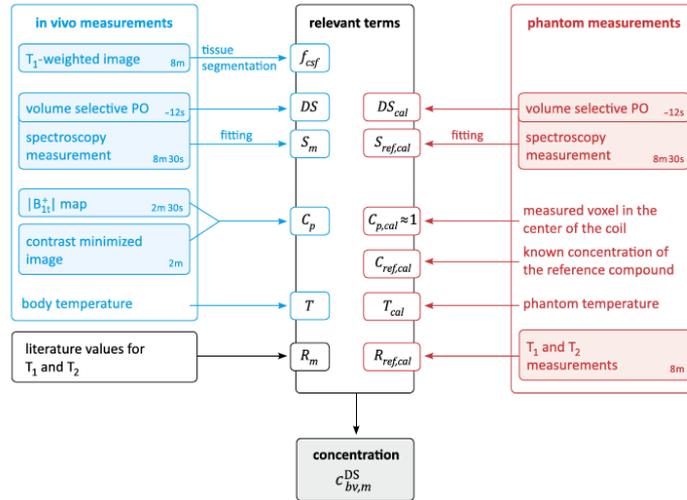


Figura 2.1: Schema riassuntivo delle misurazioni chiave per il calcolo della concentrazione metabolica con il metodo proposto da Zoelch et al. [3].

	tNAA [mM]	tCr [mM]	Cho [mM]	mI [mM]
R	8.58±0.35	5.40±0.59	1.46±0.18	4.73±1.40
M	9.07±0.46	7.49±0.45	1.53±0.16	5.79±0.62
L	8.90±0.60	5.45±0.55	1.47±0.21	4.40±1.34

Tabella 2.1: Concentrazioni assolute dei metaboliti come media \pm deviazione standard in mM che sono state calcolate per le tre diverse zone scansionate da Zoelch et al. [3].

Il metodo è stato testato su 35 soggetti sani e i volumi di interesse scansionati sono tre (L, M, R) nella zona a cavallo della fissura cerebrale longitudinale appena sopra il talamo e il corpo calloso. Il segnale dei metaboliti *in vivo* viene acquisito con uno scanner a 3 T utilizzando una sequenza PRESS con modulo di soppressione dell'acqua VAPOR (*VARIABLE Pulse power and Optimized Relaxation delays*) ($TE = 30$ ms, $TR = 1800$ ms). Come riferimento esterno è stata scelta una soluzione di acqua distillata e drogata con concentrazioni di sali (15 mM di sodio azide, 50 mM di potassio fosfato monobasico e 56 mM di idrossido di sodio) per diminuire il T_1 . Sono stati utilizzati due diversi fantocci sferici di diametro rispettivamente (18 e 8.5 cm) e la concentrazione del riferimento per il calcolo di $N_{\text{ref,cal}}$ è stata assunta 55.40 M. I risultati ottenuti per i metaboliti, mediati sul gruppo di pazienti, sono riportati in tabella 2.1 per tutte e tre i VOI analizzati. Essi risultano in accordo con i valori noti in letteratura.

In conclusione, il metodo riportato rappresenta una valida alternativa alla quantificazione con riferimento interno in quanto non risente di variazioni dovute a patologie o condizioni fisiologiche e prevede procedure di aggiustamento del segnale che permettono una valutazione delle concentrazioni in accordo con i valori noti in letteratura.

Esiste un secondo tipo di riferimento esterno. Il metodo ERETIC (*Electric Reference To access In vivo Concentrations*) utilizza un segnale di riferimento sintetico che viene indotto per mezzo di una piccola bobina ad anello che si accoppia alla bobina RF (figura 2.2). Questo segnale di riferimento a bassa potenza viene attivato solo durante l'acquisizione e simula il decadimento di induzione libera (FID) dei segnali di spin, che darà origine a un picco aggiuntivo con andamento Lorentziano nello spettro. ERETIC offre diversi vantaggi poiché (i) è applicabile a tutti i nuclei; (ii) gli spettri possono essere acquisiti contemporaneamente al segnale di riferimento artificiale riducendo così il tempo di scansione; (iii) si ottiene il segnale in ricezione scalato con il carico della bobina e il guadagno del ricevitore e (iv) l'intensità del segnale non è influenzata da variazioni dovute a patologie o altre condizioni mediche. Inoltre, l'ampiezza del segnale ERETIC è indipendente da TE e TR . Tuttavia questo metodo necessita di una correzione per l'eventuale inhomogeneità del campo B_1^+ ed è suscettibile a errori per quanto riguarda l'ottimizzazione della potenza.

Le sfide principali da affrontare nello sviluppo di un protocollo clinico che utilizza questo tipo di riferimento sono il raggiungimento di un segnale ERETIC stabile e la

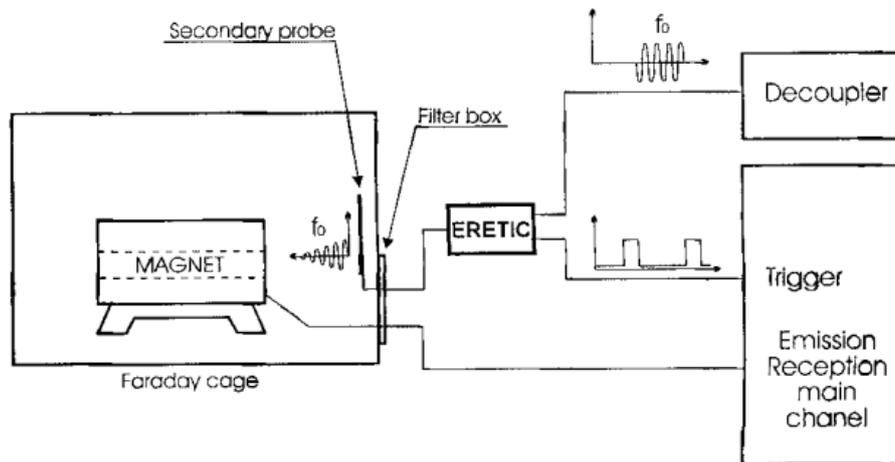


Figura 2.2: Schema dell'hardware di acquisizione del segnale ERETIC utilizzato da Barantin et al. [14] in cui la bobina (*Secondary Probe*) che produce il segnale è posta di fronte al magnete.

costruzione di una configurazione hardware e software.

Nell'applicazione di ERETIC è determinante il modo in cui il segnale sintetico viene trasmesso in quanto determina la stabilità del segnale. L'utilizzo della trasmissione con radiazione causa variazioni ogni volta che l'accoppiamento reciproco tra l'anello e la bobina di ricezione cambia, se invece si trasmette il segnale di calibrazione attraverso una linea elettrica possono verificarsi accoppiamenti parassiti con conseguente variazione di segnale nel caso in cui la posizione dei cavi non si mantiene invariata nelle diverse scansioni. Meno problematica è la trasmissione attraverso fibra ottica con cui del segnale ERETIC risulta avere una buona stabilità, una piccola variabilità inter-scansione ed è ben scalato con il carico della bobina.

Infatti, è dimostrabile [15] che segnali di ERETIC e del metabolita scalano in modo simile relativamente ai cambiamenti nel carico della bobina. Per mostrare tale comportamento, sono state simulate diverse condizioni di carico utilizzando resistori da $1k\Omega$ in parallelo collegati alla bobina attraverso interruttori. In tal modo è possibile creare tutte le combinazioni possibili, includendo o escludendo i resistori. Con la configurazione proposta è possibile trascurare gli effetti dovuti a B_1^+ , le modifiche alle impostazioni dello scanner e l'ottimizzazione automatica della potenza. Le scansioni che sono state acquisite utilizzando una singola sequenza *voxel* PRESS ($TR = 2000$ ms, $TE = 144$ ms) mostrano che l'ampiezza di segnale di ERETIC scala in modo coerente con il segnale del metabolita. Quindi si può assumere che non sia necessario alcun aggiustamento per quanto riguarda il carico della bobina.

La concentrazione di un dato metabolita è determinata confrontando l'intensità del

segnale nello spettro con quella del segnale di ERETIC acquisiti *in vivo*, secondo la seguente relazione [15]

$$c_{\text{met}} = \frac{k c_{\text{ERETIC}} A_{\text{met,invivo}}}{A_{\text{ERETIC,invivo}}} \quad (2.9)$$

dove k è il numero di nuclei che contribuiscono alle linee di risonanza, $A_{\text{met,invivo}}$ e $A_{\text{ERETIC,invivo}}$ sono rispettivamente le aree del segnale del metabolita e di ERETIC acquisiti *in vivo* e c_{ERETIC} è la concentrazione equivalente del picco ERETIC, la quale deve essere determinata in anticipo utilizzando una soluzione di calibrazione a concentrazione nota.

$$c_{\text{ERETIC}} = \frac{c_{\text{calib}} A_{\text{ERETIC,invitro}}}{A_{\text{calib}}} \quad (2.10)$$

dove $A_{\text{ERETIC,invitro}}$ e A_{calib} sono rispettivamente l'area del segnale di calibrazione e del picco ERETIC acquisite nel campione e c_{calib} è la concentrazione della soluzione di calibrazione.

L'utilizzo di questo protocollo, oltre a un'elevata riproducibilità *in vitro*, ha prodotto delle concentrazioni quantificate di acqua e metaboliti registrate *in vivo* che rientrano negli intervalli comunemente riportati in letteratura [15].

L'impulso ERETIC è stato completamente integrato nel software dello scanner, che consente all'utente di attivare la quantificazione sulla *console* dello scanner e di modificare la fase, la forma e l'ampiezza ERETIC per la misurazione spettroscopica.

Come detto in precedenza il metodo ERETIC è influenzato dalle disomogeneità spaziali del campo B_1 . Zoelch et al. [16] propongono una procedura di ottimizzazione della potenza selettiva del volume per ridurre al minimo le differenze del campo di trasmissione (B_1^+), mentre i cambiamenti della sensibilità di ricezione vengono corretti utilizzando l'imaging a contrasto ridotto e adattando la posizione del *voxel* nella misurazione fantoccio di calibrazione alla posizione misurata *in vivo*.

In conclusione, l'implementazione di ERETIC è una valida alternativa all'utilizzo del riferimento interno dell'acqua per la spettroscopia di risonanza magnetica, ma le concentrazioni assolute possono essere ottenute con elevata precisione solo se si considera l'influenza della dipendenza spaziale della sensibilità di ricezione. Togliendo la calibrazione della sensibilità di ricezione, la metodologia è completamente automatizzata e integrata nella *console* dello scanner e questo la rende facilmente utilizzabile all'interno di protocolli clinici.

Capitolo 3

Esempi di utilizzo di spettroscopia di MR quantitativa per tecniche diagnostiche

I metodi presentati nei capitoli precedenti hanno lo scopo di fornire le concentrazioni metaboliche assolute con grande accuratezza e nel minor tempo di scansione possibile. Tuttavia l'applicazione clinica per la diagnosi di disturbi neurologici può determinare limitazioni nella stima di alcune correzioni o di alcuni parametri. Si nota che le correzioni dei tempi di rilassamento dei metaboliti e dell'acqua vengono eseguite raramente in una pratica clinica di routine. Poiché gli spettri acquisiti con TE lunghi sono più vulnerabili ai cambiamenti nei tempi di rilassamento T_2 rispetto a quelli con TE brevi, prediligendo questi ultimi è possibile trascurare le correzioni con lo scopo di ridurre i tempi di scansione. Per ridurre il numero di scansioni c'è la propensione a utilizzare come tempi di rilassamento quelli riportati in letteratura piuttosto che avanzare un'indagine individuale. Il segnale interno dell'acqua, come è stato più volte riportato, può non essere attendibile come riferimento, perché determinate condizioni patologiche potrebbero alterarlo. Per questo si predilige l'uso di un riferimento esterno, oppure, dove è possibile, come è riportato da Choi et al. [17], si possono utilizzare metodi differenziali che permettono di trascurare le sottostime o le sovrastime dovute agli effetti di rilassamento. Ciò che risulta è che il set-up sperimentale che viene messo in atto è strettamente legato agli effetti e alle caratteristiche della patologia indagata.

3.1 Esempio di utilizzo di spettroscopia di MR quantitativa per la diagnosi dei tumori cerebrali

L'isocitrato deidrogenasi (IDH) è un'enzima che converte l'isocitrato in α -chetoglutarato (α KG) nel citosol (IDH1) e nei mitocondri (IDH2). L'Organizzazione mondiale della

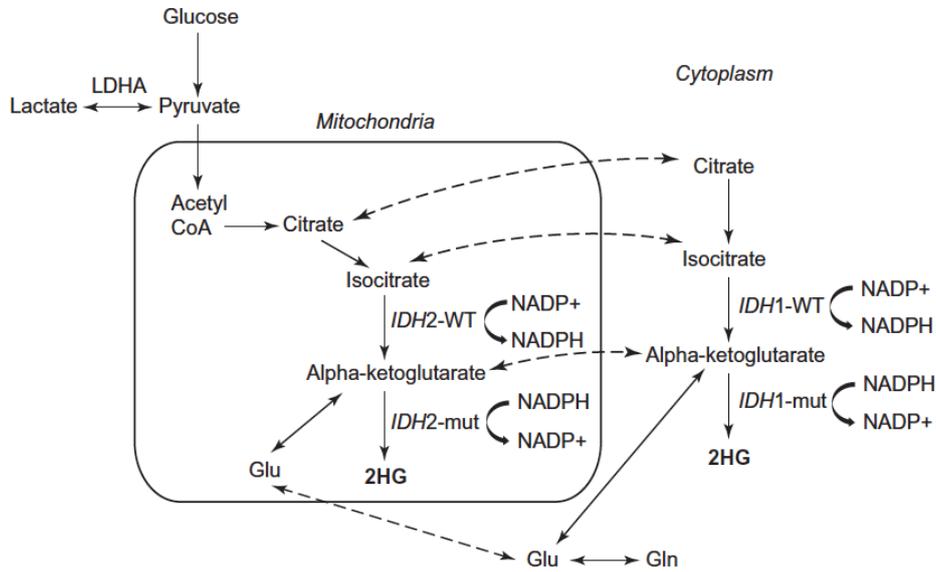


Figura 3.1: Schema della via metabolica del D-2-idrossiglutarato nel citosol e nei mitocondri riportato nel lavoro di Branzoli et al. [18].

sanità (OMS) ha messo in luce la presenza di mutazioni di IDH1 e IDH2 in pazienti con gliomi di stadio 2 e 3. Tali mutazioni sono confinate al sito attivo dell'enzima e portano ad un guadagno di funzione che determina la sovrapproduzione di D-2-idrossiglutarato (2HG) e induce iper metilazione del DNA; si riporta in figura 3.1 uno schema della via metabolica di 2HG. L'aumento della quantità di 2HG può essere utilizzato come marcatore diagnostico e prognostico nei gliomi ed essere rilevato in modo non invasivo con la spettroscopia MR. Una molecola 2HG ha cinque idrogeni legati ai carboni (figura 3.2), che risuonano a 4.02 ppm, 2.27 ppm, 2.22 ppm, 1.98 ppm e 1.83 ppm, dando luogo a multipletti di risonanza in tre posizioni per spettri acquisiti a 3 T. Nello specifico si ha un picco a 4.02 ppm prodotto da H2, uno a 2.25 ppm relativo a H4 e H4' e uno a 1.9 ppm prodotto da H3 e H3' (figura 3.2). Le risonanze di 2HG sono tutte accoppiate scalarmente e, di conseguenza, il pattern spettrale e la forza del segnale dipendono dal tempo di eco della sequenza MRS.

Nello studio condotto da Choi et al. [17], per quantificare la concentrazione di 2HG in pazienti con diagnosi di glioma, si propone di utilizzare sequenze PRESS in scanner a 3 T. Per ottenere i parametri di scansione ottimali per il rilevamento dei picchi di risonanza di 2HG viene utilizzato un metodo che, attraverso simulazioni quantomeccaniche, fornisce i giusti tempi di eco. Si ottiene che per avere un valore massimo prodotto da H4, H4' il tempo di eco totale deve essere compreso tra 90 e 100 ms. La sequenza deve essere composta da due tempi di sub-eco differenti e il primo TE_1 deve essere minore del secondo TE_2 ($TE_1 = 32$ ms, $TE_2 = 65$ ms).

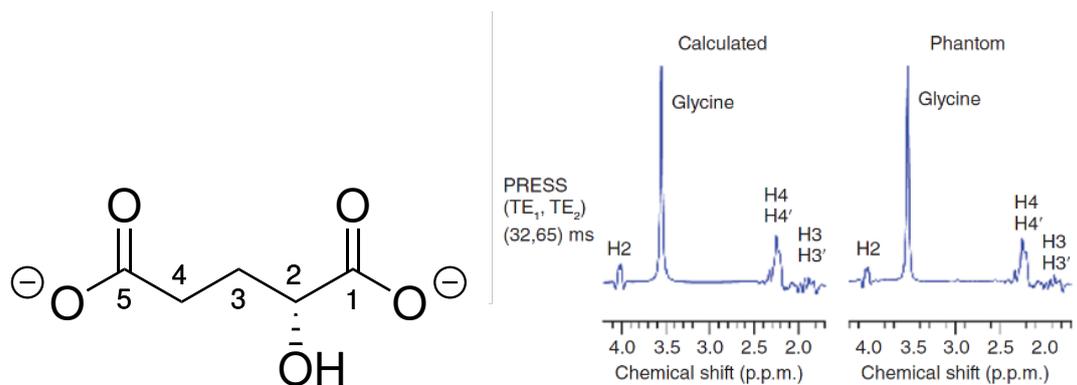


Figura 3.2: A sinistra: struttura molecolare del D-2-idrossiglutarato. A destra: spettri di 2-idrossiglutarato in cui si mette in evidenza la risonanza dei diversi protoni, riportato da Choi et al. [17].

La risonanza di H2, come si vede in figura 3.2, è spettralmente distante da H3, con cui ha però un debole accoppiamento. Al fine di rilevare il segnale prodotto da H2 si modifica la sequenza PRESS facendo ruotare di 180° selettivamente solo gli spin di H3 per indurre il segnale di H2. Sottraendo lo spettro così generato a quello ottenuto dalla sequenza PRESS canonica è possibile ottenere i multipletti di risonanza di H2. Affinché il picco di H2, sia visibile sono necessari TE_1 il più brevi possibile ($TE_1 = 26$ ms, $TE_2 = 80$ ms). In figura 3.3 si riportano le immagini di localizzazione del *voxel* e gli spettri acquisiti da Choi et al. [17] con la sequenza PRESS ottimizzata in un cervello sano e in diversi stadi di tumori cerebrali in cui si evidenzia il segnale di 2HG e la sua concentrazione.

Il metodo di ottimizzazione della sequenza PRESS viene utilizzato [19] per acquisire spettri con soppressione dell'acqua con $TR = 2$ s in 136 pazienti oncologici con glioma, posizionando uno o due *voxel* da 2 a 8 ml all'interno della massa tumorale. I tempi di scansione risultanti ammontano a circa 4 minuti e variano in base alle dimensioni del VOI. Per la quantificazione si utilizza il riferimento interno dell'acqua, si acquisisce uno spettro senza soppressione per ogni *voxel* analizzato impostando un valore di TE corto e utilizzando gli stessi parametri della sequenza precedente. I dati acquisiti sono stati analizzati con LCModel utilizzando un set di 21 metaboliti incluso il 2HG. Si considera la concentrazione dell'acqua equivalente per i vari tessuti pari a 42.3 M.

Il protocollo utilizzato non riporta alcuna correzione per i tempi di rilassamento. Il tempo di eco ottimizzato è relativamente lungo, quindi la perdita di segnale dovuta agli effetti di rilassamento trasversale può essere considerevole *in vivo*, ma l'utilizzo dell'editing differenziale permette di trascurare la correzione degli spettri per il rilassamento. Infatti, GABA, glutammato e glutammina hanno risonanze nella regione 2.1-2.4 ppm, pertanto i segnali negli spettri acquisiti con PRESS sono parzialmente sovrapposti a quello di 2HG (circa 2.25 ppm) e possono interferire con la sua stima. Per ottenere la

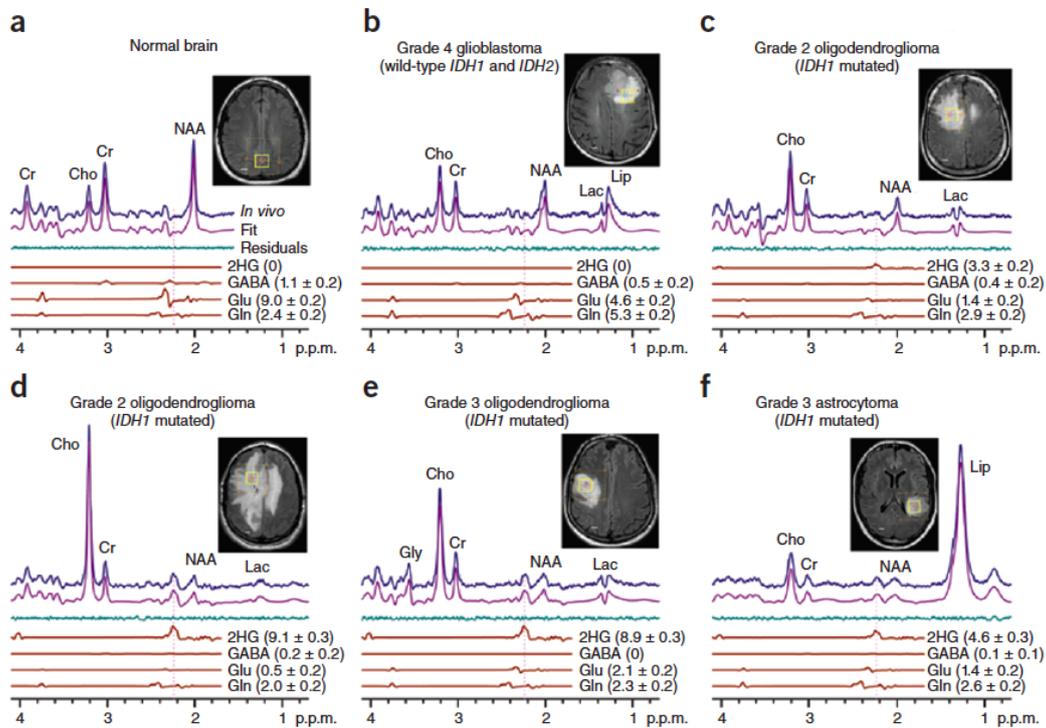


Figura 3.3: Spettri acquisiti *in vivo* a 3 T con relativa immagine che mostra la localizzazione del *voxel* ($2 \times 2 \times 2$ cm³) in (a) un cervello sano e in (b-f) tumori cerebrali a diversi stadi. Inoltre sono evidenziati gli andamenti di 2HG, GABA, glutammato e glutammina con relativa concentrazione (mM \pm deviazione standard) [17].

quantità di 2HG sono stati elaborati due metodi di editing differenziale [17]. Nel primo si confrontato gli andamenti spettrali fittati con dei set di base che contengono o meno il segnale di 2HG, da questo risulta che gli spettri con un segnale evidente a 2.25 ppm, quando fittati con un set di base senza segnale di 2HG, producono grandi residui in corrispondenza di tale valore. Questo dimostra che il segnale è principalmente attribuibile a 2HG. Nel secondo, in corrispondenza di un segnale distinguibile a 2.25 ppm negli spettri PRESS canonici, si rileva il segnale di H₂ a 4.02 ppm. Risulta che conseguentemente al mancato rilevamento negli spettri PRESS del segnale di 2HG non vi è la presenza di un picco osservabile a 4.02 ppm.

Anche se non è possibile considerare la spettroscopia di risonanza magnetica come unica tecnica diagnostica per i gliomi questi studi [17, 19] permettono di utilizzare il 2HG come bio-marcatore tumorale per verificare lo stadio della malattia, in quanto la concentrazione rilevata è direttamente correlabile allo stato tumorale e può rivelarsi utile anche per i controlli durante la fase di trattamento per verificare gli effetti. Infatti, dallo studio condotto da Choi et al. [20], in cui si confrontano gli spettri di 7 volontari sani

con quelli dei pazienti con glioma, emerge che sia per TE lunghi che per TE corti non è rilevabile alcun picco nella banda di frequenza 2.1-2.4 ppm nei soggetti sani, mentre nei soggetti con tumore nella stessa banda è sempre presente un pattern spettrale.

3.2 Esempio di utilizzo di spettroscopia di MR quantitativa per la diagnosi di malattie metaboliche

Come si legge nel sito di SIMMESN (Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale) [21] le malattie metaboliche ereditarie costituiscono una categoria di malattie genetiche causate dall'alterato funzionamento di una specifica via metabolica, ovvero l'insieme di trasformazioni che avvengono nel corpo umano che convertono prodotti di derivazione alimentare o composti già presenti rendendoli utilizzabili o impedendone l'accumulo. Una malattia metabolica può essere causata sia dal mancato funzionamento di un enzima, a causa di una modifica strutturale o funzionale della proteina o del cofattore, o da alterazioni nei meccanismi di trasporto cellulare. Le conseguenze del blocco della via metabolica possono essere:

- accumulo di composti (precursori) a monte del difetto biochimico con effetto tossico;
- assenza o scarsità dei prodotti finali della via metabolica (metaboliti), che può condurre ad un difetto di substrati essenziali o all'alterazione nella di produzione di energia;
- attivazione da parte dell'organismo di vie metaboliche collaterali con possibile produzione di metaboliti secondari, normalmente non presenti nel corpo umano e anch'essi potenzialmente tossici.

Il quadro clinico conseguente, che varia in funzione del tipo di difetto metabolico, è quindi dovuto alla tossicità dei metaboliti accumulati o alla mancanza di un prodotto importante che non viene sintetizzato o, infine, alla carenza di energia. Molto frequente è l'interessamento del sistema nervoso e più raramente sono presenti malattie limitate ad un solo organo (detto organo bersaglio).

All'origine del difetto metabolico vi è sempre un difetto genetico (mutazione del DNA) che causa la mancata produzione di un enzima o del suo cofattore o la loro produzione in forma non funzionale.

La malattia di Canavan è una forma rara di leucodistrofia causata da una carenza di aspartoacilasi, un enzima che idrolizza l'NAA in acetato e aspartato. Questo difetto metabolico porta all'accumulo di NAA nel plasma, nelle urine e nel cervello. Poiché l'NAA è il segnale più evidente negli spettri 1H MRS acquisiti *in vivo* nel cervello sano,

si ritiene che questa tecnica possa essere utilizzata per la diagnosi non invasiva di questa patologia. Siccome i disturbi neurometabolici sono estremamente rari, è necessario mettere insieme i dati acquisiti durante un periodo di tempo relativamente lungo. Pertanto, risulta molto importante che il protocollo abbia una buona riproducibilità a lungo termine affinché si abbiano informazioni sulla sua sensibilità. La riproducibilità dipende dal metodo di quantificazione che si utilizza.

Come già detto in precedenza la quantificazione assoluta dei metaboliti non è semplice e in particolare il contenuto e le proprietà di rilassamento dell'acqua nel cervello di pazienti affetti da disturbi neurometabolici, in particolare, la malattia di Canavan causa un aumento dell'acqua cellulare.

Skorupa et al. [22] propone un protocollo di valutazione della riproducibilità *in vitro* nel tempo come garanzia di qualità delle misurazioni attraverso ^1H MRS per poi interpretare retrospettivamente i dati ottenuti su pazienti affetti da malattia di Canavan e su altri con diagnosi di disturbi neurologici. La procedura proposta consiste nella valutazione della concentrazione dell'NAA utilizzando un riferimento esterno per calibrare gli spettri acquisiti *in vivo*. Si misura sia lo spettro con soppressione dell'acqua che senza con tempi di eco di 35 e 44 ms e un tempo di ripetizione di 1500 ms con una sequenza PRESS. Per ogni TE vengono acquisiti da uno a sei spettri in due diversi VOI da 8 ml localizzati nelle aree frontale, pre-ventricolare e occipito-parietale. La scelta di diversi *voxel* posti nella sostanza bianca di varie zone cerebrali permette di trascurare la correzione della disomogeneità di B_1 . Questo è possibile in quanto la malattia di Canavan causa variazione nella concentrazione di NAA non localizzate. Gli spettri vengono elaborati utilizzando LCModel con un set di basi combinazione lineare degli spettri dei singoli metaboliti precedentemente acquisiti *in vitro* e successivamente corretti da un fattore

$$f_{\text{scale}} = f_{\text{tra}} + f_{\text{gain}} + f_{\text{calib}} + f_{\text{T}} + \frac{1}{V}. \quad (3.1)$$

In cui f_{tra} è il fattore di correzione del carico della bobina che tiene conto del guadagno del trasmettitore (TG)

$$f_{\text{tra}} = 10^{0.005(TG-65)}, \quad (3.2)$$

f_{gain} è il fattore di correzione del guadagno in ricezione della bobina e dipende da due fattori R_1 e R_2 che sono rispettivamente i guadagni analogico e digitale in ricezione della bobina

$$f_{\text{gain}} = 2^{(6-\frac{R_1}{2})+(30-\frac{R_2}{2})}, \quad (3.3)$$

f_{calib} è il fattore di calibrazione ottenuto dal rapporto della concentrazione posta all'interno del campione c_{true} , il quale contiene una soluzione 12.5 mM di NAA in un solvente standard (1 mM TSP, 72 mM K_2HPO_4 , 28 mM KH_2PO_4 , 200 mM formiato di sodio, 1g/L NaN_3), e la concentrazione ottenuta dall'elaborazione condotta con LCModel, c_{LCM} , degli spettri acquisiti nel fantoccio utilizzando gli stessi parametri usati *in vivo*, corretta con i fattori f_{tra} e f_{gain} . La misurazione del campione viene fatta posizionandolo al

centro della bobina. V è il valore del volume del *voxel* analizzato e infine f_T è il fattore che corregge il segnale tenendo conto delle variazioni nel tempo del set-up dello scanner. Sono state condotte misurazioni periodiche sul campione utilizzando la medesima configurazione descritta in precedenza e la stessa elaborazione al fine di rilevare i cambiamenti nell'apparato di scansione. L'insieme dei momenti in cui avvengono le variazioni determinano dei periodi di tempo ognuno dei quali è caratterizzato da un valore di f_T calcolato come il rapporto tra la concentrazione di NAA misurata inizialmente e quella ottenuta per l'intervallo di tempo tenuto in considerazione.

Questo processo di quantificazione non tiene conto né delle correzioni di T_1 e di T_2 dei metaboliti né delle differenze di rilassamento tra le misurazioni *in vivo* e *in vitro*. Tuttavia, questo protocollo risulta molto valido nella valutazione storica su lunghi periodi di tempo garantendo la riproducibilità sul lungo periodo. I cambiamenti dipendenti dal tempo nei livelli di NAA *in vitro* sono indicatori sensibili, sebbene non specifici, dei cambiamenti dell'apparato di scansione come la frequenza di risonanza, gli angoli di vibrazione, la regolazione della bobina, la correzione del carico, la calibrazione del gradiente e le impostazioni del guadagno del ricevitore. Poiché tutti questi fattori sono importanti nella quantificazione assoluta dei metaboliti, il monitoraggio periodico della riproducibilità dello scanner presentato da Skorupa et al. [22] dovrebbe facilitare questo compito ed è adatto ad uno scanner clinico.

Capitolo 4

Conclusioni

Lo scopo di questo lavoro di tesi è di mostrare come può essere utilizzata la spettroscopia di risonanza magnetica per la quantificazione assoluta dei metaboliti cerebrali *in vivo*.

L'importanza di procedure che forniscano le concentrazioni millimolari dei metaboliti è data dal fatto che permettono di ottenere informazioni utili alla diagnosi di patologie che colpiscono il sistema nervoso centrale in maniera non invasiva.

La sfida principale per l'elaborazione di protocolli di quantificazione è trovare il giusto equilibrio tra l'accuratezza delle misure e il tempo di acquisizione; infatti, per poter essere impiegati questi protocolli in ambito clinico, è necessario che i tempi di scansione non siano troppo lunghi.

Il metodo di quantificazione assoluta che utilizza l'acqua interna come segnale di riferimento presenta il vantaggio di non essere affetto da errori legati all'hardware. Tuttavia, questo tipo di riferimento è soggetto a variabilità dovuta a vari fattori quali: patologie che ne modificano la quantità e tipo di tessuto analizzato; inoltre la presenza in concentrazioni diverse dell'acqua all'esterno delle cellule comporta che il segnale vada corretto per diversi tempi di rilassamento trasversale. Questi fattori influenzano il tempo richiesto per la scansione.

Il metodo di quantificazione assoluta che utilizza come segnale di riferimento quello acquisito in un campione esterno non è affetto da variabilità in quanto la soluzione campione viene preparata *ad hoc* a concentrazione nota, ma, poiché il fantoccio interagisce diversamente rispetto al cervello umano, è necessario elaborare delle procedure di calibrazione che correggano il carico della bobina e la diversa sensibilità dovuta alla disomogeneità del campo di magnetizzazione B_1 trasmesso. L'utilizzo di un segnale sintetico come riferimento permette di trascurare le correzioni del carico della bobina, ma necessita comunque dell'adattamento per la disomogeneità di B_1 . Tali correzioni possono essere fatte acquisendo delle mappe che permettono di associare l'intensità di B_1 ad ogni punto del *voxel*. Questo tipo di procedure permette di ridurre i tempi di acquisizione *in vivo* ma complica il set-up dell'hardware e il *post-processing*.

Nonostante i metodi proposti forniscano misure accurate, l'applicazione della quantificazione assoluta dei metaboliti con spettroscopia di risonanza magnetica in ambito clinico viene utilizzata adottando molte approssimazioni. Dal momento che le malattie legate al metabolismo cerebrale sono generalmente legate a una variazione in concentrazione di uno o più metaboliti, si elabora l'analisi specifica per ottimizzare la rilevazione dei metaboliti di interesse, cercando di massimizzare il rapporto segnale rumore e di correggere al meglio gli effetti dovuti alla disomogeneità di B_1 oppure di adottare strategie per rendere trascurabili le correzioni per i tempi di rilassamento. Questo permette di minimizzare i tempi di acquisizione, che rappresentano il maggiore ostacolo per l'applicabilità clinica di questi protocolli.

Bibliografia

- [1] Malucelli E. et al. «Pitfalls and advantages of different strategies for the absolute quantification of N-acetyl aspartate, creatine and choline in white and grey matter by 1H-MRS». In: *NMR Biomed* 22 (2009), pp. 1003–1013.
- [2] Tisell A. et al. «Procedure for quantitative 1H magnetic resonance spectroscopy and tissue characterization of human brain tissue based on the use of quantitative magnetic resonance imaging». In: *Magnetic Resonance in Medicine* 70 (2013), pp. 905–915.
- [3] Zoelch N., Hock A. e Henning A. «Quantitative magnetic resonance spectroscopy at 3T based on the principle of reciprocity». In: *NMR in Biomedicine* 31 (2018), e3875.
- [4] Tong Z. et al. «In vivo quantification of the metabolites in normal brain and brain tumors by proton MR spectroscopy using water as an internal standard». In: *Magn Reson Imaging* 22.7 (2004), pp. 1017–24.
- [5] Errico R. *Sviluppo di tecniche di segmentazione di immagini cerebrali*. 2011. URL: <http://www.infn.it/thesis/PDF/getfile.php?filename=7442-Errico-magistrale.pdf>.
- [6] Wilson M., Andronesi O.C. e Alger J.R. et al. «A Methodological consensus on clinical proton MR spectroscopy of the brain: review and recommendations». In: *Magn Reson Med* 82.2 (2019), pp. 527–550.
- [7] Buonocore M.H. e Maddock R.J. «Magnetic resonance spectroscopy of the brain: a review of physical principles and technical methods». In: *Rev. Neurosci.* 26.6 (2015), pp. 609–632.
- [8] Mlynarik V., Gruber S. e Moser E. «Proton T(1) and T(2) relaxation times of human brain metabolites at 3 Tesla». In: *NMR Biomed.* 14 (2001), pp. 325–331.
- [9] Jackson P.R. *Multieponential T2 and diffusion magnetic resonance measurements of glioma cells*. 2012. URL: https://escholarship.org/content/qt00g6d7qg/qt00g6d7qg_noSplash_a784ca49039e4dc045a1f7c1e9cbc21a.pdf.
- [10] Warntjes J.B.M. et al. «Rapid magnetic resonance quantification on the brain: optimization for clinical usage». In: *Magn Reson Med* 60 (2008), pp. 320–329.

- [11] West J., Warntjes J.B. e Lundberg P. «Novel whole brain segmentation and volume estimation using quantitative MRI». In: *Eur Radiol* 22 (2012), pp. 998–1007.
- [12] Versluis M.J. et al. «Improved signal to noise in proton spectroscopy of the human calf muscle at 7T using localized B1 calibration». In: *Magn Reson Med* 63 (2010), pp. 207–211.
- [13] Ashburner J. et al. «SPM8 manual». In: Functional Imaging Laboratory, Institute of Neurology, 2012.
- [14] Barantin L., Le Pape A. e Akoka S. «A New Method for Absolute Quantitation of MRS Metabolites». In: *Magn Reson Med* 38 (1997), pp. 179–182.
- [15] Heinzer-Schweizer S., De Zanche N. e Pavan M. et al. «In-vivo assessment of tissue metabolite levels using ^1H MRS and the electric reference to access in vivo concentrations (ERETIC) method». In: *NMR Biomed* 23 (2010), pp. 406–413.
- [16] Zoelch N. et al. «Accurate determination of brainmetabolite concentrations using ERETIC as external reference». In: *NMR Biomed* 30 (2017), e3731.
- [17] Choi C. et al. «2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in subjects with IDH-mutated gliomas». In: *Nature Medicine* 18.4 (2012), pp. 624–630.
- [18] Branzoli F. e Marjan'ska M. «Magnetic resonance spectroscopy of isocitrate dehydrogenase mutated gliomas: current knowledge on the neurochemical profile». In: *Neuroimaging* 33.4 (2020), pp. 413–421.
- [19] Choi C. et al. «Prospective Longitudinal Analysis of 2-Hydroxyglutarate Magnetic Resonance Spectroscopy Identifies Broad Clinical Utility for the Management of Patients With IDH-Mutant Glioma». In: *Journal of clinical oncology* 34.33 (2016), pp. 4030–4039.
- [20] Choi C. et al. «A comparative study of short and long TE ^1H -MRS at 3T for in vivo detection of 2-hydroxyglutarate in brain tumors». In: *NMR Biomed.* 26.10 (2013), pp. 1242–1250.
- [21] Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale. *Cosa sono le malattie metaboliche*. 2017. URL: [https://www.simmesn.it/it/societa-italiana-simmesn/le-malattie-metaboliche.html#:~:text=Questi%5C%\\$20processi%5C%\\$20metabolici%5C%\\$20di%5C%\\$20trasformazione,energia%5C%\\$20all' interno%5C%\\$20delle%5C%\\$20cellule..](https://www.simmesn.it/it/societa-italiana-simmesn/le-malattie-metaboliche.html#:~:text=Questi%5C%$20processi%5C%$20metabolici%5C%$20di%5C%$20trasformazione,energia%5C%$20all' interno%5C%$20delle%5C%$20cellule..)
- [22] Skorupa A. et al. «Four and one half years' experience in monitoring of reproducibility of an MR spectroscopy system application of in vitro results to interpretation of in vivo data». In: *Journal of Applied Clinical Medical Physics* 15.3 (2014), pp. 323–334.