

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Scuola di Scienze
Corso di Laurea Magistrale in Fisica

Rilassometria NMR per lo studio degli ioni Cobalto nel cobaltismo da artroprotesi

Relatore:
Prof.ssa Paola Fantazzini

Presentata da:
Marta Pedacchia

Correlatori:
Dott. Fabio Baruffaldi
Dott. Manuel Mariani

Sessione III
Anno Accademico 2013/2014

Ai miei genitori

Abstract

Il rilascio di detriti d'usura metallici è una grave problematicità connessa ai sistemi protesici, e principalmente riguarda le protesi d'anca ad accoppiamento metallo su metallo in lega CoCr. La presenza di un livello di ioni Co nel siero che supera la soglia di tossicità è correlata a metallosi periprotetica e al fallimento dell'impianto. Recentemente è emersa un'altra casistica, presumibilmente connessa alla distribuzione e accumulo di questi ioni in tessuti di organi anche lontani dall'impianto, che si manifesta con una sintomatologia sistemica analoga a casi noti di avvelenamento da Cobalto.

Nel contesto di questa nuova patologia sarebbe di grande interesse la possibilità di monitorare *in-vivo* la distribuzione del Cobalto rilasciato da protesi articolari, in organi o tessuti di pazienti che manifestano alti livelli ionici di Co nel siero utilizzando metodiche non invasive come l'NMR. L'ipotesi sperimentale di applicabilità prende spunto dalle proprietà magnetiche che alcuni composti del Cobalto possono presentare nell'organismo.

In questo lavoro sperimentale, nato dalla collaborazione tra il laboratorio NMR del DIFA dell'Università di Bologna e l'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) di Bologna, si presentano i risultati relativi allo studio di fattibilità condotto con diverse metodiche di rilassometria NMR su campioni biologici in presenza di Co. L'obiettivo riguarda la caratterizzazione delle proprietà di rilassamento con elettromagnete a temperatura ambiente e fisiologica, e la valutazione delle dinamiche molecolari dai profili NMRD ottenuti alle basse frequenze con metodica Fast Field Cycling, dei nuclei ^1H di tali sistemi in presenza di Co.

Indice

| | |
|---|-----------|
| Introduzione | 1 |
| 1 Cobaltismo da artroprotesi | 5 |
| 1.1 Introduzione | 5 |
| 1.2 Le protesi d'anca MoM in lega Co-Cr | 7 |
| 1.2.1 Composizione dei biometalli | 8 |
| 1.2.2 Prodotti metallici d'usura e loro distribuzione | 9 |
| 1.3 Il Cobalto nell'organismo | 11 |
| 1.3.1 L'Albumina sierica | 12 |
| 2 Aspetti fondamentali di Risonanza Magnetica Nucleare | 15 |
| 2.1 Introduzione | 16 |
| 2.2 Trattazione classica | 17 |
| 2.3 Trattazione di Bloch | 20 |
| 2.4 Trattazione semiclassica | 22 |
| 2.5 Il segnale NMR | 25 |
| 2.5.1 <i>Free Induction Decay</i> | 25 |
| 2.5.2 Sequenze di acquisizione | 27 |
| 3 NMR in presenza di molecole paramagnetiche | 31 |
| 3.1 Sostanze paramagnetiche | 32 |
| 3.2 Interazione dipolare | 33 |
| 3.2.1 Accoppiamento dipolare per dipoli puntiformi | 35 |
| 3.3 Interazione di contatto | 36 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.4 | Modello del rilassamento paramagnetico | 37 |
| 3.4.1 | Rilassività protonica di sfera interna | 39 |
| 3.4.2 | Rilassività protonica di sfera esterna | 43 |
| 3.5 | Profili NMRD | 44 |
| 4 | Materiali e Metodi | 45 |
| 4.1 | I campioni biologici | 45 |
| 4.1.1 | Campioni di siero umano | 46 |
| 4.1.2 | Campioni tessuto animale | 47 |
| 4.1.3 | Quantificazione del ^{59}Co tramite ICP-MS | 49 |
| 4.2 | Rilassometria ^1H -NMR | 51 |
| 4.2.1 | Sistema di acquisizione del segnale NMR | 52 |
| 4.2.2 | Sequenze e parametri di acquisizione | 53 |
| 4.2.3 | Fit dei dati sperimentali | 55 |
| 4.3 | Rilassometria <i>Fast Field Cycling</i> | 56 |
| 4.3.1 | Struttura elementare di un esperimento FFCR | 56 |
| 4.3.2 | Componenti hardware di un Fast Field Cycling | 58 |
| 4.3.3 | Acquisizione di un profilo NMRD completo | 59 |
| 4.3.4 | Sequenze e parametri di acquisizione | 60 |
| 4.3.5 | Fit dei dati sperimentali | 62 |
| 5 | Risultati | 63 |
| 5.1 | Indagine di rilassometria NMR su campioni di siero umano | 63 |
| 5.1.1 | Set di campioni ex-vivo | 64 |
| 5.1.2 | Set di campioni in-vitro con siero di controllo 7649 | 66 |
| 5.1.3 | Set di campioni in-vitro con siero di controllo 9996 | 68 |
| 5.1.4 | Indagine in funzione della temperatura | 70 |
| 5.1.5 | Indagine in funzione del campo magnetico applicato | 74 |
| 5.2 | Indagine rilassometrica di tessuto animale | 77 |
| 5.3 | Discussione dei risultati | 81 |
| 5.3.1 | Rilassometria NMR a 20.15 MHz | 81 |
| 5.3.2 | Indagine condotta in funzione della temperatura | 83 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 5.3.3 | Profili NMRD | 85 |
| 5.3.4 | Indagine su campioni di tessuto animale | 86 |
| | Conclusione | 89 |
| | Appendice | 91 |
| | Ringraziamenti | 93 |
| | Bibliografia | 95 |

Introduzione

In campo medico ortopedico ogni anno vengono impiantati sistemi protesici d'anca su un numero crescente di pazienti affetti da severa compromissione dell'articolazione.

Recentemente è emersa una grave problematicità su tale tipologia di impianti che ha comportato un numero significativo di fallimenti protesici legati al rilascio continuo di detriti metallici. Il problema riguarda principalmente sistemi ad accoppiamento metallo su metallo (MoM) composti in lega CoCr (Cobalto-Cromo).

La principale manifestazione della presenza di una protesi usurata in pazienti operati è la presenza di un elevato livello di ioni metallici nei fluidi corporei; in particolare, la presenza di un livello elevato di Cobalto nel siero (Cobaltemia $> 7\mu\text{g}/\text{L}$) è stato associato all'insorgenza di una compromissione locale dei tessuti periprotetici (metallosi). Oltre ai problemi locali è emersa un'altra casistica, probabilmente connessa alla distribuzione di questi ioni in tessuti vicini e lontani dalla protesi, che riguarda le implicazioni sistemiche; si sono infatti verificati casi di pazienti che presentano una sintomatologia del tutto analoga alle manifestazioni da avvelenamento da Cobalto, cui ci si riferisce con Cobaltismo Artroprotesico.

La risonanza magnetica nucleare, nota anche con l'acronimo NMR dall'inglese Nuclear Magnetic Resonance, è una tecnica che permette, attraverso l'utilizzo di campi magnetici statici e pulsati, di determinare parametri importanti di struttura e dinamica molecolare. In particolare la rilassometria studia i tempi di rilassamento della magnetizzazione nucleare longitudinale (T_1) e trasversale (T_2) che risultano parametri importanti nella caratterizzazione di tessuti ed organi.

Numerose sono le tecniche di diagnostica medica che si basano sulla NMR le

quali permettono di coniugare la possibilità di ottenere informazioni sia qualitative sia quantitative alla non invasività della metodica.

Nel contesto di questa nuova patologia, il Cobaltismo da artroprotesi, sarebbe di grande interesse la possibilità di monitorare *in-vivo* la distribuzione e l'accumulo del Cobalto emesso da endoprotesi, in organi o tessuti di pazienti che manifestano alti livelli ionici di Co nel siero. L'ipotesi sperimentale prende spunto dalle proprietà paramagnetiche che alcuni composti del Cobalto possono presentare.

In questo lavoro sperimentale si presentano i risultati relativi allo studio di fattibilità condotto con varie metodiche di rilassometria NMR su campioni biologici, nello specifico siero e urina di volontari e pazienti, e biopsie di tessuti animali, per la caratterizzazione delle proprietà di rilassamento dei nuclei 1H di tali sistemi biologici in presenza di Co. Si sono a tale finalità condotte indagini di rilassometria con elettromagnete a 20.15 MHz in funzione della temperatura per la valutazione dell'interazione del Co con le molecole proteiche del siero, e indagini con strumentazione Fast Field Cycling per la valutazione dei profili di dispersione NMRD. Quest'ultima indagine condotta al variare del campo magnetico, quindi della frequenza di Larmor del nucleo di interesse, permette di ottenere principalmente alle basse frequenze informazioni connesse alla dinamica molecolare del sistema.

La tesi si articola in cinque capitoli. Nel primo capitolo si introduce in dettaglio il problema del Cobaltismo da artroprotesi per la comprensione del ruolo del Cobalto nell'organismo e degli aspetti legati al rischio biologico comportato dall'emissione di detriti d'usura che si generano dalla corrosione delle protesi, connesso allo stato chimico fisico dei detriti emessi riscontrati da ricerche recenti; di particolare rilievo è la tossicità dello ione Co^{2+} .

Il secondo e terzo capitolo sono dedicati alla trattazione degli aspetti teorici. Prima si richiamano gli aspetti fisici fondamentali e si descrivono le modalità di acquisizione del segnale NMR, poi si discutono le modalità di interazione tra lo spin elettronico ed i nuclei NMR per la trattazione del rilassamento in presenza di molecole paramagnetiche; il modello di rilassamento paramagnetico che viene riportato segue la trattazione Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM).

Il quarto ed il quinto capitolo sono infine dedicati alla discussione dettaglia-

ta degli aspetti sperimentali di questo lavoro. Prima si descrivono in dettaglio i campioni indagati e la loro provenienza, poi i diversi apparati di acquisizione del segnale NMR che si sono utilizzati nei diversi esperimenti condotti, in ultimo si riportano i risultati ottenuti da tutte le metodiche di indagine.

Il lavoro è stato principalmente svolto presso il Laboratorio di Tecnologia Medica (LTM) dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) di Bologna, e presso il Laboratorio NMR del Dipartimento di Fisica e Astronomia (DIFA) dell'Università Alma Mater Studiorum di Bologna. Misure sperimentali sono state inoltre realizzate presso i laboratori NMR dell'Università di Pavia e dell'Università di Milano.

Capitolo 1

Cobaltismo da artroprotesi

1.1 Introduzione

Uno dei principali sviluppi della medicina classica riguarda la sostituzione delle articolazioni compromesse, da patologie specifiche o traumi, con protesi artificiali. In particolar modo, la protesi d'anca è considerata come l'intervento chirurgico di maggiore successo in campo ortopedico. Sistemi protesici di questo tipo vengono impiantati ogni anno su un numero crescente di pazienti e prevedono, di norma, un accoppiamento fra una testina sferica ed una coppa acetabolare, costituite da materiali ad alta resistenza e a bassa usura. Negli ultimi anni, la presenza di alti livelli di ioni metallici derivanti dall'usura superficiale degli impianti è stata, e continua ad essere, una delle questioni più controverse delle protesi d'anca, ad accoppiamento metallo su metallo (Metal-on-Metal, MoM) in leghe Cromo-Cobalto. I dispositivi MoM hanno entrambe le componenti, testina e acetabolo, in metallo e vengono utilizzati negli interventi chirurgici di sostituzione totale d'anca (Total Hip Arthroplasty, THA) e nelle procedure di Resurfacing (Hip Resurfacing Arthroplasty, HRA); la scelta dell'accoppiamento metallico consente l'uso di teste femorali più grandi e più simili all'anca naturale.

Nel 2010, dai dati del settimo report annuale del National Joint Registry for England and Wales [34] è stato riscontrato un tasso di revisioni¹ per le protesi

¹La revisione in ambito ortopedico si riferisce all'intervento per rimuovere o sostituire una o

d'anca ad accoppiamento MoM significativamente più alto rispetto al tasso previsto che ha portato al ritiro dal mercato delle Depuy ASR™ (Depuy international Ltd, Leeds, UK) sia dei sistemi HRA che XL-THA (THA con testina > 36mm). A seguito di questo fatto la Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA, ha inviato un avviso di sicurezza nel Settembre 2010 richiamando l'attenzione sulla sicurezza a lungo termine di tutti i tipi di impianti MoM. Nel documento [3], MHRA ha spiegato i dettagli dell'avviso di sicurezza. In particolare, ha suggerito che un livello ematico, riferito a sangue intero, di Co superiore a 7 ppb ($7 \mu\text{g}/\text{L}$) è molto probabile che sia associato ad una reazione significativa dei tessuti molli (presenza di metallosi periprotetica) e al fallimento dell'impianto.

Alla luce di tutte le raccomandazioni internazionali la SIOT (Società Italiana di Ortopedia e Traumatologia) consiglia la sospensione dell'uso di protesi di anca MoM con testa di diametro superiore ai 36 mm e fornisce le linee guida al follow-up dei pazienti. Per il SIOT il valore soglia per l'insorgenza di possibili complicanze cliniche, poichè l'esatto valore risulta essere ancora ignoto, è compreso nel range tra 2 e $7 \mu\text{g}/\text{L}$. Ne consegue che, in generale, in pazienti con valori di Cobalto elevati ($> 2 \mu\text{g}/\text{L}$) sono necessari ulteriori accertamenti (ecografia, TAC, NMR), anche se asintomatici.

Nella letteratura scientifica internazionale sono note alcune manifestazioni di intossicazione da Cobalto (casi di *cobaltismo*) dovute ad additivi introdotti nella birra e ad esposizioni industriali e iatrogene [39]. Gli effetti noti del Cobaltismo possono comportare tremori, cecità, sordità, cardiomiopatia ed effetti neurotossici vari. Tower nel 2010 [41] riporta, per la prima volta, due casi di pazienti protesizzati con livelli di Cobalto superiori ai valori normali di riferimento (Tower riporta una concentrazione di Cobalto nel siero di $122 \mu\text{g}/\text{L}$ per il primo paziente a 36 mesi dall'operazione e di $23 \mu\text{g}/\text{L}$ per il secondo paziente dopo 40 mesi dall'operazione) cui sono state correlate manifestazioni neurotossiche caratterizzate soprattutto da sordità neurosensoriale e atrofia ottica, dovute a rilascio interno di Cobalto da protesi difettosa e chiama tale fenomeno *cobaltismo artroprotesico*.

più componenti di una protesi articolare. Tutti i tipi di dispositivi protesici hanno un'incidenza di revisione.

| Valori normali di riferimento soggetti non esposti | |
|--|--|
| [Co] Sangue | < 2 μ g/L (ppb) |
| [Co] Siero | < 0,6 μ g/L (ppb) |
| Soglia di non tossicità presunta (soggetti portatori di protesi) | |
| [Co] Siero | < 7 μ g/L (ppb) |
| Tower 2010 [41] | |
| [Co] Siero | > 20 μ g/L (ppb) presunta neurotossicità |
| [Co] Siero | > 60 μ g/L (ppb) presunta neurotossicità grave |

Tabella 1.1: Valori di riferimento di Cobalto in sangue e siero.

1.2 Le protesi d'anca MoM in lega Co-Cr

Le protesi d'anca di norma sono composte di tre parti, figura 1.1: uno stelo posizionato all'interno del canale distale dell'osso, una testa sferica collegata allo stelo attraverso un collo, e la coppa acetabolare, costituita da una porzione esterna chiamata cotile, che vuole riprodurre la cavità della pelvi e sulla quale viene fissata, e una interna, l'inserto, che si articola con la testa del femore.

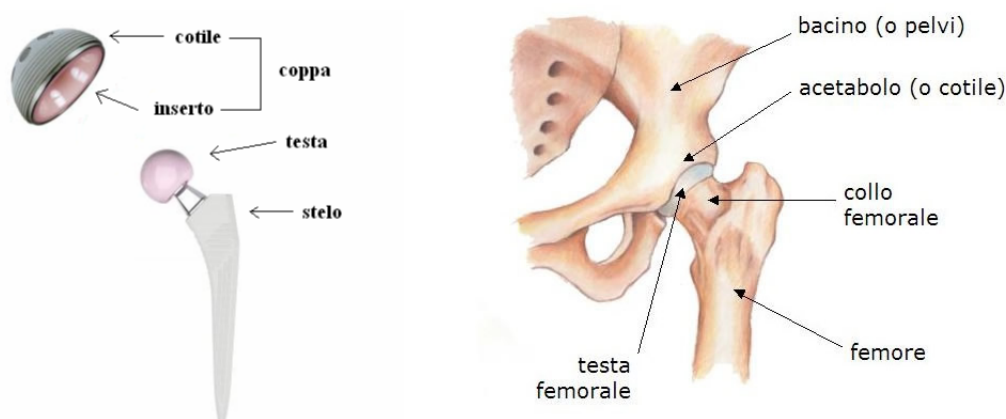


Figura 1.1: A sx è riportato lo schema di un generico sistema protesico completo, d'anca, mentre a dx è riportata un'immagine anatomica dell'anca umana.

Le tipologie di artroplastiche d'anca più comunemente utilizzate, sono:

- gli impianti THA *stemmed*, che consistono di una testa sferica (che può essere sia *Small Head*, SH che *Large Head*, LH) che va a sostituire l'intera testa femorale, dotati di stelo incorporato nel femore. (figura 1.2, dx)
- gli impianti HRA, nei quali la testa femorale viene sostituita senza uno stelo e la coppa acetabolare viene integrata all'acetabolo. Queste hanno sempre una testa femorale di grande diametro. (figura 1.2, sx)



Figura 1.2: A sx un sistema protesico MoM-THA, a dx un sistema protesico MoM-HRA.

1.2.1 Composizione dei biometalli

I materiali metallici, nell'ambito dell'impiantologia ortopedica, vengono ampiamente utilizzati per via delle proprietà meccaniche che rendono possibile la realizzazione di protesi in grado di sopportare carichi elevati con piccole sezioni. I requisiti che maggiormente devono essere soddisfatti sono [32]: la biocompatibilità con i tessuti circostanti, la resistenza alla corrosione dei fluidi corporei e la non tossicità. Inoltre, devono soddisfare le proprietà meccaniche che sono connesse alla microstruttura della lega e al suo livello di omogeneità.

I biometalli che rispondono a queste esigenze e vengono quindi usati per la sostituzione delle articolazioni, sono descritti dalla ASTM (American Society of Testing and Materials) e dalla ISO (International Organization for Standardization). Per le sostituzioni dell'anca si usano principalmente le leghe di Titanio (Ti), gli acciai inox e le leghe a base di Cobalto (Co). Tra queste elencate, le ultime possono essere descritte [29] come non-magnetiche, resistenti all'usura e alla corrosione oltre che stabili ad elevate temperature e sono le più comunemente

utilizzate. Si possono distinguere le protesi al Cobalto-Cromo-Molibdeno (Co-Cr-Mo) e le protesi al Cobalto-Cromo-Molibdeno-Nichel (Co-Cr-Ni-Mo), le cui composizioni chimiche sono riportate nella tabella in Figura 1.3.

| Type of material | ISO Denotation* | Composition (wt %) |
|----------------------|-----------------|--|
| Stainless steel 316L | ISO 5832-1(D) | 17.0–19.0 Cr; 13.0–15.0 Ni; 2.25–3.5 Mo; ≤ 0.030 C; ≤ 2.0 Mn; ≤ 0.10 N; ≤ 0.50 Cu; ≤ 0.025 P; ≤ 0.010 S, ≤ 1.0 Si; rest Fe |
| Co–28Cr–6Mo, cast | ISO 5832-4 | 26.5–30.0 Cr; 4.5–7.0 Mo; max 1.0 Ni, 1.0 Fe, and 1.0 Mn; rest Co |
| Co–28Cr–6Mo, wrought | ISO 5832-12 | 26.0–30.0 Cr; 5.0–7.0 Mo; max 1.0 Ni and Mn; max 0.75 Fe; rest Co |
| Commerically pure Ti | ISO 5832-2 | Max 0.05 N; 0.10 C; 0.125 H; 0.50 Fe and 0.40 O; rest Ti |
| Ti–6Al–4V, wrought | ISO 5832-3 | 5.5–6.75 Al; 3.4–4.5 V; max 0.05 N, 0.08 C, 0.015 H, 0.30 Fe and 0.20 O; rest Ti |
| Ti–6Al–7Nb, wrought | ISO 5832-11 | 5.5–6.5 Al; 6.5–7.5 Nb; max 0.05 N, 0.08 C, 0.009 H; 0.25 Fe; 0.20 O and 0.50 Ta; rest Ti |

*ISO: International Organization for Standardization

Figura 1.3: Composizioni chimiche ISO delle principali leghe metalliche utilizzate per le protesi d'anca. [32]

In queste leghe, il Cromo incrementa la durezza e la resistenza alla corrosione formando uno strato sottile di ossido sulla superficie del prodotto che consiste in un film di passivazione di Cr_2O_3 , il Nichel, invece, provvede ad aumentare la resistenza alla corrosione ma allo stesso tempo aumenta la possibilità di rigetto per il rilascio di ioni del metallo all'interno del corpo.

1.2.2 Prodotti metallici d'usura e loro distribuzione

Nessun metallo o lega metallica è completamente inerte *in vivo*. L'attacco distruttivo dei biometalli dovuto alle reazioni che hanno luogo con l'ambiente corrosivo circostante (Figura 1.4) può comportare un rilascio di materiale non biocompatibile che da luogo a risposte avverse nei tessuti biologici. L'effetto può essere quantificato localmente nei tessuti periprotetici o, più rilevantemente, nei fluidi corporei, quali sangue, siero od urine, come manifestazione diretta di un impatto sistemico del rilascio metallico.

Diversi studi di tribologia condotti sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che il rilascio di materiale metallico avviene per corrosione elettrochimica e fattori meccanici, come sfregamento, sollecitazione, urto di detriti e stress (fatica). La corrosione è un processo estremamente complesso di natura biochimica, può essere dovuto ad esempio a cambiamenti di pH oppure a specifici processi cellulari metabolici. Il film superficiale protettivo della protesi in una protesi MoM di successo, inibisce questo tipo di interazione con i tessuti limitrofi, mantenendo il rilascio di prodotti da corrosione a bassi livelli [40].

Si hanno conferme sperimentali riguardo alla presenza di detriti metallici in forma non solo ionica ma anche di particolato; uno studio post-mortem [42] ha confermato che particelle metalliche libere o fagocitate da macrofagi (particelle singole o in agglomerati) vengono trasferite dal sistema linfatico e si accumulano nei linfonodi, nel fegato e nella milza.

Doorn et al.[20] riportano i risultati di un'analisi condotta con TEM di detriti di particolato metallico di 13 pazienti sottoposti a revisione di MoM-THA; il range di particolato metallico riportato è 6-834 nm. Altri studi riportano che la dimensione più frequente di nanoparticelle è di 40-50 nm [17][18].

Anche nel sistema circolatorio si trovano ioni metallici e particelle metalliche [16], che in questo modo, vengono distribuite anche a tessuti lontano dalla protesi. Contaminazioni superficiali a tessuti sono state riscontrate in diversi organi come cuore, reni, fegato e milza [37].

Il rischio biologico di questi detriti di usura potrebbe essere correlato principalmente alla formazione di ioni metallici liberi, sali metallici inorganici ed ossidi metallici. Identificare le specie chimiche coinvolte in tutti i possibili processi di rilascio di materiale dagli impianti nei tessuti e nei fluidi corporei è di fondamentale importanza. La citotossicità di un elemento è strettamente connessa allo stato chimico dell'elemento rilasciato; purtroppo questo tipo di informazione nell'ambito dei metalli in tracce è alquanto scarsa.

Studi mirati ad esplorare la possibile associazione dei metalli rilasciati con le proteine del siero, condotti su campioni in cui i livelli di Cromo (Cr), Cobalto (Co) e Manganese (Mn) erano molto maggiori rispetto ai pazienti di controllo, hanno

dimostrato che il Manganese è principalmente associato alle Transferrine mentre il Cobalto alle Albumine [35].

| | Value | Location | | | | |
|------------------------|-----------|-----------------|------------------|--------|--------------------------------|--------|
| pH | 1.0 | Gastric content | Cations | mmol/l | Anions | mmol/l |
| | 4.5–6.0 | Urine | | | | |
| | 6.8 | Intracellular | | | | |
| | 7.15–7.35 | Blood | | | | |
| pO ₂ (mmHg) | 40 | Venous blood | Na ⁺ | 142 | Cl ⁻ | 101 |
| | 100 | Arterial blood | K ⁺ | 4 | HCO ₃ ⁻ | 27 |
| | 160 | Atmospheric | Ca ²⁺ | 5 | HPO ₄ ²⁻ | 2 |
| | 40 | Alveolar | Mg ²⁺ | 2 | SO ₄ ²⁻ | 1 |
| | 2 | Atmospheric | Total | 153 | Total | 131 |
| Temperature (°C) | 37 | Normal core | | | Organic acids | 6 |
| | 20–42.5 | Diseases | | | Proteins | 16 |

Figura 1.4: Nella tabella a sx sono riportate le condizioni chimico-fisiche nell'organismo, per valutare i fattori corrosivi è necessario tenere presente l'acidità dell'intorno biologico; nella tabella a dx sono, invece, riportate le concentrazioni di anioni e cationi del siero. Gli ioni cloridrici sono importanti nel fenomeno della corrosione per via della loro capacità di interagire con il film di passivazione della protesi. [32]

1.3 Il Cobalto nell'organismo

Il Cobalto (Co) è un metallo ferromagnetico appartenente agli elementi di transizione del gruppo IX, ha numero atomico 27 e massa 59. E' un composto inorganico di colore azzurro argenteo con proprietà simili a nichel e ferro, e può essere magnetizzato come quest'ultimo.

Per l'uomo il Co è un elemento essenziale nella forma di Cobalamina (Coenzima B12) dove si trova strettamente legato ad un anello "corrin" e si comporta come *carrier*² del gruppo Metile³. In questa molecola il Cobalto si presenta negli stati ossidati Co⁺ e Co³⁺. Tuttavia, gli esseri umani sono esposti alla forma ionica Co²⁺ la quale è la forma più stabile in condizioni ambientali, sia per via alimentare (alimentazione normale) sia per esposizione ambientale. Il Co²⁺ è rapidamente scambiabile e può assumere varie geometrie e numeri di coordinazione

²In biochimica, il termine si riferisce alle proteine trasportatrici delle molecole che non sono in grado di diffondere liberamente attraverso le membrane cellulari.

³-CH₃

tra 4 e 6 oltre al fatto che può essere facilmente ossidato alla forma inerte, sempre ottaedrica Co^{3+} .

Uno studio recente [38] condotto con le tecniche XRF e XAS hanno portato dei contributi che riguardano la distribuzione e la speciazione intracellulare di cobalto (Co) e Cromo (Cr) nelle cellule ossee umane (osteoblasti e osteoclasti primari). Con queste tecniche è infatti possibile studiare la forma chimica e lo stato di ossidazione di un elemento in campioni microscopici. I risultati più importanti ottenuti con tecnica k-edge μ -XANES hanno confermato che non si verificano nella cellula delle reazioni redox per le forme chimiche Co^{2+} e Cr^{3+} , quindi il Cobalto si può trovare nella cellula in forma chimica Co^{2+} .

1.3.1 L'Albumina sierica

L'Albumina (Human Serum Albumin, HSA) [23] è la proteina del plasma più abbondante oltre ad essere tra le proteine la più estensivamente investigata. È sintetizzata dalle cellule epatiche, è composta da una singola catena di 585 residui ed ha un'emivita biologica di circa 20 giorni. La sua concentrazione normale nel sangue è di circa $7 \cdot 10^{-4} M$. La straordinaria capacità legante di questa proteina fornisce un deposito per una grande varietà di composti, che in questo modo sono disponibili in quantità che vanno ben oltre la loro solubilità nel plasma. Per tutte queste proprietà, HSA risulta avere un ruolo significativo nella farmacocinetica di farmaci e droghe, ed è anche alla base dello sviluppo degli agenti di contrasto *blood pool*⁴ per angiografia MRI. Infine, risulta essere un potente antiossidante del siero sia per azione diretta sia indirettamente legandosi e trasportando radicali liberi e "sequestrando" ioni di metalli di transizione, come Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} .

⁴Gli agenti di contrasto (mdc) a distribuzione *blood pool* sono rappresentati da una classe di molecole con capacità di legame forte ma reversibile con l'Albumina sierica e a prolungata permanenza nell'albero vascolare. Questi mdc permettono l'acquisizione di immagini angio-RM fino a 50-60 min dalla somministrazione endovenosa. L'unica molecola *blood pool* attualmente commercializzata è *Gadofosveset-Trisodium*

Interazione Co-HSA

L'Albumina sembra essere il trasportatore principale di Co^{2+} nel sangue. Il Co^{2+} viene trattato come tossico perchè HSA può legare il Cobalto ionico solo quando questo non è incorporato nel metabolismo normale del Cobalto nell'uomo. Da tempo vengono indagate le modalità di interazione Co^{2+} -HSA [7] anche se il meccanismo non è ancora del tutto compreso, fino a poco tempo fa si pensava che il sito principale di legame fosse l'N-terminale (analogamente a quanto accade per il Cu^{2+} e Ni^{2+}). Recentemente, due studi indipendenti, effettuati anche con diverse metodiche, hanno messo in luce nuove possibilità di interazione tra HSA e Co^{2+} . Sembra proprio che HSA abbia altri due siti di legame (A e B) definiti per il Co^{2+} oltre all'N-terminale, inoltre, questi ultimi sembrano essere a maggiore affinità.

La caratterizzazione spettroscopica di questi siti di interazione ha mostrato che il Co^{2+} si trova nello stato ad alto spin (HS state) e che sembra legarsi in una configurazione ottaedrica distorta. Invece, la geometria di coordinazione con cui il Co^{2+} si lega all'N-terminale (NTS) non è stata ancora identificata ⁵.

⁵Ciò che si è appurato è che il Cobalto ionico sembra preferire siti di legame a geometria ottaedrica, penta-coord e tetraedrica (come per Zn/Cd) piuttosto che a coordinazione planare come invece è noto per Cu(II) e Ni(II).

Capitolo 2

Aspetti fondamentali di Risonanza Magnetica Nucleare

La risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) permette di studiare le proprietà della materia sia a livello macroscopico, sia a livello microscopico, sfruttando, come sonda locale, i nuclei dotati di momento magnetico non nullo. In questo lavoro di tesi sono state condotte misure sperimentali con la tecnica NMR impulsata sui nuclei ^1H , (in seguito denominati anche più semplicemente protoni). In particolare, attraverso la rilassometria NMR si possono ottenere informazioni a partire dallo studio dell'evoluzione temporale del ritorno all'equilibrio termico della magnetizzazione nucleare a seguito di perturbazioni del sistema attraverso l'utilizzo di opportune sequenze di impulsi nel range delle radiofrequenze (RF). In questo capitolo, in primis, verranno esposti alcuni aspetti teorici di base della risonanza magnetica nucleare sia attraverso un approccio semiclassico vettoriale che fenomenologico arrivando alla definizione dei tempi caratteristici, T_1 e T_2 , del rilassamento nucleare; in seguito saranno delineate le metodologie di acquisizione del segnale NMR e le sequenze a radiofrequenza con tecnica impulsata utilizzate per le misure di questa tesi.

2.1 Introduzione

Il fenomeno della risonanza magnetica è legato alle proprietà magnetiche dei nuclei degli atomi che sono dotati di un grado di libertà intrinseco chiamato spin o momento angolare intrinseco. Si tratta di una proprietà quantistica delle particelle elementari che non ha una corrispondenza da un punto di vista classico. Esso segue la matematica dei momenti angolari pertanto lo spin nucleare \vec{I} si ottiene pertanto dalla composizione dei contributi dei singoli nucleoni di cui è composto il nucleo.

| I | Massa Atomica | Numero Atomico | Esempio (I) |
|-------------|---------------|----------------|---|
| semi-intero | dispari | dispari o pari | ${}^1_1\text{H}(\frac{1}{2}), {}^{17}_8\text{O}(\frac{5}{2}), {}^{15}_7\text{N}(\frac{1}{2})$ |
| intero | pari | dispari | ${}^2_1\text{H}(1), {}^{14}_7\text{N}(1), {}^{10}_5\text{B}(3)$ |
| zero | pari | pari | ${}^{12}_6\text{C}(0), {}^{16}_8\text{O}(0), {}^{34}_{16}\text{S}(0)$ |

Tabella 2.1: Esempio di calcolo del numero di spin nucleare per alcuni atomi.

Ai nuclei aventi spin \vec{I} è legato un momento magnetico nucleare $\vec{\mu}$ che può essere espresso secondo la seguente relazione:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \quad (2.1)$$

dove \hbar indica la costante di Planck ridotta ($\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1.054571 \cdot 10^{-34} \text{Js}$), mentre γ è noto come *rapporto giromagnetico*, viene misurato in MHzT^{-1} e varia al variare del nucleo investigato. In questa descrizione vettoriale (equazione 2.1) lo spin nucleare ed il momento magnetico corrispondente sono paralleli e di verso concorde. La risonanza magnetica nucleare interessa gli isotopi che presentano spin nucleari la cui abbondanza naturale sia sufficientemente alta da poter essere rivelata. Tra i nuclei più utilizzati per la caratterizzazione dei sistemi fisici, chimici e biomedici ci sono i nuclei: ${}^1\text{H}$, ${}^{19}\text{F}$, ${}^{13}\text{C}$, ${}^{23}\text{Na}$.

| elemento | $\gamma(\text{rad s}^{-1}\text{T}^{-1})$ | $\gamma/2\pi(\text{MHz/T})$ | \vec{I} | abb. nat. % |
|------------------|--|-----------------------------|-----------|-------------|
| ^1H | 267.513 | 42.576 | 1/2 | 99.98 |
| ^2H | 41.065 | 6.536 | 1 | 0.02 |
| ^{13}C | 67.262 | 10.705 | 1/2 | 1.11 |
| ^{14}N | 19.331 | 3.007 | 1 | 99.6 |
| ^{15}N | -27.116 | -4.316 | 1/2 | 0.37 |
| ^{17}O | -36.264 | -5.772 | 5/2 | 0.04 |
| ^{19}F | 251.662 | 40.053 | 1/2 | 100 |
| ^{23}Na | 70.761 | 11.262 | 3/2 | 100 |
| ^{31}P | 108.291 | 17.235 | 1/2 | 100 |

Tabella 2.2: Proprietà dei nuclei di interesse biologico

2.2 Trattazione classica

Si consideri uno spin isolato immerso in un campo magnetico $\vec{B}_0 = B_0\vec{z}$ costante, omogeneo ed uniforme, diretto lungo la direzione arbitraria \vec{z} di un sistema tridimensionale di assi cartesiani, detto sistema di riferimento del laboratorio (Σ_{LAB}). Secondo una trattazione classica [19], il suo comportamento è del tutto analogo a quello di una trottola immersa in un campo gravitazionale; l'interazione tra momento e campo magnetico applicato induce un momento torcente sul momento magnetico nucleare che può essere espresso dall'equazione:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma\vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (2.2)$$

Proiettando questa equazione vettoriale lungo gli assi cartesiani si ottengono le tre equazioni:

$$\frac{d\vec{\mu}_x}{dt} = \gamma B_0 \mu_y \quad (2.3a)$$

$$\frac{d\vec{\mu}_y}{dt} = \gamma B_0 \mu_x \quad (2.3b)$$

$$\frac{d\vec{\mu}_z}{dt} = 0 \quad (2.3c)$$

Come è evidenziato dalle equazioni sopra scritte l'effetto dell'interazione è quello di un moto di precessione attorno all'asse di applicazione del campo magnetico statico, con frequenza caratteristica

$$\omega_L = \gamma B_0 \quad (2.4)$$

conosciuta come frequenza di risonanza o frequenza *di Larmor*.

Se ora si applica al sistema, in aggiunta al campo magnetico statico B_0 un campo magnetico di ampiezza B_1 , oscillante con frequenza angolare ω , nel piano xy perpendicolare alla direzione di B_0 , l'equazione del moto dello spin, sottoposto all'azione di entrambe i campi, diventa:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \gamma [\vec{B}_0 + \vec{B}_1(t)] \quad (2.5)$$

in cui si assume che l'intensità del campo oscillante sia molto minore di quella del campo magnetico statico ($|B_1| \ll |B_0|$). La trattazione teorica attraverso l'uso dell'equazione 2.5 potrebbe risultare complicata. A questo scopo è conveniente introdurre un sistema di riferimento cartesiano (x', y', z') con $z' \equiv z$, detto sistema di riferimento rotante (Σ_{rot}) che ruoti intorno all'asse z con velocità ω stessa. Come risultato di questo cambio di coordinate, si ottiene B_1 stazionario lungo una prefissata direzione. Scegliendo x' come direzione di applicazione di B_1 , l'equazione del moto del momento magnetico dello spin, nel nuovo sistema di riferimento diventa:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \gamma \left[\left(\vec{B}_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \vec{z} + \vec{B}_1 \vec{x} \right] \quad (2.6)$$

Se ora si definisce il campo effettivo

$$\vec{B}_{eff} = B_0\vec{z} - (\omega/\gamma)\vec{z} + B_1\vec{x} \quad (2.7)$$

l'equazione 2.6 diventa:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma\vec{\mu} \times \vec{B}_{eff} \quad (2.8)$$

Il significato fisico della (2.8) è quello di un moto di precessione del momento magnetico nucleare intorno al campo magnetico effettivo B_{eff} in Σ_{ROT} . Nel caso particolare in cui la frequenza di oscillazione del campo a radiofrequenza sia pari alla frequenza di Larmor ($\omega = \omega_L$), ovvero in condizione di risonanza, la (2.8) si riduce a:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma\vec{\mu} \times \vec{B}_1 \quad (2.9)$$

che traduce il fatto che il campo magnetico precessa nel solo piano $y'z$ rimanendo sempre perpendicolare alla direzione del campo B_1 . Partendo da questi presupposti, risulta chiaro che per guidare la magnetizzazione verso un'orientazione a piacere in Σ_{ROT} , è sufficiente applicare il campo B_1 per un certo intervallo di tempo τ ed, in seguito rimuoverlo. Questo ha portato ad un predominio, nel tempo, dell'utilizzo della tecnica NMR che sfruttava l'utilizzo di questi impulsi e per questo denominata NMR impulsata. Questa tecnica, che verrà chiarita attraverso le sue sequenze di impulsi più significative, è stata quella utilizzata nelle misure NMR di questa tesi.

Nel caso più generale, sia μ_k il k -esimo spin di un sistema di spin; la grandezza che si misura sperimentalmente in un esperimento NMR è il valore atteso del momento magnetico totale per unità di volume, vale a dire, la magnetizzazione nucleare M , la cui equazione è:

$$\vec{M} = \langle \vec{\mu} \rangle = \sum_k \vec{\mu}_k \quad (2.10)$$

Se si considera un sistema di spin non interagenti, l'equazione classica descrive correttamente la dinamica della magnetizzazione. L'equazione del moto

della magnetizzazione nel sistema di riferimento rotante, in condizione di risonanza, si ottiene come una generalizzazione della (2.9) e risulta essere:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma\vec{M} \times \vec{B}_1 \quad (2.11)$$

2.3 Trattazione di Bloch

Nel paragrafo 2.2 si è considerato dapprima un momento magnetico isolato, quindi un sistema di spin non interagenti, che rappresenta una condizione ideale. Infatti in un sistema reale non è possibile considerare gli spin come indipendenti ma devono sempre essere prese in esame le interazioni tra gli spin (interazione spin-spin) e quelle tra gli spin ed il reticolo (interazione spin-reticolo), ove per reticolo si intende ogni gradi di liberta del sistema cristallino in cui gli spin sono immersi ad esclusione degli spin stessi. Se un sistema di spin, che inizialmente è soggetto solamente all'agitazione termica e quindi i momenti magnetici sono disposti random, è soggetto ad un campo magnetico statico B_0 , che ha le stesse proprietà descritte nel paragrafo precedente, dopo una fase di transizione giunge ad un equilibrio termico in cui la magnetizzazione nucleare è parallela al campo magnetico applicato ed assume un certo valore M_0 . Se, in seguito, il sistema viene perturbato temporaneamente, per esempio, attraverso l'applicazione del campo magnetico oscillante B_1 descritto nel paragrafo 2.2 e quindi lasciato di nuovo libero, la componente M_z della magnetizzazione tornerà, sperimentalmente, alla condizione precedente di equilibrio, regolata dalla statistica di Boltzmann. Il ritorno all'equilibrio di questa componente avviene secondo una delle leggi fenomenologiche formulate nel 1946 da Felix Bloch che può essere espressa con la formula:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (2.12)$$

Dove T_1 è chiamato tempo di rilassamento spin-reticolo che è legato principalmente alle suddette interazioni spin-reticolo che, a loro volta sono responsabili del cosiddetto rilassamento longitudinale della magnetizzazione nucleare. Se si

tiene conto anche del fenomeno della precessione degli spin nucleari intorno alla direzione del campo B_0 l'equazione (2.12) diventa:

$$\frac{d\vec{M}_z}{dt} = \gamma \left(\vec{M} \times \vec{B}_0 \right)_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (2.13)$$

Le componenti lungo gli assi x ed y (M_x ed M_y) invece, durante il rilassamento si annulleranno con la stessa legge, per questioni di simmetria, analoga a quella del rilassamento longitudinale ma caratterizzata da una tempistica diversa. Non trascurando nemmeno in questo caso la precessione degli spin, l'equazione completa del cosiddetto rilassamento trasversale è rappresentata dalla relazione:

$$\frac{d\vec{M}_i}{dt} = \gamma \left(\vec{M} \times \vec{B}_0 \right)_i - \frac{M_i}{T_2} \quad (2.14)$$

dove $i = x, y$ e T_2 è il tempo caratteristico di questa dinamica ed è chiamato tempo di rilassamento trasversale, in quanto legato alle componenti trasverse della magnetizzazione rispetto alla direzione del campo statico B_0 . Questo rilassamento è legato a campi interni del sistema (campi di dipolo dovuti agli altri spin) o a disomogeneità del campo statico B_0 e che vanno a sfasare i momenti magnetici ed ad annullare la magnetizzazione trasversale. L'equazione vettoriale totale da cui discendono le equazioni di Bloch (2.13) e (2.14) è data da:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B} - \frac{M_x \hat{i} + M_y \hat{j}}{T_2} - \frac{M_z + M_0}{T_1} \hat{k} \quad (2.15)$$

Quando la componente M_z non è all'equilibrio termico, si suppone che torni all'equilibrio ad un tasso proporzionale a quello di allontanamento dal valore di equilibrio. Integrando il termine di rilassamento della magnetizzazione longitudinale si ottiene:

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-t/T_1}) \quad (2.16)$$

Al contrario, quando in un campo B_{0z} la componente M_{xy} non è nulla, allora decade esponenzialmente a zero, raggiungendo velocemente la condizione di equilibrio. Integrando il termine di rilassamento per la magnetizzazione trasver-

sale si ottiene:

$$M_{xy} = M_0 e^{-t/T_2} \quad (2.17)$$

Durante il rilassamento di M_{xy} non vi è nessuna cessione di energia da parte del sistema di spin. Questo fenomeno viene ricondotto alla presenza di interazioni di tipo spin-spin, come precedentemente chiarito.

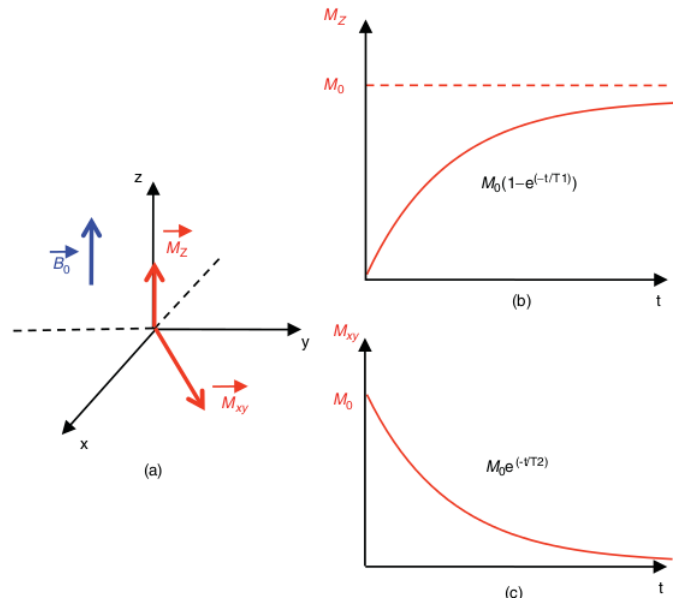


Figura 2.1: (a) Ritorno all'equilibrio della magnetizzazione, (b) recupero della componente M_z , (c) decadimento a zero della componente M_{xy} .

2.4 Trattazione semiclassica

Se si considera un nucleo a cui è associato un momento magnetico non nullo $\vec{\mu}$ sottoposto ad un campo magnetico statico B_0 , che supponiamo, anche in questo caso, applicato lungo l'asse z , di una terna di assi cartesiani orientati, esso acquisisce un'energia magnetica descritta dalla formula:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 = -\mu B_0 \cos\theta = -\mu_z B_0 = -\gamma(h/2\pi) I_z B_0 \quad (2.18)$$

dove I_z e μ_z sono rispettivamente le componenti dello spin nucleare e del suo associato momento magnetico nucleare lungo la direzione di applicazione del campo magnetico statico. In accordo con la meccanica quantistica, il nucleo può possedere solo valori discetti di energia, che equivale a dire che esso può assumere solo un numero discreto di posizioni nello spazio. I valori di I_z permessi sono $m_I = I, I-1, \dots, -I+1, -I$; la (2.18) può quindi essere riscritta:

$$E_{m_I} = -\gamma(\hbar/2\pi)m_I B_0 \quad (2.19)$$

con m_I numero quantico magnetico. Da queste considerazioni discende che i valori di energia possibili per un nucleo con spin I sono in numero di $2I+1$. L'effetto per cui l'interazione con un campo magnetico statico riesce a splittare i livelli energetici di un atomo, cioè a risolvere la degenerazione di questi in assenza di campo è noto come effetto Zeeman.

Si consideri il caso più semplice, vale a dire quello del nucleo dell'atomo di Idrogeno, in cui $I = 1/2$ e quindi $m_I = \pm 1/2$. In questo caso solo due sono le possibili configurazioni del momento magnetico nucleare sottoposto a B_0 : parallela ed antiparallela al campo magnetico statico, alle quali corrispondono i due valori dell'energia, a seguito della rimozione della degenerazione dei livelli energetici di ^1H , la cui espressione è:

$$E_{1/2} = -\frac{1}{2}\gamma\left(\frac{\hbar}{2\pi}\right)B_0 \quad (2.20a)$$

$$E_{-1/2} = +\frac{1}{2}\gamma\left(\frac{\hbar}{2\pi}\right)B_0 \quad (2.20b)$$

Separate in energia della quantità

$$\Delta E = \gamma\left(\frac{\hbar}{2\pi}\right)B_0 \quad (2.21)$$

Si consideri un insieme di nuclei ^1H non interagenti soggetti a B_0 , all'equilibrio termico le popolazioni di spin si arrangiano sui livelli energetici secondo la statistica di Maxwell-Boltzmann, originando una magnetizzazione netta, dovuta alla prevalenza statistica benché minima (qualche parte per milione), di nu-

clei ^1H con i momenti magnetici in configurazione concorde alla direzione del campo magnetico. Questa situazione può essere descritta dall'equazione, per la magnetizzazione:

$$M = \frac{N}{V} \langle \mu_z \rangle \quad (2.22)$$

in cui, il rapporto N/V rappresenta la densità di nuclei mentre $\langle \mu_z \rangle$ è il valor medio della componente lungo la direzione del campo dei momenti magnetici. In regime di Curie, quindi, per temperature relativamente alte e campi magnetici deboli ($B/k_B T \ll 1$), si può ricavare il vettore magnetizzazione all'equilibrio M_0 :

$$M_0 \simeq \frac{N \mu^2 B_0}{V 3k_B T} \quad (2.23)$$

nota come legge di Curie. Per variare l'orientazione di uno spin, per esempio per farlo passare dalla configurazione parallela a quella antiparallela, il cui valore di energia è maggiore, è necessario fornirgli una certa quantità di energia pari alla differenza ΔE tra i due livelli.

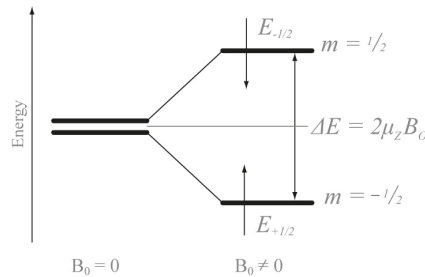


Figura 2.2: Separazione Zeeman dei livelli energetici per nuclei $I = 1/2$, come ^1H

L'energia necessaria può essere fornita attraverso radiazione elettromagnetica, con l'interazione dei momenti magnetici nucleari ed il campo magnetico associato alla radiazione stessa. Il modo più semplice per fornire energia al sistema di spin e produrre quindi risonanza, è quello di usare un campo magnetico alternato oscillante in direzione perpendicolare a quella di B_0 la cui equazione. Poiché, sempre per la meccanica quantistica, anche l'energia legata alla radiazione elettromagnetica applicata come perturbazione risulta essere quantizzata con quanti

di energia:

$$\Delta E = \left(\frac{h}{2\pi}\right)\omega \quad (2.24)$$

Uguagliando la (2.21) con la (2.24) si ottiene la condizione fondamentale di assorbimento della risonanza magnetica:

$$\omega_L = \gamma B_0 \quad (2.25)$$

Nel caso dei nuclei ^1H i valori in frequenza variano tipicamente da 4 a 400 MHz, ossia nel range della radiofrequenza (RF).

In un esperimento NMR l'ampiezza del segnale è proporzionale alla differenza di numerosità dei nuclei negli stati di energia quindi alla magnetizzazione netta del campione. Si può incrementare il segnale NMR agendo su tre fattori, come si vede dall'equazione (2.23) aumentando B_0 , cambiando nucleo di interesse (incremento di γ) oppure diminuendo T la temperatura di acquisizione.

2.5 Il segnale NMR

2.5.1 Free Induction Decay

Il segnale rilevato in un esperimento di NMR impulsata è legato ai principi fisici che lo hanno generato. Come già spiegato nel paragrafo 2.2, lavorando nel sistema rotante Σ_{ROT} si è mostrato come sia possibile muovere a piacimento il vettore magnetizzazione nucleare intorno alla direzione di applicazione del campo magnetico B_1 piano $x'y'$. L'effetto di questo campo, applicato per una durata limitata nel tempo τ , è quello di ruotare M dalla direzione z di un angolo α (flip angle) proporzionale alla durata dell'impulso e definito dalla relazione:

$$\alpha = \gamma B_1 \tau, \quad [rad] \quad (2.26)$$

Agendo su τ è possibile applicare un impulso RF a 90° e orientare il vettore magnetizzazione in modo da farlo giacere completamente sul piano trasversale rispetto alla direzione di B_0 . Sperimentalmente l'impulso viene generato appli-

cando una corrente RF, per un tempo finito, nella bobina in cui è posto il campione da indagare. La bobina usata per trasmettere l'impulso, dopo un breve tempo morto, viene usata come bobina ricevente il segnale generato dalla precessione degli spin sul piano $x'y'$, in cui è posta anche la bobina. Infatti il passaggio periodico del vettore magnetizzazione viene interpretato dal solenoide stesso come un campo magnetico variabile nel tempo: questo porta una variazione di flusso magnetico che genera una fem indotta (per la legge di Faraday-Neumann-Lenz) con frequenza pari a quella di precessione degli spin. Da questo meccanismo deriva il segnale NMR. Questo segnale di ritorno libero, cioè senza nessuna altra perturbazione al di fuori di quella del campo magnetico B_0 , all'equilibrio da parte di M , viene chiamato Free Induction Decay (FID) ed ha un andamento oscillatorio esponenziale decrescente. Nella pratica, il FID rivelato dal rilassometro NMR non ha questo andamento oscillatorio, generalmente viene visualizzata la sua decrescita esponenziale, che corrisponde alla deconvoluzione del segnale "grezzo".

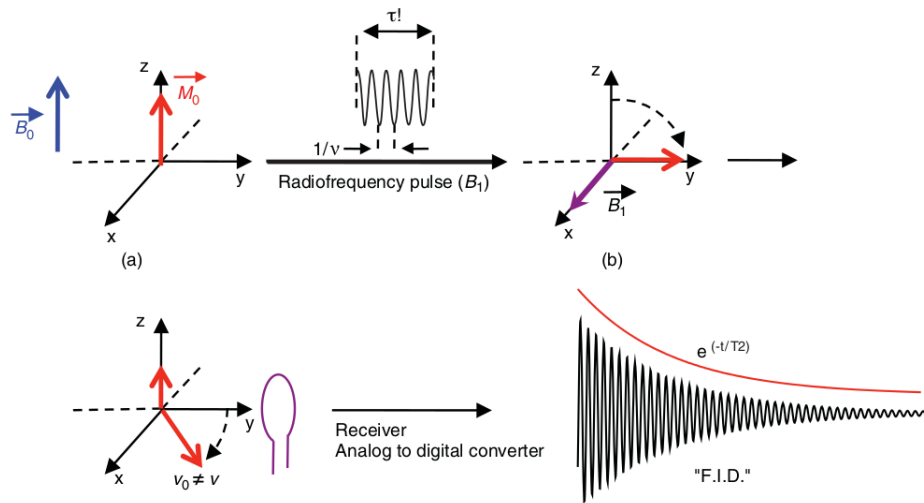


Figura 2.3: (a) magnetizzazione netta all'equilibrio M_0 , (b) l'impulso RF inclina il vettore magnetizzazione nel piano xy , (c) contemporaneamente al moto di precessione di M intorno a z il segnale nel piano xy decresce, (d) acquisizione del FID: il segnale appare come sinusoide smorzata.

Il campo magnetico esterno B_0 è prodotto sperimentalmente attraverso l'uso di elettromagneti o magneti permanenti e non è mai realmente uniforme, come invece supposto a livello teorico. Pertanto presenta nelle diverse zone del sistema

di spin, disomogeneità che creano una distribuzione di campi magnetici locali ai vari siti nucleari e, quindi una distribuzione, all'interno del campione macroscopico, di frequenze di Larmor. L'effetto di queste disomogeneità si traduce, in un esperimento NMR, in un decadimento più rapido della magnetizzazione trasversa rispetto al caso ideale; pertanto il parametro misurato a seguito di una sequenza di FID, non è il reale tempo di rilassamento dell'insieme di spin ma un tempo effettivo chiamato T_2^* la cui espressione è:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \gamma \frac{\Delta B_0}{2} \quad (2.27)$$

Dove con ΔB_0 si vogliono indicare le inomogeneità del campo statico espresse dalla differenza tra l'intensità di campo in posizione \vec{r} e quella nominale del campo magnetico, $\Delta B_0 = B_0(\vec{r}) - B_0$. Il corrispondente segnale di FID complesso può essere completamente descritto utilizzando le sue proiezioni sui piani (M_x, t) e (M_y, t) , legati alla parte reale e parte immaginaria del segnale. Dalle equazioni di Bloch si può ricavare:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) e^{-t/T_2} \int e^{i\gamma \Delta B_0(\vec{r})t} d\vec{r} = M_{xy}(0) e^{-t/T_2^*}$$

Negli esperimenti NMR il FID viene generalmente acquisito preventivamente per effettuare il tuning della bobina RF ed ottimizzare la risposta del sistema con la scelta della durata dell'impulso di $\pi/2$ che massimizzi il segnale stesso.

2.5.2 Sequenze di acquisizione

Come spiegato nel paragrafo precedente, a seguito delle problematiche intrinseche legate ad un esperimento NMR, nel tempo si è reso necessario implementare nuove sequenze impulsive per riuscire ad ottenere la stima più verosimile possibile dei due tempi di rilassamento nucleare T_1 e T_2 . Scegliendo opportunamente la successione degli impulsi è possibile imporre al sistema di spin una dinamica prescelta, ed ottenere i parametri del rilassamento caratteristici del sistema indagato. Di seguito si descrivono brevemente le sequenze utilizzate in questo lavoro

di tesi per la stima delle costanti di tempo dei rilassamenti longitudinale (T_1) e trasversale (T_2).

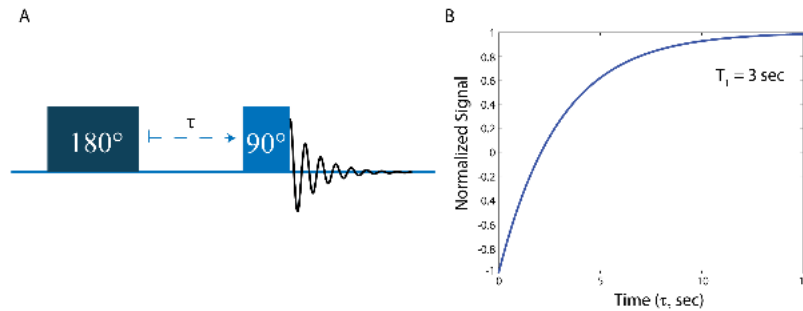


Figura 2.4: Sequenza IR. A) Diagramma temporale degli impulsi successivi della sequenza IR per la misura del T_1 del campione. B) Una simulazione di fit della curva ottenuta da una acquisizione IR per un campione con T_1 di 3s

Inversion Recovery (IR)

La sequenza Inversion Recovery (IR) viene utilizzata per misurare il tempo di rilassamento longitudinale T_1 . Inizialmente, alla magnetizzazione in equilibrio lungo il verso positivo dell'asse z viene inviato un impulso di π , detto impulso di inversione, applicato lungo x' per invertire il segno della magnetizzazione, da M_0 a \tilde{M}_0 , che viene a trovarsi in $-z$. A seguito di questo, il sistema di momenti magnetici nucleari è libero di rilassare e tornare alla condizione di equilibrio. Dopo un intervallo di tempo τ variabile, viene applicato al campione un impulso di $\pi/2$, ancora lungo x' , che ulteriormente rovescia la magnetizzazione nel piano $x'y'$, a cui segue l'acquisizione del segnale di FID. Per τ brevi rispetto al valore del T_1 , solo una piccola parte della magnetizzazione è già rilassata tornando lungo il verso positivo dell'asse z , mentre la maggior parte sarà ancora lungo $-z$. L'effetto netto dell'impulso di $\pi/2$ è, quindi, quello di avere nel piano $x'y'$ una magnetizzazione prevalente lungo $-y'$, a cui segue la rivelazione di un FID a valori negativi. Aumentando progressivamente l'intervallo di tempo τ tra l'impulso di inversione e l'impulso di acquisizione del FID, si vedrà progressivamente il segnale di FID diminuire in intensità fino ad annullarsi per poi, a tempi paragonabili o più lunghi

del T_1 intrinseco nel campione, iniziare a crescere nel verso positivo. la legge che guida il rilassamento longitudinale in una sequenza IR è data da:

$$M_z(\tau) = M_0(1 - 2e^{-\tau/T_1}) \quad (2.28)$$

Graficando per punti l'intensità del segnale di FID rilevata in funzione del tempo τ e interpolandola con la (2.28), è possibile ricavare il valore del tempo di rilassamento spin-reticolo del sistema.

Carr-Purcell-Meibom-Gill (CPMG)

Nel caso di campioni solidi, monocristalli o polveri, le imperfezioni legate alle disomogeneità di campo, a causa delle quali non è possibile misurare il vero T_2 dei campioni con la semplice sequenza di FID, vengono risolte utilizzando la cosiddetta sequenza spin-eco, (o eco di Hahn). Tuttavia questa sequenza non risulta essere la più adatta in presenza di campioni in fase fluida come nel nostro caso. Infatti per sistemi liquidi si presenta l'ulteriore problema legato alla diffusione delle molecole di acqua all'interno del campione, che nell'intervallo di tempo necessario per la misura, diffondono all'interno del campione andando a percepire campi diversi. A conseguenza di questo effetto, per lunghi intervalli di tempo del rifasamento del segnale nella sequenza di spin-eco, si ripresenterebbe il problema della perdita di coerenza degli spin e della misura di un tempo di rilassamento T_2 effettivo ma non realistico. L'utilizzo invece della sequenza Carr-Purcell-Meiboom-Gill (dal nome dei suoi creatori) permette di superare questo inconveniente attraverso una serie di impulsi applicati tutti lungo x' .

Infatti la sequenza CPMG ha inizio con un impulso di $\pi/2$ che permette di ruotare la magnetizzazione nel piano $x'y'$; a questo segue, dopo un intervallo di tempo τ , durante il quale la diffusione e le disomogeneità di campo agiscono sfasando gli spin nel piano trasverso, un impulso di π che fa a rifocalizzare gli stessi spin lungo $-y'$ dopo un ulteriore intervallo di tempo τ . Dopo questo intervallo di tempo pari a 2τ viene acquisito il segnale NMR di eco. Questa procedura viene ripetuta un numero n di volte fino all'azzeramento del segnale. In questo

modo, applicando ogni 2τ un impulso di 180° ed acquisendo, tra l'applicazione di un impulso ed il successivo, il segnale NMR, si ottiene il decadimento del T_2 reale del campione in esame. Il vantaggio rispetto alla sequenza spin-eco risiede nella possibilità di accorciare il tempo τ il più possibile, nei limiti strumentali, per ridurre l'effetto della diffusione. In pratica il vero T_2 del sistema si otterrebbe solo nel caso in cui 2τ tendesse a zero. Tuttavia, potendo accorciare τ fino a qualche decina di microsecondi, si ha in ottima approssimazione una stima molto buona del tempo di rilassamento trasversale.

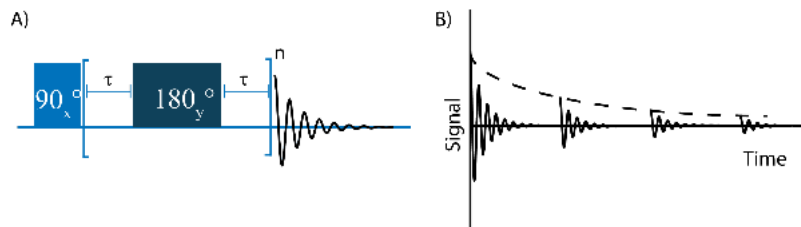


Figura 2.5: Sequenza CPMG. A) Diagramma temporale degli impulsi di una sequenza di acquisizione CPMG. B) esempio di fit del decadimento esponenziale che risulta dalla serie di eco successive, della sequenza CPMG, per la stima della costante di tempo T_2

Capitolo 3

NMR in presenza di molecole paramagnetiche

I meccanismi di rilassamento dello spin nucleare vengono influenzati dalla presenza di sostanze paramagnetiche. L'accoppiamento di momenti magnetici nucleari ed elettronici genera un'ulteriore percorso di rilassamento, che accelera il processo di ritorno all'equilibrio della magnetizzazione. Studi NMR in-vitro sull'interazione tra ioni paramagnetici e matrici organiche, tra le quali molto importanti le proteine del siero [22], forniscono una grande quantità di informazioni sulle modalità e dinamiche di legame che hanno permesso, nel tempo, di creare sistemi-modello attualmente alla base dello sviluppo degli agenti di contrasto usati in MRI, a scopo diagnostico [28]. In questo capitolo vengono descritte le modalità di interazione con i rispettivi tempi caratteristici, che concorrono all'incremento del rilassamento nucleare, le quali, possono essere scomposte nei contributi dipolare e di contatto. Una volta chiaro l'approccio teorico utilizzato per trattare matematicamente processi di questo tipo, si descrivono i meccanismi del rilassamento in presenza di ioni paramagnetici secondo i modelli di inner sphere e outer sphere con approccio Solomon-Bloembergen-Morgan [12]. In ultimo si mette in luce l'importante aspetto della dipendenza della rilassività dal campo magnetico.

3.1 Sostanze paramagnetiche

Si consideri una sostanza immersa in un campo magnetico omogeneo \vec{H} . Nello spazio occupato dalla sostanza il vettore induzione magnetica \vec{B} ed il vettore campo magnetico \vec{H} non coincidono ma sono legati tramite l'espressione:

$$\frac{\vec{B}}{\mu_0} = \vec{H} + \vec{M} \quad (3.1)$$

dove \vec{M} è la magnetizzazione della sostanza e μ_0 la permeabilità del vuoto. Dalla (3.1) si può facilmente verificare che l'induzione magnetica \vec{B} è generata dall'induzione magnetica nel vuoto ($\vec{B}_0 = \mu_0\vec{H}$) più un contributo ($\mu_0\vec{M}$) che dipende dal tipo di sostanza costituente il mezzo:

$$\vec{B} = \vec{B}_0 + \mu_0\vec{M} \quad (3.2)$$

Per effetto del campo magnetico, come già descritto nel capitolo 2, si viene a stabilire un momento magnetico complessivo indotto μ_{ind} . L'energia di interazione netta dell'intero sistema con il campo magnetico è data dal prodotto tra questo momento magnetico e \vec{B}_0 . La magnetizzazione M per unità di volume corrisponde al momento magnetico indotto per unità di volume e per la maggior parte delle sostanze è proporzionale al campo B_0 :

$$M = \frac{\mu_{ind}}{V} = \chi_V H = \frac{1}{\mu_0} \chi_V B_0 \quad (3.3)$$

dove, la costante adimensionale di proporzionalità χ_V tra M e H è la suscettibilità magnetica per unità di volume. Le sostanze paramagnetiche hanno suscettibilità positiva e consistono di molecole che presentano uno o più elettroni spaiati.

Negli esperimenti NMR la presenza di elettroni spaiati nei composti indagati, dovuti generalmente a ioni metallici o complessi di ioni metallici, paramagnetici, comporta un incremento dei tassi di rilassamento. L'interazione tra spin elettronico e nucleare può essere descritta in termini di contributi dipolari e di contatto.

3.2 Interazione dipolare

Secondo la descrizione classica dell'accoppiamento tra due dipoli posti a distanza r e dotati di momenti magnetici $\vec{\mu}_1$ e $\vec{\mu}_2$, l'energia di interazione E^{dip} è direttamente proporzionale al prodotto scalare dei momenti magnetici e inversamente proporzionale alla terza potenza della distanza:

$$E^{dip} \propto \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \quad (3.4)$$

Se l'orientamento reciproco dei due vettori cambia casualmente nel tempo, il campo magnetico fluttuante prodotto da uno dei due nella posizione dell'altro può indurre transizioni di spin e generare una modalità di rilassamento. In questo contesto siamo principalmente interessati alle transizioni di spin nucleari indotte da campi magnetici fluttuanti originati da elettroni spaiati. Ad ogni modo l'interazione nucleo-nucleo sarà sempre presente, anche se con peso minore, e contribuirà al rilassamento nucleare complessivo.

Nelle soluzioni diluite, di principale interesse per questo lavoro di tesi, ci sono tre meccanismi principali che causano l'originarsi di campi magnetici fluttuanti nel tempo a frequenze caratteristiche:

- **Il rilassamento elettronico:** il rilassamento dello spin elettronico è molto più rapido rispetto a quello dello spin nucleare.
- **Il tumbling molecolare:** assumendo che i momenti magnetici, sia nucleare che elettronico, di una stessa molecola siano allineati alla direzione del campo esterno, si può immaginare di come la rotazione della molecola generi un moto relativo tra i due momenti magnetici; il nucleo indagato risente di fluttuazioni di campo magnetico.
- **Lo scambio chimico:** questo meccanismo si verifica quando il nucleo di interesse appartiene ad una molecola che viene scambiata tra la molecola paramagnetica ed il composto bulk

I tassi di rilassamento nucleari saranno proporzionali all'energia quadratica media di questa interazione e ad un opportuna funzione di densità spettrale.

$$R_{1M} \propto \langle (E^{dip})^2 \rangle f(\omega, \tau_c) \quad (3.5)$$

La funzione f è funzione sia della frequenza delle transizioni di spin, ω , sia del tempo di correlazione, τ_c , del moto che modula l'interazione.

Funzione di correlazione e tempo di correlazione

La funzione correlazione è una funzione del tempo data dal prodotto dei valori di una qualche proprietà, dipendente dal tempo, in due diversi stati, sommato su un grande numero di particelle. Nel nostro caso la proprietà potrebbe essere M_s di un elettrone spaiato, e la funzione di correlazione dovrebbe essere calcolata su un grande numero di molecole che presentano tale proprietà. Allora al tempo $t = 0$ la funzione è massima; il prodotto $M_s(t)M_s(0)$ dà in ogni caso $1/4$ come risultato. Nel tempo, alcuni spin possono mutare la loro orientazione, quindi alcune molecole contribuiranno con $-1/4$. Si assume, in questa trattazione, che il valore della funzione correlazione $C(t)$ decresca approssimativamente in modo esponenziale.

$$C(t) \approx \left(\sum_i \frac{1}{4} \right) e^{(-t/\tau_c)} \quad (3.6)$$

In questo modo è possibile definire il tempo di correlazione τ_c come la costante di tempo con cui la funzione di correlazione va a zero.

- per $t \ll \tau$, sostanzialmente tutti gli spin mantengono il loro valore originale, pertanto la maggior parte dei prodotti darà $1/4$.
- per $t \gg \tau$, sostanzialmente tutti gli spin hanno cambiato il valore originale molte volte, pertanto, in media la metà degli spin risulterà avere il valore originale, l'altra metà lo avrà cambiato. La somma complessiva su tutti le molecole sarà statisticamente nulla.

La trasformata di Fourier di un decadimento esponenziale nel dominio del tempo, da una Lorentziana nelle frequenze:

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (3.7)$$

Questa funzione fornisce l'intensità delle varie frequenze disponibili nel reticolo a causa di fluttuazioni a cui τ_c è collegato.

3.2.1 Accoppiamento dipolare per dipoli puntiformi

Si consideri il caso in cui un elettrone ed un singolo nucleo siano trattati come dipoli puntiformi separati da una distanza r e gli elettroni spaiati siano localizzati solo sullo ione metallico. I livelli di energia del sistema di spin accoppiati, immersi nel campo magnetico B_0 , sono dati dalla seguente Hamiltoniana:

$$\mathcal{H} = g_e \mu_B \vec{B}_0 \cdot \hat{S} - \hbar \gamma_N \vec{B}_0 \cdot \hat{I} + \hat{I} \cdot \vec{A}_{dip} \cdot \hat{S} \quad (3.8)$$

dove, i primi due termini si riferiscono all'interazione Zeeman per elettrone e nucleo, rispettivamente, e l'ultimo termine è il termine di interazione dipolare. L'ultimo termine fluttua nel tempo ed il rilassamento è dovuto a queste fluttuazioni.

L'incremento al tasso di rilassamento longitudinale dovuto alla presenza degli ioni paramagnetici può essere calcolato a partire dalla (3.8) espresso in termini di probabilità di tutte le transizioni permesse tra gli stati di spin¹, dalle quali hanno origine le fluttuazioni di spin:

$$R_{1M} = T_{1M}^{-1} = W_{\omega_s - \omega_I} + 2W_{\omega_I} + W_{\omega_s + \omega_I} \quad (3.9)$$

¹ Il calcolo deriva dalla teoria delle perturbazioni dipendenti dal tempo in cui H_0 ossia il termine Hamiltoniano non perturbato è rappresentato dai primi due termini della (3.8) con autovalori $E_n = \hbar \omega_n$, mentre il termine perturbativo H_1 è rappresentato dalle fluttuazioni di campo magnetico locale comportate dall'interazione dipolare.

3.3 Interazione di contatto

Il rilassamento nucleare può anche essere generato da interazioni di contatto dei momenti magnetici nucleari con la densità di spin spaiati delocalizzati sui nuclei stessi. Se l'energia di interazione oscilla allora si verificano incrementi del tasso di rilassamento nucleare, i quali, sono proporzionali al valore quadratico medio dell'energia di interazione:

$$R_i \propto \langle (E^{int})^2 \rangle \quad i=1M,2M \quad (3.10)$$

Il contributo all'Hamiltoniana dovuto all'interazione iperfine tra elettroni spaiati e un nucleo con spin I può essere espresso come segue:

$$\mathcal{H} = A_c \hat{I} \cdot \hat{S} \quad (3.11)$$

dove \hat{S} è l'operatore di spin elettronico totale della molecola e A_c la costante di accoppiamento di contatto di Fermi, la quale è definita da:

$$A_c = \frac{2}{3} \mu_0 \hbar \gamma_I g_e \mu_B \rho \quad (3.12)$$

$$\rho = \Psi_{-1/2}(0)^2 - \Psi_{+1/2}(0)^2 \quad (3.13)$$

Poichè la costante di accoppiamento iperfine, A_c^2 , è legata alla densità di spin sui nuclei risonanti ρ , porta con se alcune importanti informazioni che riguardano la natura dell'interazione tra il nucleo risonante e lo ione metallico paramagnetico. Ψ rappresenta la funzione d'onda dell'orbitale molecolare. $\Psi(0)$ è il suo valore calcolato a distanza zero dal nucleo, per le densità elettroniche positiva $+1/2$ e negativa $-1/2$.

Anche in questo caso, calcolando le probabilità di transizione tra gli stati di spin permessi per unità di tempo si ottiene il contributo dell'interazione di contatto

² A_c è un'energia e si esprime in *Joule* ma si può trovare espressa anche in unità di frequenza nella forma $\left(\frac{A_c}{\hbar}\right)$, nel quale caso l'unità di misura è l'*Hz* oppure il *rad/s*.

alla velocità di rilassamento:

$$W_{\omega_I} = W_{\omega_S} = W_{\omega_S + \omega_I} = 0 \quad (3.14)$$

$$R_{1M} = W_{\omega_S - \omega_I} \propto \left(\frac{A_c}{\hbar} \right) \quad (3.15)$$

3.4 Modello del rilassamento paramagnetico

I sistemi paramagnetici sono sostanze che presentano suscettività positiva in presenza di un campo magnetico associata agli elettroni spaiati negli orbitali. Queste specie paramagnetiche influenzano i risultati NMR interagendo con i nuclei risonanti, tramite le modalità riportate nei paragrafi precedenti, comportando un incremento dei tassi di rilassamento degli spin nucleari, nel caso di specie protoni. Questo effetto è anche conosciuto come Proton Relaxation Enhancement (PRE).

La rilassività dell'agente paramagnetico

In un esperimento NMR, il tasso di rilassamento osservato per i protoni dell'acqua è dato dalla somma di due contributi, il contributo diamagnetico ed il contributo paramagnetico:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,dia}} + \frac{1}{T_{i,par}} \quad i = 1,2 \quad (3.16)$$

ove per contributo diamagnetico si intende l'inverso del tempo di rilassamento del campione in assenza di centri paramagnetici, mentre per contributo paramagnetico quello del centro magnetico. Il termine paramagnetico fornisce, inoltre, l'incremento al tasso di rilassamento complessivo causato dalla sostanza paramagnetica che è linearmente proporzionale alla concentrazione della specie paramagnetica [SP]:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,dia}} + r_i[SP] \quad i = 1,2 \quad (3.17)$$

La concentrazione di soluto paramagnetico viene generalmente espressa in mmol per litro (*mM*) nei sistemi diluiti. Graficando il tasso di rilassamento osservato in funzione della concentrazione di complesso paramagnetico si ottiene una retta,

la cui pendenza definisce operativamente la *relattività* del sistema, r_i , espressa in $mM^{-1}s^{-1}$.

Contributi alla rilattività

Le soluzioni di interesse contengono generalmente radicali liberi o complessi di metalli di transizione e la trattazione è del tutto analoga agli agenti di contrasto MRI in ambito medico. L'effetto del campo magnetico locale, generato dal centro paramagnetico, decresce rapidamente con la distanza. Per questo motivo, tutte quelle interazioni chimiche, che comportano la diffusione di molecole d'acqua del solvente in prossimità del centro paramagnetico, giocano un ruolo importante nella propagazione dell'effetto paramagnetico al solvente bulk. Le diverse interazioni chimiche comportano contributi diversi alla rilattività che dipendono in ultimo dal tempo di interazione con lo ione metallico.

In questo tipo di soluzioni si possono incontrare comunemente situazioni in cui i ligandi dotati degli spin nucleari di interesse possono trovarsi in due diversi ambienti: possono o risiedere in una delle sfere di coordinazione del centro metallico oppure possono venire a trovarsi nella soluzione bulk. Queste due modalità contribuiscono in modo diverso alla rilattività complessiva dell'agente paramagnetico, quindi all'abbattimento dei tempi NMR.

La duplice natura, intramolecolare ed intermolecolare, del rilassamento paramagnetico, rende possibile separare i contributi alla rilattività generata dall'agente metallico in contributo di *inner-coordination sphere*, *IS* e contributo di *outer-coordination sphere*, *OS* seguente modo:

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} \quad i = 1,2 \quad (3.18)$$

Per alcuni agenti paramagnetici si può verificare la situazione in cui molecole del solvente, non appartenenti alla prima sfera di coordinazione, rimangono in prossimità del centro metallico per un tempo relativamente lungo; in termini chimici ciò è dovuto alla formazione di legami deboli, come ponti Idrogeno, con i ligandi o con le molecole appartenenti alla sfera interna di coordinazione. Questo even-

tuale ulteriore contributo alla rilassività del sistema si chiama di *second sphere* ed è trattato alla stregua del contributo di *inner sphere*.

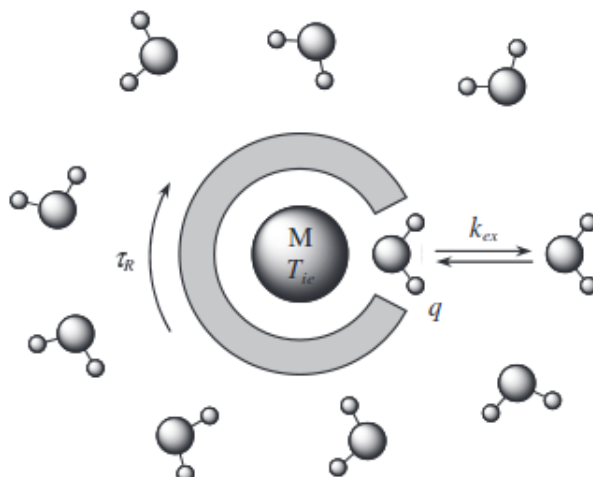


Figura 3.1: Rappresentazione schematica di uno ione metallico paramagnetico chelato, che ha una molecola d'acqua nella sfera interna di coordinazione. τ_R è il tempo di correlazione rotazionale del complesso, k_{ex} rappresenta il tasso di scambio delle molecole d'acqua (dei protoni delle molecole d'acqua). $T_{i,M}$ è il tempo di rilassamento (longitudinale o trasversale) dei protoni delle molecole d'acqua coordinate, mentre, $T_{i,e}$ è il tempo di rilassamento (longitudinale o trasversale) dello spin elettronico del centro paramagnetico.

3.4.1 Rilassività protonica di sfera interna

Il contributo *inner sphere* alla rilassività è dovuto allo scambio chimico dei ligandi ³ che implica una sostituzione, per un certo tempo, delle molecole di acqua coordinata con le molecole di acqua bulk (rappresentato in Figura 3.1). Data una soluzione in cui sono presenti ioni paramagnetici, il tasso di rilassamento dovuto al meccanismo di sfera interna può essere descritto come:

$$r_i^{IS} = \left(\frac{1}{T_{i,par}} \right)^{IS} = \frac{c q}{55,6 (T_{i,m} + \tau_m)} \quad (3.19)$$

³Esempio di *water exchange* per acqua-ioni, dove, con M si indica lo ione paramagnetico e con $*$ si indicano le molecole di acqua bulk: $[M(H_2O)_n]^{2+} + H_2O^* \rightarrow [M(H_2O)_{n-1}(H_2O^*)]^{2+} + H_2O$

dove c è la molarità, q è il numero di molecole coordinate per centro paramagnetico, $T_{i,m}$ è il tempo di rilassamento dei protoni e τ_m la vita media dei legami, delle molecole d'acqua nella sfera di prima coordinazione.

La costante di tempo del rilassamento delle molecole d'acqua legate è costituita da due componenti, una dipendente dalla distanza dal centro paramagnetico, la componente dipolare, ed una scalare o di contatto, dovuta al legame, inoltre, dipende dal campo magnetico applicato. Dalla teoria Solomon-Bloembergen si ottengono le equazioni sia per il rilassamento longitudinale sia per la componente trasversale:

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_{1,M}} = & \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1)}{r^6} \left[\frac{7\tau_{c2}}{1 + (\omega_S \tau_{c2})^2} + \frac{3\tau_{c1}}{1 + (\omega_I \tau_{c1})^2} \right] + \\ & + \frac{2}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \left[\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right] \end{aligned} \quad (3.20)$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_{2,M}} = & \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1)}{r^6} \left[\frac{6,5\tau_{c2}}{1 + (\omega_S \tau_{c2})^2} + \frac{1,5\tau_{c1}}{1 + (\omega_I \tau_{c1})^2} + 2\tau_{c1} \right] + \\ & + \frac{2}{3} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 S(S+1) \left[\frac{\tau_{e2}}{1 + \omega_S^2 \tau_{e2}^2} \right] \end{aligned} \quad (3.21)$$

Nelle equazioni sopra riportate, S rappresenta lo spin elettronico totale, $\omega_{S,I}$ rispettivamente, le frequenze di Larmor per gli spin elettronici e nucleari, r è la distanza centro-centro tra lo ione metallico ed il protone dell'acqua, il rapporto A/\hbar rappresenta la costante di accoppiamento iperfine scalare. I meccanismi di rilassamento, di cui sopra, sono modulati dai tempi di correlazione τ_{ci} e τ_{ei} , definiti

come segue:

$$\frac{1}{\tau_{ci}} = \frac{1}{T_{1,e}} + \frac{1}{\tau_m} + \frac{1}{\tau_r} \quad (3.22)$$

$$\frac{1}{\tau_{ei}} = \frac{1}{T_{1,e}} + \frac{1}{\tau_m} \quad (3.23)$$

dove, con T_{1e} si intende la costante di tempo del rilassamento dello spin elettronico, mentre con τ_r si indica il tempo di correlazione rotazionale.

La rilassività *inner-sphere* (Equazione 3.19) è linearmente proporzionale al numero di molecole direttamente coordinate allo ione metallico paramagnetico, q . Questo numero, noto anche come numero di idratazione, va da 1 per i metalli fortemente chelati (ad esempio, Gd^{3+} -DOTA), a 8-9 per gli ioni metallici liberi in soluzione (ad esempio, Gd^{3+}). Gli acqua-ioni paramagnetici che presentano diverse molecole d'acqua nella prima sfera di coordinazione sarebbero agenti di contrasto ideali perchè le molecole d'acqua coordinate sono in rapido scambio con le molecole d'acqua del solvente. A causa della loro tossicità, però, i metalli paramagnetici non vengono somministrati nella loro forma ionica ma sono sempre coordinati attraverso molecole organiche che rendono il complesso biocompatibile per l'organismo.

Anche l'intervallo di tempo τ_m (dove $\tau_m = 1/k_{ex}$) gioca un ruolo importante nella determinazione della rilassività protonica. Esso modula l'efficienza dello scambio chimico di molecole d'acqua dalla sfera di coordinazione interna del metallo al suo intorno (Equazione 3.19) contribuendo al tempo di correlazione τ_c (Equazioni 3.22 e 3.23), che dirige l'interazione dipolare elettrone-nucleo.

Il tempo di correlazione di riorientamento molecolare τ_r , può essere qualitativamente stimato dall'equazione Stokes-Einstein, la quale è valida per particelle

sferiche Browniane che ruotano isotropicamente nel mezzo:

$$\tau_r = \frac{4\pi\eta a^3}{3k_B T} \quad (3.24)$$

dove con η ci si riferisce alla viscosità⁴ del solvente e con a al raggio della molecola. τ_r dipende dal peso molecolare⁵ del complesso.

Nelle equazioni (3.20) e (3.21) il termine $1/r^6$ esprime la dipendenza spaziale dell'interazione dipolare che risulta tanto maggiore quanto più le molecole d'acqua si avvicinano agli ioni paramagnetici. La costante dell'accoppiamento iperfine esprime, invece, la probabilità che si realizzi un'interazione di contatto tra un elettrone spaiato e una molecola d'acqua. Di solito, ad eccezione di alcuni metalli di transizione che delocalizzano i loro elettroni orbitali sui protoni dell'acqua, il termine scalare può essere trascurato rispetto a quello dipolare.

Sulla teoria Solomon-Bloembergen-Morgan

La teoria Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM) è una delle teorie più semplici e viene comunemente utilizzata per predire matematicamente il PRE osservato. Ad ogni modo l'intero set di equazioni, dalle quali si possono ricavare le equazioni (3.20) e (3.21) è basato su diverse approssimazioni che, per completezza, si riportano:

- gli elettroni spaiati vengono considerati come dipoli puntiformi, di conseguenza viene totalmente trascurata la densità di spin elettronico delocalizzata
- il riorientamento molecolare viene assunto essere isotropico e caratterizzato da un singolo tempo di correlazione rotazionale, in questo modo si trascurano anisotropie e moti interni

⁴Nel SI la viscosità si misura in $Kg s^{-1} m^{-1}$. Per H_2O a $25^\circ C$ $\eta = 0,8904 \cdot 10^{-3} Kg s^{-1} m^{-1}$

⁵Il P.M. si misura in $Kg mol^{-1}$, valori calcolati in soluzioni acquose a temperatura ambiente vanno da $10^{-11} s$ per complessi esaidrati, a $10^{-8} s$ per piccole proteine (P.M. $\sim 10^4$), a $10^{-6} s$ per macromolecole (P.M. $\sim 10^6$).

- i tempi di correlazione caratteristici dei singoli processi coinvolti vengono trattati come indipendenti (approssimazione di decomposizione)
- il rilassamento dello spin elettronico viene trattato come processo di decadimento monoesponenziale, più precisamente segue la teoria di Redfield per $S=1$ ad alti campi magnetici (dove domina l'effetto Zeeman)

3.4.2 Rilassività protonica di sfera esterna

L'effetto di sfera esterna fornisce il rilassamento addizionale comportato dalla traslazione delle molecole d'acqua in prossimità dei chelati del centro paramagnetico e può essere spiegato in termini di interazione dipolare a lungo raggio, tra lo spin nucleare dell'idrogeno e quello elettronico. Bennett et all.[8] definiscono il rilassamento di sfera esterna come:

$$\frac{1}{T_{1,outer}} = \frac{32\pi}{405} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \frac{N_{Ac} [7J(\omega_S) + 3J(\omega_I)]}{1000dD} \quad (3.25)$$

$$\frac{1}{T_{2,outer}} = \frac{32\pi}{405} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) \frac{N_{Ac} [6, 5J(\omega_S) + 1, 5J(\omega_I) + 2]}{1000dD} \quad (3.26)$$

$\gamma_{I,S}$ sono, rispettivamente, i fattori giromagnetici espressi in rad/s di protone ed elettrone. N_A è il numero di Avogadro, D somma dei coefficienti di diffusione dell'acqua D_I e del centro paramagnetico D_S , S lo spin elettronico totale, c la concentrazione molare degli ioni metallici e d distanza di minimo avvicinamento per una molecola d'acqua allo ione metallico.

Definendo il tempo di correlazione traslazionale come $\tau_t = d^2/D$, si può ricavare la funzione densità spettrale di Freed et all. [24]:

$$J(\omega) = \frac{1 + \frac{5}{8}z + \frac{1}{8}z^2}{1 + z + \frac{1}{2}z^2 + \frac{4}{81}z^4 + \frac{1}{648}z^6} \quad (3.27)$$

con $z = 2(\omega\tau_t + \tau_t/\tau_s)^{1/2}$.

Per gli ioni metallici strettamente chelati, l'effetto *outer-sphere* domina il contributo paramagnetico totale al rilassamento sperimentale.

3.5 Profili NMRD

Il contenuto di informazioni delle misure dei tassi di rilassamento, sia in sistemi diamagnetici che in sistemi paramagnetici, può essere ampiamente aumentato effettuando questo tipo di misure in funzione del campo magnetico. Per le specie paramagnetiche la ragione principale è la forma funzionale delle equazioni discusse nei paragrafi precedenti (3.4.1 e 3.4.2), poichè $\omega_I = \gamma_I B_0$ e $\omega_s = \gamma_s B_0$ ($\omega_s = 658\omega_I$ per i protoni). La dipendenza della rilassività r_i (equazione 3.18) dal campo magnetico esterno viene rappresentata nei profili di dispersione del rilassamento nucleare (NMRD profile), i quali, riportano le variazioni di $(1/T_i)$ in funzione della frequenza di Larmor (o dell'intensità del campo magnetico applicato). Rilassometri FC(Field Cycling)-NMR dedicati permettono di ottenere dati di rilassamento su un range esteso di frequenze (0.01 MHz - 10 MHz). Dati ulteriori possono essere acquisiti con strumenti che operano a campi più alti.

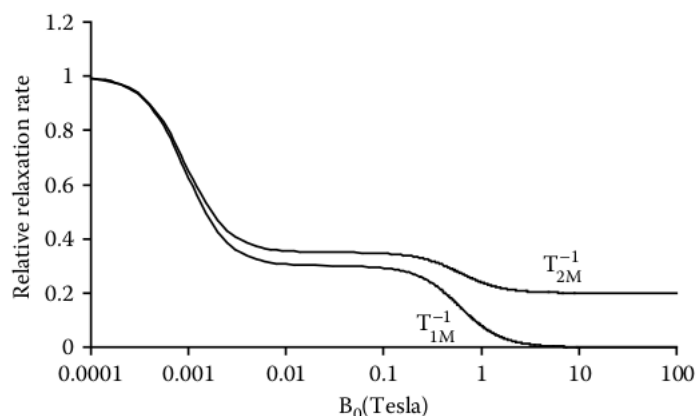


Figura 3.2: Esempio di dipendenza dal campo magnetico dei termini dipolari dei tassi di rilassamento, longitudinale e trasversale, calcolati in accordo con la teoria SBM dalle equazioni (3.20) e (3.21), assumendo che il tumbling molecolare sia il meccanismo dominante di modulazione, imponendo $\tau_c = 1ns$

Capitolo 4

Materiali e Metodi

4.1 I campioni biologici

Nella parte sperimentale di questo lavoro di tesi si sono trattate matrici biologiche, umane e animali. I campioni includono fluidi corporei quali siero e urina, e biopsie crioconservate di numerosi tessuti di conigli studiati in un lavoro del 2012 (Apostoli et al. [6]) sulla valutazione degli effetti clinici neuropatologici dovuti al rilascio di agenti tossici da parte di protesi all'anca MoM al Co-Cr, gentilmente concessi da Simona Catalani, una delle fautrici di tale ricerca. Nonostante questi campioni animali negli anni siano stati utilizzati più volte, e quindi siano stati sottoposti a numerosi cicli congelamento-scongelo presentano uno stato di conservazione ancora soddisfacente ai fini del nostro lavoro. I dettagli tecnici su come i conigli siano stati trattati e sulle condizioni fisico-chimiche delle biopsie riutilizzate allo stato del nostro lavoro saranno riportati nei paragrafi successivi.

La concentrazione complessiva di ^{59}Co di ogni matrice è stata quantificata tramite la tecnica analitica ICP-MS, con strumentazione Elan DRC II (Perkin Elmer, Waltham, USA) equipaggiata di Dynamic Cell Reaction (DCR), presso il Laboratorio di Igiene e Tossicologia industriale (LITO) – Spedali Civili di Brescia – Università degli Studi di Brescia.

4.1.1 Campioni di siero umano

Il siero umano utilizzato per le misure di questa tesi proviene dalla collezione di campioni biologici dei pazienti ricoverati all'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) di Bologna, conservati in loco, nel Laboratorio di Biologia del reparto di Tecnologia Medica. Questi campioni sono destinati all'analisi elementale al fine di un monitoraggio routinario dei loro valori. I pazienti selezionati per questo studio sono o portatori di protesi d'anca ad accoppiamento MoM con alti livelli ematici di Cobalto, o pazienti sani non portatori di protesi MoM-CoCr con livelli di cobalto entro la soglia di normalità utilizzati come controllo (Tabella 4.1), che hanno sottoscritto consenso informato. A partire dai campioni 9996 e 7649 (sieri di controllo), e 7695 (siero di paziente che presenta una concentrazione di Co di $200\mu\text{g}/\text{L}$ imputabile ad emissione da protesi) si sono preparati tre set di campioni finalizzati alle acquisizioni NMR, a varie concentrazioni di Cobalto. Sono stati predisposti anche due ulteriori campioni uno di siero a concentrazione di Cobalto pari a $9,9\mu\text{g}/\text{L}$ e uno di urina di concentrazione di Cobalto pari a $113,7\mu\text{g}/\text{L}$ di un altro paziente. Per la misura dei tempi di rilassamento si è utilizzato un volume di $250\mu\text{L}$ di composto per ogni campione indagato mentre per le misure di rilassività con Fast Field Cycling è stato necessario utilizzare un volume maggiore pari a 1mL , per ottimizzare il rapporto segnale/rumore delle misure.

| n. paziente | genere | età | MoM-HA | [Co] ($\mu\text{g}/\text{L}$) |
|-------------|--------|-----|--------|---------------------------------|
| 9996 | F | 42 | N | Siero-0,3 |
| 9941 | F | 77 | N | Siero-0,3 |
| 7649 | M | 41 | N | Siero-0,2 |
| 9450 | F | 56 | S | Siero-9,9 |
| 9450 | F | 56 | S | Urina-113,7 |
| 7695 | F | 72 | S | Siero-200 |

Tabella 4.1

Set campioni *ex-vivo*

Questo set di campioni è stato predisposto per riprodurre i valori sierici di Cobalto che si riscontrano nella letteratura dei *case report* di metallosi peri-protesica e cobaltismo artroprotesico. A partire da siero di una paziente che presentava una concentrazione di Cobalto molto alta pari a $200 \mu\text{g/L}$ (paziente 7695) si è utilizzato il siero di controllo 9996 per ottenere delle diluizioni a vari step di concentrazione di Co in modo da indagare principalmente alle basse concentrazioni. Le concentrazioni di Cobalto ottenute sono pari a: $200\mu\text{g/L}$, $100\mu\text{g/L}$, $50\mu\text{g/L}$, $25\mu\text{g/L}$, $5\mu\text{g/L}$, $2,5\mu\text{g/L}$, $1,2\mu\text{g/L}$, $0,6\mu\text{g/L}$ e $0,3\mu\text{g/L}$.

Set campioni *in-vitro* con siero di controllo 7649

Questo set di campioni *in-vitro* è stato predisposto a partire da siero di controllo 7649 (tabella 4.1) aggiungendo un quantitativo di CoCl_2 -esaidrato esaidrato purissimo (31277 Sigma-Aldrich, Cobalt(II) Chloride Hexahydrate, puriss.p.a., 99-102%) in modo da andare a simulare gli step di concentrazione di Co del set di campioni *ex-vivo* e anche da raggiungere concentrazioni sieriche di Co molto alte, fino ad un valore di 200g/L . Oltre agli step di concentrazione di Co del set *ex-vivo* si sono aggiunti i valori di $0,3 \text{ g/L}$, $0,44 \text{ g/L}$, 25 g/L e 200 g/L .

Set campioni *in-vitro* con siero di controllo 9996

Il set di campioni *in-vitro*, è stato preparato a partire dal siero di controllo 9996 (Tabella 4.1) cui è stato aggiunto CoCl_2 esaidrato purissimo (31277 Sigma-Aldrich, Cobalt(II) Chloride Hexahydrate, puriss.p.a., 99-102%) a diversi step di concentrazione a concentrazione molto alta nel range $0,3\text{g/L} - 200 \text{ g/L}$.

4.1.2 Campioni tessuto animale

I campioni di tessuto animale, sono costituiti da porzioni di tessuto estratte da vari organi di conigli. Tali conigli sono stati preventivamente trattati con Cobalto, il quale, una volta metabolizzato si va a distribuire in concentrazione variabile in alcuni tessuti target. Le biopsie utilizzate in questo lavoro provengono da due

conigli trattati (2A e 3A) ed un coniglio non trattato (B_k) di controllo. Sia il volume che lo stato di conservazione dei campioni è variabile e verrà giudicato, singolarmente, per ogni misura. I valori delle concentrazioni di Cobalto riscontrate nelle biopsie sono riportati in tabella 4.2 e sono funzione del peso secco di campione; i dettagli dello studio e del trattamento subito dagli animali verranno descritti nel paragrafo successivo.

| Concentrazioni di Cobalto nei vari tessuti, in $\mu\text{g/g}$ | | | |
|--|-----------|-----------|-------------------------|
| TESSUTO | A2 | A3 | B_k |
| <i>Encefalo</i> | 0,405 | 0,079 | 0,02 |
| <i>Polmone</i> | 1,44 | 0,38 | nd |
| <i>Cuore</i> | 1,07 | 0,42 | 0,12 |
| <i>Fegato</i> | 1,58 | 0,72 | 0,14 |
| <i>Adipe</i> | 0,05 | 0,009 | 0,003 |
| <i>Pancreas</i> | 1,15 | 0,073 | 0,46 |
| <i>Muscolo Zampa</i> | 0,1 | 0,071 | 0,016 |
| <i>Rene</i> | 3,5 | 1,48 | 0,53 |
| <i>Muscolo Addome</i> | 0,13 | 0,057 | 0,055 |

Tabella 4.2

Origine delle biopsie animali

La fase *in vivo* di questo studio [6] era stata condotta su 21 conigli New Zeland White di entrambi i sessi e circa 4 Kg di peso corporeo, trattati ad elevate dosi di Cobalto e Cromo, per un intervallo di tempo utile a mimare un rilascio cronico di materiale metallico, da sorgente interna all'organismo, quale potrebbe essere una protesi d'arto usurata. In particolare, l'obiettivo di tale studio era quello di riprodurre il rapporto Volume Ematico-Cobalto riportato precedentemente in un *case report* di cobaltismo artroprotesico del 2009 (Rizzetti et al. [36]). Per farlo avevano scelto di somministrare per via endovenosa sia il Cobalto che il Cromo nella forma chimica di cloruro, solubilizzato in soluzione fisiologica. In tabella 4.3 vengono riportati i valori delle dosi giornaliere assunte dai conigli ed il tempo di esposizione al trattamento. A trattamento completato da ciascun animale sono stati prelevati encefalo, polmone, cuore, nervi ottici, fegato, tessuto adiposo,

pancreas, muscolo, rene e, da uno dei due occhi, i fluidi oculari. Su tali organi, analogamente al sangue ed al plasma, è stata valutata la concentrazione di cobalto con una strumentazione per la spettrometria di massa accoppiata induttivamente al plasma (ICP-MS).

| gruppo | animali/gruppo | CoCl ₂ | CrCl ₃ | giorni |
|--------|----------------|-------------------|-------------------|--------|
| A | 4 | 1354 | - | 18 |
| B | 4 | 1354 | 820 | 18 |
| C | 4 | - | 820 | 18 |
| D | 7 | 1354 | - | 42 |
| D | 7 | 2708 | - | 53 |
| E | 2 | - | - | - |

Tabella 4.3: Dosi di CoCl₂ e CrCl₃ (espresse in µg disciolti in 1 mL di soluzione salina fisiologica) somministrate giornalmente per infusione endovenosa e durata del trattamento. La tabella è stata tratta da [6]

4.1.3 Quantificazione del ⁵⁹Co tramite ICP-MS

Il Cobalto nei campioni di siero, urine e tessuti, viene misurato con una strumentazione ICP-MS, Elan DRC II, Perkin Elmer, Waltham, USA equipaggiata di Dynamic Cell Reaction (DCR) nei laboratori di Brescia. I LOD (Limits Of Detections) della metodica sono stati calcolati come tre deviazioni standard dal segnale di background ottenuto su 10 campioni “bianchi”. Per sangue, plasma e tessuti i LOD sono rispettivamente di 0,1 µg/L, 0,05 µg/L e 0,003µg/L. La precisione del metodo viene determinata in acqua naturale, fegato bovino standard di riferimento (NIST 1640 e MS1577b, rispettivamente, National Institute of Standard e Technology, Gaithersburg, MD) e materiali di riferimento per le diverse matrici 1A / B (campioni di sangue) e 11A / B (plasma) certificati dalla Società Tedesca di Occupational and Environmental Medicine (Erlangen, Germania) [6].

Descrizione della metodica ICP-MS

La ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) [2][25][1] è una tecnica analitica utilizzata per la determinazione elementale ad alta sensibilità.

La sorgente di plasma ad accoppiamento induttivo ionizza gli atomi degli elementi nel campione; le diverse forme ioniche vengono prima separate da uno spettrometro di massa infine rivelate da un sistema di acquisizione, Figura 4.1. La soluzione acquosa dell'analita viene immessa nebulizzata nella torcia al plasma (ICP) sottoforma di finissimo aerosol. L'altissima temperatura del plasma (6000°C) ionizza le gocce in sospensione creando un fascio di ioni. Poichè la torcia ICP lavora a pressione atmosferica mentre lo spettrometro di massa a vuoto spinto (10^{-6} Torr), esiste una zona di interfaccia composta di due coni di materiale inerte sia alle elevate temperature che all'ambiente acido che favorisce un efficiente trasporto degli ioni. Un sistema di lenti focalizza gli ioni nella cella di reazione mantenendoli il più possibile coerenti con quelli formati nel plasma, eliminando particelle neutre e fotoni dal plasma sono riuscite ad attraversare i coni. Questo sistema è fondamentale in quanto screma ciò che arriverà successivamente al rivelatore. Lo spettrometro è dotato di selettore quadrupolare. Il quadrupolo è un filtro di massa, è costituito da quattro barre di metallo parallele alle cui coppie diagonalmente opposte vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fisso unito ad un altro oscillante con frequenze nel range delle onde radio, fa muovere gli ioni secondo traiettorie sinusoidali consentendo solo a quelli che possiedono un preciso rapporto massa-carica elettrica, stabilito a priori, di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore; gli altri ioni si scontrano con le barre metalliche e sono pompate all'esterno del sistema. Quando l'analita colpisce il rivelatore, una serie di dinodi moltiplica il segnale fino a formare il segnale di lettura che viene interpretato da un software dedicato.

Cella dinamica di reazione

La DRC (dynamic reaction cell) [2][25][1] è parte integrante dello strumento e si trova tra l'ottica conica e il quadrupolo analizzatore. Anch'essa sfrutta un sistema quadrupolare situato all'interno di una camera di reazione chiusa, il quale ha la funzione di eliminare le interferenze poliatomiche causate dalla combinazione tra i gas del plasma e i costituenti della matrice del campione, prima che questi

possano entrare nello spettrometro di massa. All'interno della cella sono presenti dei reagenti in fase gassosa come ammoniacca, metano e altri gas, ognuno dei quali viene selezionato in base alle proprie capacità di interagire con gli ioni interferenti e quindi di eliminarli. Quando il campione entra nella DRC, la combinazione tra il gas di reazione e lo ione interferente crea un prodotto con massa differente che non si sovrappone a quella dell'analita da individuare. Il risultato è l'eliminazione completa dell'interferente in qualsiasi matrice.

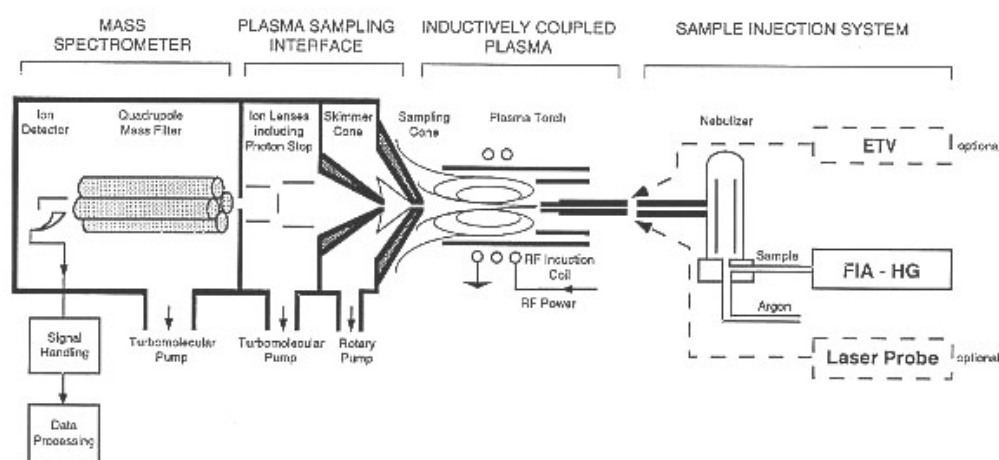


Figura 4.1: Rappresentazione schematica del sistema ICP-MS, PerkinElmer ELAN DRC II. fonte: <http://icp-ms.wikispaces.com/>

4.2 Rilassometria $^1\text{H-NMR}$

Sono state effettuate misure di rilassometria NMR per stimare i tempi di rilassamento caratteristici, sia longitudinale (T_1) che trasversale (T_2), dei nuclei degli atomi di Idrogeno dei campioni. Le misure sono state effettuate presso i laboratori NMR del Dipartimento di Fisica e Astronomia dell'università di Bologna, dell'Università di Pavia e dell'Università di Milano e sono state condotte sui tre diversi elettromagneti con le medesime modalità, utilizzando una console di acquisizione portatile Stellar (Stellar s.r.l.). Si riporta la descrizione dell'apparato presente a Bologna dove i dati NMR sono stati acquisiti con un campo statico applicato $B = 0,47$ T corrispondente ad una frequenza per i nuclei di Idrogeno

$\nu_L = 20,15$ MHz. Per la determinazione del tempo T_1 si è utilizzata la sequenza di acquisizione *IR* (paragrafo 2.5.2) mentre per la determinazione del tempo caratteristico T_2 si è usata la sequenza *CPMG* (paragrafo 2.5.2).

4.2.1 Sistema di acquisizione del segnale NMR

L'apparato sperimentale utilizzato per l'acquisizione del segnale NMR è costituito da varie componenti: un elettromagnete Jeol in grado di generare un campo magnetico di circa 0,5 T corrispondente ad una frequenza di $\nu_0 = 20,15$ MHz connesso ad un sistema di *locking* per la stabilizzazione del campo statico; una bobina trasmittente e ricevente di impulsi RF; un preamplificatore, un generatore di impulsi, un oscilloscopio e infine un convertitore analogico-digitale connesso ad un pc-console portatile Stelar. Quest'ultimo è dotato di software dedicati per il controllo remoto dei parametri di acquisizione delle sequenze di impulsi e per l'analisi del segnale di output.

Perchè vengano garantite le condizioni ottimali di funzionamento dell'apparato sperimentale è opportuno effettuare delle operazioni preventive al caricamento della sequenza desiderata e quindi all'acquisizione del segnale.

Il *probe* del sistema è la cavità all'interno della bobina ricetrasmittente posizionata tra le due espansioni dell'elettromagnete. Le provette dedicate per l'acquisizione dei campioni hanno dimensioni standard (diametro massimo di 10mm) ma poichè il volume dei campioni può variare, vanno posizionate all'interno del *probe* in modo che la parte di campo più omogenea comprenda il volume maggiore di campione.

L'inserimento di un carico nella bobina in presenza un accoppiamento di tipo capacitivo tra campione e bobina può modificare la frequenza di risonanza. Una volta inserito il campione nel *probe* risulta quindi necessario calibrare il sistema tramite settaggio del circuito RLC, per ottimizzarne la curva di risposta. Le due operazioni di set-up del circuito si chiamano *tuning* e *matching*. Il *tuning* modifica l'offset orizzontale mentre il *matching* l'ampiezza della curva di risonanza. Questa operazione nello SpinMaster va effettuata utilizzando un cacciavite schermato ed andando a regolare manualmente due capacità. L'obiettivo è raggiun-

gere un segnale di input che sia il più vicino possibile alla frequenza di risonanza ($\omega = 1/(LC)^{1/2}$) e allo stesso tempo impostare un'impedenza del segnale di output ben accoppiata a quella dell'amplificatore, perchè avvenga il trasferimento massimo di potenza.

Il guadagno del ricevitore (GAIN), ossia l'amplificazione del segnale di FID, deve essere controllato impostando un valore che massimizzi l'intensità del segnale senza saturare il ricevitore, altrimenti si potrebbero generare distorsioni nel segnale acquisito.

Infine per ottimizzare l'ampiezza del FID, è necessario impostare correttamente la rotazione della magnetizzazione sul piano trasversale alla direzione del campo statico; i parametri strumentali sui quali si può agire sono l'intervallo di tempo di applicazione e la potenza, dell'impulso RF.

4.2.2 Sequenze e parametri di acquisizione

In questo lavoro si sono utilizzate delle sequenze standard già implementate nel software di acquisizione (Stelar), che permettono di modificare i parametri per l'ottimizzazione del sistema di acquisizione e per la misura dei tempi di rilassamento caratteristici del campione indagato. Si descrivono brevemente:

- **Impostazione dell'offset di risonanza:** la sequenza S1P permette di apportare delle piccole correzioni in frequenza, agendo sull'offset F1 della bobina ricetrasmittente, per ottimizzare lo stato di risonanza del sistema. Quando il sistema non appare in risonanza si visualizza un FID disturbato da numerosi battimenti. Lo stato di risonanza può essere perturbato da vari fattori, come ad esempio, l'iserimento del campione nel sistema oppure da piccole fluttuazioni di corrente.
- **Selezione dell'impulso RF:** la sequenza ANGLE permette di acquisire numerosi FID utilizzando una serie di impulsi $\pi/2$ a τ variabile (Equazione 2.26). In questo modo è possibile selezionare il tempo dell'impulso, parametro PW90, che massimizza l'ampiezza del FID. Nelle misure effettuate il τ otti-

male è nel range tra $3 - 5\mu s$ dove il segnale viene visualizza a step di $0,1\mu s$ (21 volte).

- **Misura di T_1** : per misurare il tempo caratteristico T_1 dei campioni si carica la sequenza di inversion recovery (descritta nel paragrafo 2.5.2) IR/S. Facendo variare il parametro TAU (in s) che rappresenta il tempo tra l'impulso di inversione e l'impulso di lettura, da $TAU \ll T_1$ a $TAU \simeq 4T_1$, si ottiene il completo recupero della magnetizzazione longitudinale. Altri parametri che caratterizzano la sequenza sono:
 - RD: tempo di ripetizione, vale a dire intervallo di tempo, in s, tra una misura e la successiva necessario a riportare la magnetizzazione al suo valore di equilibrio a seguito della singola sequenza impulsata (tipicamente $RD \sim 4 * T_1$),
 - BS: numero di punti campionati per ogni segnale di FID acquisito,
 - BINI: Tempo di inversione più breve, in secondi,
 - BEND: Tempo di inversione più lungo, in secondi,
 - AQD e RINH: tempo morto totale prima dell'inizio dell'acquisizione del segnale (necessario per evitare segnali spuri non legati alla risposta del campione)
- **Misura di T_2** : per misurare il tempo caratteristico T_2 dei campioni si carica la sequenza CPMG (descritta nel paragrafo 2.5.2). I parametri caratteristici di questa sequenza sono:
 - EDLY: la metà del tempo tra due impulsi π successivi espresso in μs ,
 - BS: il numero di punti campionati della curva di decadimento corrispondenti al numero complessivo di impulsi π della sequenza e di echi acquisiti.

4.2.3 Fit dei dati sperimentali

Una volta acquisite le curve di rilassamento dei campioni indagati, è necessario scegliere la modalità di fit dei dati sperimentali per ricavare i tempi caratteristici, longitudinale e trasversale. Per tutte le acquisizioni oltre ad un fit mono-esponenziale ai minimi quadrati si è utilizzato il software UpenWin [13][15][14] di proprietà del gruppo NMR e commercializzato dall'Università di Bologna, per ottenere le distribuzioni dei tempi di rilassamento.

Il software UpenWin

Il software UpenWin è basato su UPEN (“Uniform PENalty”), un algoritmo robusto per l'inversione di dati da decadimento multiesponenziale. Da un punto di vista matematico, esegue un'antitrasformata di Laplace con dati discreti, in modo da ottenere la distribuzione quasi continua di tempi di rilassamento che meglio approssima i dati sperimentali. L'algoritmo, la cui descrizione matematica viene riportata in appendice, impone alla distribuzione un appropriato smoothing in modo che tali distribuzioni non contengano del dettaglio non significativo.

L'analisi con UpenWin di una curva sperimentale di acquisizione NMR produce i files di output .eps, .tst e .dat. I primi due contengono, rispettivamente, l'immagine della distribuzione continua di tempi di rilassamento ottenuta per il campione acquisito ed i parametri matematici calcolati durante l'inversione. Nel file dati, invece, rimangono registrate per colonne le grandezze dell'acquisizione NMR sia quelle di input sia quelle dedotte dall'analisi. Tra queste si sono maggiormente utilizzate:

- **T**: colonna dei tempi di rilassamento equispaziati nella scala logaritmica;
- **Sig_Np**: quantità di segnale di input riferita ad unità di e (Nepero)
- **Pct_Np**: percentuale di segnale totale estrapolato per Nepero;
- **SigT**: intensità di segnale nella curva sperimentale di rilassamento;
- **Sig**: intensità di segnale di input;

- **SigCalc**: intensità di segnale calcolato dal software.

4.3 Rilassometria *Fast Field Cycling*

In questo lavoro sono state effettuate misure con lo spettrometro Fast-Field-Cycling SMARtracer Stelar, presso il dipartimento di fisica dell'Università degli studi di Milano, che copre il range di basse frequenze 10 KHz ÷ 10 MHz, e con un rilassometro Spinmaster Stelar per frequenze nel range i 10-60 MHz, al fine di ottenere profili NMRD completi dei campioni indagati.

La FFCR (*Fast Field Cycling Relaxometry*) è una tecnica NMR utilizzata per determinare il tempo di rilassamento longitudinale (T_1) in un range di campi B_0 molto ampio che copre svariati ordini di grandezza. Questa tecnica necessita di un sistema altamente specializzato che permette di estendere verso il basso l'intervallo di frequenze disponibili per misure NMR.

Il principale problema delle misure a bassi campi è il basso rapporto SNR (segnale/rumore) del segnale. Campi bassi non sono in grado di generare una magnetizzazione d'equilibrio che sia apprezzabile. La prepolarizzazione, che è alla base del Field Cycling, garantisce una prima grande magnetizzazione del campione, che, essendo $M \propto \Delta N$ (differenza di popolazione tra gli stati), porta ad avere una differenza di popolazione sufficiente per poter essere rilevata. Dopodichè il fenomeno di rilassamento viene studiato nel campo magnetico desiderato. Con una strumentazione di Fast Field Cycling tale *switch* è fatto elettronicamente; tipicamente, il passaggio da zero a 1 Tesla avviene in pochi millisecondi.

4.3.1 Struttura elementare di un esperimento FFCR

Gli intervalli elementari di ogni sequenza FFC possono essere o di tipo *fixed-field interval* oppure di tipo *switching intervals*. In genere una misura di rilassività con FFC richiede tutta una serie di esperimenti elementari nei quali la durata τ di uno solo degli intervalli a campo fisso, varia, mentre gli *switching intervals* hanno sempre la stessa durata. Solo in questo modo si può garantire che la percentuale di segnale recuperato sia corretta e corrisponda esattamente al rilassamento nel

campo a durata variabile. Il periodo, o ciclo di campo, che viene ripetuto in una qualsiasi sequenza FFC, è composto di tre fasi cronologicamente ordinate:

1. **Polarizzazione.** Il campione viene polarizzato ad alto campo magnetico B_p per un tempo t_p in cui la magnetizzazione nucleare va a saturazione ($t_p > 4T_1$, con T_1 considerato a campo B_p)
2. **Evoluzione.** Il campo magnetico viene commutato al valore di B_r per un tempo t_r durante il quale la magnetizzazione rilassa verso un nuovo valore di equilibrio
3. **Acquisizione.** Il campo magnetico viene commutato al valore B_d e la magnetizzazione di equilibrio viene misurata dopo l'applicazione di un impulso $\pi/2$. Si noti che la radiofrequenza dell'impulso di eccitazione è predeterminata (essendo pari a $\omega_d = \gamma B_d$) e non ha a che fare con il campo di rilassamento B_r scelto.

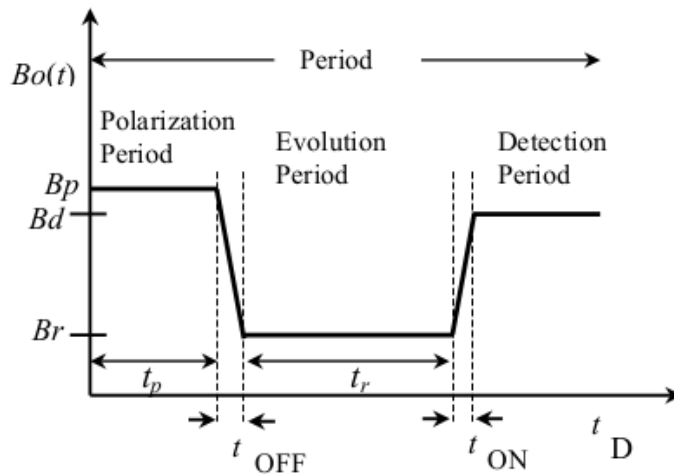


Figura 4.2: Tipico ciclo di campo di una sequenza FFC

Queste fasi vengono ripetute per un set di valori t_r finchè non viene determinato il valore di T_1 a B_r . Poi viene selezionato un nuovo valore di B_r e misurato il corrispondente valore T_1 .

4.3.2 Componenti hardware di un Fast Field Cycling

Nella pratica si vuole un sistema in cui un campo magnetico omogeneo commuti velocemente tra due valori. In termini qualitativi, il campo B_p dovrebbe essere il più alto possibile per aumentare la magnetizzazione del campione e quindi il rapporto segnale-rumore dell'acquisizione. Allo stesso tempo, per riuscire ad apprezzare fenomeni di rilassamento veloci, il campo dovrebbe anche essere in grado di passare velocemente dal valore B_r al valore B_d , con B_d alto al fine di ottenere una buona sensibilità. Per assecondare contemporaneamente tutte queste esigenze, i rilassometri FFC sono dotati di specifiche tecnologie. Le componenti di cui è costituito un rilassometro di questo tipo sono riassunte nello schema a blocchi in figura 4.3; tra queste le più caratterizzanti sono il magnete, il sistema di alimentazione "switchable" e ultimo, ma non meno importante, il sistema di raffreddamento, dalla cui efficienza dipende la performance degli altri due.

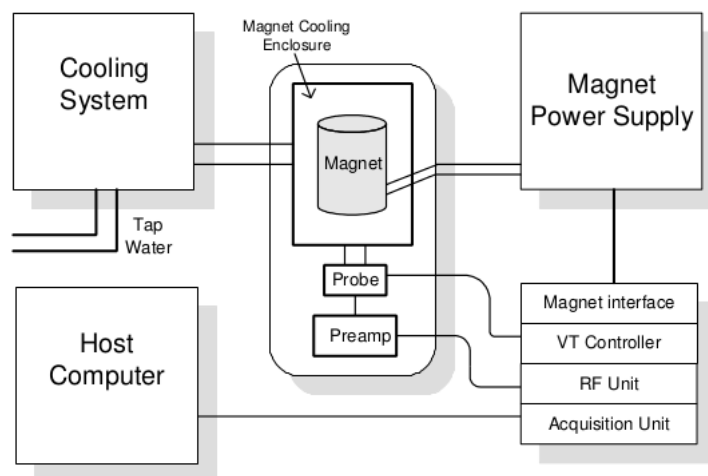


Figura 4.3: Tipico diagramma a blocchi di un Rilassometro Fast Field Cycling.

Il sistema del magnete è costituito da una bobina ad aria in alluminio racchiuso in uno speciale Plexiglas e raffreddato da liquido refrigerante, ottimizzato per avere una massima omogeneità di campo al centro. A differenza dell'elettromagnete convenzionale, l'omogeneità del campo è generata dalla densità di corrente e non dal cuore ferromagnetico. Il sistema di *power supply* è dotato di un genera-

tore di corrente capace di raggiungere i 350 A. Ci sono 14 differenti “interlocks” che controllano il sistema contro ogni possibile rottura o scorretto uso da parte dell’operatore. Il sistema di raffreddamento ha il compito di mantenere a basse temperature sia il magnete che il power supply. Entrambe i dispositivi sono infatti raffreddati da uno speciale liquido refrigerante. Attraverso uno scambiatore di calore sono accoppiati un circuito di raffreddamento principale, in cui scorre un fluido perfluorato, e un circuito secondario, in cui si utilizza acqua. L’unità di acquisizione è adibita alla programmazione degli impulsi e all’acquisizione del segnale. La console RF è basata sull’ultima generazione di sintetizzatori digitali; le unità RF operano nella banda 2 – 30 MHz. Da questa console, si ha il controllo digitale di tutti i parametri della misura tramite software dedicati. Infine, il probe è a banda larga e può essere sintonizzato tra 2,5 e 20MHz;

4.3.3 Acquisizione di un profilo NMRD completo

L’approccio classico per una misura di T_1 mediante FFC consiste nell’uso di sequenze non-polarizzate (NP) ad alti campi di rilassamento (sopra i 4 MHz alla frequenza di Larmor ^1H) e sequenze prepolarizzate (PP) a bassi campi di rilassamento (sotto i 4MHz alla frequenza di Larmor ^1H); di seguito si descrivono le due sequenze, i cui diagrammi temporali di impulsi e campi magnetici sono riportati in figura 4.4.

Sequenze non-polarizzate (NP/S)

Una magnetizzazione M_0 nulla viene predisposta lasciando rilassare il campione a campo nullo per un tempo RD. Successivamente, il magnete viene commutato al valore B_r desiderato, dove, dopo il tempo costante di *switching*, viene mantenuto per un tempo τ variabile, durante il quale la magnetizzazione rilassa al valore di equilibrio corrispondente a B_r . Il magnete è quindi nuovamente commutato, questa volta ad un campo di acquisizione B_a . Dopo il tempo costante di *switching* viene raccolto il FID a seguito di un impulso $\pi/2$. Immediatamente dopo l’acquisizione il campo viene spento e l’intera sequenza ripetuta.

Sequenze polarizzate (PP/S)

In questo caso, viene generata una magnetizzazione di equilibrio con un forte campo polarizzante B_p applicato per un tempo sufficientemente lungo t_p , in questo modo si ottiene M_0 allineata a B_p . Successivamente, il magnete viene commutato al campo di rilassamento B_r desiderato, dove, dopo il periodo costante di commutazione si mantiene per un tempo τ variabile, durante il quale la magnetizzazione da M_0 decade al nuovo valore di equilibrio M_r . Infine inizia la fase di acquisizione del tutto analoga a quella della sequenza non polarizzata.

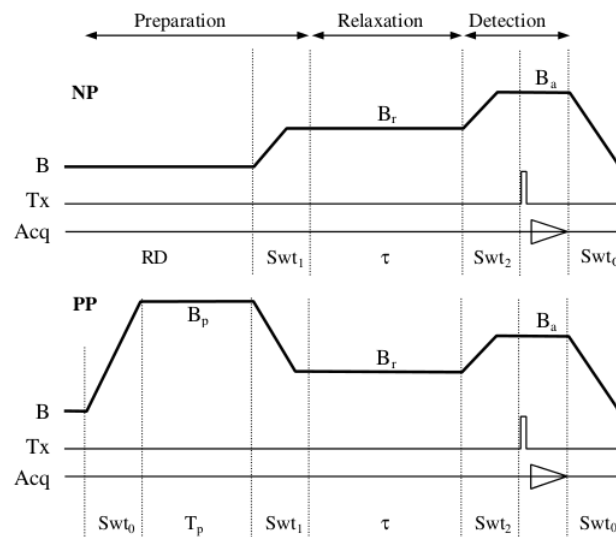


Figura 4.4: Schemi di lavoro di un rilassometro FFC: misure con (a) e senza (b) campo di pre-polarizzazione. In entrambi i casi, lo schema superiore mostra le variazioni del campo magnetico, mentre gli schemi inferiori rappresentano la stima della magnetizzazione durante la misura.

4.3.4 Sequenze e parametri di acquisizione

In questo lavoro si sono utilizzate le due sequenze standard NP/S e PP/S, per acquisire i profili NMRD rispettivamente, per campi compresi tra 9.5 MHz e 5MHz e per campi compresi tra 4,9 MHz e 10 KHz. Il dispositivo Smartracer è ottimiz-

zato per acquisire un volume di campione di almeno 1mL, disposto all'interno di provette dedicate di 10mm di diametro. Il posizionamento ottimale del campione nel probe è fondamentale viste le dimensioni ristrette del magnete (dimensioni magnete), per sfruttarne le caratteristiche di omogeneità. Si descrivono cronologicamente le sequenze utilizzate sia per la predisposizione del sistema sia per le acquisizioni dei segnali:

- **Tuning e matching:** come già descritto approfonditamente nel paragrafo 4.2.1 per il probe dell'elettromagnete, anche in questo sistema è necessario, ogni volta che si inserisce un nuovo campione da acquisire nel probe, effettuare queste operazioni.
- **Sequenza NP:** questa sequenza è analoga alla sequenza S1P già descritta per le acquisizioni con il sistema SpinMaster. In questo caso il sistema effettua automaticamente una calibrazione dell'offset di corrente del magnete e un check di eventuali errori di voltaggio. E' opportuno ottimizzare l'acquisizione del FID tagliando i tempi morti dello strumento. Diversamente dalle acquisizioni con elettromagnete, il segnale strumentale è particolarmente alto. Non escluderlo dall'acquisizione del FID comporterebbe la perdita di significatività della misura.
- **Selezione dell'impulso:** anche in questo sistema si sceglie il tempo dell'impulso sulla base dell'ampiezza massima del segnale FID e si verifica, che questo annulli la magnetizzazione dopo un impulso π .
- **Sequenze NP/S e PP/S:** una volta impostati i valori di frequenza entro i quali si vuole acquisire il profilo NMRD ($f_{max} = 9,5$ MHz, $f_{min} = 0,01$ MHz), il numero di step di campo B_r (12) ed il numero di tempi di campionamento del segnale τ (16) di ogni blocco, il sistema utilizza la sequenza non polarizzata NP/S finchè non raggiunge valori di frequenza di Larmor di circa 5MHz, poi cambia automaticamente impostazioni ed inizia ad utilizzare la sequenza pre-polarizzata PP/S. Il campo di polarizzazione B_p ha un valore fisso di 8 MHz mentre quello di lettura è sempre 7,2 MHz.

4.3.5 Fit dei dati sperimentali

L'acquisizione di una curva completa di rilassamento $M(\tau)$ consiste nel ripetere una sequenza NP o PP modificando ogni volta il valore di τ in accordo ad una strategia predefinita (lineare, logaritmica, multi-range, etc...), mentre tutte le altre impostazioni strumentali e delle sequenze vengono mantenute costanti. Ogni blocco dati di una sequenza multiblocco si riduce a valore singolo (figura 4.5), il che significa che il valore viene mediato su una predefinita finestra di dati e graficato in funzione del valore del blocco τ . Il best fit della curva di rilassamento risultante serve a stimare il tasso di decadimento.

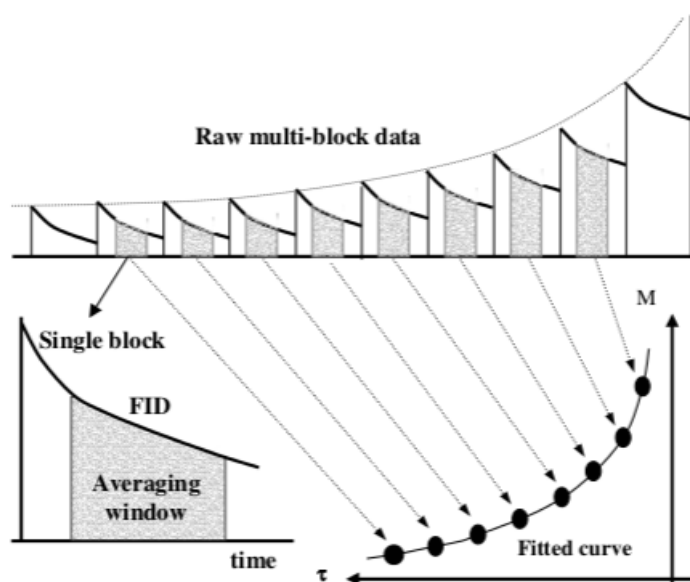


Figura 4.5: Esempio di processo di riduzione dei dati.

Dal software Stellar è possibile escludere o includere un numero qualsiasi di blocchi iniziali e finali dal fit. I parametri EWIB (Evaluation Window Initial Block) ed EWEB (Evaluation Window End Block) indicano il primo e l'ultimo blocco considerati in fase di analisi dei dati, analogamente EWIP ed EWEP si riferiscono ai punti iniziale e finale presi in considerazione sui singoli FID ottenuti.

Capitolo 5

Risultati

5.1 Indagine di rilassometria NMR su campioni di siero umano

In questo paragrafo si riportano i risultati ottenuti dagli esperimenti di rilassometria 1H -NMR condotti su diversi campioni di siero umano in presenza di Cobalto, al fine di indagare al variare della sua concentrazione l'eventuale effetto sui tempi di rilassamento, trasversale T_2 e longitudinale T_1 .

In tabella 5.1 si riassumono le caratteristiche dei pazienti i cui campioni di siero sono alla base di tutti gli esperimenti che verranno descritti nei prossimi paragrafi. Con MoM-HA si vuole indicare se il paziente è portatore di protesi d'anca (Hip Arthroplasty) ad accoppiamento metallo su metallo (MoM) al CoCr. Il campione di urina riportato appartiene al paziente 9450 ed è risultato utile per lo sviluppo di considerazioni qualitative sulla composizione proteica dei diversi sieri.

L'errore sperimentale considerato sulla singola acquisizione NMR dei tempi di rilassamento e tenendo conto delle condizioni del campione biologico, è contenuto entro il 10%. Il procedimento sperimentale di misura, le sequenze di acquisizione con i relativi parametri utilizzati per la stima dei tempi caratteristici T_1 e T_2 e la modalità di fit dei dati sperimentali sono state già descritte nei materiali e metodi. Nelle tabelle verranno messi a confronto i risultati del fit mono-esponenziale e

| n. paziente | genere | età | MoM-HA | [Co] ($\mu\text{g}/\text{L}$) |
|-------------|--------|-----|--------|---------------------------------|
| 9996 | F | 42 | N | Siero-0,3 |
| 9941 | F | 77 | N | Siero-0,3 |
| 7649 | M | 41 | N | Siero-0,2 |
| 9450 | F | 56 | S | Siero-9,9 |
| 9450 | F | 56 | S | Urina-113,7 |
| 7695 | F | 72 | S | Siero-200 |

Tabella 5.1: Tabella dei campioni di siero e urina utilizzati.

di quello di Upen. Si tratta di due approcci diversi, l'uno ritiene che tutti gli ^1H risentano dello stesso ambiente, l'altro di una distribuzione di ambienti; comunque i risultati sono consistenti.

5.1.1 Set di campioni ex-vivo

Le stime dei tempi T_1 e T_2 relative alle acquisizioni a 20.15 MHz del set di campioni ex-vivo è riportato in tabella 5.2, mentre gli andamenti delle curve di rilassamento, trasversale e longitudinale, nelle figure 5.1 e 5.2.

| set campioni ex-vivo [Co] in $\mu\text{g}/\text{L}$ | fit UPEN | | fit monoesponenziale | |
|--|------------|------------|----------------------|------------|
| | T_1 (ms) | T_2 (ms) | T_1 (ms) | T_2 (ms) |
| 0,3 | 1420 | 600 | 1330 | 560 |
| 0,6 | 1430 | 620 | 1400 | 600 |
| 1,2 | 1470 | 580 | 1330 | 560 |
| 2,5 | 1420 | 530 | 1330 | 500 |
| 5 | 1470 | 620 | 1470 | 620 |
| 25 | 1410 | 540 | 1300 | 540 |
| 50 | 1420 | 600 | 1340 | 570 |
| 100 | 1500 | 620 | 1380 | 600 |
| 200 | 1480 | 620 | 1380 | 620 |
| S-9,9 | 1490 | 620 | 1400 | 620 |
| U-113,7 | 2740 | 2430 | 2580 | 2400 |

Tabella 5.2

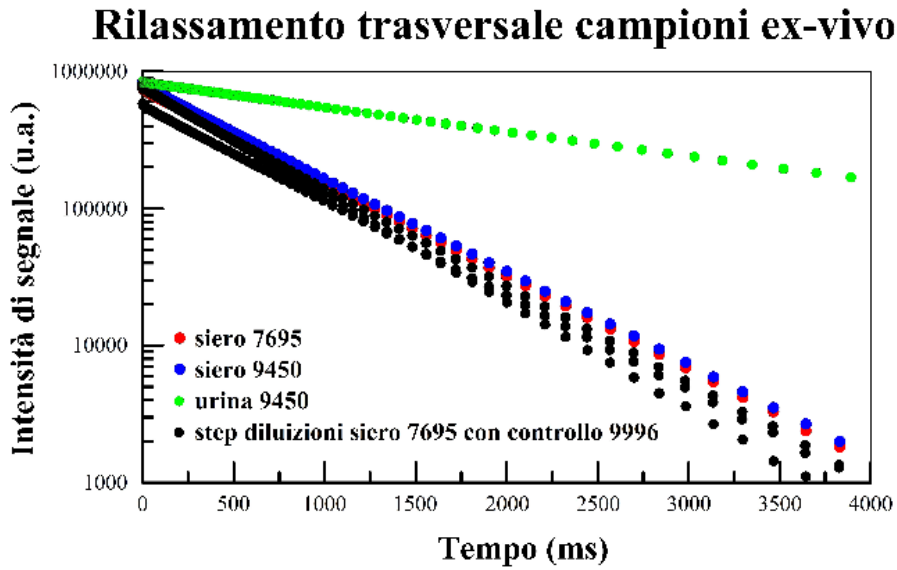


Figura 5.1: Curve sperimentali di rilassamento trasversale in scala semilogaritmica, dal cui fit si sono ottenuti i tempi caratteristici T_2 .

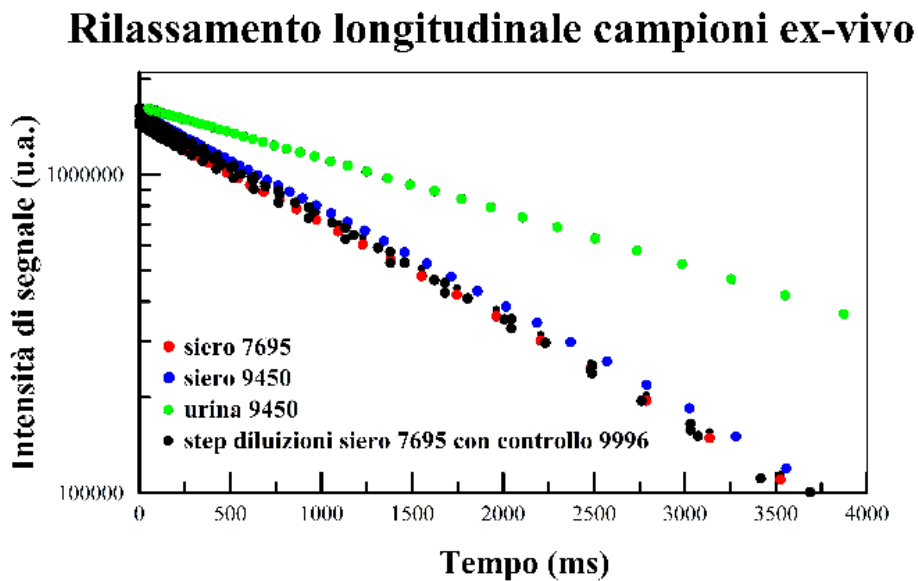


Figura 5.2: Curve sperimentali di rilassamento longitudinale in scala semilogaritmica, dal cui fit si sono ottenuti i tempi caratteristici T_1 .

5.1.2 Set di campioni in-vitro con siero di controllo 7649

Le stime dei tempi di rilassamento caratteristici per tutti i campioni del set acquisiti a 20 MHz sono riportate in tabella 5.3, mentre, le curve di rilassamento sono rappresentate nelle figure 5.3 e 5.4.

| Set campioni in-vitro con siero di controllo 7649 | | | | |
|---|------------|------------|----------------------|------------|
| campioni [Co] in $\mu\text{g}/\text{L}$ | fit UPEN | | fit monoesponenziale | |
| | T_1 (ms) | T_2 (ms) | T_1 (ms) | T_2 (ms) |
| controllo | 2340 | 1640 | 2320 | 1630 |
| 0,6 | 2350 | 1650 | 2340 | 1670 |
| 1,2 | 2350 | 1638 | 2320 | 1650 |
| 2,5 | 2350 | 1617 | 2330 | 1520 |
| 5 | 2360 | 1656 | 2360 | 1680 |
| 25 | 2350 | 1616 | 2320 | 1560 |
| 50 | 2360 | 1727 | 2350 | 1720 |
| 100 | 2350 | 1632 | 2440 | 1630 |
| 200 | 2350 | 1633 | 2340 | 1620 |
| $0,3 \cdot 10^6$ | 1650 | 1216 | 1640 | 1200 |
| $0,44 \cdot 10^6$ | 1220 | 847 | 1180 | 850 |
| $25 \cdot 10^6$ | 42 | 38 | 43 | 39 |
| $200 \cdot 10^6$ | 8,3 | 8,2 | 8,7 | 8,3 |

Tabella 5.3

La presenza di una concentrazione di ioni Co^{2+} in siero 7649 fino ad un livello pari a $200 \mu\text{g}/\text{L}$ non sembra influenzare i tempi di rilassamento rispetto al bianco di riferimento (siero 7649 puro); riduzioni significative si verificano per concentrazioni di Co pari o superiori al valore di $0,3 \text{ g}/\text{L}$.

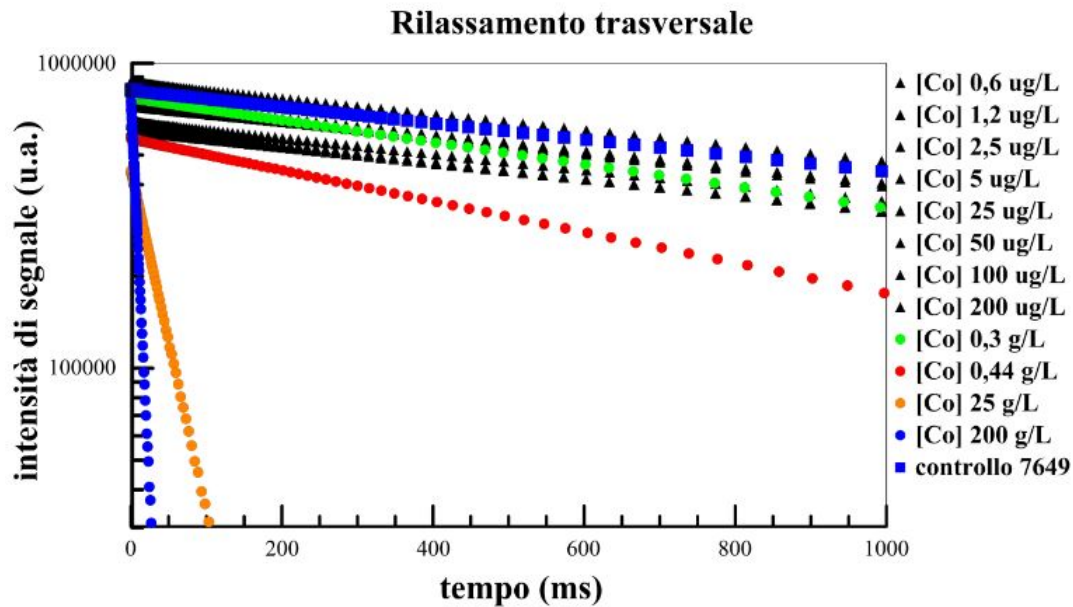


Figura 5.3: Curve sperimentali di rilassamento trasversale in scala semilogaritmica, dal cui fit si sono ottenuti i tempi caratteristici T_2 .

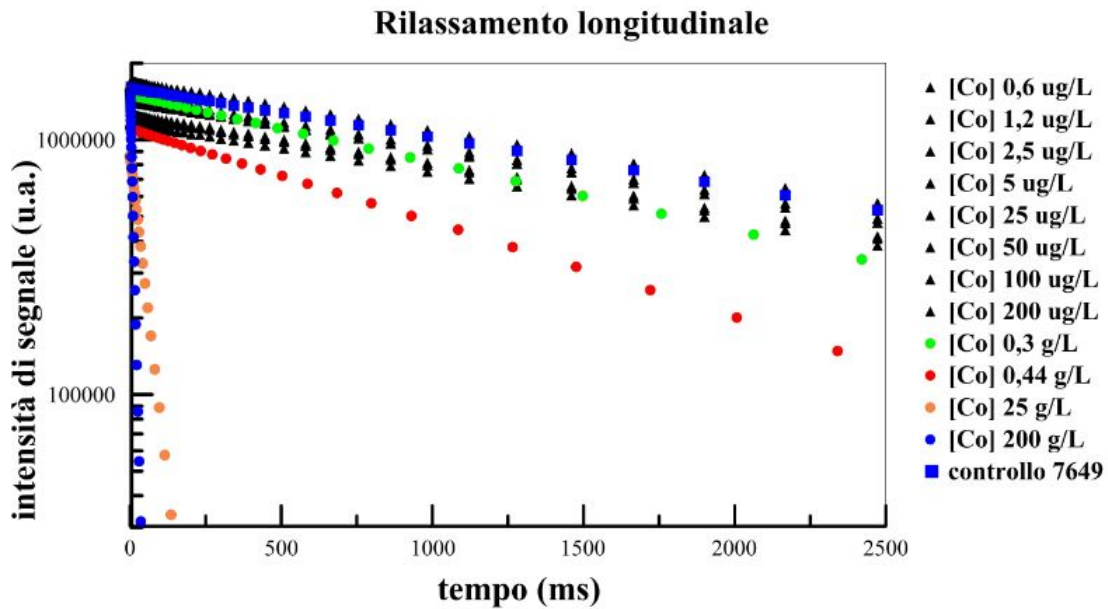


Figura 5.4: Curve sperimentali di rilassamento longitudinale in scala semilogaritmica, dal cui fit si sono ottenuti i tempi caratteristici T_1 .

5.1.3 Set di campioni in-vitro con siero di controllo 9996

Questo set di campioni è stato predisposto a partire da siero di controllo 9996 (tabella 5.1) per indagare campioni di siero ad alte concentrazioni di Co. I valori di concentrazione ottenuti e le relative misure rilassometriche sono riportate in tabella 5.4. Le curve sperimentali di acquisizione, sia trasversale che longitudinale, sono riportate nelle figure 5.5 e 5.6.

| Set campioni in-vitro con siero di controllo 9996 | | | | |
|---|------------|------------|----------------------|------------|
| set campioni in-vitro [Co] in g/L | fit UPEN | | fit monoesponenziale | |
| | T_1 (ms) | T_2 (ms) | T_1 (ms) | T_2 (ms) |
| controllo | 1420 | 590 | 1350 | 580 |
| 0,3 | 1470 | 630 | 1330 | 600 |
| 0,6 | 1390 | 580 | 1290 | 570 |
| 1,2 | 1220 | 510 | 1140 | 510 |
| 2,5 | 950 | 440 | 900 | 440 |
| 5 | 690 | 300 | 620 | 300 |
| 25 | 72 | 54 | 73 | 54 |
| 50 | 52 | 29 | 35 | 29 |
| 100 | 18 | 16 | 18 | 15 |
| 200 | 8,4 | 8,0 | 8,9 | 7,8 |

Tabella 5.4

Nei campioni di siero 9996 in cui sono presenti concentrazioni di Cobalto pari o superiori al valore di 0,3 g/L i tempi di rilassamento caratteristici, sia trasversale che longitudinale, vengono significativamente ridotti rispetto al siero di controllo. Tale riduzione è funzione del valore di concentrazione di Cobalto presente nel campione.

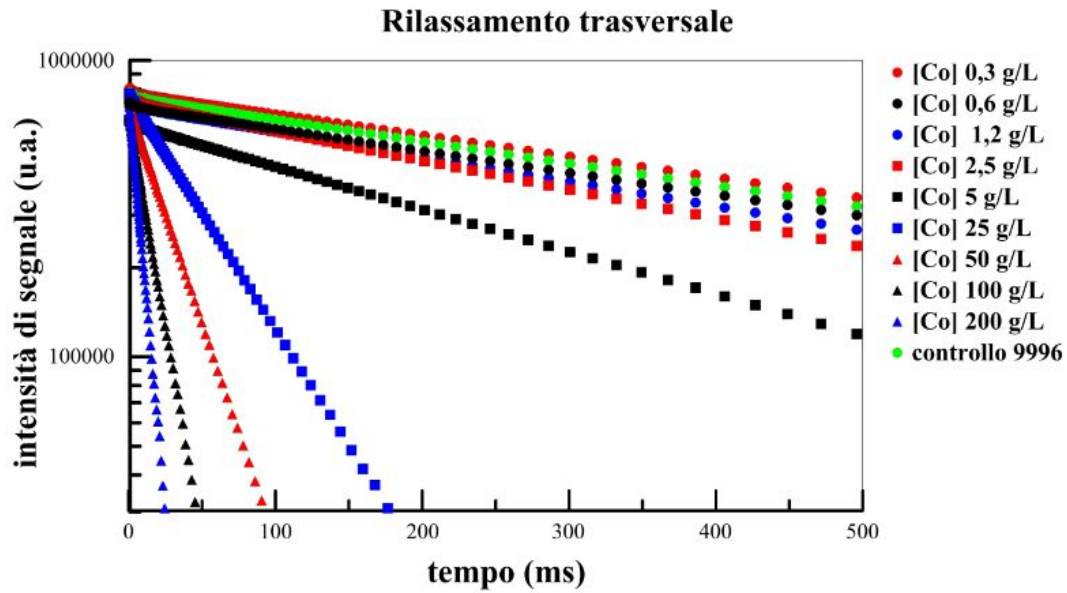


Figura 5.5: Curve di rilassamento trasversale del set di campioni in-vitro a partire da siero di controllo 9996

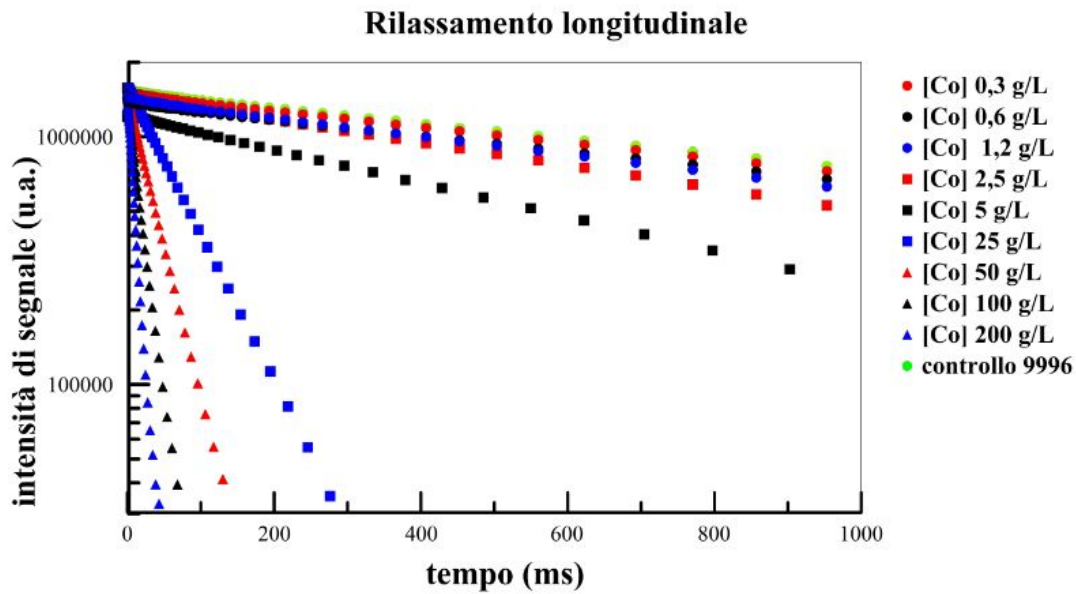


Figura 5.6: Curve di rilassamento longitudinale del set di campioni in-vitro a partire da siero di controllo 9996

5.1.4 Indagine in funzione della temperatura

Per indagare le proprietà di rilassamento dei campioni di siero in situazioni simili alle condizioni fisiologiche, si sono effettuate misure $^1\text{H-NMR}$ a 20,15 MHz su alcuni campioni del set ex-vivo e del set in-vitro con siero di controllo 9996 a 37°C. Questa tipologia di indagine si è svolta, inoltre, su tre campioni di surnatanti ottenuti dalla deproteinizzazione dei campioni di siero mediante ACTCA (procedura: ACTCA al 10% 1:1 per 20' poi centrifuga per 10' a 14000rcf). Il siero utilizzato, in riferimento alla tabella 5.1, proviene da un campione di siero 7695 e da due campioni di siero 9996 ai quali viene aggiunto Cloruro di Cobalto in un primo caso a 25°C (**campione 1**: 9996 + CoCl_2 a 25°C) ed in un secondo caso a temperatura fisiologica (**campione 2**: 9996 + CoCl_2 a 37°C). I risultati ottenuti sono evidenziati nei grafici delle figure 5.7, 5.8 e 5.9. Si rappresenta il rate di rilassamento, anziché il tempo, perchè la teoria prevede una proporzionalità tra rate e concentrazione.

| [Co] in $\mu\text{g/L}$ | Acquisizioni a 25°C | | Acquisizioni a 37°C | |
|--|---------------------|------------|---------------------|------------|
| | T_1 (ms) | T_2 (ms) | T_1 (ms) | T_2 (ms) |
| campioni ex-vivo | | | | |
| 0,6 | 1400 | 550 | 1620 | 620 |
| 5 | 1410 | 530 | 1640 | 600 |
| 100 | 1507 | 600 | 1740 | 620 |
| 200 | 1500 | 540 | 1720 | 570 |
| campioni in-vitro a partire da controllo 9996 | | | | |
| $0,3 \cdot 10^6$ | 1380 | 460 | 1560 | 530 |
| $0,6 \cdot 10^6$ | 1390 | 470 | 1580 | 540 |
| $1,2 \cdot 10^6$ | 900 | 240 | 800 | 210 |
| $5 \cdot 10^6$ | 810 | 240 | 820 | 240 |
| $50 \cdot 10^6$ | 35 | 29 | 38 | 32 |
| $200 \cdot 10^6$ | 8,5 | 8,1 | 9,1 | 8,8 |
| campioni deproteinizzati | | | | |
| 200 (siero 7695) | 2150 | 2050 | 2640 | 2460 |
| $200 \cdot 10^6$ (campione 2) | 9,6 | 9,5 | 10,0 | 10,3 |
| $200 \cdot 10^6$ (campione 1) | 7,7 | 7,8 | 8,1 | 8,6 |

Tabella 5.5

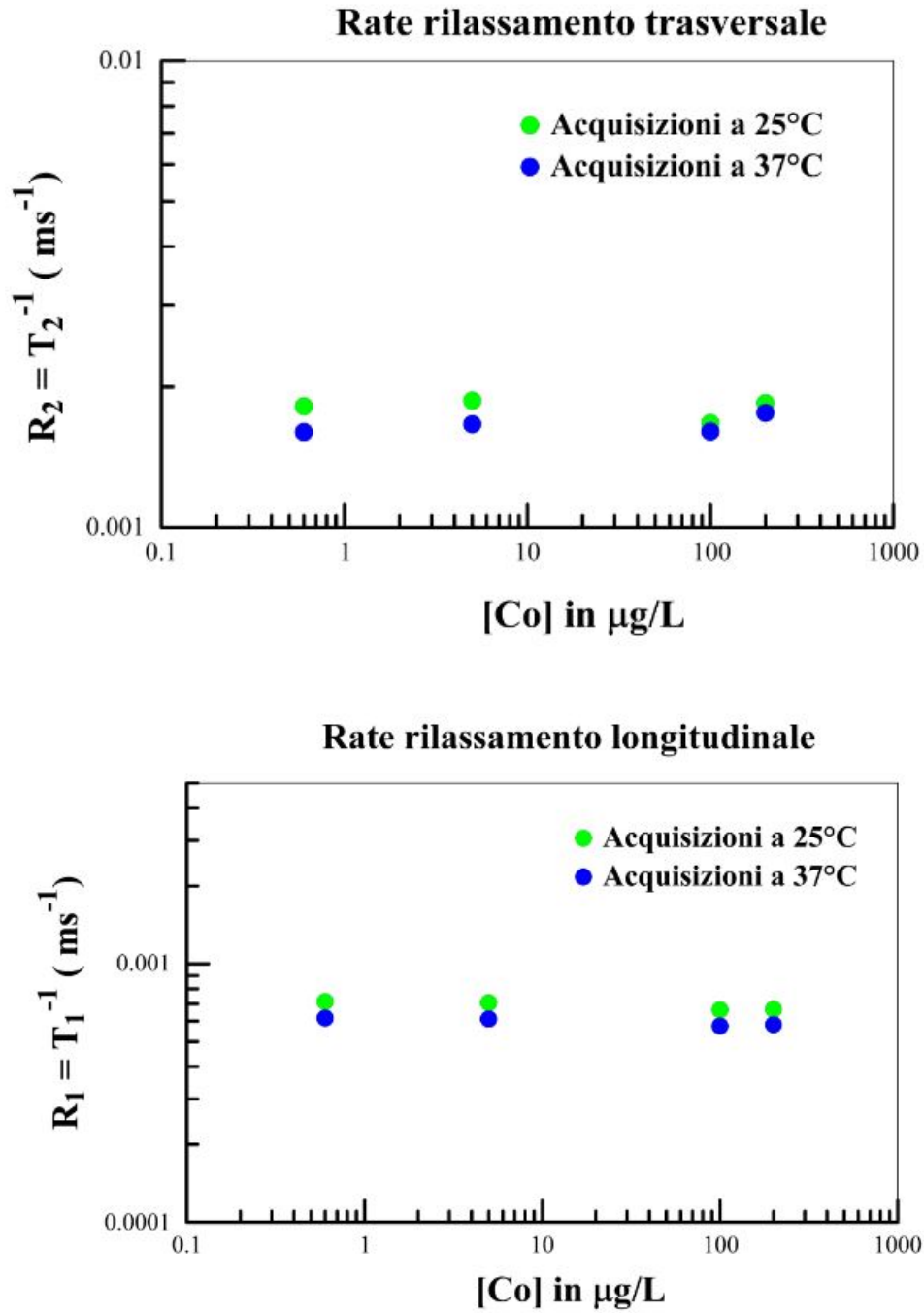


Figura 5.7: Andamenti del rilassamento dei **campioni ex-vivo** in funzione della concentrazione di Cobalto, nelle due acquisizioni a 25°C e 37°C.

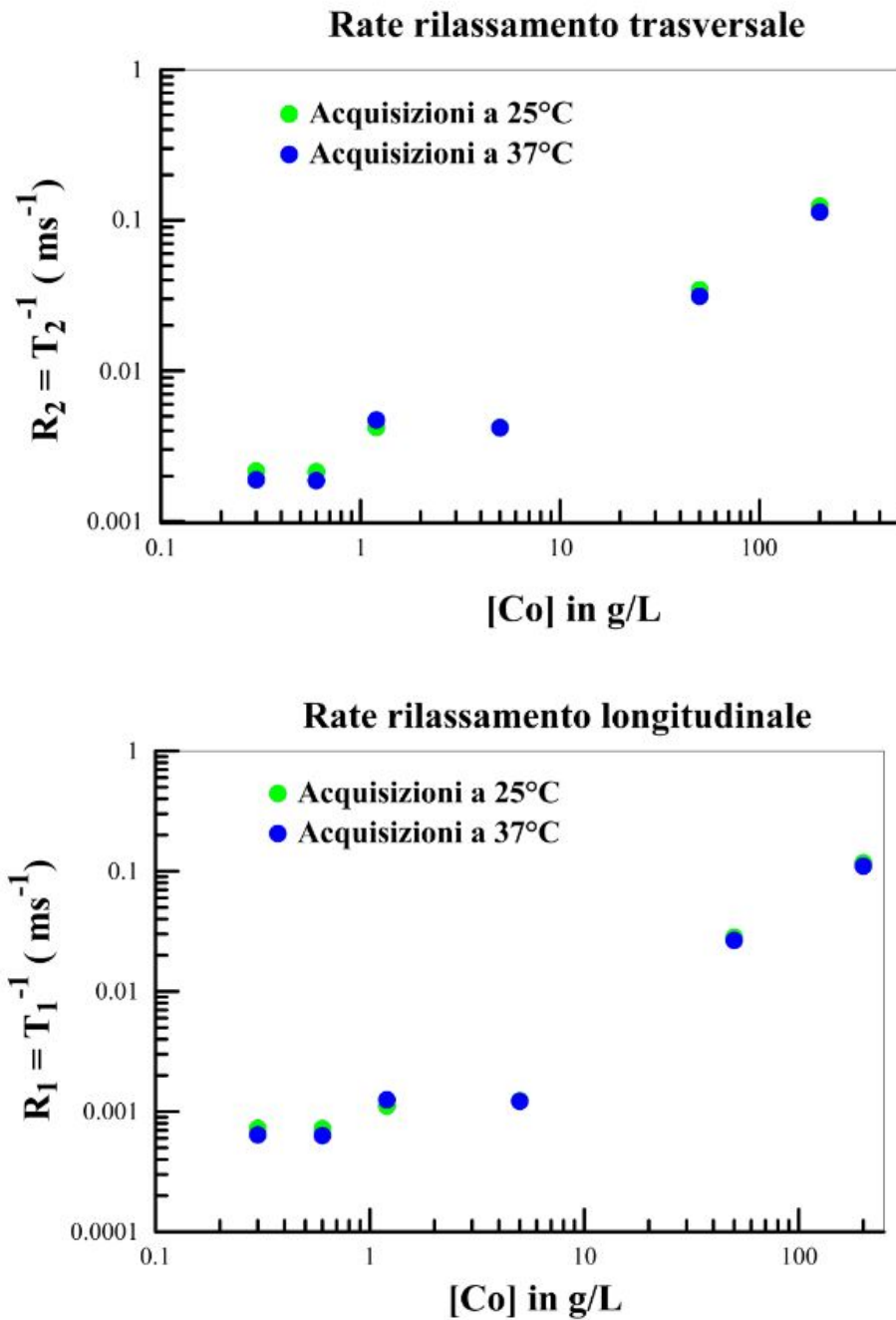


Figura 5.8: Andamenti della velocità di rilassamento dei **campioni in-vitro** in funzione della concentrazione di Cobalto, nelle due acquisizioni a 25°C e 37°C.

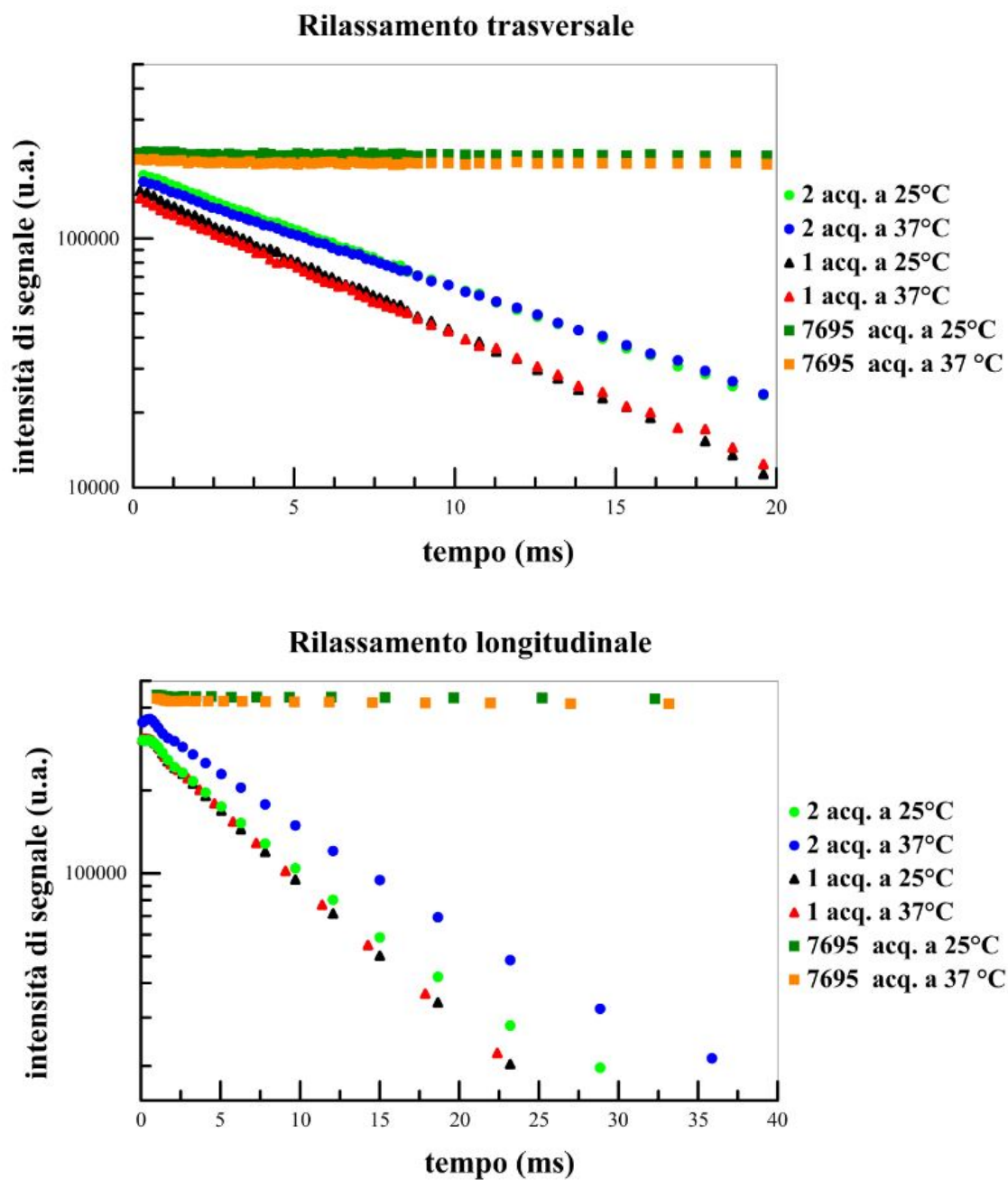


Figura 5.9: Curve di rilassamento dei **campioni deproteinizzati** nelle due acquisizioni a 25°C e 37°C, a confronto.

5.1.5 Indagine in funzione del campo magnetico applicato

Per investigare le proprietà molecolari di rilassamento dei campioni di siero si sono condotte delle acquisizioni al variare del campo magnetico (quindi della frequenza di Larmor dalla formula $\omega_L = \gamma B_0$), con una strumentazione Fast Field Cycling nel range di frequenze da 10KHz a 10MHz e con un elettromagnete a campo variabile per le acquisizioni ad alti campi. I campioni indagati con tale modalità sono un campione **ex-vivo** corrispondente a siero 7695 in cui è presente una concentrazione di Co pari a $200\mu\text{g/L}$, dovuta a rilascio da endoprotesi; un campione di **siero di controllo** (siero 7649) e un campione **in-vitro** composto a partire da siero 7649 cui è stata aggiunta una quantità di CoCl_2 -esaidrato purissimo tale da ottenere una concentrazione di Co di $200\mu\text{g/L}$.

| Frequenza (MHz) | Ex-Vivo | Controllo | In-Vitro |
|-----------------|------------|------------|------------|
| | T_1 (ms) | T_1 (ms) | T_1 (ms) |
| 40,3 | 1801 | 2989 | 2834 |
| 31,9 | 2020 | 3410 | 3360 |
| 20 | 1416 | 2212 | 2173 |
| 15 | 1289 | 1979 | 2171 |
| 9,5 | 1149 | 2042 | 2083 |
| 9,5 | 1051 | 1779 | 1808 |
| 7 | 974 | 1744 | - |
| 5 | 892 | 1688 | 1711 |
| 3,5 | 804 | 1751 | 1953 |
| 2,73 | 628 | 1703 | 1713 |
| 1,5 | 551 | 1438 | 1383 |
| 0,78 | 461 | 1224 | 1306 |
| 0,42 | 379 | 1196 | 1161 |
| 0,23 | 334 | 1132 | 1181 |
| 0,12 | 308 | 1024 | 1126 |
| 0,06 | 287 | 1024 | 1065 |
| 0,03 | 260 | 943 | 970 |
| 0,02 | 263 | 1058 | 965 |
| 0,01 | 253 | 972 | 1009 |

Tabella 5.6: Tabella dei tempi di rilassamento ottenuti con fit monoesponenziale dalle curve sperimentali acquisite variando il campo magnetico, nel range 0,01-9,5 MHz con FFC e nel range 9,5-40,3 MHz con elettromagnete.

I due valori di frequenza a 9,5 MHz riportati in tabella corrispondono, il primo al valore minore di frequenza di acquisizione con elettromagnete a campo variabile ed il secondo al massimo valore impostato in frequenza nelle acquisizioni con FFC. La divergenza delle due misure rientra nell'errore sperimentale.

Nelle figure 5.10, 5.11 e 5.12, si riportano gli andamenti delle velocità di rilassamento longitudinale in funzione della frequenza di acquisizione per i tre campioni indagati. In tutti i casi i tempi di rilassamento longitudinale aumentano con la frequenza, di conseguenza le velocità di rilassamento longitudinale ($1/T_1$) diminuiscono.

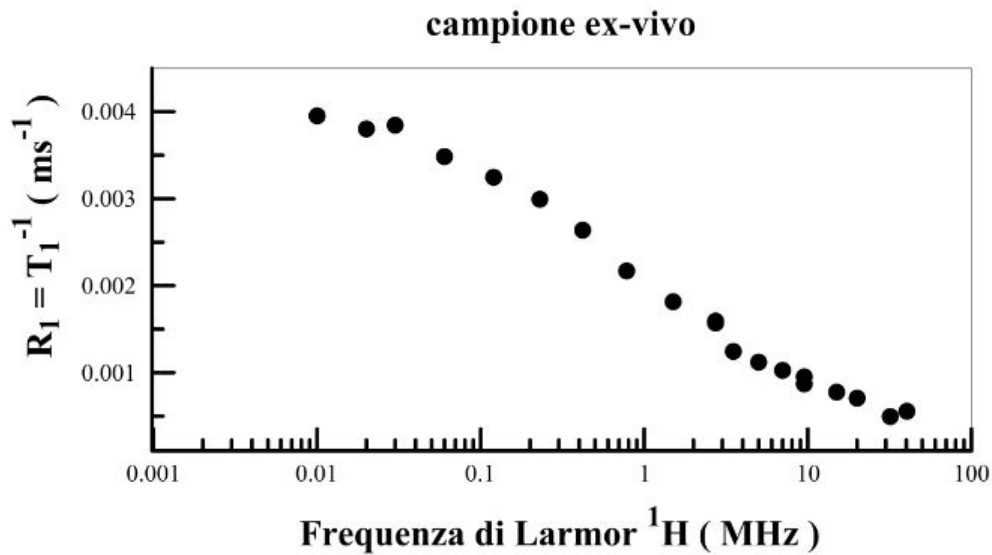


Figura 5.10: Rate di rilassamento longitudinale in funzione della frequenza di acquisizione per il campione **ex-vivo**.

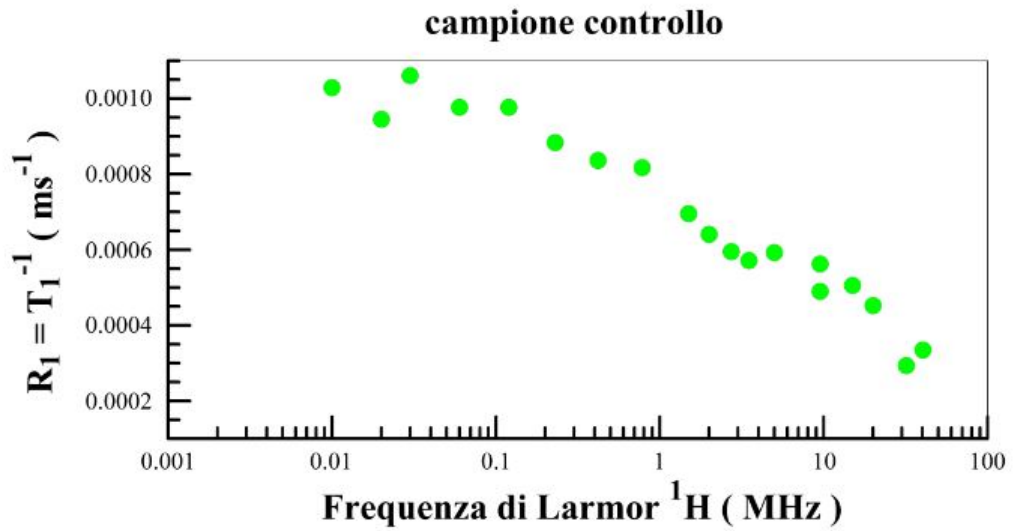


Figura 5.11: Rate di rilassamento longitudinale in funzione della frequenza di acquisizione per il campione **controllo**.

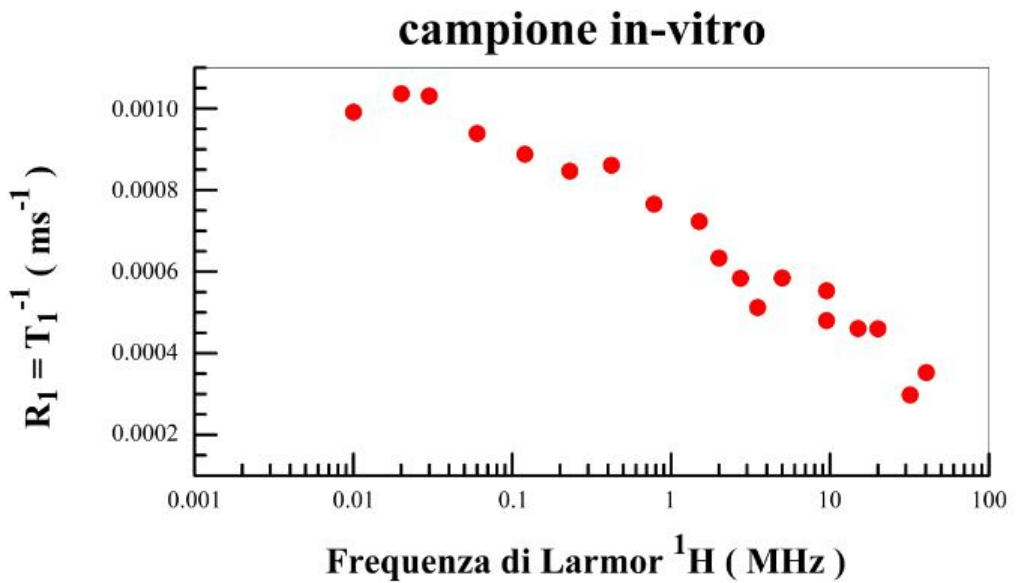
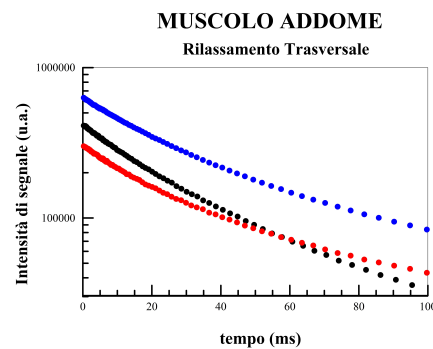
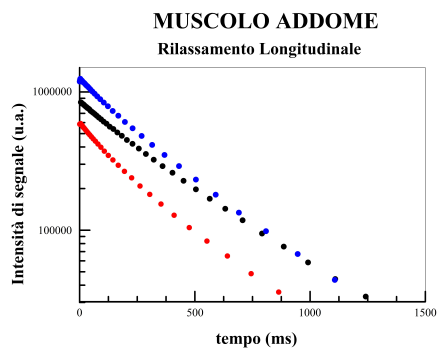
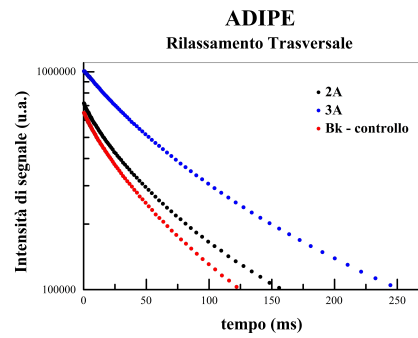
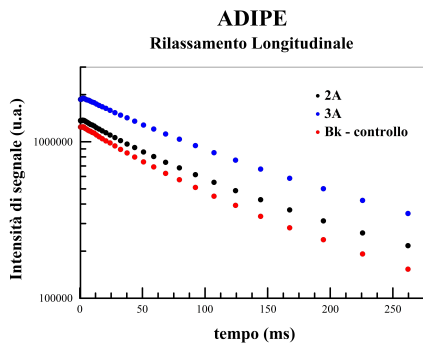
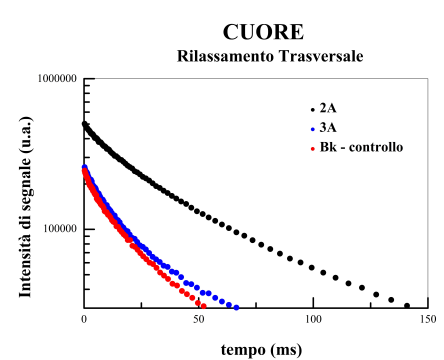
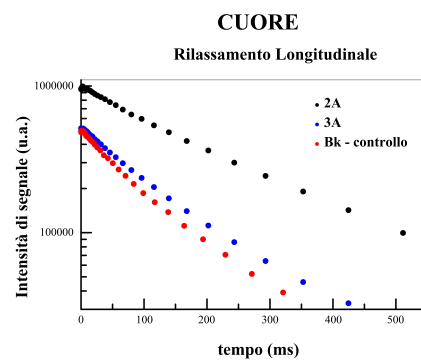
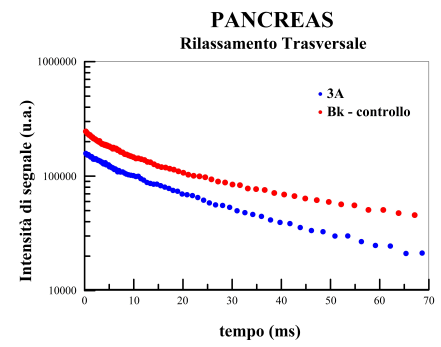
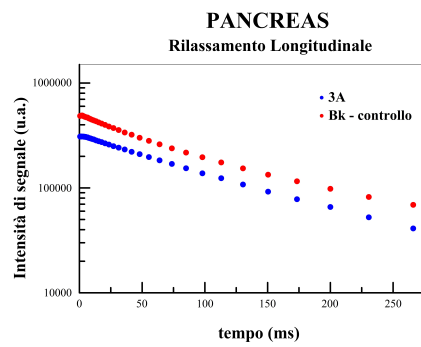
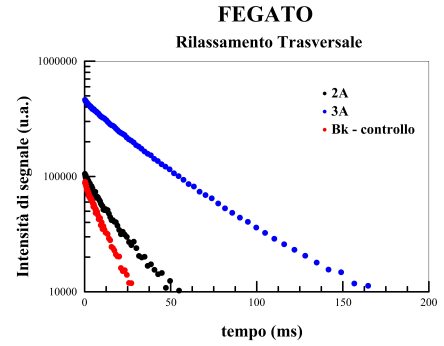
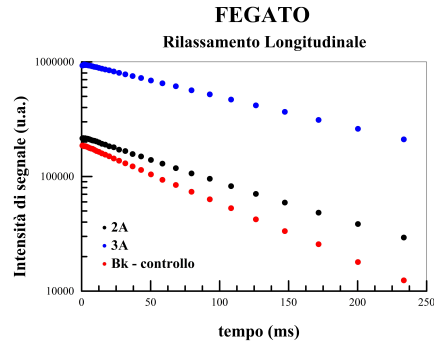


Figura 5.12: Rate di rilassamento longitudinale in funzione della frequenza di acquisizione per il campione **in-vitro**.

5.2 Indagine rilassometrica di tessuto animale

Nella tabella 5.7 sono riportati i risultati ottenuti dall'indagine rilassometrica NMR dei nuclei 1H sui tessuti animali. Per ogni tessuto si sono acquisiti tre campioni provenienti da tre conigli diversi dei quali due trattati con Cobalto, come spiegato nei materiali e metodi, ed uno (B_K) di controllo. Sono riportate anche le concentrazioni di Co presenti in ogni campione note dalla misura con metodica ICP-MS. Di seguito si riportano le curve sperimentali di rilassamento longitudinale e trasversali dei set di campioni per ogni tessuto, raccolte in una unica figura per comodità.





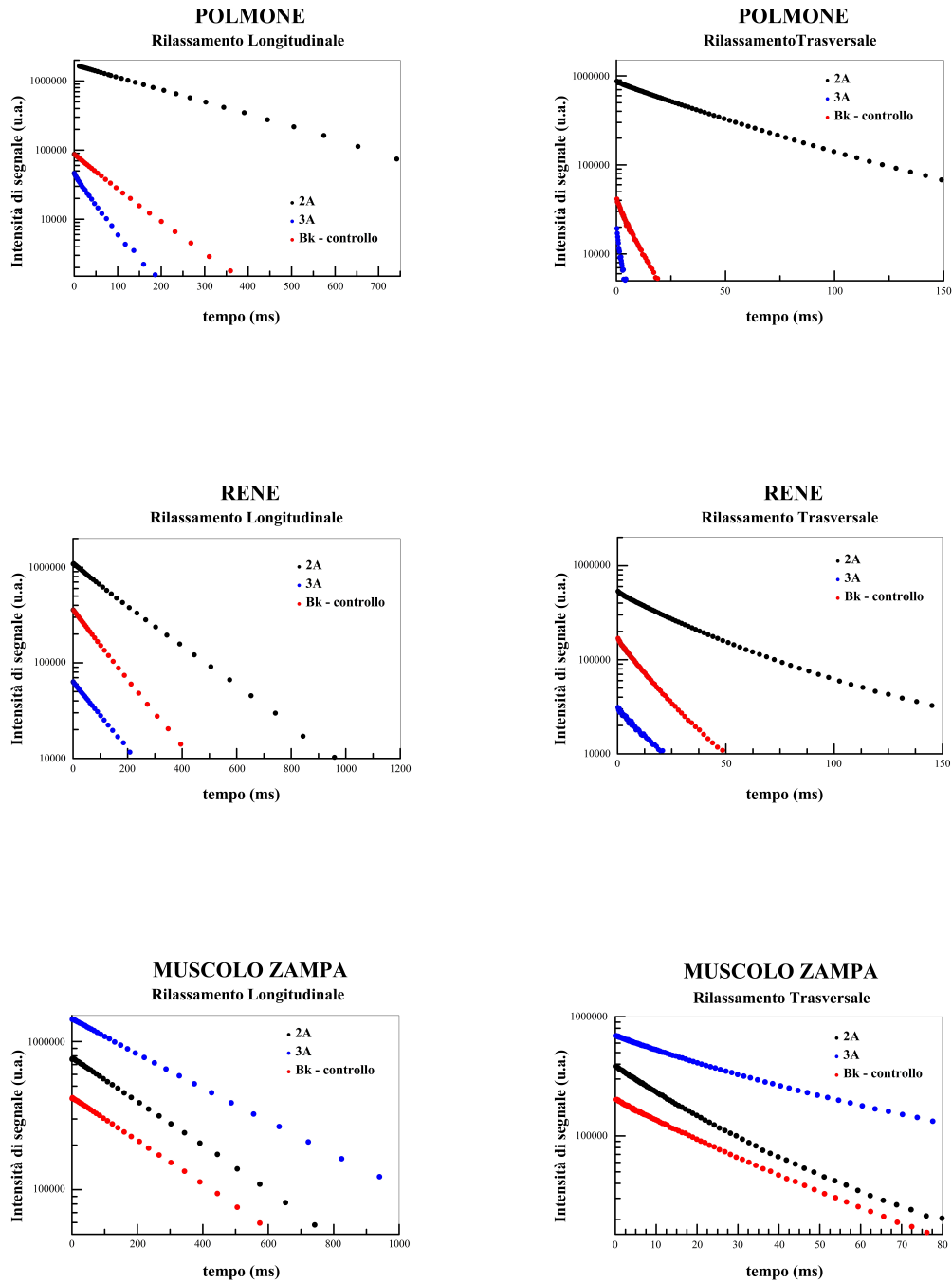


Figura 5.13: Raccoltà di tutte le curve di rilassamento longitudinale e trasversale per tutti i tessuti, per i tre animali.

| campione | [Co] in $\mu\text{g/g}$ | fit UPEN | | fit monoesponenziale | |
|-----------------------|-------------------------|------------|------------|----------------------|------------|
| | | T_1 (ms) | T_2 (ms) | T_1 (ms) | T_2 (ms) |
| Adipe | | | | | |
| 2A | 0,05 | 71 | 43 | 110 | 56 |
| 3A | 0,009 | 96 | 54 | 136 | 83 |
| Bk | 0,003 | 65 | 42 | 100 | 50 |
| Muscolo Addome | | | | | |
| 2A | 0,13 | 400 | 31 | 350 | 28 |
| 3A | 0,057 | 250 | 27 | 280 | 35 |
| Bk | 0,055 | 180 | 25 | 240 | 33 |
| Fegato | | | | | |
| 2A | 1,58 | 110 | 21 | 110 | 18 |
| 3A | 0,72 | 150 | 36 | 150 | 34 |
| Bk | 0,14 | 86 | 13 | 85 | 12 |
| Pancreas | | | | | |
| 2A | 1,15 | - | - | - | - |
| 3A | 0,073 | 100 | 26 | 120 | 23 |
| Bk | 0,46 | 86 | 14 | 100 | 25 |
| Cuore | | | | | |
| 2A | 1,07 | 180 | 53 | 200 | 37 |
| 3A | 0,42 | 110 | 15 | 125 | 19 |
| Bk | 0,12 | 80 | 20 | 100 | 18 |
| Polmone | | | | | |
| 2A | 1,44 | 270 | 44 | 240 | 50 |
| 3A | 0,38 | 47 | 2 | 45 | 2,8 |
| Bk | Nd | 86 | 20 | 86 | 8,1 |
| Rene | | | | | |
| 2A | 3,5 | 170 | 39 | 190 | 38 |
| 3A | 1,48 | 122 | 19 | 124 | 20 |
| Bk | 0,53 | 111 | 15 | 120 | 15 |
| Muscolo Zampa | | | | | |
| 2A | 0,1 | 300 | 20 | 300 | 21 |
| 3A | 0,071 | 360 | 32 | 363 | 40 |
| Bk | 0,016 | 300 | 26 | 300 | 27 |

Tabella 5.7

5.3 Discussione dei risultati

5.3.1 Rilassometria NMR a 20.15 MHz

I risultati ottenuti dall'indagine NMR condotta a 20.15 MHz sui campioni del set **ex-vivo** non mostrano nessuna particolare influenza dei tempi di rilassamento nucleare degli atomi di Idrogeno che possano in qualche modo essere imputabili alla presenza di Cobalto nei campioni acquisiti. Le curve sperimentali di rilassamento della magnetizzazione, sia longitudinale che trasversale (figure 5.1 e 5.2), non sono discriminabili tra le varie concentrazioni, infatti, la variabilità dei tempi caratteristici per le due modalità di rilassamento ottenuti con fit mono-esponenziali (la deviazione standard è di ± 52 ms per il T_1 e ± 31 per il T_2) cade entro l'errore sperimentale del 10%.

Il Cobalto presente nei campioni potrebbe essere in forma complessata non paramagnetica oppure, la concentrazione è troppo bassa perchè l'effetto paramagnetico sia apprezzabile.

A differenza dei campioni **ex-vivo** per i quali non si conosce la natura chimica del Co presente, i campioni **in-vitro** sono formati a partire da siero di controllo con concentrazione di Co entro i valori normali di riferimento, cui viene aggiunto Cobalto in forma chimica nota, di Cloruro (CoCl_2 -esaidrato). Il Cloruro di Cobalto è un sale che una volta in soluzione nel siero si dissocia liberando ioni Co^{2+} ($S=3/2$).

Le acquisizioni dei campioni del set **in-vitro** predisposti a partire da siero di controllo 7649 confermano per concentrazioni di Cobalto tra $0,3 \mu\text{g}/\text{L}$ e $200 \mu\text{g}/\text{L}$ il medesimo risultato riscontrato per i campioni **ex-vivo** (Figure 5.4 e 5.3). La variabilità di tali misure calcolata come deviazione standard dal valore medio, risulta essere di ± 37 ms per il T_1 e ± 60 ms per il T_2 ; tali valori rientrano ampiamente nell'errore associato alla misura sperimentale. La divergenza tra le misure riportate inizia ad essere significativa dal valore di concentrazione di Cobalto pari a $0,3 \text{ g}/\text{L}$. Per chiarezza in figura 5.14 si riportano a confronto le velocità di rilassamento dei set **ex-vivo** ed **in-vitro** per basse concentrazioni di Co, nel range $0,3\text{-}200 \mu\text{g}/\text{L}$.

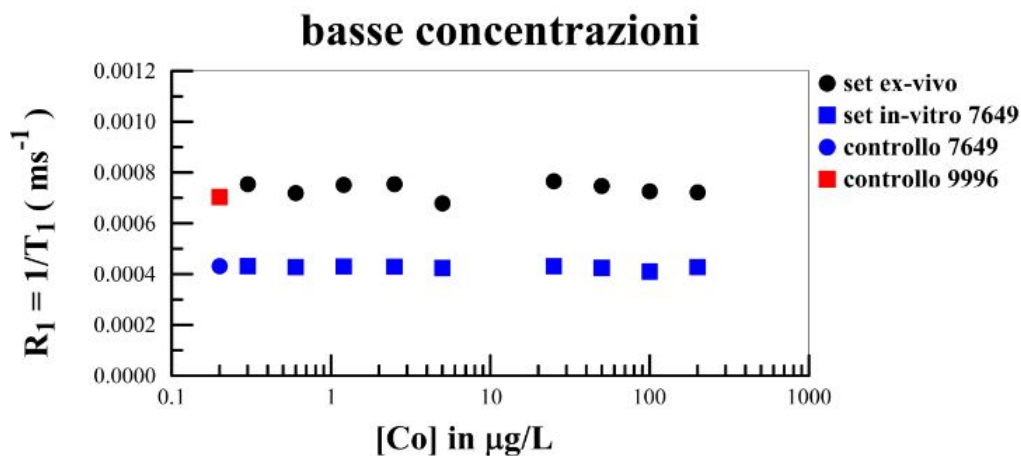


Figura 5.14

I campioni appartenenti al set in-vitro predisposti a partire da siero di controllo 9996 presentano “alte” concentrazioni di Cobalto; queste concentrazioni sono molto superiori alla soglia presunta di tossicità dovuta ad emissione interna da endoproteasi ($[Co] = 7\mu\text{g/L}$). I risultati dell’indagine rilassometrica (Figure 5.6 e 5.5) in questo caso mostrano una dipendenza del tempo di rilassamento nucleare degli Idrogeni in funzione della concentrazione di Cobalto presente nel campione, riscontrabile sia nei tempi caratteristici T_1 sia nei tempi caratteristici T_2 . L’effetto paramagnetico dei campioni cui è stato aggiunto Co rispetto al bianco di riferimento, costituito da siero 9996, diventa significativo sia per il tempo T_1 che per il tempo T_2 dal valore di concentrazione di pari a 0,3 g/L. Per chiarezza in figura 5.14 si riportano a confronto le velocità di rilassamento dei set in-vitro composti a partire da siero di controllo 7649 e siero di controllo 9996, per alte concentrazioni di Co nel range 0,3-200g/L.

Effettuare un confronto tra i tre set di misure riportati, il set ex-vivo ed i due set in-vitro, che non sia espresso in termini puramente qualitativi non è possibile a causa dell’ampia variabilità esistente nella composizione molecolare (per lo più proteica, essendo le proteine le specie più abbondanti del siero umano) dei sieri provenienti da pazienti diversi. Risulta quindi complesso stabilire un valore di concentrazione di Cobalto di soglia oltre il quale l’effetto paramagnetico nel siero

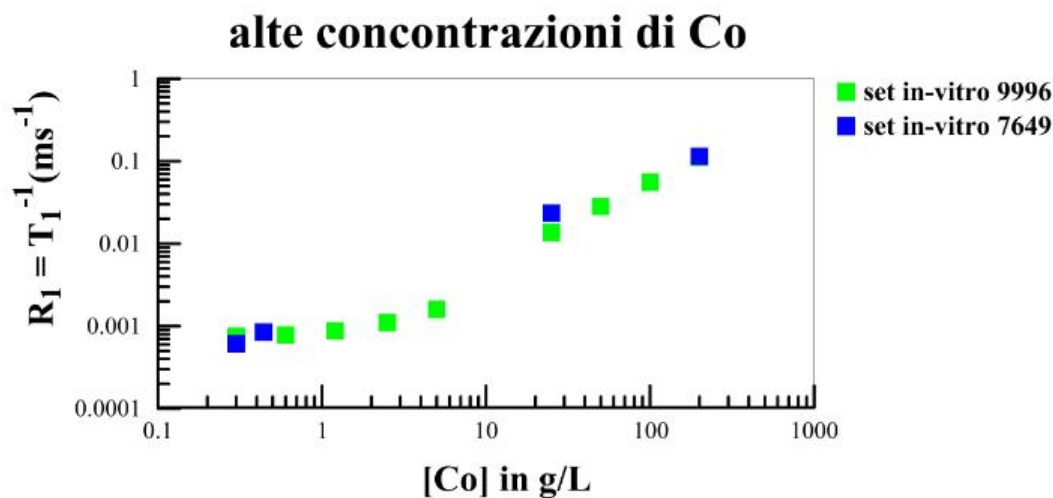


Figura 5.15

sia apprezzabile con metodica NMR; da questa indagine, tale valore risulta essere di 0,3 g/L.

5.3.2 Indagine condotta in funzione della temperatura

La temperatura corporea fisiologica normale è di circa 37°C; numerosi sono i processi metabolici che non si verificano a temperature inferiori. L'obiettivo dell'indagine rilassometrica in funzione della temperatura è stato quello di indagare se a questa temperatura si verificano nel siero processi biochimici che modificando lo stato chimico del Co presente possano influenzare i tempi di rilassamento del composto.

Dalle prove effettuate non si osserva un diverso comportamento del Cobalto presente nei campioni **ex-vivo** nelle misure condotte a temperatura fisiologica rispetto alle stesse condotte a 25°C (Figura 5.7).

L'acquisizione a temperatura più alta comporta in generale un aumento dei tempi di rilassamento, allo stesso tempo la variabilità tra le singole misure, sia per le misure di T_1 che per le misure di T_2 (anche in questo caso, esprimendo tale variabilità come deviazione standard dal valore medio tra le misure si ottiene per le misure condotte a 37°C ± 28 ms per il T_1 e ± 26 ms per il T_2) rientra nell'errore

del 10%, pertanto anche a temperatura fisiologica si conferma il risultato per cui i tempi di rilassamento non vengono influenzati dalla presenza di Cobalto nei campioni, a questi livelli di concentrazione.

Per i campioni in-vitro ad alte concentrazioni di Co (siero di controllo 9996) l'indagine condotta a 37°C conferma la manifestazione dell'effetto paramagnetico sui tempi di rilassamento nucleare T_1 e T_2 in funzione della quantità di Co^{2+} contenuta nel campione (figura 5.8). Sia per le misure condotte a 25°C che per le stesse condotte a 37 °C si ha una variazione significativa dei tempi di rilassamento a partire da un valore di concentrazione di Co di 0,3 g/L.

Per i campioni nei quali il Cobalto è presente nella forma dissociata Co^{2+} l'interazione dei centri paramagnetici (per $[\text{Co}] > 0,3 \text{ g/L}$) con i nuclei Idrogeno delle molecole d'acqua presenti nel campione avviene, sia per le misure condotte a 25°C sia per le misure condotte a 37°C, con le stesse modalità.

La procedura di deproteinizzazione dei campioni di siero con attacco acido (ACTCA) comporta l'introduzione di questo acido entro il campione di siero. Il campione deproteinizzato è costituito dal surnatante che risulta da tale operazione, mentre la componente proteica rimane depositata. I tempi di rilassamento del campione di siero 7695 sottoposto a deproteinizzazione, rispetto al campione originario, aumentano per via della minore viscosità del composto ma non si notano ulteriori effetti particolari dovuti all'assenza proteica, quindi alla presunta assenza di Cobalto; lo stesso risultato si ottiene al variare della temperatura di acquisizione (figura 5.9).

Per i campioni in-vitro alla massima concentrazione di Cobalto ($[\text{Co}]$ pari a 200 g/L) si osserva che i campioni deproteinizzati rilassano allo stesso modo di quelli non deproteinizzati, inoltre, la discrepanza tra i tempi di rilassamento tra le misure effettuate a 25°C e 37°C non è significativa (figura 5.9). Questi risultati sembrano confermare che in tali campioni l'effetto predominante del rilassamento è sempre quello paramagnetico dovuto al Co^{2+} . Infine, la deproteinizzazione dei campioni di siero non comporta un allungamento dei tempi di rilassamento e quindi non sembra comportare una diminuzione della concentrazione di Co^{2+} ; Si osserva una piccola differenza nei campioni deproteinizzati tra quello in cui

il Cobalto viene aggiunto al siero a 25°C ed il campione in cui il Cobalto viene aggiunto al siero a 37°C (tabella 5.5); in tutte le misure effettuate il secondo campione manifesta tempi leggermente più lunghi, sia in T_1 che in T_2 , rispetto al primo campione. Questo effetto potrebbe essere giustificato dal fatto che a temperatura fisiologica sia più probabile l'interazione tra il Co^{2+} e l'Albumina e che quindi una piccola frazione di Cobalto venga eliminata con la deproteinizzazione. Ad ogni modo, questa ipotesi dovrebbe essere validata da ulteriori approfondimenti.

5.3.3 Profili NMRD

L'indagine sul rilassamento longitudinale condotta al variare della frequenza è una tipologia di indagine che, in modo particolare alle basse frequenze, permette di ottenere informazioni connesse alle dinamiche molecolari della sostanza indagata. Utilizzando un FFC per le acquisizioni a basse frequenze ed un elettromagnete alle alte frequenze si sono ottenuti i profili NMRD completi dei tre campioni indagati: ex-vivo, controllo ed in-vitro (figure 5.10, 5.11 e 5.12).

Per tutti i campioni l'andamento generale del profilo di dispersione è una diminuzione della velocità di rilassamento longitudinale all'aumentare della frequenza di Larmor di acquisizione.

Le stime del tempo di rilassamento longitudinale per ogni valore di frequenza corrispondenti al campione ex-vivo differiscono dalle stesse calcolate per i campioni in-vitro e controllo, risultando significativamente più basse (tabella 5.6). Gli ultimi due campioni, invece, presentano lo stesso comportamento per ogni valore di frequenza selezionato nelle acquisizioni sperimentali. La presenza di una concentrazione di Co pari a $200\mu\text{g}/\text{L}$ nel campione in-vitro non altera in alcun modo i tempi di rilassamento T_1 al variare della frequenza, rispetto al controllo.

Il profilo del campione ex-vivo è significativamente diverso dagli altri principalmente alle basse frequenze; la divergenza tra le misure aumenta al diminuire della frequenza (il confronto degli andamenti è riportato in figura 5.16). Questo incremento maggiore di "rilassività" per il campione ex-vivo alle basse frequenze implica che i nuclei indagati in queste condizioni rilassano più velocemente a causa di un maggior numero di transizioni indotte dalla presenza di campi fluttuan-

ti alla frequenza di Larmor, più intensi. Poichè nei campioni ex-vivo il Cobalto non è in forma ionica dissociata ma si trova verosimilmente connesso ad Albumina sierica (un macromolecola), mentre negli altri campioni o è presente in quantità trascurabile oppure in forma ionica nello stato di ossidazione 2+, non è escluso che questa variazione significativa sia generata da moti di queste macromolecole alla frequenza di Larmor.

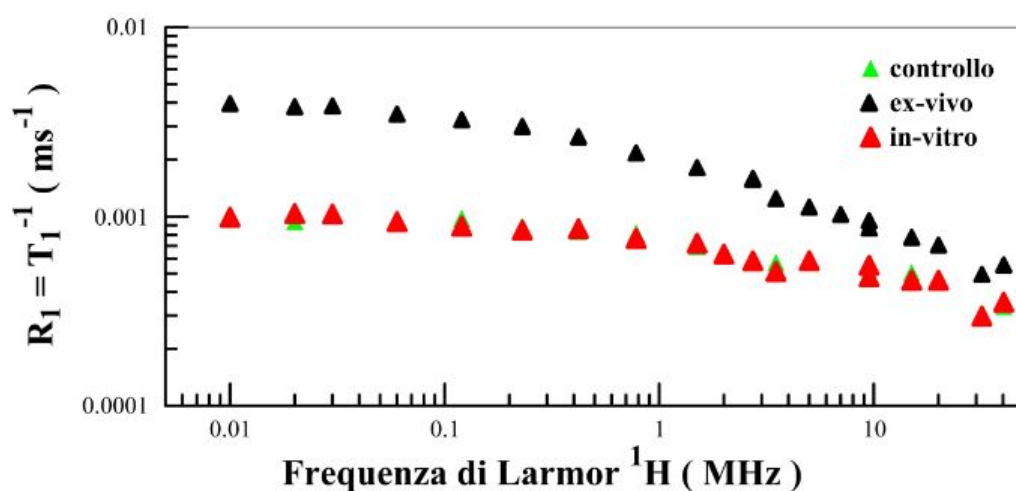


Figura 5.16

5.3.4 Indagine su campioni di tessuto animale

L'indagine condotta con rilassometria ^1H -NMR sulle biopsie di tessuti di coniglio che presentano un accumulo di Cobalto a diversa concentrazione non mostra alcun andamento particolare; nessuna correlazione è stata riscontrata tra i tempi caratteristici di rilassamento nucleare e la quantità di Co presente, prendendo ogni volta come tempo caratteristico di riferimento del tessuto quello dell'animale di controllo (tabella 5.7). Le curve di rilassamento sperimentali trasversali e longitudinali acquisite per ogni campione risultano essere, anche in questo caso, rappresentabili da un fit di tipo monoesponenziale o monomodale (figura 5.13). Ad ogni modo, sia i valori di picco sia i range di rilassamento di ogni tessuto tra i vari animali

non presentano discrepanze significative o comunque la loro variabilità può essere giustificata da una variabilità presente tra i campioni. Tale variabilità risiede sia nello stato di conservazione dei vari campioni, i campioni infatti non presentavano ne lo stesso volume ne la stesso livello di idratazione, sia nella variabilità intrinseca tra animali.

Conclusione

L'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di condurre uno studio sistematico per valutare la fattibilità dell'utilizzo della metodica NMR *in-vivo* al fine di discriminare il potenziale accumulo di Cobalto, che viene emesso da protesi articolare d'anca ad accoppiamento metallo su metallo, su tessuti target di pazienti che manifestano alti livelli ionici di Co nel siero.

Nei campioni di siero in cui il livello di Cobalto è correlato ad usura di protesi articolare e nei campioni in cui il Cobalto è stato aggiunto come CoCl_2 e quindi è presente in forma chimica dissociata Co^{2+} , alle stesse concentrazioni (nel range di concentrazioni $0,3\text{-}200 \mu\text{g/L}$) non si riscontrano variazioni nei tempi caratteristici T_1 e T_2 che segnalino la manifestazione di un effetto paramagnetico. Invece, le indagini condotte sui due set di campioni *in-vitro*, in cui il Cobalto è aggiunto in forma di CoCl_2 , mostrano un comportamento paramagnetico a partire dalla concentrazione di Co (nello stato ossidato 2+) di $0,3 \text{ g/L}$. Oltre questo valore l'aumento del tasso di rilassamento ($1/T_i$ con $i=1,2$) del campione è direttamente proporzionale alla concentrazione di soluto paramagnetico in soluzione.

Dall'indagine degli stessi campioni condotta a temperatura fisiologica si ottengono risultati del tutto analoghi a quanto riassunto finora. Inoltre, l'unico andamento riscontrato nelle acquisizioni alle due diverse temperature (25°C e 37°C) è quello atteso di un aumento dei tempi di rilassamento all'aumentare della temperatura. Per i campioni ad alta concentrazione di Cobalto paramagnetico la deproteinizzazione non comporta un aumento dei tempi di rilassamento. Il Cobalto presente nei campioni sembra esistere in forma chimica ionica libera e non sembra quindi interagire con l'Albumina del siero, quando il CoCl_2 viene aggiunto

a 25°C. Un aumento significativo nei tempi di rilassamento si riscontra invece, per il campione in cui il CoCl_2 era stato inserito a 37°C. Non si può escludere in questo caso la possibilità che una frazione, benchè minima, di Cobalto possa essere legata all'Albumina.

L'indagine di rilassometria condotta sulle biopsie di tessuti di conigli trattati con Cobalto per ogni tessuto analizzato, a confronto con la stessa condotta su un coniglio di controllo, della stessa specie e non trattato, non mostra un trend in funzione della quantità di Cobalto presente. Nonostante la discutibilità dello stato di conservazione e delle diverse condizioni di idratazione presenti tra i campioni acquisiti, anche dello stesso tessuto, il risultato ottenuto conferma quanto riscontrato per i campioni di siero ex-vivo.

Un risultato da approfondire con ulteriori misure è legato ai profili NMRD e riguarda le misure condotte a frequenza variabile entro l'intervallo 10KHz-40MHz. Si evidenzia che il tasso di rilassamento protonico diminuisce all'aumentare della frequenza. Ciò sembra indicare che il meccanismo dominante del rilassamento nucleare protonico, secondo la trattazione con modello Solomon-Bloembergen-Morgan, sia quello del tumbling molecolare. E' importante sottolineare che il profilo NMRD del campione ex-vivo si distingue significativamente da quelli del controllo e del campione in-vitro indicando una maggiore rilassività alle basse frequenze.

In conclusione, le concentrazioni di Cobalto che sono associate alla potenziale manifestazione di cobaltismo da artroprotesi, sebbene considerate elevate per l'uomo in un contesto biochimico tossicologico, non sono sufficienti perchè la rilassometria ^1H -NMR, almeno alle alte frequenze qui utilizzate (20 MHz), risulti un metodo idoneo per una diagnosi non invasiva. La scelta della rilassometria era stata fatta nell'ipotesi che a fini diagnostici potesse essere utilizzata la tecnica di imaging a risonanza magnetica (MRI), con pesatura nei tempi di rilassamento. I risultati ottenuti indicano che indagini tomografiche potrebbero invece essere indirizzate ad ottenere immagini con informazioni spettroscopiche (imaging spettroscopico).

Appendice

Upen: analisi del decadimento multiesponenziale

Il rilassamento NMR è dato in generale da una somma di processi esponenziali nel tempo combinata ad una frazione ineliminabile di rumore di fondo.

Gli algoritmi che permettono di ottenere la funzione di distribuzione dei tempi di rilassamento $T_{1,2}$ di sistemi multicomponente, effettuano l'inversione dalla scala dei tempi di misura t alla scala dei tempi $T_{1,2}$ con trasformata inversa di Laplace introducendo dei fattori di smoothing costanti. Questi ultimi vengono introdotti nell'algoritmo sottoforma di funzione di merito.

La peculiarità di Upen è quella di essere un algoritmo a feedback negativo che per iterazioni successive fa variare il coefficiente di smoothing per ogni punto della curva fino a che ciascuno risulti inversamente proporzionale al quadrato della curvatura in quel punto. Effettuando questa operazione di penalizzazione uniforme lungo tutta la distribuzione $f(T_{1,2})$ riesce a minimizzare i picchi non giustificati dai dati.

Algoritmo

Il segnale discreto s_i recuperato in un esperimento NMR può essere pensato come generato da un numero finito M di contributi esponenziali. Gli M tempi di rilassamento caratteristici T_M , ciascuno con la rispettiva ampiezza g_M , possono essere ottenuti dal fit dei dati. Il segnale misurato al tempo sperimentale t è dato da:

$$s_i \approx g_0 + \sum_{k=1}^M g_k e^{-t_i/T_{(1,2)}^k} \quad (1)$$

con g_0 valore del segnale a tempo infinito.

Si consideri ora la distribuzione continua di tempi di rilassamento caratterizzata da una funzione densità di segnale $f(T_{1,2})$:

$$S(t) = \int_0^{\infty} f(T_{1,2}) e^{-t/T_{1,2}} dT_{1,2} \quad (2)$$

L'inversione di questa funzione per ottenere $f(T_{1,2})$ a partire dai valori discreti $s(t_i)$ ottenuti per gli M valori di $T_{1,2}$, ammette un ampio spettro di soluzioni, pertanto è necessario ricorrere a metodi di regolarizzazione.

La funzione di merito che Upen va a minimizzare è costituita dal termine della minimizzazione dell'errore quadratico medio rispetto ai dati sperimentali al quale è aggiunto il termine di penalizzazione uniforme per ogni punto che va a ridurre l'eccessivo dettaglio della distribuzione:

$$\underbrace{\sum_{i=1}^N B_i \left(g_0 + \sum_{k=1}^M g_k \exp(-t_i/T_k) - s_i \right)^2}_{\text{errore quadratico di fit}} + \underbrace{\sum_{k=1}^M A_k g_k^2 + \sum_{k=1}^M C_k (g_{k-1} - 2g_k + g_{k+1})^2}_{\text{penalizzazione uniforme}}$$

dove i coefficienti A_k e C_k sono i coefficienti per l'ampiezza dello smoothing e la curvatura dello smoothing. Per ottimizzare i C_k l'algoritmo usa la strategia *local compliance contributions* tra pendenza e curvatura, e bilancia il peso dei due termini nella minimizzazione, che riguardano l'influenza del rumore e lo smoothing complessivo; in prossimità della soluzione i due termini avranno ragionevolmente pesi confrontabili.

Ringraziamenti

Vorrei ricordare e ringraziare tutti coloro che hanno contribuito allo sviluppo di questo lavoro di tesi.

Ringrazio in primis la Prof.ssa Fantazzini per la pazienza ed i preziosi consigli che hanno permesso lo svolgimento dell'intero lavoro ed il Dott. Fabio Baruffaldi la cui disponibilità ha permesso la realizzazione di tale attività in ambito medico, senza la loro guida questo lavoro non esisterebbe. Un ringraziamento speciale va al Dott. Manuel Mariani, il quale ha seguito con interesse tutto lo sviluppo del progetto in particolar modo della parte sperimentale dello stesso. Il suo supporto sia sperimentale che morale è stato di fondamentale importanza.

Ringrazio l'intero gruppo di ricerca che comprende il Laboratorio di Tecnologia Medica del Rizzoli in particolare le biologhe Dott.ssa Alina Beraudi, Dott.ssa Dalila De Pasquale Dott.ssa Susanna Stea per la disponibilità rivolta nei miei confronti che ha reso possibile la predisposizione dei campioni biologici.

Un ulteriore ringraziamento è rivolto alla Dott.ssa Simona Catalani, biochimica e tossicologa dell'Università di Brescia, la quale ha gentilmente concesso l'utilizzo delle biopsie di campioni animali veramente significativi ai fini di questo lavoro.

Un ringraziamento sentito va al Prof. Alessandro Lascialfari, al Dott. Paolo Arosio e al Dott. Francesco Orsini del gruppo NMR dell'Università degli Studi di Milano, per la loro infinita disponibilità e per l'interesse mostrato per questo lavoro. Grazie a loro si sono potute realizzare le misure con FFC. Stimolo molto la passione che ripongono nella ricerca. Allo stesso modo, ringrazio il Prof. Corti e l'intero gruppo NMR del dipartimento di Fisica dell'Università di Pavia, an-

che loro hanno contribuito con immensa disponibilità allo sviluppo delle misure sperimentali, offrendomi l'opportunità di utilizzare la loro strumentazione NMR.

Ringrazio le persone più vicine che hanno segnato questa permanenza al Rizzoli: Chiara che abita vicino a tutto, Rosaria, Nadia e Sami l'antipatico.

Un ringraziamento speciale va alle amiche storiche che ci sono sempre anche se sono lontane fisicamente e che non vedo l'ora di andare a trovare la Marty, la Sara e la Miss. A Simone per cui ho sempre un pensiero e lui lo ha per me e Damiano che non vedo l'ora di rivedere. La Bianca e i nostri hobby comuni. A JaPoCo, il Corra, Daniele che rendono felici e divertenti i momenti Orvietani; grazie a voi tornare a Orvieto è sempre una gioia. Un Grazie fortissimo è per gli amici che sono rimasti vicino in questi anni di università, in particolare la Lù e Marco e a tutte le cose che abbiamo condiviso e le belle serate passate insieme. Laura compagna gioie e dolori degli ultimi 3 anni. Fabio e le ore al telefono. Ringrazio inoltre le persone con cui ho condiviso questi ultimi due anni di università e alle belle serate trascorse insieme, Giulio, Francesco e Francesca. Ringrazio anche Silviona che mi ha sopportato negli ultimi anni.

Infine anche l'ultimo pensiero va a tutta la mia famiglia. Voglio ringraziare prima di tutti mio padre, che oltre ad essere un esempio di vita mi ha sempre incoraggiato e permesso di superare ogni difficoltà, senza di lui forse non sarei arrivata a questo punto. Voglio ringraziare mia madre perchè è sempre presente, mia sorella che ha dovuto subire anche un'intrusione domestica e Filippo per la sua infinita dolcezza. Ringrazio anche mia nonna e le tante preghiere che l'hanno tenuta occupata in questi anni. Voglio ricordare nonna Bice, nonno Guerrino e la zia Dina che vorrei tanto fossero qui.

Bibliografia

- [1] *ELAN DRC II Hardware Guide. PerkinElmerSCIEX Instruments 2005.*
- [2] *ELAN ICP-MS Series Safety Manual. PerkinElmerSCIEX Instruments 2001.*
- [3] *Medical Advice Alert. Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, MHRA. Issued: 07 September 2010 at 13:00.*
- [4] *Field Cycling NMR Relaxometry. Review of Technical Issues and Applications, 2004.*
- [5] The safety of Metal-on-Metal joint replacements with a particular focus on hip implants, SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. 25 September 2014.
- [6] P. Apostoli, S. Catalani, A. Zaghini, A. Mariotti, P. L. Poliani, V. Vielmi, F. Semeraro, S. Duse, A. Porzionato, V. Macchi, A. Padovani, M. C. Rizzetti, and R. D. Caro. High doses of cobalt induce optic and auditory neuropathy. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(6):719 – 727, 2013.
- [7] W. Bal, M. Sokolowska, E. Kurowska, and P. Faller. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1830(12):5444–5455, Dec 2013.
- [8] Bennett, H. F. and Brown, R. D. and Koenig, S. H. and Swartz, H. M. Effects of nitroxides on the magnetic field and temperature dependence of $1/T_1$ of solvent water protons. *Magnetic Resonance in Medicine*, 4(2):93–111, 1987.

- [9] I. Bertini, C. Luchinat, and G. Parigi. Magnetic susceptibility in paramagnetic {NMR}. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 40(3):249 – 273, 2002.
- [10] Bertini, I. and Luchinat, C. *Nmr of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*. Physical Bioinorganic Chemistry Series. Benjamin/Cummings Publishing Company, 1986.
- [11] Bertini, I. and Luchinat, C. and Parigi, G. *Solution NMR of Paramagnetic Molecules: Applications to metallobiomolecules and models*. Current Methods in Inorganic Chemistry. Elsevier Science, 2001.
- [12] Bloembergen, N. and Morgan, L. O. Proton Relaxation Times in Paramagnetic Solutions. Effects of Electron Spin Relaxation. *The Journal of Chemical Physics*, 34(3):842–850, 1961.
- [13] G. Borgia, R. Brown, and P. Fantazzini. Examples of uniform-penalty inversion of multiexponential relaxation data. *Magnetic Resonance Imaging*, 16(5–6):549 – 552, 1998.
- [14] G. Borgia, R. Brown, and P. Fantazzini. Uniform-penalty inversion of multiexponential decay data. *Journal of Magnetic Resonance*, 132(1):65 – 77, 1998.
- [15] G. Borgia, R. Brown, and P. Fantazzini. Uniform-penalty inversion of multiexponential decay data: Ii. data spacing, {T2} data, systematic data errors, and diagnostics. *Journal of Magnetic Resonance*, 147(2):273 – 285, 2000.
- [16] Case, CP and Langkamer, VG and James, C and Palmer, MR and Kemp, AJ and Heap, PF and Solomon, L. Widespread dissemination of metal debris from implants. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 76(5):701–712, 1994.
- [17] Catelas, Isabelle and Bobyn, J. Dennis and Medley, John B. and Krygier, Jan J. and Zukor, David J. and Petit, Alain and Huk, Olga L. Effects of digestion

- protocols on the isolation and characterization of metal–metal wear particles. I. Analysis of particle size and shape. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(3):320–329, 2001.
- [18] Catelas, Isabelle and Bobyn, J. Dennis and Medley, John J. and Zukor, David J. and Petit, Alain and Huk, Olga L. Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal–metal wear particles. II. Analysis of ion release and particle composition. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(3):330–337, 2001.
- [19] Charles Kittel. *Introduction to Solid State Physics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 6th edition, 1986.
- [20] Doorn, Peter F. and Campbell, Patricia A. and Worrall, Jack and Benya, Paul D. and McKellop, Harry A. and Amstutz, Harlan C. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: Transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42(1):103–111, 1998.
- [21] Eldik, R. V. and Bertini, I. *Relaxometry of Water-metal Ion Interactions*. Advances in Inorganic Chemistry : including Bioinorganic Studies. Vol. 57. Amsterdam: Elsevier,, 2005.
- [22] Fanali, Gabriella and Cao, Yu and Ascenzi, Paolo and Fasano, Mauro. Mn(II) binding to human serum albumin: a ¹H-NMR relaxometric study. *Journal of inorganic biochemistry*, 117:198—203, December 2012.
- [23] Fasano, M and Curry, S and Terreno, E and Galliano, M and Fanali, G and Narciso, P and Notari, S and Ascenzi, P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB LIFE*, 57:787–796, 2005.
- [24] J. H. Freed. Dynamic effects of pair correlation functions on spin relaxation by translational diffusion in liquids. ii. finite jumps and independent t1 processes. *The Journal of Chemical Physics*, 68(9), 1978.
- [25] P. Instruments. *The 30-Minute Guide to ICP-MS*.

- [26] R. Kimmich and E. Anoardo. *Field-cycling NMR relaxometry*, 2004.
- [27] Kowalewski, J. and Maler, L. *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments, and Applications*. Series in Chemical Physics. CRC Press, 2006.
- [28] Lauffer, Randall B. Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design. *Chemical Reviews*, 87(5):901–927, 1987.
- [29] A. Marti. Cobalt-base alloys used in bone surgery. *Injury*, 31 Suppl 4:18–21, Dec 2000.
- [30] H. Matusiewicz. Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: from ions to nanoparticles—a systematic analytical review. *Acta Biomater*, 10(6):2379–2403, Jun 2014.
- [31] Merbach, A.S. and Helm, L. and Tóth, É. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Wiley, 2013.
- [32] I. Milošev. Metallic materials for biomedical applications: Laboratory and clinical studies. *Pure and Applied Chemistry*, (2):309–324, 2010.
- [33] E. Monzani, M. Curto, M. Galliano, L. Minchiotti, S. Aime, S. Baroni, M. Fasano, A. Amoresano, A. M. Salzano, P. Pucci, and L. Casella. Binding and relaxometric properties of heme complexes with cyanogen bromide fragments of human serum albumin. *Biophysical Journal*, 83(4):2248 – 2258, 2002.
- [34] National Joint Registry for England and Wales. 7th Annual Report, 2010.
- [35] Ordóñez, Yoana Nuevo and Montes-Bayón, Maria and Blanco-González, Elisa and Paz-Jiménez, José and Tejerina-Lobo, Jose Maria and Peña-López, Jose Miguel and Sanz-Medel, Alfredo. Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24(8):1037–1043, 2009.

- [36] M. C. Rizzetti, P. Liberini, G. Zarattini, S. Catalani, U. Pazzaglia, P. Apostoli, and A. Padovani. Loss of sight and sound. could it be the hip? *The Lancet*, 373(9668):1052 –, 2009.
- [37] Schnabel, C and Herpers, U and Michel, R and Löer, F and Buchhorn, G and Willert, H-G. Changes of concentrations of the elements Co, Cr, Sb, and Sc in tissues of persons with joint implants. In *Nuclear Analytical Methods in the Life Sciences 1994*, pages 389–395. Springer, 1994.
- [38] K. M. Shah, P. D. Quinn, A. Gartland, and J. M. Wilkinson. Understanding the tissue effects of tribo-corrosion: uptake, distribution, and speciation of cobalt and chromium in human bone cells. *J. Orthop. Res.*, 33(1):114–121, Jan 2015.
- [39] Simonsen, Lars Ole and Harbak, Henrik and Bennekou, Poul. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. *Science of the Total Environment*, 432:210–215, 2012.
- [40] Singh, Raghuvir and Dahotre, Narendra B. Corrosion degradation and prevention by surface modification of biometallic materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(5):725–751, 2007.
- [41] Tower, Stephen S. Arthroprosthetic cobaltism: neurological and cardiac manifestations in two patients with metal-on-metal arthroplasty. *JBJS Case Connector*, (17):2847–2851, 2010.
- [42] Urban, Robert M. and Jacobs, Joshua J. and Tomlinson, Michael J. and Gavrilovic, John and Black, Jonathan and Peoc’h, Michel. Dissemination of Wear Particles to the Liver, Spleen, and Abdominal Lymph Nodes of Patients with Hip or Knee Replacement. *J Bone Joint Surg Am*, 82(4):457–476, apr 2000.