

METODICHE AVANZATE DI RISONANZA MAGNETICA NELLO STUDIO DELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DELLE GAMBE SENZA RIPOSO

RAZIONALE DELLO STUDIO

La fisiopatologia della sindrome delle gambe senza riposo (RLS) non è ancora ben chiarita. Una serie di osservazioni suggeriscono il coinvolgimento di strutture del SNC, di vie dopaminergiche e del metabolismo del ferro. Le metodiche avanzate di Risonanza Magnetica (RM) hanno fornito importanti informazioni a riguardo. Alcuni studi, sfruttando l'effetto del ferro sul T2, T2* e T2' (e sui parametri derivati R2, R2* e R2'), hanno ottenuto dati compatibili con un ridotto contenuto di ferro cerebrale, anche se con qualche risultato contrastante¹. Utile sarebbe quindi un'ulteriore conferma, attraverso l'utilizzo di una metodica di recente introduzione, la phase-imaging².

Il primo obiettivo di questo studio è effettuare un'analisi quantitativa dei parametri derivati dalle sequenze di phase-imaging (fase, magnitudine, suscettibilità) in pazienti con RLS idiopatica.

Un altro aspetto approfondito negli ultimi anni è il coinvolgimento del sistema nocicettivo, di cui è stata evidenziata una disfunzione centrale da tecniche di tipo elettrofisiologico³. Inoltre, studi PET hanno documentato il coinvolgimento del sistema nocicettivo mediale (SNM), che comprende talamo mediale, corteccia frontale, corteccia insulare e giro del cingolo anteriore⁴.

Il secondo obiettivo dello studio è utilizzare la spettroscopia di RM del protone (^1H -MRS) a livello del talamo mediale per evidenziarne un'eventuale alterazione metabolica.

Il terzo obiettivo dello studio è quello di analizzare il cervello dei pazienti con RLS attraverso la RM funzionale a riposo ("resting state fMRI"). Quest'ultima è una tecnica sempre più utilizzata sia per la semplicità di esecuzione (non richiede l'esecuzione di compiti) che per le grosse potenzialità informative derivabili dall'attivazione e connettività di specifiche strutture e network neuronali, che sono evidenziabili a riposo (resting-state networks, RSNs), caratterizzati da una lenta (<0,1 Hz) oscillazione del segnale BOLD. Fino ad ora sono stati identificati nove RSNs tra cui il default-mode network (DMN), il network visivo, sensori-motorio, uditivo, e fronto-parietale⁵.

MATERIALI E METODI

Saranno reclutati e studiati con uno scanner da 1.5 Tesla (GE) pazienti con RLS idiopatica, diagnosticati secondo i criteri internazionali, fino a raggiungere un campione di:

- 20 pazienti per lo studio di phase-imaging
- 25 pazienti per lo studio H¹-MRS
- 10 pazienti per lo studio di resting state fMRI

Ogni paziente sarà sottoposto ad almeno uno dei seguenti protocolli (per motivi di tempo non è possibile eseguire il protocollo completo in ogni paziente):

- Phase-imaging: saranno acquisite sequenze assiali T2-FSE ($\alpha=90^\circ$; TE: 107 ms; TR: 5080 ms; FOV: 24 cm; matrice 320×256; spessore fette 4/0). Immagini sensibilizzate per la fase saranno acquisite utilizzando una sequenza in gradient echo, conservando sia il canale reale che immaginario (TE/TR: 40/60 ms; matrice 512×256; bandwidth 15.6 kHz). Saranno ottenute le mappe di fase, di magnitudine e di suscettibilità, che verranno analizzate con ROIs (regioni di interesse), istogrammi e analisi voxel-wise.
- H¹-MRS: Verrà studiato il talamo mediale, utilizzando la tecnica a singolo voxel PRESS. Il volume di interesse (VOI) avrà un volume compreso tra 4 e 5 cm³. Verrà acquisito uno spettro a corto tempo di eco (TE = 35ms; TR = 4 s; numero di acquisizioni = 128). Il segnale dell'acqua verrà soppresso con la sequenza CHESS. Le aree dei picchi di NAA, Cr, Cho e mI verranno calcolate utilizzando il programma di fitting LC Model.
- resting state fMRI: Ogni soggetto sarà sottoposto a scansioni fMRI, comprendenti l'acquisizione di immagini durante un periodo di riposo attraverso una sequenza gradient echo ecoplanare (TR=2 s, spessore fette 5 mm, FOV= 24 cm, TE=40 ms, flip angle=90°). Saranno successivamente acquisite immagini strutturali 3D, per identificare correttamente le aree di interesse. L'analisi verrà effettuata sia con ROIs, ICA (independent component analysis) e analisi voxel-wise.

Sarà reclutato e studiato anche un numero adeguato di soggetti normali di controllo di pari età e sesso.

RISULTATI PRELIMINARI

- 15 pazienti con RLS idiopatica (età 52±10) e 15 soggetti sani di controllo (età 51±16) sono già stati studiati con l' ^1H -MRS a livello dei talami mediali. Tali risultati preliminari hanno evidenziato un rapporto NAA/Cr ($P < 0.01$) e Cho/Cr ($P < 0.05$) significativamente ridotto nei pazienti rispetto ai controlli, compatibile con una disfunzione metabolica del talamo mediale (**tabella 1, figura 1-2**). Non sono state evidenziate delle correlazioni con i parametri clinici.
- 10 pazienti con RLS idiopatica (età 54±11) e 10 soggetti sani (età 51±18) sono già stati studiati con la phase-imaging. Tali risultati preliminari (derivanti solo dall'analisi delle mappe di fase) hanno dimostrato una significativa minor dispersione delle fasi degli spin nel cervello dei pazienti con RLS ($p < 0.05$), evidenziata dalla valutazione del 10° e 90° percentile dell'istogramma relativo a tutto il cervello, compatibile con un minor contenuto globale di ferro, con un andamento proporzionale alla durata della malattia (**tabella 2, figura 3-5**).

Tali risultati supportano un modello patogenetico della RLS caratterizzato da un ridotto contenuto di ferro cerebrale, che potrebbe essere alla base di un'alterazione funzionale a livello del SNC, che coinvolge anche strutture del sistema nocicettivo mediale come il talamo mediale.

Tabella 1. Risultati preliminari dello studio l' ^1H -MRS.

	Rapporti				P^*
	Controlli		Pazienti RLS		
	Media	±DS	Media	±DS	
NAA/Cr	1.39	0.11	1.20	0.17	<0.01
Cho/Cr	0.31	0.03	0.28	0.03	<0.05
mI/Cr	0.82	0.17	0.77	0.10	n.s.

*Student T test (un valore di $P < 0.05$ è stato considerato significativo). NAA = N-acetil-aspartato; Cr = creatina-fosfocreatina; Cho = colina; mI = mio-inositolo.

Figura 1. Esempio di spettro del talamo mediale in un controllo sano ed in un paziente con RLS (nota la riduzione del picco di NAA nel paziente RLS).

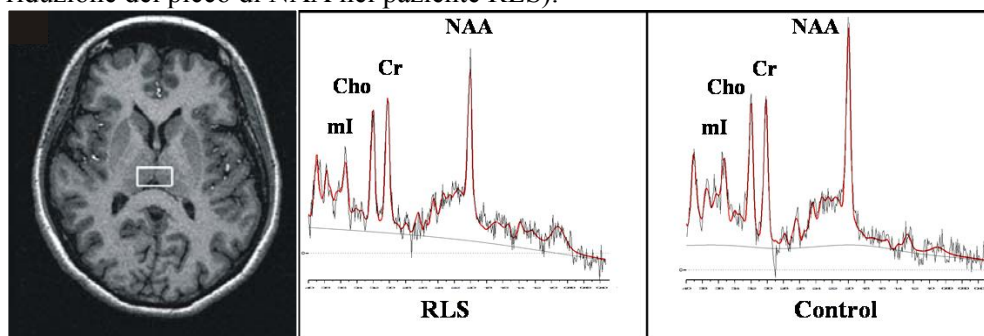
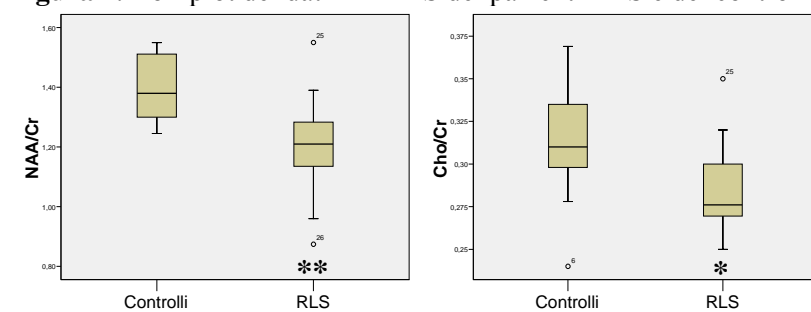


Figura 2. Box-plot dei dati ^1H -MRS dei pazienti RLS e dei controlli



** = $P < 0.01$; * = $P < 0.05$

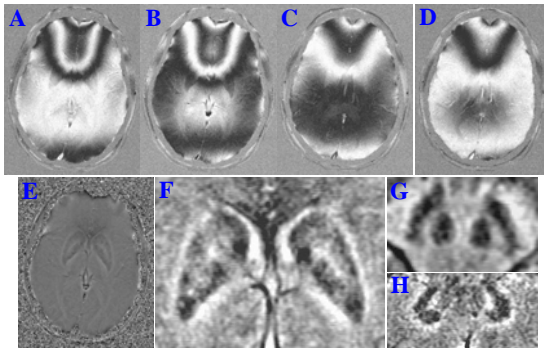


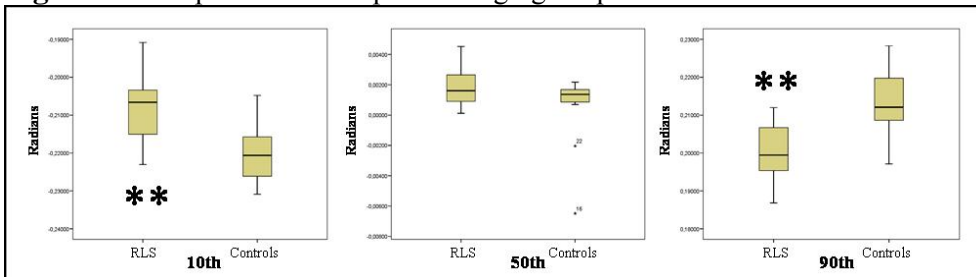
Figura 3. Illustrazione schematica del preprocessing della phase-imaging. A-B: immagini reale e immaginaria; C-D: immagini filtrate; E: mappa di fase; F-H: dettagli di strutture ricche di ferro (F: gangli della base, G: substantia nigra and nucleo rosso, H: nuclei dentati).

Tabella 2. Risultati preliminari dello studio di phase-imaging.

	Fase (radianti)				P*
	Controlli		Pazienti RLS		
	Media	±DS	Media	±DS	
Nucleo Dentato 25°#	-0,172	0,033	-0,165	0,024	n.s.
Nucleo Dentato 50°#	-0,060	0,027	-0,062	0,022	n.s.
Nucleo Rosso 25°#	-0,265	0,055	-0,234	0,056	n.s.
Nucleo Rosso 50°#	-0,141	0,039	-0,132	0,043	n.s.
Substantia nigra 25°#	-0,287	0,046	-0,243	0,077	n.s.
Substantia nigra 50°#	-0,138	0,042	-0,119	0,072	n.s.
Gangli della Base 25°#	-0,205	0,026	-0,203	0,028	n.s.
Gangli della Base 50°#	-0,075	0,015	-0,081	0,016	n.s.
Istogramma di tutto il cervello					
10° percentile	-0,220	0,007	-0,208	0,010	0.01
50° percentile	0,000	0,003	0,002	0,001	n.s.
90° percentile	0,214	0,009	0,200	0,009	0.02

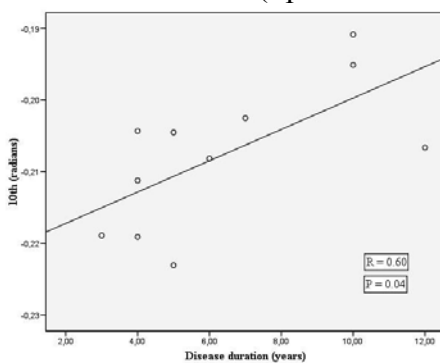
*Mann–Whitney U test (un valore di P < 0.05 dopo la correzione per comparazioni multiple è stato considerato significativo). # = media dei valori di destra e di sinistra.

Figura 4. Box-plot dei dati di phase-imaging dei pazienti RLS e dei controlli



**=P<0.05

Figura 5. Correlazione tra il 10° percentile derivante dall'istogramma delle fasi nei pazienti RLS e la durata di malattia (Spearman rank test).



TEMPI PREVISTI PER LA REALIZZAZIONE DEL PROGETTO

12 MESI:

- 9 mesi per reclutare la popolazione di pazienti
- 2 mesi per l'analisi dei dati
- 1 mese per la scrittura del/dei manoscritto/i

RUOLO CHE IL CANDIDATO COPRE NELLO SVOGLIMENTO DEL PROGETTO

Dott. Giovanni Rizzo: principal investigator

Il dott. Giovanni Rizzo ha ideato e disegnato il protocollo sperimentale, si è occupato della raccolta dei dati preliminari e coordinerà la continuazione dello studio. Si occuperà sia del reclutamento clinico dei pazienti, in collaborazione con il Centro per i Disturbi del Movimento ed il Centro per i Disturbi del Sonno del Dipartimento di Scienze Neurologiche di Bologna, sia dell'esecuzione ed analisi degli esami di RM, in collaborazione con la SSD Diagnostica con Spettroscopia RM del Dipartimento di Medicina Interna, dell'Invecchiamento e Malattie Nefrologiche di Bologna. Si occuperà inoltre della scrittura del/dei manoscritto/i.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Allen RP, Earley CJ. The role of iron in restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2007;22 Suppl 18:S440-8.
- 2) Ogg RJ, Langston JW, Haacke EM, Steen RG, Taylor JS. The correlation between phase shifts in gradient-echo MR images and regional brain iron concentration. *Magn Reson Imaging.* 1999;17:1141-8.
- 3) Stiasny-Kolster K, Magerl W, Oertel WH, Moller JC, Treede RD. Static mechanical hyperalgesia without dynamic tactile allodynia in patients with restless legs syndrome. *Brain* 2004;127:773-82.
- 4) Cervenka S, Pålhagen SE, Comley RA, Panagiotidis G, Cselényi Z, Matthews JC, Lai RY, Halldin C, Farde L. Support for dopaminergic hypoactivity in restless legs syndrome: a PET study on D2-receptor binding. *Brain.* 2006;129:2017-28.
- 5) Fox MD, Greicius M. Clinical applications of resting state functional connectivity. *Front Syst Neurosci.* 2010;4:19.