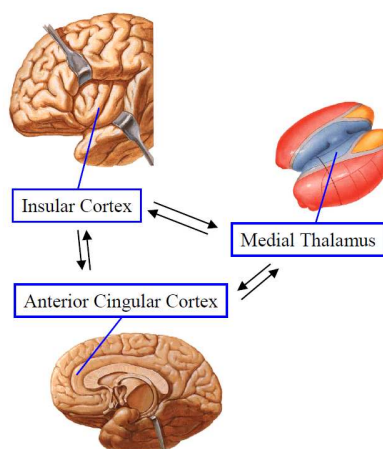


I RENDICONTO DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA DEL PROGETTO "METODICHE AVANZATE DI RISONANZA MAGNETICA NELLO STUDIO DELLA FISIOPATOLOGIA DELLA SINDROME DELLE GAMBE SENZA RIPOSO" FINANZIATO DALLA FONDAZIONE NEURECA (8 MARZO 2011)

Allo stato attuale risulta raggiunto uno degli obiettivi del progetto, ovvero lo studio del talamo mediale nei pazienti con sindrome delle gambe senza riposo. Lo studio è stato effettuato utilizzando sia la spettroscopia di RM del protone (H^1 -MRS) che il tensore di diffusione (DTI). Il razionale dell'indagine derivava dalle evidenze di un coinvolgimento del sistema nocicettivo provenienti da studi clinici [1,2] e di medicina nucleare [3,4] e neuropatologici [5]. Il talamo mediale è stato scelto come target in quanto componente del sistema nocicettivo mediale (SNM).

Fig. 1. Medial nociceptive system



MATERIALI E METODI

Sono stati reclutati e studiati con uno scanner da 1.5 Tesla (GE) 26 pazienti con RLS idiopatica (M/F: 9/17; età media \pm DS: 52 \pm 10), diagnosticati secondo i criteri internazionali, e 18 controlli sani (M/F: 11/7; età media \pm DS: 51 \pm 16).

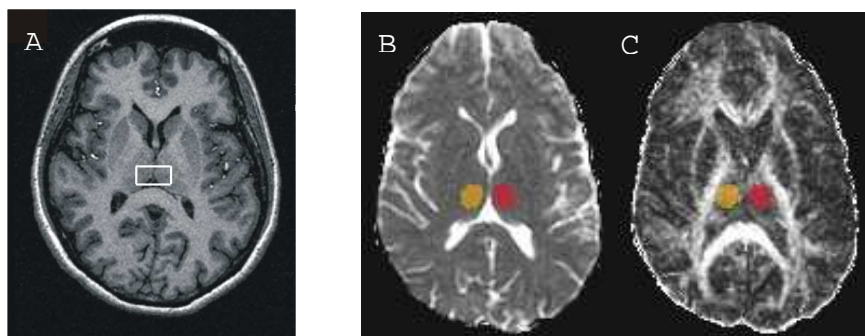
H^1 -MRS: è stata utilizzata la tecnica a singolo voxel PRESS. Il volume di interesse (VOI) aveva un volume compreso tra 4 e 5 cm³ ed è stato posizionato a livello del talamo mediale bilateralmente (**Figura 2-A**). In tutti i pazienti e controlli è stato acquisito uno spettro a corto tempo di eco (TE = 35ms; TR = 4 s; numero di acquisizioni = 128). Il segnale dell'acqua è stato soppresso con la sequenza CHESS. Le aree dei picchi di N-acetil-aspartato (NAA, marker di integrità neuronale), creatina-fosfocreatina (Cr), colina (Cho, marker di integrità di membrana) e mio-inositolo (mI, marker di proliferazione gliale) sono state calcolate utilizzando il programma di fitting LC Model. In un sottogruppo di pazienti (10) e controlli (9) è stato calcolato anche il contenuto di acqua del VOI selezionato attraverso l'acquisizione di un singolo spettro, senza la soppressione dell'acqua, al TE = 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 300, 600, 900, 1000 ms (TR = 15 s). L'area del picco dell'acqua è stata calcolata usando lo stesso programma. I dati del picco dell'acqua sono stati elaborati con un fit bi-esponenziale per separare il parenchima cerebrale dal liquido cerebrospinale per estrapolare il valore dell'intensità di segnale dell'acqua cerebrale al TE = 0. Le concentrazioni assolute di NAA, Cr, Cho, e mI, sono state calcolate utilizzando i valori di T2 ottenuti in una popolazione di controllo usando 5 tempi di eco (da 35 a 288 ms).

DTI: permette il calcolo della diffusività media (MD) e della anisotropia frazionale (FA) delle molecole di acqua in un determinato volume di tessuto. Modificazioni dell'integrità microstrutturale nelle aree cerebrali, come perdita neuronale/assonale e gliosi, può alterarne l'architettura con un incremento della MD e riduzione di FA. Il rigonfiamento cellulare che accompagna la depolarizzazione delle membrane cellulari in corso di specifiche condizioni patologiche porta ad una riduzione della diffusione delle molecole di acqua ed una concomitante riduzione della MD dell'acqua tissutale.

Le immagini del tensore sono state ottenute da fette assiali con uno spessore di 5mm, senza gap in 6 direzioni e utilizzando una sequenza "single shot spin echo" eco planare (EPI). La sequenza EPI è stata acquisita con $\alpha = 90^\circ$, TR = 10 secondi, TE = 89.2, FOV 32 cm², NEX = 1, una risoluzione nel piano dell'immagine di 192x192, con codificazione di fase nella direzione destra-sinistra. Immagini assiali del tensore di diffusione sono state ottenute con un valore di b di 900 s/mm². Inoltre, è stata acquisita un'immagine senza peso di diffusione ($b = 0$ s/mm²), esibendo un contrasto pesato in T2. Generalmente, le immagini di EPI pesate in diffusione presentano delle distorsioni dovute alle correnti indotte dai grandi gradienti magnetici applicati per generare il peso di diffusione. Tali distorsioni sono state corrette attraverso una registrazione fetta-per-fetta dell'immagini del tensore su quelle pesate in T2, usando il software FLIRT. Infine è stata calcolata una mappa della MD e FA utilizzando il software DTIFIT. È stata delineata manualmente una regione di interesse (ROI) a livello dei talami mediali comprendendo un'area sovrapponibile a quella compresa nel VOI dell'esame di spettroscopia (**Figura 2 B-C**). È stata quindi calcolata la MD ed FA corrispondente.

Analisi statistica: sia i dati derivati dallo studio di H¹-MRS che quelli derivati dallo studio di DTI avevano una distribuzione normale come evidenziato dal test di Kolmogorov-Smirnov. Sono stati quindi utilizzati dei test parametrici sia per le comparazioni (Student T test) che per le correlazioni (Pearson test e regressione multipla). I risultati ottenuti sono stati corretti per il numero di comparazioni multiple utilizzando il metodo di Bonferroni. Sono stati considerati significativi i risultati con valori di $P < 0.05$ corretto.

Figura 2. Esempio di localizzazione del volume di interesse per lo studio di H¹-MRS (A) e di regione di interesse per lo studio di DTI (B: mappa di MD; C: mappa di FA), entrambi a livello del talamo mediale.



RISULTATI

Lo studio di H¹-MRS ha evidenziato un rapporto NAA/Cr ($P < 0.01$) significativamente ridotto nei pazienti rispetto ai controlli, compatibile con una disfunzione metabolica del talamo mediale (**Tabella 1, Figura 3, Figura 4**). La stessa differenza significativa è stata confermata anche a livello delle concentrazioni assolute di NAA che sono risultate significativamente ridotte nei 10 pazienti con RLS rispetto ai 9 controlli che hanno eseguito il protocollo per la quantificazione dell'acqua. Sono risultate assenti correlazioni con i parametri clinici e demografici.

Lo studio di DTI invece non ha evidenziato nessuna differenza tra pazienti e controlli né in termini di MD né di FA (**Tabella 2**).

Figura 3. Esempio di spettro del talamo mediale in un controllo sano (A) ed in un paziente con RLS (B). Si noti la riduzione del picco di NAA nel paziente RLS.

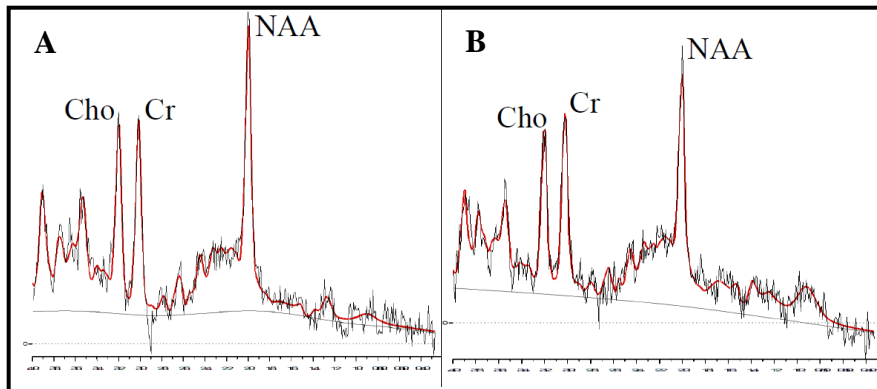


Tabella 1. Risultati dello studio di H^1 -MRS.

Rapporti					
	Controlli (18)		Pazienti RLS (26)		<i>P</i>*
	Media	\pmDS	Media	\pmDS	
NAA/Cr	1.39	0.11	1.23	0.16	<0.01
Cho/Cr	0.31	0.04	0.29	0.03	n.s
mI/Cr	0.83	0.17	0.79	0.15	n.s
Concentrazioni assolute					
	Controlli (9)		Pazienti RLS (10)		<i>P</i>*
	Media	\pmDS	Media	\pmDS	
[NAA]	9.05	1.25	7.40	1.05	<0.05
[Cho]	2.01	0.21	1.77	0.24	n.s
[Cr]	6.65	1.16	6.25	0.90	n.s
[mI]	5.16	0.31	4.73	0.78	n.s

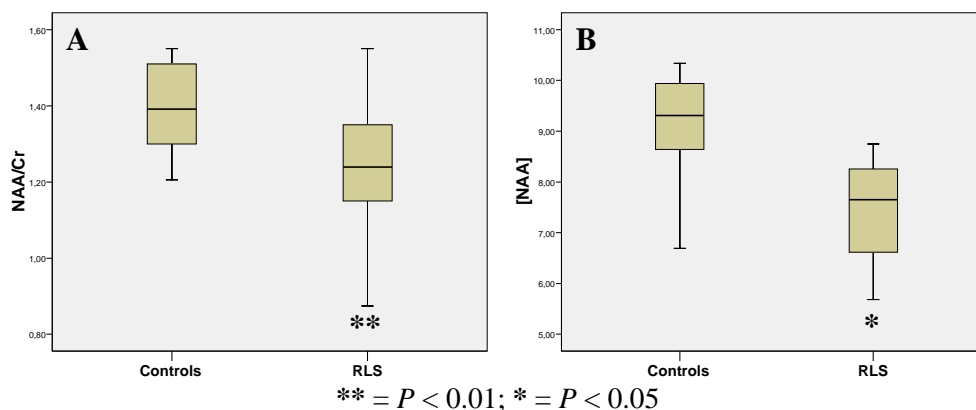
*Student T test (un valore di $P < 0.05$ corretto per comparazioni multiple è stato considerato significativo). NAA = N-acetil-aspartato; Cr = creatina-fosfocreatina; Cho = colina; mI = mio-inositolo.

Tabella 2. Risultati dello studio di DTI.

	Controlli (18)		Pazienti RLS (26)		<i>P</i>*
	Media	\pmDS	Media	\pmDS	
MD ($\times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{s}$)	0.78	0.03	0.78	0.05	n.s
FA	0.32	0.02	0.33	0.03	n.s

*Student T test (un valore di $P < 0.05$ corretto per comparazioni multiple è stato considerato significativo). MD: diffusività media. FA: anisotropia frazionale.

Figura 4. Box-plot dei dati di H^1 -MRS dei pazienti RLS e dei controlli. A: rapporti NAA/Cr; B: concentrazioni assolute di NAA



DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questi primi quattro mesi di studio suggeriscono la presenza di un coinvolgimento del sistema nocicettivo mediale, nello specifico di una sua struttura quale il talamo mediale, nella fisiopatologia della RLS idiopatica. L'aver evidenziato un'alterazione solo con lo studio di H^1 -MRS e non con quello di DTI depone per una disfunzione più che per un'alterazione strutturale di tipo degenerativo. La presenza di una disfunzione del SNM è in accordo con il fatto che i pazienti con RLS frequentemente descrivono i sintomi sensitivi come "dolorosi" [1], con l'iperalgia meccanica di tipo statico riscontrata in questi pazienti [2], con l'alterata captazione sia di traccianti per i recettori dopaminergici che per i recettori degli oppioidi a livello del sistema nocicettivo mediale evidenziata in pazienti RLS con studi PET [3,4] e con il riscontro autoptico di minori livelli di meta-enkefaline e beta-endorfine nel talamo di pazienti con RLS [5].

BIBLIOGRAFIA

- 1) Hornyak M, Sohr M, Busse M; 604 and 615 Study Groups. Evaluation of painful sensory symptoms in restless legs syndrome: experience from two clinical trials. *Sleep Med.* 2011 Feb;12(2):186-9.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) von Spiczak S, Whone AL, Hammers A, Asselin MC, Turkheimer F, Tings T, Happe S, Paulus W, Trenkwalder C, Brooks DJ. The role of opioids in restless legs syndrome: an $[11C]$ diprenorphine PET study. *Brain.* 2005 Apr;128(Pt 4):906-17.
- 5) Walters AS, Ondo WG, Zhu W, Le W. Does the endogenous opiate system play a role in the Restless Legs Syndrome? A pilot post-mortem study. *J Neurol Sci.* 2009 Apr 15;279(1-2):62-5.

È in corso la stesura del manoscritto riguardante questa prima parte dello studio. Stiamo continuando il reclutamento di altri pazienti per completare la restante parte del progetto.

Colgo l'occasione per porgere i miei saluti alla Commissione Scientifica della Fondazione Neureca che ringrazio per la fiducia accordatami.