



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

CORSO DI STUDIO IN BIOINGEGNERIA

Tesi di Laurea per il conseguimento del titolo di

Dottore Magistrale in Bioingegneria

**Implementazione ed ottimizzazione di una
procedura per l'acquisizione e l'analisi di
dati di spettroscopia a risonanza magnetica
per la rilevazione del GABA**

Matteo Cantelli

26/3/2024

Relatore: Prof.ssa Laura Bonzano

Relatore: Prof. Mauro Costagli

Correlatore: Dott.ssa Monica Biggio

INDICE

Abstract	4
Abstract (inglese)	5
Introduzione	6
Capitolo 1	8
1. Neurofisiologia e ruolo del GABA	8
1.1 Sistema nervoso centrale e periferico	8
1.2 Neuroni	9
1.3 Sinapsi	11
1.4 Neurotrasmettitori	13
1.4.1 GABA	14
Capitolo 2	17
2. Spettroscopia di risonanza magnetica	17
2.1 Spettroscopia (principi di funzionamento)	17
2.2 Principi della spettroscopia di Risonanza Magnetica	19
4.3.1 Gradienti di campo	22
2.3 Chemical shift	23
2.4 Soppressione dell'acqua	24
2.5 Metaboliti	24
2.6 Sequenze spettroscopia	27
2.3.1 PRESS	27
2.3.2 MEGAPRESS	29
Capitolo 3	31
3. Il GABA nelle patologie	31
3.1 Ruolo del GABA in diverse patologie del sistema nervoso	31
3.2 Parkinson	31
3.3 Schizofrenia	32

3.4 Disturbi dell'umore e dell'ansia	33
3.5 Alzheimer	34
3.6 Epilessia	35
3.7 Disturbi dello spettro autistico	36
3.8 Sclerosi multipla	37
3.9 Depressione	41
3.10 Apprendimento motorio	45
Capitolo 4	47
4. Materiali e metodi	47
4.1 Fantocci utilizzati negli esperimenti	47
4.1.1 Fantocci preparati	47
4.1.2 Spectre	49
4.2 Macchinario Siemens	51
4.2.1 Sequenza utilizzata	52
4.3 Files di spettroscopia	53
4.4 Software utilizzati	54
4.4.1 Gannet	54
4.4.2 Osprey	57
4.5 Basis set	59
Capitolo 5	61
5. Risultati	61
5.1 Water reference	61
5.2 Fantoccio_tampone	63
5.3 Fantoccio_GABA	65
5.4 Fantoccio_GABA+Glx	67
5.5 SPECTRE	68
5.5.1 Analisi dello SPECTRE con Gannet	68
5.5.2 Analisi dello SPECTRE con Osprey	72
Capitolo 6	73
6. Conclusioni	73
Ringraziamenti	75
Bibliografia	76

Abstract

La spettroscopia di Risonanza Magnetica (MRS) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla presenza e sulla concentrazione di metaboliti presenti nel cervello umano. L'acido γ -amminobutirrico (GABA) è il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale (SNC) ed è coinvolto in una pluralità di patologie del SNC. Misurare i livelli di GABA in-vivo è molto complicato poiché le sue concentrazioni nel cervello sono nell'ordine di 1-2 mM (millimolare) e il suo segnale sovrappone quello della creatina (Cr) e del n-acetil-aspartato (NAA) con MRS ad idrogeno a campo magnetico standard (1.5-3.0 T).

L'obiettivo di questa tesi è stato la progettazione, lo sviluppo e la verifica sperimentale di una metodologia basata su tecnologia di MRS a 3T al fine di meglio quantificare e controllare la concentrazione di GABA.

Sono stati analizzati quattro fantocci, tre preparati, contenenti pochi metaboliti, ed uno acquistato, lo SPECTRE, contenente i principali metaboliti rilevabili in aree cerebrali. I dati sono stati acquisiti utilizzando una sequenza di MRS sperimentale, la MEGAPRESS specifica per l'analisi del GABA. Le analisi sono state eseguite utilizzando software specifici per la MRS che funzionano su ambiente MATLAB, Gannet ed Osprey.

I software adoperati per l'analisi hanno presentato aspetti positivi e criticità.

Le analisi eseguite con Gannet sui fantocci preparati hanno avuto un esito positivo in quanto i modelli dei dati combaciavano con il modello teorico ed il rapporto tra le quantificazioni del GABA nei diversi fantocci rimaneva invariato rispetto al valore nominale. Per lo SPECTRE non è stato possibile rilevare la concentrazione di GABA.

Osprey è risultato migliore per l'analisi dei dati dello SPECTRE, ma non permette la quantificazione di GABA.

Abstract (inglese)

Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) is an instrumental analytical technique that allows detailed information to be obtained on the presence and concentration of metabolites present in the human brain. γ -aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter of the central nervous system (CNS) and is involved in a variety of CNS pathologies. Measuring GABA levels in-vivo is very complicated since its concentrations in the brain are in the order of 1-2 mM (millimolar) and its signals overlaps that of creatine (Cr) and n-acetyl-aspartate (NAA) with standard magnetic field hydrogen MRS (1.5-3.0 T).

The objective of this thesis was the design, development and experimental verification of a methodology based on 3T MRS technology in order to better quantify and control the concentration of GABA.

Four phantoms were analysed, three prepared, containing few metabolites, and one purchased, the SPECTRE, containing the main metabolites detectable in brain areas. The data were acquired using an experimental MRS sequence, the MEGAPRESS specific for the analysis of GABA. The analyses were performed using specific MRS software running on MATLAB environment, Gannet and Osprey.

The software used for the analysis presented positive and critical aspects.

The analyses performed with Gannet on the prepared phantoms had a positive outcome as the data models matched the theoretical model and the ratio between the GABA quantifications in the different phantoms remained unchanged compared to the nominal value. For SPECTRE it was not possible to detect the concentration of GABA.

Osprey was better for analysing SPECTRE data but does not allow quantification of the GABA.

Introduzione

L'obiettivo della mia tesi è la progettazione, lo sviluppo e la verifica sperimentale di una metodologia basata su tecnologia di spettroscopia a risonanza magnetica (3T) al fine di meglio quantificare e controllare la concentrazione di neurotrasmettitori coinvolti in una pluralità di patologie del Sistema Nervoso Centrale (SNC). La spettroscopia di Risonanza Magnetica (MRS) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla presenza e sulla concentrazione di metaboliti in maniera non invasiva (Valk, J., van der Knaap, 1989).

Il neurotrasmettitore sul quale questa tesi concentra la sua attenzione è l'**acido γ -amminobutirrico (GABA)**. Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale, periferico ed enterico (Chen et al., 2019). Nell'uomo, il GABA svolge una funzione inibitoria legandosi ai suoi recettori e questo legame causa un'apertura dei canali ionici che permettono il passaggio degli ioni-potassio fuori dalla cellula e l'ingresso, invece, degli ioni-cloruro. Quest'avvenimento causa uno spostamento negativo del potenziale di membrana con conseguente iperpolarizzazione e diminuzione dell'eccitabilità del neurone (Sarasa et al, 2020).

Il GABA promuove il metabolismo delle cellule cerebrali incrementando l'approvvigionamento di ossigeno. In aggiunta ai suoi effetti antidiuretici, antidepressivi ed antiossidanti, regola la secrezione dell'ormone della crescita ed abbassa la pressione sanguinea dilatando i vasi sanguinei. Funziona come un efficace antidolorifico, regola la funzione cardiovascolare ed è utilizzato come medicina per il trattamento dell'ictus (Ngo DH, Vo TS, 2019). È conosciuto per essere efficace nella regolazione di diverse patologie neurologiche come il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington e l'Alzheimer (Boecker H., 2013). Inoltre, il GABA stimola l'apoptosi delle cellule cancerogene e svolge un effetto inibitorio sulla loro proliferazione. È usato anche come un componente bioattivo nel cibo e nei prodotti farmaceutici (Sarasa et al., 2020). Cibi e prodotti farmaceutici contenenti GABA svolgono un effetto in grado di ridurre stress ed ansia e di migliorare il sonno. (Lapin I., 2001) (Boonstra et al, 2015).

Misurare i livelli del GABA in-vivo è molto complicato poiché le sue concentrazioni nel cervello di un uomo adulto sono nell'ordine di 1-2 mM (millimolare) e si sovrappone con i segnali ottenuti dalla creatina (Cr) e dal n-acetil-aspartato (NAA) (Song et al., 2020) con spettroscopia di risonanza magnetica ad idrogeno che utilizzano un campo magnetico di forza standard (1.5-3.0 T). Scanners con campi magnetici ultra-alti (7-9 T) permettono di aumentare la risoluzione spettrale e di misurare

le concentrazioni di GABA negli animali. Per gli studi sull'uomo vengono usati scanner clinici con campo magnetico a 3T.

Per la rilevazione delle concentrazioni di GABA sull'uomo si usano delle sequenze specifiche che danno maggior peso alla rilevazione di quel metabolita. Un'altra difficoltà nella rilevazione del GABA sull'uomo è causata dalla possibile contaminazione della misurazione da altre macromolecole (MM) che possono portare all'ottenimento di una quantificazione del GABA non ottimale che in letteratura viene identificato come GABA+ (Mikkelsen et al., 2017). Esistono metodi in grado di risolvere o ridurre questo problema ma a loro volta causano altri inconvenienti nella rilevazione del GABA.

La tesi è organizzata nei seguenti Capitoli:

- Capitolo 1. Neurofisiologia e ruolo del GABA: In questo capitolo verrà descritto il sistema nervoso ponendo l'attenzione sui neuroni, le sinapsi ed i neurotrasmettitori. Il GABA sarà il neurotrasmettitore, trattato più approfonditamente.
- Capitolo 2. Basi di spettroscopia RM: In questo capitolo verranno introdotti i principi di funzionamento della spettroscopia RM, elencati i principali metaboliti studiati in spettroscopia e verranno elencate alcune delle principali sequenze spettroscopiche.
- Capitolo 3. Ruolo del GABA in diverse patologie: in questo capitolo verranno elencate alcune patologie, i cui sintomi hanno a che fare con il GABA, descrivendo il loro quadro clinico e quale ruolo il GABA svolge nello sviluppo di tale patologia. Verranno dati maggiore risalto alla sclerosi multipla ed alla depressione.
- Capitolo 4. Materiali e metodi: in questo capitolo verranno presentati i materiali ed i metodi che sono stati utilizzati per la creazione di fantocci, per l'analisi sperimentali di essi e per l'elaborazione dei dati ottenuti dall'analisi in modo che gli esperimenti possano essere ricreati.
- Capitolo 5. Risultati: È il capitolo in cui vengono presentati e discussi i risultati sperimentali ottenuti.
- Capitolo 6. Conclusioni: Capitolo in cui saranno presenti i miei commenti personali sul progetto di tesi svolto.

Capitolo 1

1. Neurofisiologia e ruolo del GABA

1.1 Sistema nervoso centrale e periferico

Il Sistema nervoso si divide nel sistema nervoso centrale (SNC) e nel sistema nervoso periferico (SNP). Il sistema nervoso centrale è composto dal cervello e dal midollo spinale, mentre tutto il resto forma il sistema nervoso periferico. Lo scopo del midollo spinale è di inviare comandi motori dal cervello al corpo periferico così come di trasmettere informazioni sensoriali dagli organi sensoriali fino al cervello. (Thau L et al., 2022)

Il cervello ed il midollo spinale formano il SNC. Il sistema nervoso periferico consiste di tutto il tessuto nervoso che si trova al di fuori del SNC. Il sistema nervoso presenta delle suddivisioni.

Sistema nervoso somatico: I nervi sensoriali ed i nervi motori, conosciuti come nervi afferenti ed efferenti, comunicano con il SNC. I nervi motori comunicano solamente con i muscoli scheletrici e sono sotto controllo volontario. I nervi sensoriali portano le informazioni al cervello ed al midollo spinale dai recettori somatici che si trovano lungo tutto il corpo (Farley A et al., 2014).

Sistema nervoso autonomo: L'attività del sistema nervoso autonomo (SNA) non è sotto controllo cosciente o volontario. Lo SNA è diviso in due parti: la divisione simpatica e quella parasimpatica. Lo SNA regola la temperatura, la frequenza cardiaca, la pressione sanguinea ed il glucosio nel sangue (Farley A et al., 2014).

Sistema nervoso enterico: Un'altra suddivisione del sistema nervoso periferico è stata identificata ed è conosciuta con il nome di sistema nervoso enterico (SNE). Lo SNE è il sistema nervoso intrinseco del tratto gastrointestinale. È stato chiamato come "brain of the gut" (Tortora and Derrickson 2013) ed esercita il controllo locale della funzione gastrointestinale. (Farley A et al., 2014).

1.2 Neuroni

Il neurone o cellula nervosa, è l'unità funzionale del sistema nervoso. I neuroni hanno una conformazione particolare, con lunghi processi che escono dal corpo della cellula nervosa. Questi processi, di solito, vengono classificati o come dendriti, se ricevono segnali in arrivo, o come assoni, se trasportano informazioni in uscita. La forma, il numero e la lunghezza degli assoni e dei dendriti variano da un neurone all'altro, ma queste strutture sono una caratteristica fondamentale che permette ai neuroni di comunicare tra loro e con le altre cellule.

Il neurone può essere diviso in tre parti principali, riportate in Figura 1:

- Soma (corpo cellulare). Il corpo cellulare include il nucleo e tutti gli organi necessari al controllo dell'attività cellulare. In genere il corpo cellulare costituisce un decimo, o meno, del volume cellulare totale della cellula. Il nucleo del soma contiene il DNA.
- Dendriti. I dendriti sono lunghi processi ramificati che ricevono informazioni in entrata da cellule vicine. I neuroni più semplici hanno un unico dendrite mentre quelli più complessi ne hanno molti di più con ramificazioni molto complesse.
- Assone. Gli assoni trasportano l'informazione in uscita fino agli organi bersaglio. La maggior parte dei neuroni periferici ha un unico assone che origina in una regione specializzata del corpo cellulare, chiamata monticolo assonico. La loro lunghezza varia da pochi micrometri a più di un metro. Gli assoni hanno ramificazioni sparse per tutta la loro lunghezza formando ramificazioni collaterali. Ogni ramificazione laterale termina in un rigonfiamento chiamato terminale assonico. La funzione principale di un assone è trasmettere segnali elettrici in uscita dal centro di integrazione del neurone all'estremità dell'assone stesso.

La regione in cui un terminale assonico incontra una cellula bersaglio è chiamata sinapsi. Il neurone che trasmette il segnale è chiamato cellula presinaptica, mentre la cellula che riceve il segnale è detta cellula postsinaptica. Lo stretto spazio tra le due cellule si chiama fessura sinaptica (Silverthorn, "Human Physiology: An Integrated Approach", 6th edition, 2013).

STRUCTURE OF NEURON

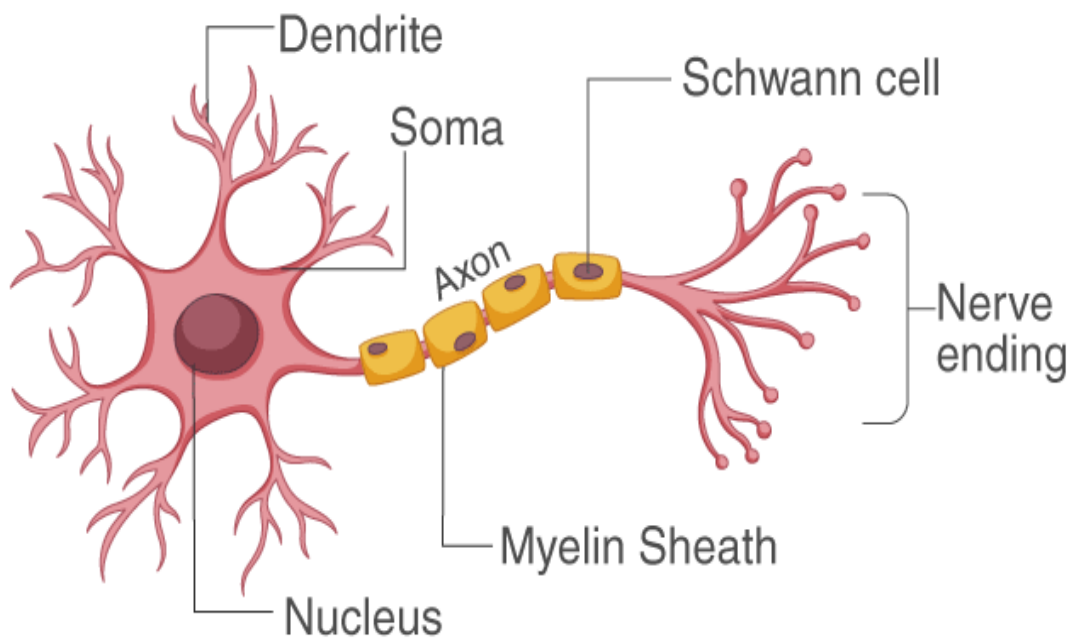


Figura 1 Struttura di un neurone (<https://byjus.com/biology/neurons/>)

1.3 Sinapsi

Le sinapsi sono giunzioni asimmetriche intracellulari che mediano rapide comunicazioni punto a punto tra i neuroni; perciò, li connettono portando a formazione di circuiti. Le sinapsi non solo trasferiscono informazioni da un neurone ad un altro ma li processano anche durante il trasferimento.

In un circuito neurale, le sinapsi trasferiscono rapidamente l'informazione tra i neuroni e durante il trasferimento stesso trasformano l'informazione. Le proprietà delle sinapsi sono modellate dalle interazioni tra i neuroni pre- e post-sinaptici.

Le sinapsi si dividono in due categorie, elettriche e chimiche.

Le sinapsi elettriche, invece, consistono in due membrane situate tra loro molto più vicine rispetto alle chimiche. Queste membrane possiedono canali formati da proteine chiamate "connessine", che permettono il passaggio diretto della corrente da un neurone all'altro e, quindi, non si basano sull'utilizzo dei neurotrasmettitori. Il ritardo sinaptico è molto più breve rispetto alla trasmissione chimica.

Le sinapsi chimiche sono differenziate da quelle elettriche da una serie di criteri identificativi; usano neurotrasmettitori per trasmettere l'informazione e sono utilizzate vescicole per raccogliere il neurotrasmettitore e trasportarlo al terminale. Il neurotrasmettitore viene rilasciato e va a legarsi ai recettori presenti sulla membrana postsinaptica. L'informazione viene trasmessa con un ritardo sinaptico, definito come il tempo necessario affinché la corrente del neurone presinaptico venga trasmessa al neurone postsinaptico, che è approssimativamente di 0.5-1.0 ms.

La trasmissione sinaptica per la trasmissione chimica è un processo che inizia con la sintesi del neurotrasmettitore e finisce con il suo rilascio.

- Sintesi: Il neurotrasmettitore è sintetizzato nel corpo cellulare e viene poi trasportato al terminale presinaptico oppure è sintetizzato direttamente nel terminale presinaptico da neurotrasmettitore riciclato. Il neurotrasmettitore viene poi immagazzinato nelle vescicole.
- Rilascio: Il neurotrasmettitore viene rilasciato in modo controllato dal terminale presinaptico alla fessura sinaptica.
- Attivazione del recettore: Il neurotrasmettitore si lega al recettore postsinaptico e produce una risposta nel neurone postsinaptico.
- Terminazione del segnale: Il segnale viene terminato dall'attivazione di qualche meccanismo, come la rimozione del neurotrasmettitore eccessivo dalla fessura sinaptica.

(Caire et al., 2023)

Tutte le sinapsi chimiche (rappresentate in figura 2) esibiscono la stessa struttura: un terminale presinaptico che confina con terminale postsinaptico, separati da una fessura sinaptica uniforme di 10-20 nm. La zona presinaptica è specializzata per il rilascio del neurotrasmettitore attivato da ioni di calcio (Ca^{2+}) mentre il terminale postsinaptico si occupa della ricezione di esso. Le “specializzazioni” presinaptiche sono solitamente formate dagli assoni ma possono anche essere assemblate dai dendriti. Le specializzazioni postsinaptiche sono formate principalmente dalle spine dendritiche (sinapsi eccitatorie) o dagli alberi dendriti ed il soma neurale (sinapsi inibitorie). Le sinapsi esibiscono diverse proprietà come il tipo di neurotrasmettitore, la probabilità di rilascio, la composizione del recettore postsinaptico e la presenza di recettori neuromodulatori. (Südhof TC et al., 2021)

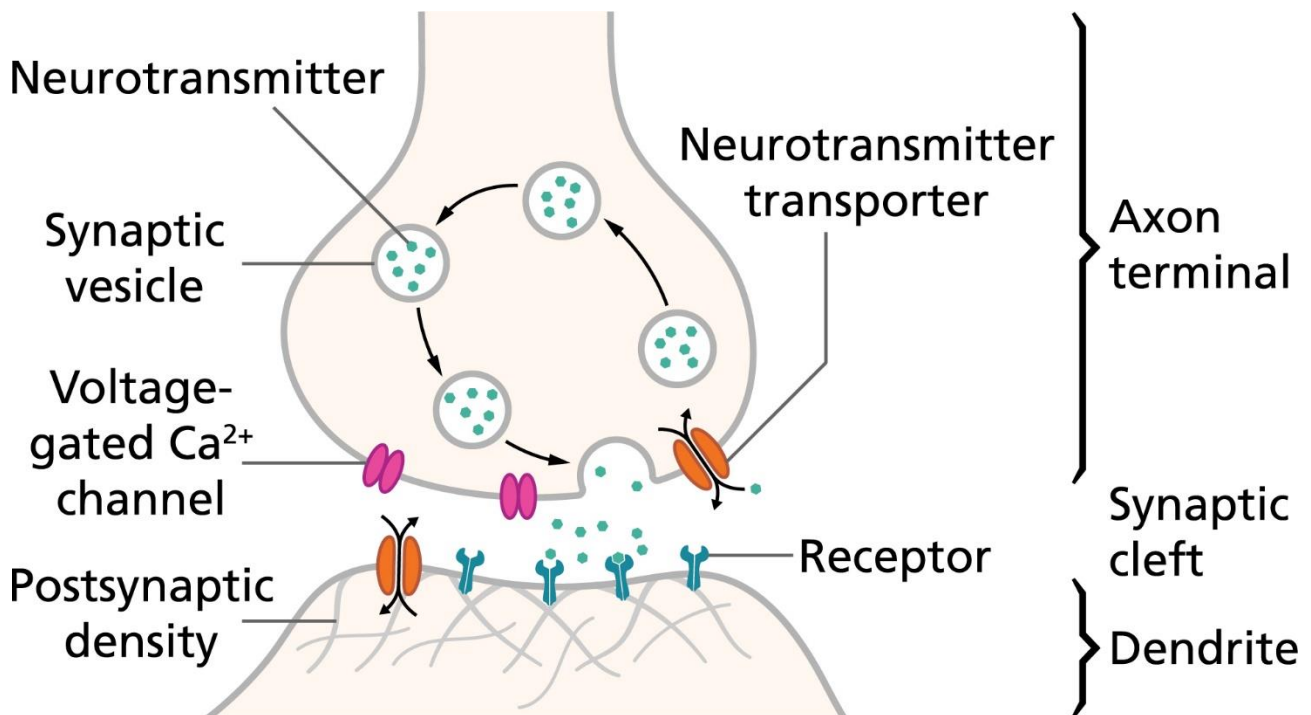


Figura 2 Rappresentazione di una sinapsi chimica. In figura viene illustrato il bottone terminale (o assonico), il rilascio del neurotrasmettitore e l'attivazione del recettore (immagine di Thomas Spletstoesser / CC BY-SA 4.0)

1.4 Neurotrasmettitori

Un neurotrasmettitore in un caso classico di trasmissione chimica è rilasciato da un neurone presinaptico e si lega ai recettori del neurone postsinaptico. L'informazione chimica è convertita dai recettori e dalle proteine associate in informazione elettrica dall'attivazione dei canali ionici. Nei casi più semplici, come i recettori del GABA, il canale è un componente intrinseco dello stesso recettore. A riposo, il potenziale di una cellula è negativo; regolando i canali ionici, il legame del neurotrasmettitore può attivare i flussi ionici attraverso la membrana. A seconda delle tipologie di canali attivati, possono entrare nella cellula particelle negative 'iperpolarizzanti' o cariche positive 'depolarizzanti'.

Per diversi neurotrasmettitori i recettori possono essere strutturalmente e funzionalmente distinti, quindi, oltre ad avere i recettori ligando dipendenti, alcuni di essi hanno anche recettori che sono accoppiati con proteine G. (Hyman SE, 2005)

I neurotrasmettitori possono essere suddivisi in tre categorie a seconda dell'azione che svolgono sulla cellula postsinaptica (Hyman SE, 2005):

- **Eccitatori** - I neurotrasmettitori eccitatori portano ad una depolarizzazione della cellula bersaglio, aumentando la possibilità di generare un potenziale d'azione, un evento di breve durata in cui l'energia di una cellula aumenta rapidamente per poi scendere, seguendo una traiettoria coerente. Alcuni neurotrasmettitori eccitatori sono il glutammato e l'epinefrina.
- **Inibitori** - I neurotrasmettitori inibitori inducono una iperpolarizzazione sulla cellula postsinaptica bersaglio, il che comporta una riduzione della probabilità di generare un potenziale d'azione. GABA, glicina e serotonina sono esempi di neurotrasmettitori con funzione inibitoria.
- **Modulatori** - I neurotrasmettitori modulatori influenzano l'effetto degli altri messaggeri chimici. Regolano come le cellule comunicano al sito sinaptico.

Sono conosciuti ad oggi almeno cento neurotrasmettitori diversi e si sospetta che ne esistano ancora molti altri da scoprire. Essi vengono raggruppati secondo la loro natura chimica. Questi neurotrasmettitori sono presenti per la maggior parte nelle funzioni del sistema nervoso.

Dei diversi neurotrasmettitori presenti si darà maggior importanza al GABA, è il neurotrasmettitore inibitorio più comune del sistema nervoso. Regola l'attività cerebrale per prevenire problemi di ansia, irritabilità, concentrazione, sonno, convulsioni e depressione e gioca un ruolo in diverse patologie neurologiche.

1.4.1 GABA

Il GABA fu scoperto per la prima volta nel 1950 ed è il principale neurotrasmettitore inibitorio della corteccia umana. È formato dalla alfa-decarbossilazione del glutammato dalla GAD (glutamic acid decarboxylase) e viene metabolizzato in succinato dalla progressiva azione della GABA-transaminasi (GABA-T) e della succinil-CoA sintetasi (SSADH). Si ritiene che l'attività della GAD sia la responsabile principale per regolare la concentrazione allo stato stazionario del GABA in vivo attraverso l'interconversione P5P (pyridoxal-5'-phosphate-dependent delle forme attive (holo-GAD) ed inattive (apo-GAD)). (Petroff, 2002)

La maggior parte del GABA è codificato dal gene GAD1. Una disfunzione nel gene GAD1 causa uno squilibrio dei neurotrasmettitori inibitori e stimolanti. La molecola è formata come uno zwitterione (il gruppo carbossile deprotonato ed il gruppo amminico protonato). La conformazionale struttura del GABA è cruciale per le sue funzioni biologiche per via del suo legarsi a diversi recettori di diverse conformazioni. Diversi analoghi del GABA con strutture più rigide sono stati sviluppati farmaceuticamente per poter controllare il loro legarsi ai loro rispettivi recettori più efficacemente. (Akyuz et al., 2020)

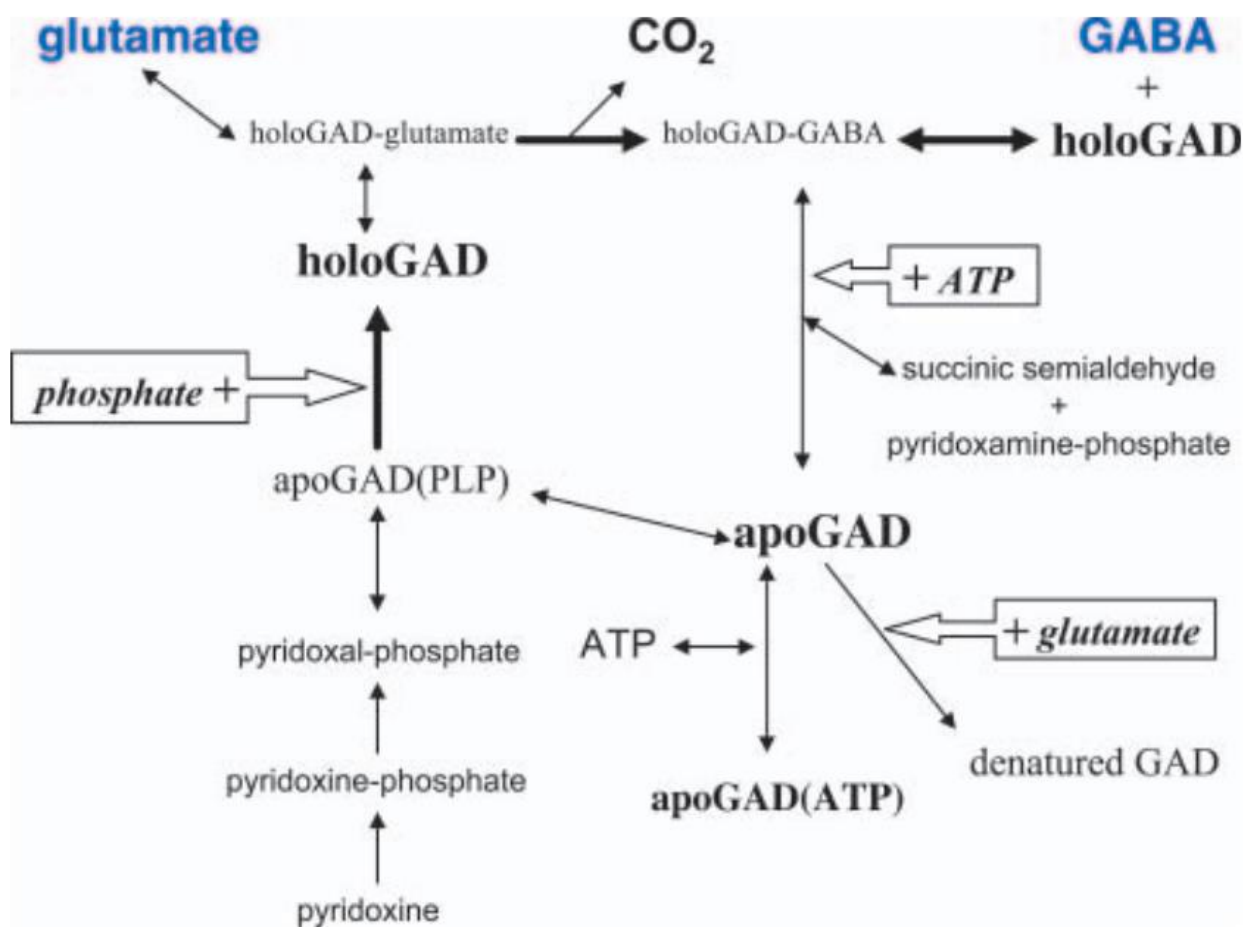


Figura 3 Schema della regolazione della sintesi del GABA. ATP = adenosina trifosfato; PLP = fosfato piridossale; CO₂ = diossido di carbonio; holoGAD = holo-enzima (attivo) isoforma della decarbossilasi dell'acido glutammico; apoGAD apo-enzima (inattivo) isoforma decarbossilasi dell'acido glutammico (Petroff, 2002)

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio rilasciato dai neuroni per inviare l'informazione ad un altro. È immagazzinato in sacche membranose, chiamate vescicole, situate nella parte terminale dell'assone. Ogni vescicola contiene migliaia di molecole di GABA. Per rilasciare il GABA la vescicola si fonde con la membrana presinaptica e poi viene rilasciato attraverso esocitosi, successivamente si riversa nello spazio sinaptico e da lì si diffonde al neurone postsinaptico. Dopo aver finito di svolgere la sua azione, la maggior parte del GABA è riassorbita dalla fessura sinaptica e riusata dal GAT (trasportatori di GABA). Il GAT si divide in 4 tipi: GAT1, GAT2, GAT3 e betaine-GABA transporter. GAT1 e GAT3 sono i principali tipi di trasportatori presenti nel cervello e regolano l'equilibrio del GABA. Il GAT1 è principalmente importante nei neuroni e può anche trasportare inversamente il GABA fuori dai neuroni con meccanismi non ancora certi. Il GAT3 si trova principalmente nelle cellule gliali. (Chen et al., 2019)

Nell'uomo, il GABA svolge una funzione inibitoria legandosi ai suoi recettori e questo legame causa un'apertura dei canali ionici che permettono il passaggio degli ioni-potassio fuori dalla cellula e l'ingresso, invece, degli ioni-cloruro. Quest'avvenimento causa uno spostamento negativo del potenziale di membrana con conseguente iperpolarizzazione e diminuzione dell'eccitabilità del neurone. Il GABA rilasciato che non si è legato a nessun recettore viene degradato da enzimi presenti nello spazio sinaptico o riassorbito nel terminale presinaptico.

Il GABA possiede tre diversi recettori divisi in recettori alpha (GABA-A), beta (GABA-B) e gamma (GABA-C). I recettori GABA-A e GABA-C sono canali ionici ligando-dipendenti mentre i recettori GABA-B sono accoppiati con le proteine-G. I GABA-A mediano una trasmissione sinaptica veloce, di circa 10ms (ionotropici), mentre i GABA-B mediano una trasmissione lenta, sui 100ms (metabotropici). I primi sono associati con convulsioni, ansia e panico mentre i secondi sono associati alla memoria, all'umore ed al dolore. Sebbene i recettori GABA-C siano stati riconosciuti, la loro importanza fisiologica non è ancora stata definita. Alcuni recettori ionotropici del GABA erano inizialmente identificati come recettori GABA-C, adesso sono identificati come un sottoinsieme dei recettori GABA-A. Il GABA ha importanti effetti sulla salute. Il GABA promuove il metabolismo delle cellule cerebrali aumentando la fornitura di ossigeno, attivando il flusso ematico cerebrale ed inibisce la secrezione di vasopressina agendo sul centro vasomotore del midollo allungato. Oltre ad avere effetti diuretici, anti depressivi ed antiossidanti, regola la secrezione dell'ormone della crescita, riduce la pressione sanguinea attraverso l'espansione dei vasi sanguigni. Funziona come un effettivo antidolorifico, regola la funzione cardiovascolare ed è usato in medicina per il trattamento dello stroke. Il GABA è conosciuto per essere efficace nella regolazione di diverse patologie neurologiche come il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington e l'Alzheimer. Inoltre, il GABA stimola l'apoptosi delle cellule cancerogene e svolge un effetto inibitorio sulla loro proliferazione. È usato anche come un componente bioattivo nel cibo e nei prodotti farmaceutici (Sarasa et al., 2020).

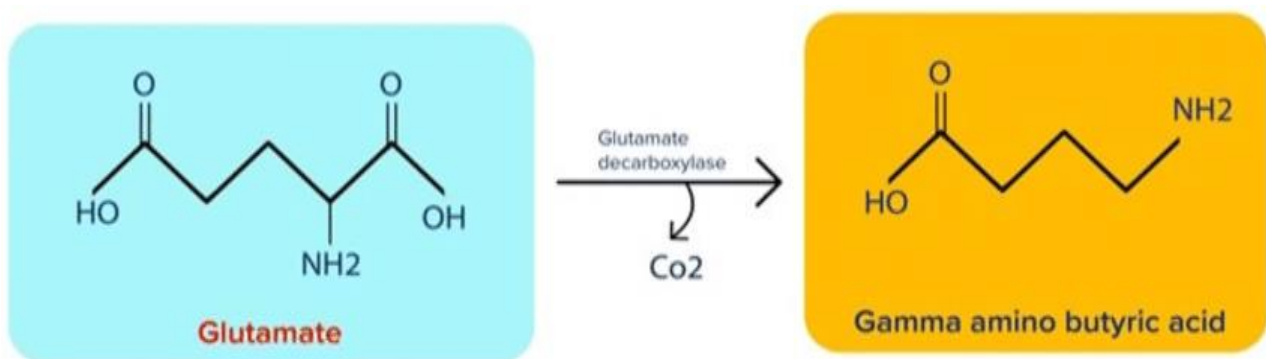


Figura 4 Decarbossilazione del glutammato in GABA attraverso la glutammato-decarbossilasi (Sarasa et al., 2020)

Capitolo 2

2. Spettroscopia di risonanza magnetica

Lo scopo di questa tesi è studiare il GABA con tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) che permette di individuare i livelli di alcuni metaboliti in specifiche strutture anatomiche senza causare nessun rischio per il paziente e che verranno illustrate in questo capitolo.

2.1 Spettroscopia (principi di funzionamento)

La MRS è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla presenza e sulla concentrazione di metaboliti.

Per comprendere la MRS bisogna prima comprendere i principi della risonanza magnetica (MR). Il fenomeno della MR è l'assorbimento fisico e la re-emissione di radiazione elettromagnetica, che avviene nel range delle radiofrequenze, ed è una proprietà della natura magnetica di alcuni particolari nuclei atomici e dell'intensità del campo magnetico applicato. È una caratteristica di tutti i nuclei che contengono un numero dispari di protoni e/o neutroni di possedere un momento magnetico intrinseco ed un momento angolare. (Rhodes CJ, 2017)

La MRS integra l'MR come metodo non invasivo per la caratterizzazione dei tessuti. Mentre nell'imaging MR (MRI) si utilizza il segnale dei protoni d'idrogeno per formare immagini anatomiche, la MRS a protoni utilizza quest'informazione per determinare la concentrazione di diversi metaboliti presenti nel cervello. Il principale utilizzo clinico della MRS, sebbene possa teoricamente essere utilizzata per qualsiasi tessuto del corpo umano, è nella valutazione di patologie neurali del sistema nervoso centrale (Gujar et al., 2005). Infatti, i cambiamenti metabolici associati con tumori (ad es. cervello, seno e prostata), epilessia, ictus, disturbi convulsivi, malattia

dell'Alzheimer, malattia di Parkinson, corea di Huntington, tubercolosi ipofisaria, depressione ed altre malattie neurologiche possono essere rilevati utilizzando la MRS. (Rhodes CJ, 2017)

La MRS permette la caratterizzazione non invasiva di cambiamenti chimici-patologici nel cervello. MRS ha prodotto prove di patologie e riparazioni chimiche che hanno riguardato cellule del cervello non neurali basate sul cambiamento dei metaboliti, che includono la colina, il myo-inositolo, il glutammato ed il GABA.

La MRS ha il potenziale di caratterizzare la patologia chimica delle lesioni e delle regioni del cervello che non sono associate con evidenti anomalie strutturali su MRI convenzionale. Queste informazioni sono state usate per migliorare le diagnosi, per meglio definire la storia del processo di una malattia e, in alcuni studi, per monitorare la risposta metabolica alla terapia.

A contrario della MRI, che fornisce informazioni strutturali basate sul segnale ottenuto dall'acqua, l'MRS è in grado di registrare segnali dai metaboliti, che sono presenti nei tessuti a concentrazioni molto minori. L'informazione nello spettro MR è identificata principalmente dalla posizione dei picchi relativi a ciascun metabolita sull'asse delle frequenze (posizione nello spettro) e dalla loro ampiezza. L'intensità del segnale di ogni risonanza è determinata dall'area sottesa dal picco ed è in funzione del numero dei nuclei che contribuiscono al picco in qualsiasi elemento di volume (voxel) del tessuto. Il voxel (volumetric picture element) è un'unità di misura del volume, è la controparte tridimensionale del pixel. L'intensità del segnale e l'area sottesa da ciascun picco, quindi, è proporzionale alla concentrazione del metabolita nel voxel d'esame.

2.2 Principi della spettroscopia di Risonanza Magnetica

La MRS si basa sull'interazione dei momenti magnetici dei nuclei di vari atomi con i campi magnetici. Il momento magnetico di un nucleo è associato con uno spin nucleare, che è una forma di momento angolare posseduta da questi nuclei. Il valore dello spin nucleare è definito da un numero di spin. Il momento magnetico nucleare dipende dalle proprietà del nucleo e dal suo numero di spin. I nuclei di un numero pari di protoni e neutroni hanno spin e momento magnetico nullo, mentre tra i nuclei con un numero dispari di protoni o neutroni, alcuni nuclei, come ^1H , ^{31}P , ^{13}C o ^{15}N hanno un numero di spin di $\frac{1}{2}$, che è favorevole per le applicazioni pratiche di risonanza magnetica. Se lo stato di spin di questi nuclei viene misurato nel campo magnetico, due diversi stati vengono osservati che corrispondono ai numeri magnetici di $\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. Uno di questi stati corrisponde alla direzione parallela dei nuclei paralleli al campo magnetico mentre l'altro corrisponde a quella antiparallela. Questi due stati possiedono diversa energia.

Inseriti in un campo magnetico statico, i nuclei con momento magnetico diverso da zero, tendono ad assumere la direzione di minore energia. Questo orientamento dei momenti magnetici dei nuclei in un campo magnetico statico \mathbf{B}_0 da origine ad una magnetizzazione macroscopica \mathbf{M} che è un vettore somma dei momenti magnetici individuali. All'equilibrio, il vettore di magnetizzazione \mathbf{M}_0 è allineato alla direzione del campo magnetico statico.

L'interazione dei campi magnetici con la magnetizzazione può essere descritta da:

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = -\gamma \mathbf{M} \times \mathbf{B} = -\mathbf{M} \times \boldsymbol{\omega}$$

dove γ è la costante giromagnetica, che è definita come il rapporto del momento magnetico nucleare con il suo momento angolare. Se la magnetizzazione è allineata con il campo magnetico \mathbf{B} , il prodotto vettoriale $\mathbf{M} \times \mathbf{B}$ è uguale a 0 e \mathbf{M} è statico. Se, invece, non sono paralleli, la magnetizzazione precessa intorno alla direzione \mathbf{B}_0 con una frequenza angolare ω ($\omega = 2\pi\nu$, dove ν è la frequenza misurata in Hz) che è chiamata frequenza di Larmor. Nel caso del protone, la costante giromagnetica ha un valore di 42.5756 MHz/T, pertanto la frequenza di Larmor su un sistema di risonanza magnetica operante a 3T è di circa 128 MHz.

La magnetizzazione \mathbf{M} può essere rilevata solamente se non è parallela al campo statico. Per misurarla, perciò, bisogna spostarla dalla direzione parallela al campo magnetico. Si utilizza il

concetto di risonanza. Un impulso di radio frequenza (RF) esattamente alla stessa frequenza di risonanza del nucleo di interesse (ad esempio del protone) può produrre un campo magnetico \mathbf{B}_1 di basso valore di asse perpendicolare a \mathbf{B}_0 in grado di far ruotare il vettore di magnetizzazione. L'ampiezza del campo \mathbf{B}_1 è molto minore rispetto a quella del campo \mathbf{B}_0 .

Attivando \mathbf{B}_1 per diversi millisecondi, M si inclina verso il piano xy . Dopo l'impulso RF la magnetizzazione precessa intorno a \mathbf{B}_0 e induce una forza elettromotrice decadente nella bobina, che è chiamata segnale FID (Free Induction Decay) o segnale NMR. L'impulso RF può ruotare la magnetizzazione di un angolo arbitrario, se l'impulso fa ruotare il vettore dall'equilibrio di un angolo minore di 90° viene detto impulso di eccitazione, se invece è di 180° è chiamato impulso di inversione.

Se l'impulso RF contiene una banda di frequenze centrate attorno alla frequenza di risonanza, esso può spostare la magnetizzazione in un range frequenza di diverse centinaia o migliaia di Hz attorno alla frequenza di risonanza del protone. Questa proprietà è utile per misurare lo spettro MR di molecole complesse che contengono numerosi picchi differenti.

La magnetizzazione dopo un impulso RF non si trova più all'equilibrio poiché la componente parallela al campo magnetico è ridotta ed è presente una componente non nulla della magnetizzazione nel piano perpendicolare alla direzione del campo magnetico statico. La componente di precessione nel piano trasversale decade nel tempo a causa delle interazioni dei momenti magnetici individuali con i campi magnetici locali a livello molecolare. Queste interazioni portano ad una perdita di coerenza (sfasamento) delle componenti della magnetizzazione trasversale. Il decadimento della componente trasversale è chiamato rilassamento trasversale o rilassamento spin-spin. Questo decadimento è in prima approssimazione esponenziale e la sua costante di tempo è chiamata tempo di rilassamento trasversale T_2 . Nella pratica, però, la magnetizzazione trasversale decade con una costante di tempo minore rispetto a T_2 , questo è causato dalle disomogeneità del campo magnetico statico \mathbf{B}_0 . La costante di tempo reale con cui decade il segnale MR è denominata T_2^* .

Dopo l'applicazione di un impulso, la componente della magnetizzazione parallela a \mathbf{B}_0 è ridotta o rimossa ed inizia a recuperare il suo stato di equilibrio. Questo procedimento è chiamato rilassamento longitudinale o rilassamento spin-lattice. È presente di nuovo un andamento esponenziale con la costante di tempo T_1 che è chiamata tempo di rilassamento longitudinale/spin-reticolo. (Mlynárik V, 2016).

La sequenza Spin-Echo (SE) è una sequenza dove un impulso di eccitazione di 90° è seguito da impulso di rifocalizzazione di 180° (American college of radiology, ACR). Di seguito la formula della sequenza SE.

Spin-Echo:

$$S = k \rho (1 - \exp(-TR/T1)) \exp(-TE/T2).$$

Con S ampiezza del segnale e k è una costante di proporzionalità che dipende dalla sensibilità circuitale del ricevitore.

Con tempo di echo (TE) si definisce il tempo dal centro dell'impulso RF al centro dell'eco ("American College of Radiology", ACR) ed è misurato in millisecondi. L'ammontare di rilassamento di T2 è controllato dal TE.

Il tempo di ripetizione (TR) è il tempo che intercorre tra l'applicazione di un impulso di eccitazione e l'applicazione del successivo impulso (ACR).

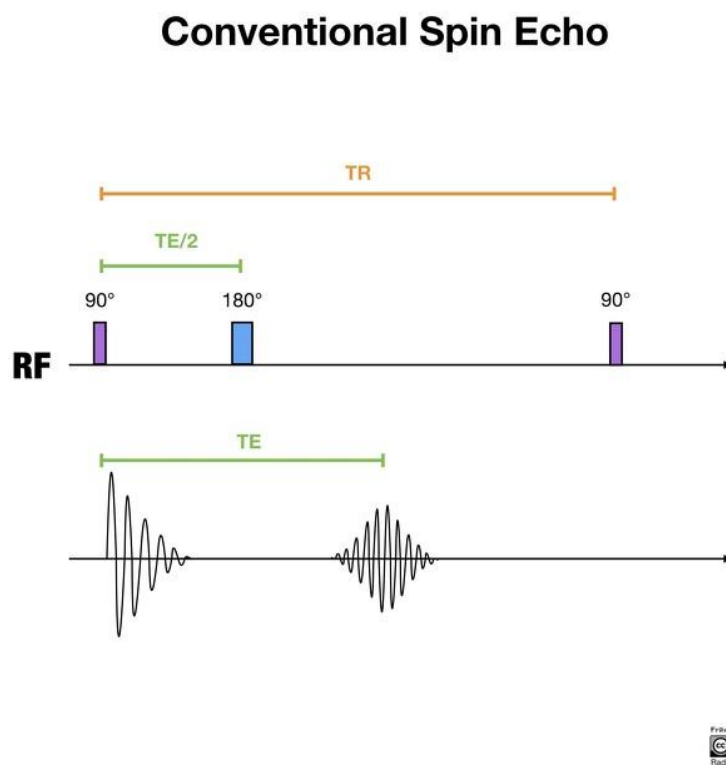


Figura 5 La figura mostra una sequenza SE dove si possono vedere il TE ed il TR ([Spin echo sequences / Radiology Reference Article / Radiopaedia.org](https://radiopaedia.org/articles/spin-echo-sequences))

2.2.1 Gradienti di campo

Per ottenere uno spettro MR da una specifica regione vengono utilizzati gradienti di campo magnetico. Sono prodotti da correnti elettriche generate da bobine ausiliare posizionate intorno al magnete principale in modo tale che il campo magnetico vari lungo ciascuno degli assi del magnete; come risultato anche la frequenza dei nuclei lungo dato asse varierà linearmente. Se un impulso RF, in grado di eccitare un certo range di frequenze, è applicato in presenza di un gradiente di campo, solamente una fetta (slice) dell'oggetto in esame sarà eccitato mentre tutte le altre rimarranno all'equilibrio. L'utilizzo di un impulso RF insieme ad un gradiente di campo magnetico è chiamato impulso di selezione della fetta. L'impiego di gradienti di campo lungo tutte e tre le dimensioni consente di ottenere il segnale RM da uno specifico volume di interesse (VOI) (MlynárikV, 2016).

2.3 Chemical shift

Nuclei delle stesse specie, come per esempio ^1H , in una molecola possono avere frequenze di risonanza leggermente diverse. Queste differenze sono causate dagli elettroni che circondano i nuclei. In un campo magnetico statico, il movimento degli elettroni genera campi magnetici orientati in modo opposto rispetto al campo esterno, riducendo quindi il campo magnetico dei nuclei. L'effetto di schermatura degli elettroni, che riduce la frequenza di risonanza del nucleo, varia con il suo ambiente chimico ed è quindi caratteristica per specifiche strutturali di parti di composti organici. Siccome l'effetto di schermatura è proporzionale a \mathbf{B}_0 , un parametro indipendente dal campo, chiamato spostamento chimico è stato introdotto. È indicato da δ che è definita come:

$$\delta = \frac{(v - v_{ref})}{v_{ref}}$$

I valori di δ sono espressi in **ppm** (parti per milione) dove v è la frequenza di risonanza (misurata in Hz) del composto misurato e v_{ref} è la frequenza di un composto di riferimento misurato nello stesso campo magnetico statico. Per convenzione è solitamente usata la frequenza di risonanza del **TMS** (tetrametilsilano). (Mlynárik V, 2017)

Lo spettro ottenuto è un grafico che ha sull'asse delle ascisse la posizione del picco (misurato solitamente in ppm), mentre sull'asse delle ordinate è presente l'intensità del segnale, che è strettamente legata alla concentrazione del metabolita preso in esame.

Lo spostamento chimico assoluto risulta tanto maggiore quanto più grande è il campo applicato; quindi, strumenti operanti a campi magnetici diversi fornirebbero spostamenti chimici assoluti diversi in rapporto all'intensità del loro campo magnetico. Per questo si preferisce utilizzare lo spostamento chimico relativo (parametro adimensionale).

I risultati ottenuti con MRS sono visualizzati come uno spettro di risonanze (picchi) distribuiti lungo l'asse X (frequenze), con ppm come unità di misura. Nell'asse Y vengono misurate le ampiezze dei picchi di risonanza utilizzando una scala arbitraria.

2.4 Soppressione dell'acqua

La concentrazione dell'acqua supera la concentrazione dei metaboliti d'interesse di oltre quattro ordini di grandezza. Questo significa che la risonanza dominante (picco di risonanza) in uno spettro dell'idrogeno rappresenterà i protoni della molecola d'acqua, superando nettamente le concentrazioni millimolari degli altri metaboliti. La soppressione del segnale dell'acqua al fine di visualizzare il contributo di metaboliti, perciò, diventa un passo necessario della MRS, ottenuta aggiungendo impulsi di soppressione.

Tecniche comuni di spettroscopia includono la spettroscopia a voxel singolo (SVS) e la tecnica a voxel multipli, chiamata anche “chemical shift imaging” (CSI) o imaging di spettroscopia a risonanza magnetica (MRSI). La tecnica SVS permette l'acquisizione di segnale proveniente da una specifica parte di volume. Tecniche CSI permettono l'acquisizione di più voxel multipli ma richiede tempi più lunghi di acquisizione e di post processing (Gujar et al., 2005). In questo elaborato ci limiteremo ad illustrare il caso della SVS.

La maggior parte delle tecniche di soppressione dell'acqua si basano sul differente chemical shift tra il segnale dei metaboliti e quello dell'acqua. Metodi come il VAPOR applicano impulsi di pre-saturazione frequenza-selettivi in congiunzione con “crusher gradients” per sfasare e di conseguenza sopprimere il segnale dell'acqua lasciando inalterate le magnetizzazioni dei metaboliti. Ad oggi è la tecnica più comune di soppressione dell'acqua per MRS a voxel singolo. (Chan et al., 2018)

2.5 Metaboliti

Le concentrazioni di metaboliti possono essere espresse sia come rapporti tra esse sia in concentrazioni assolute. I rapporti possono essere utili per le diagnosi cliniche per caratterizzare tessuti patologici. La quantificazione relativa è stata applicata con successo per la diagnosi di cancro, epilessia, leucemia, demenza e sclerosi multipla.

Nella MRS i principali metaboliti che possono essere analizzati nel tessuto cerebrale e che danno informazioni sul suo stato se sia sano o patologico sono i composti che verranno elencati di seguito (Williamson et al, 2021):

N-acetyl aspartato (NAA) (frequenza di risonanza = 2,02 ppm). La sua presenza in normali condizioni indica integrità neurale ed assonale, ridotti livelli di NAA, invece, indicano perdita o danneggiamento di tessuto neurale e può essere causato da diversi tipi di danni cerebrali.

Creatina e fosfocreatina (Cr/PCr) (picco a 3.0 ppm). Composti che sono coinvolti nel metabolismo energetico. La riduzione di creatina insieme ad altri metaboliti indica morte tissutale o maggiore morte cellulare come causato da malattie, infortunio od insufficiente apporto di sangue. In contrasto, alte concentrazioni di creatina possono essere a causa di un trauma craniocerebrale.

Composti della colina (Cho). Picco principale a 3.2 ppm. Alti livelli di questi composti indicano un incremento della produzione cellulare o una rottura della membrana e può essere a causa della demielinizzazione o della presenza di tumori maligni.

Mio-inositolo (ml) (picco principale a 3.56 ppm). Concentrazioni aumentate di mio-inositolo sono state riscontrate in pazienti affetti da Alzheimer, HIV e demenza.

Lattato (Lac) (picco di risonanza a 1.33 ppm). Il lattato presenta due accoppiamenti deboli nella MRS: un doppietto. L'accoppiamento scalare da origine ad un'evoluzione della fase del doppietto, che dipende dal TE utilizzato. Con TE = 144ms, la risonanza mostra una fase di 180° che porta ad un doppietto in fase negativo, mentre utilizzando TE = 288ms si ottiene un doppietto in fase positivo. Poiché solamente risonanze in fase possono essere quantificate, è preferibile utilizzare TE di 144ms e 288ms per il suo rilevamento (Lange T. et al., 2006). La concentrazione di lattato è normalmente non visibile poiché la sua concentrazione è inferiore ai limiti di rilevamento ma quando viene rilevato è indicata la presenza di glicolisi poiché è stata iniziata in un ambiente mancante ossigeno. Alcune delle cause che possono spiegare questo sono ischemia, ipossia, disordini mitocondriali ed alcuni tipi di tumori.

Lipidi liberi (Lip) (frequenza di risonanza nella regione 0.9-1.5 ppm). Un incremento di lipidi del cervello è un indicatore aggiuntivo di necrosi. Siccome concentrazioni di lipidi sono presenti anche in tessuti biologici come nel grasso del cuoio capelluto e nell'area tra il cuoio capelluto ed il cranio, è possibile ottenere false indicazioni da uno spettro di risonanza magnetica.

Glutammina (GLN). Il picco si presenta con aspetto "multiplo" situato tra 2 e 2,5 ppm.

Glutammato (GLU). Presenta il picco in concomitanza con la Glutammina. Cambiamenti delle loro concentrazioni sono coinvolti in una grande varietà di patologie neurologiche

Acido gamma-ammino butirrico (Gaba). Il GABA è difficile da misurare utilizzando la spettroscopia di risonanza magnetica (MRS). I suoi piccoli picchi spettrali accoppiati vengono sovrapposti da risonanze molto più intense come quelle prodotto dalle concentrazioni di NAA, Cr, Glu e Gln. Metodi sono stati progettati per rimuovere questi altri segnali.

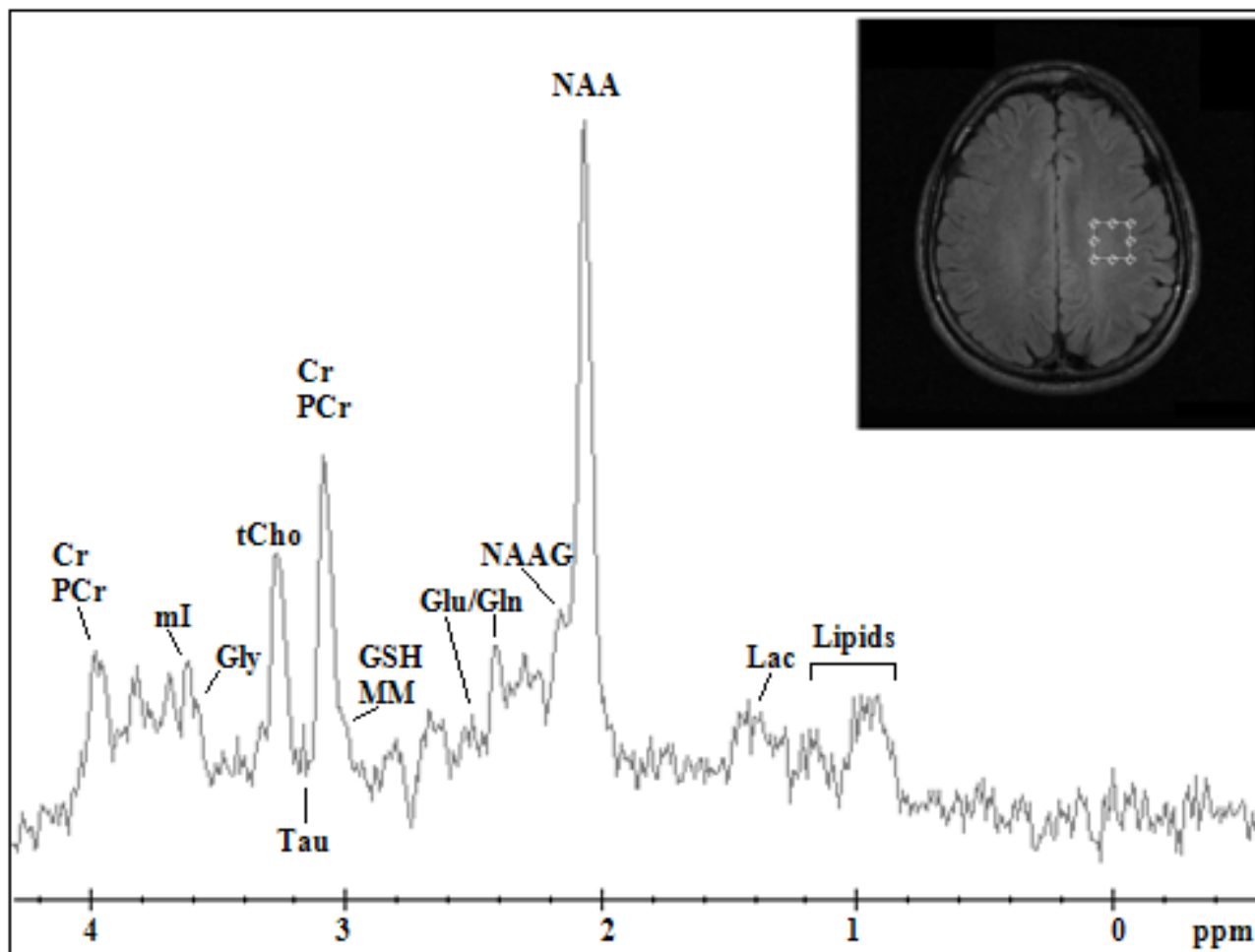


Figura 6 Spettro di alcuni dei principali metaboliti, rilevati nella sostanza bianca parietale misurati a 3T in un cervello sano di un volontario di 19 anni (Kousi et al., 2013)

Misurare i livelli del GABA in-vivo è molto complicato poiché le sue concentrazioni nel cervello di un uomo adulto sono nell'ordine di 1-2 mM (milli molare) e sono sovrapposte dai segnali ottenuti dalla creatina con picco a 3 ppm e dal NAA con picco a 2.2 e 1.9 ppm (Song et al., 2020) rendendone l'analisi con spettroscopia di risonanza magnetica ad idrogeno con campo magnetico di forza a 1.5 T impossibile. È necessario almeno un campo magnetico statico di 3T.

2.6 Sequenze di spettroscopia

Esistono diverse sequenze di spettroscopia che possono essere già testate e pronte per l'utilizzo sull'uomo o ancora sperimentali. In seguito, si parlerà solo di sequenze di spettroscopia SVS e le sequenze citate saranno la "point resolved spectroscopy" (PRESS) e la sua variante, utilizzata quasi esclusivamente per lo studio del metabolita GABA, la sequenza chiamata MEGAPRESS.

2.6.1 PRESS

La PRESS è una delle principali sequenze utilizzate per la spettroscopia single voxel (SVS).

La sequenza PRESS si basa su un treno di echi 90° - 180° - 90° e permette di raccogliere un segnale SE. Ad ognuno dei tre impulsi è associato un gradiente secondo ogni asse la cui applicazione consente la selezione del volume di interesse (VOI), cioè di una piccola regione localizzata dove poter quantificare le concentrazioni di metaboliti all'interno di suddetta regione. Il segnale SE prodotto dalla combinazione dei due primi impulsi a 90° e 180° non viene misurato e soltanto l'ultimo echo, che corrisponde alla misura ottenuta dall'intersezione dei tre assi, viene raccolto e campionato.

Per evitare che il segnale possa essere contaminato da contributi non appartenenti al VOI, vengono applicati altri gradienti (chiamati "gradienti di spoiler") nella sequenza di PRESS. L'effetto di questi gradienti diventa nullo per tutti i nuclei che sono sottoposti da tutti e tre gli impulsi RF (i nuclei all'interno del VOI), mentre fuori dal VOI causano un effetto di sfasamento della magnetizzazione indesiderata (Klose U., 2008).

La sequenza PRESS viene adoperata generalmente impiegando tempi di echo lunghi (135 o 270 ms) ma può anche permettere l'utilizzo di un TE più breve (30 ms). Lo spettro ottenuto è facile da analizzare; solo i segnali ottenuti da NAA, creatina, choline contribuiscono al segnale, e tutti questi metaboliti sono chiaramente separati. A causa degli effetti di accoppiamento, il segnale del lattato è un doppietto ed ha ampiezza negativa a TE = 144 ms, il quale rende facile il riconoscimento del metabolita. Se si adoperano TE più brevi si possono ottenere altre informazioni poiché nello spettro saranno visibili altri metaboliti come il glutammato e la glutammina. Per via degli effetti di accoppiamento, questi segnali avvengono come multipletti (Klose U., 2008).

Poiché la PRESS viene utilizzata con TE troppo lunghi per poter visualizzare il GABA, si preferisce utilizzare la sequenza MEGAPRESS, la quale rapidamente è diventata lo standard di riferimento.

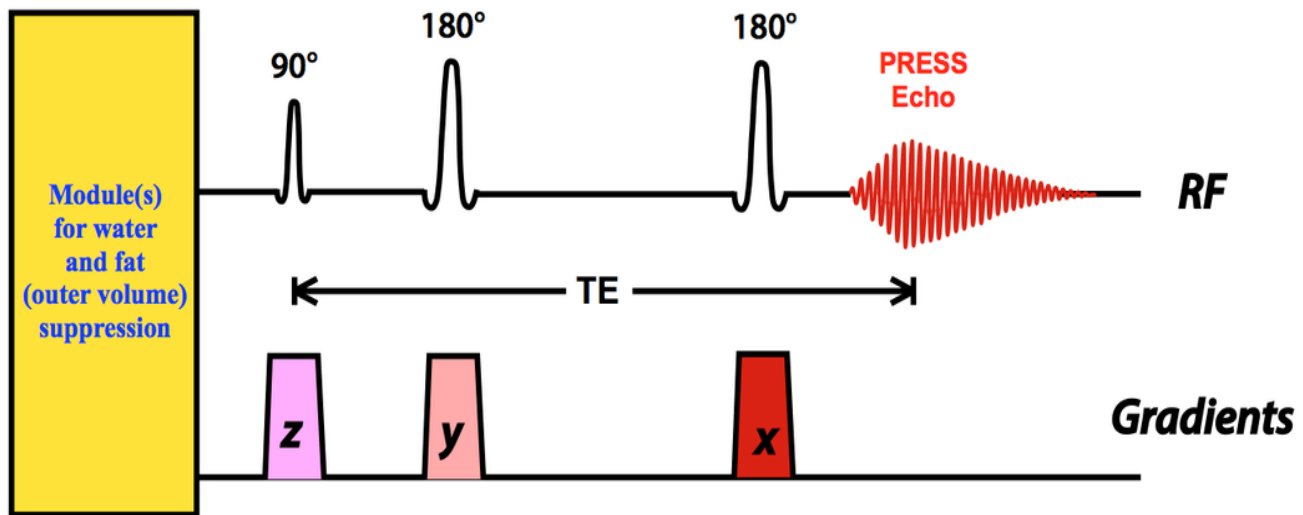


Figura 7 Diagramma semplificato della sequenza PRESS SVS per MRS (<https://mriquestions.com/press.html>)

2.6.2 MEGAPRESS

Il GABA è presente nello spettro MR ma a causa della sua concentrazione minore e dei pattern di picco abbondanti, il suo segnale è difficile da separare con costanza da metaboliti presenti in quantità maggiore come la creatina, soprattutto se si lavora con i campi di forza adoperati solitamente negli scanner di MRI ad uso clinico (Klose U., 2008).

L'approccio più comune di MRS per rilevare il segnale del GABA con un campo magnetico di forza 3T è la "j-difference editing", implementata con maggior successo adoperando la MEscher–GARwood Point RESolved Spectroscopy (MEGAPRESS). La MEGAPRESS sfrutta le conosciute proprietà scalari di accoppiamento delle molecole per separare i segnali associati da quelli sovrapposti delle altre molecole. Per metaboliti a minore concentrazione come il GABA, l'editing spettrale differenzia i deboli segnali di interesse dai più forti segnali sovrapposti di altri metaboliti a maggiore concentrazione. (Mikkelsen M, et al., 2017)

La popolarità della MEGAPRESS è dovuta ad un diverso numero di fattori; alcuni di questi fattori sono la vasta disponibilità delle sequenze basiche di PRESS nelle piattaforme di scanner, la sua riproducibilità, la sua semplice implementazione ed il continuo sviluppo di metodologie per l'acquisizione e di nuovi strumenti per l'elaborazione dei dati. (Mikkelsen M, et al., 2017)

Le diversità di implementazione della sequenza MEGAPRESS hanno reso difficile confrontare i dati tra studi diversi. Parametri nella sequenza differiscono tra le sequenze specifiche di MEGAPRESS e portano ad impercettibili ma importanti differenze nel segnale del GABA. (Mikkelsen M, et al., 2017)

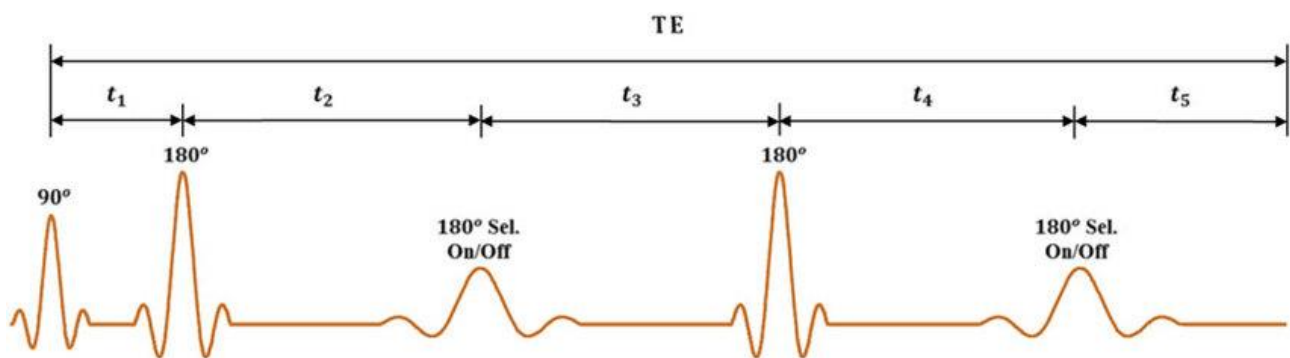


Figura 8 Sequenza MEGAPRESS semplificata (Guo et al., 2018)

La MEGAPRESS consiste in due acquisizioni; in una si applica un impulso di editing di frequenza 1.9 ppm per rimettere a fuoco selettivamente l'evoluzione dell'accoppiamento del segnale del GABA

a 3 ppm (edit-on) mentre l'altro permette l'evoluzione libera del sistema di spin durante tutto il tempo di echo (edit-off). Sottraendo lo spettro edit-off da quello edit-on si ottiene il segnale editato del GABA ed allo stesso tempo si rimuovono tutti i segnali dei composti che tendono a sovrapporsi.

Il segnale editato a 3 ppm è contaminato da altri segnali di macromolecole co-editate (stimato essere il 50% dell'area del segnale editata). Tutto questo insieme viene identificato con il nome di **GABA+**.

La contaminazione causata da altre macromolecole può essere ridotta utilizzando un secondo impulso di editing di frequenza 1.5 ppm; questo comporta un aumento della specificità causando però anche un aumento della sensibilità della misura all'instabilità sperimentale, soprattutto il drift termico del campo magnetico. La separabilità del segnale del GABA migliora notevolmente quando si adopera la MEGAPRESS però un rilevamento accurato richiede di avere dei dati di alta qualità. La qualità dei dati ottenuti è influenzata dai parametri di acquisizione che scegliamo; in ogni caso esistono studi che forniscono sufficienti informazioni per poter scegliere i migliori parametri. (Peek AL et al.,2023)

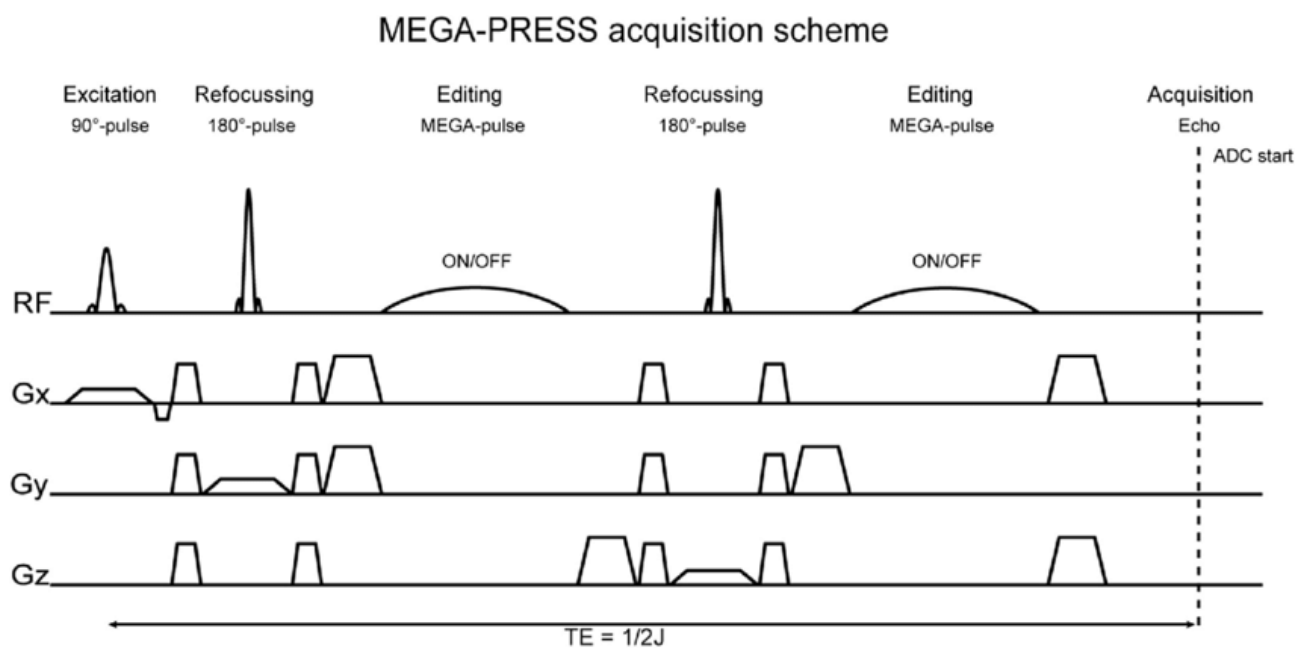


Figura 9 Nella sequenza MEGAPRESS il modulo di localizzazione della PRESS è esteso da due impulsi MEGA per l'editing e/o la soppressione di acqua/lipidi intorno al secondo impulso di rifocus (Bogner et al, 2016)

Capitolo 3

3. Il GABA nelle patologie

3.1 Ruolo del GABA nelle patologie del sistema nervoso

La MRS ha già compiuto avanzamenti importanti nel rilevamento non invasivo delle differenze nelle concentrazioni di GABA in una grande varietà di condizioni dall'autismo fino all'epilessia. In aggiunta, la MRS fornisce informazioni sulla composizione chimica del tessuto cerebrale (Levy et al., 2013).

Di seguito verranno elencate alcune delle principali patologie in cui è stato accertato o fortemente ipotizzato che il GABA abbia un ruolo nel quadro clinico della malattia. Si darà maggiore importanza alla depressione ed alla sclerosi multipla.

3.2 Parkinson

La malattia di Parkinson (PD) è una patologia neurodegenerativa causata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella sostanza nera (SN) che porta ad un controllo motorio disfunzionale. I corpi di Lewy (LB) intraneuronali e i neuriti di Lewy sono i tratti distintivi della PD. I primi segni clinici della PD sono sintomi non motori (NMS: depressione, allucinazioni, disturbi olfattivi) ma la diagnosi solitamente non avviene fino all'arrivo dei sintomi motori (bradicinesia, acinesia, rigidità e tremori) che avvengono a seguito della perdita di un grande numero di neuroni dopaminergici (Song et al., 2021).

Le allucinazioni visive sono comuni nella PD, particolarmente quando la patologia avanza e passa da semplici flash di luce o colore a più complesse allucinazioni che consistono tipicamente in immagini ben formate. Uno studio neuro patologico del sistema visivo sulla demenza con i corpi di lewy (DLB) ha scoperto una ridotta attività GABAergica nella corteccia visiva primaria. Questo potrebbe essere

un adattamento ad uno scarso input visivo o ad una connettività compromessa con altre aree visive, con una ridotta inibizione GABAergica per poter mantenere l'abilità di riconoscere gli oggetti, a costo di vedere cose che non ci sono (Firbank et al., 2018).

La patologia dopaminergica della PD impatta i circuiti che hanno a che fare con i neuroni GABAergici, soprattutto nel flusso cerebrale dove la malattia si manifesta presto. I livelli di GABA+ sono ridotti nel flusso cerebrale superiore della PD, dove i cambiamenti patologici precedono quelli che avvengono nei gangli della base. È stato verificato che avviene una significativa riduzione nei livelli del GABA+ nei pazienti con PD comparati con quelli dei gruppi di controllo. Misurare i livelli di GABA+ nel flusso cerebrale superiore potrebbe facilitare un rilevamento precoce della disfunzione GABAergica prima che appaiano difetti nigrostriatali e potrebbe potenzialmente essere usato come un biomarcatore di una PD presintomatica (Song et al., 2021).

La concentrazione di GABA+ era minore nei pazienti con PD con allucinazioni visive (PD-VH) rispetto ai pazienti PD-nonVH. I pazienti con allucinazioni avevano una peggiore acuità visiva. Combinato con una precedente ricerca che scoprì i livelli di GABA occipitale diminuiscono dopo l'occlusione oculare, queste scoperte supportano l'ipotesi che un input scarso alla corteccia visiva porta ad una riduzione dei livelli di GABA inibitorio per ottimizzare l'elaborazione visiva a spese di una maggiore classificazione errata degli stimoli ambigui. L'assenza di associazioni tra il GABA+ e la gravità delle allucinazioni visive suggerisce che bassi livelli di GABA possano predisporre le persone ad avere allucinazioni ma l'avvenimento di queste allucinazioni è controllato da altri fattori, che includono l'attenzione e l'ambiente visivo. Sono state riscontrate alterazioni del GABA+ nella corteccia occipitale insieme a cambiamenti strutturali nel flusso ventrale di pazienti con PD-VH (Firbank et al., 2018).

3.3 SCHIZOFRENIA

Uno dei risultati più ricorrenti dati dagli studi post-morte sulla schizofrenia è una riduzione dell'enzima sintetizzante il GABA, il GAD67 che è responsabile per la produzione (citosolica) di oltre il 90% del GABA. I potenziali effetti di una riduzione del GAD67 nei networks eccitatori/inibitori corticali è un componente chiave di alcuni modelli neurobiologici di schizofrenia. In particolare, si pensa che la disfunzione del GABA porti alla disinibizione dei neuroni piramidali glutammatergici e ad una perdita di attività corticale sincrona. Gli studi post-morte suggeriscono che la schizofrenia sia associata ad un segnalazione disfunzionale del GABA a livello dei recettori post-

sinaptici. Le prove che le disfunzioni del GABA abbiano un ruolo nella fisiopatologia della schizofrenia hanno incrementato l'interesse verso il potenziale terapeutico di composti farmacologici che agiscono sulla funzione del GABA (Egerton et al., 2017).

I disturbi cognitivi osservati in schizofrenia potrebbero essere collegati ad un decremento dei livelli di GABA risultanti da una ridotta trascrizione pancorticale del GAD. Uno studio di spettroscopia MR (inserire) ha scoperto che il GABA è ridotto nella corteccia visiva in pazienti affetti da schizofrenia, rinforzando l'idea della riduzione del GABA come meccanismo di perdita di inibizione cognitiva (Levy, Degnan, 2013).

Una metanalisi degli studi in vivo sulla schizofrenia eseguiti, sebbene il numero degli studi fosse insufficiente, con H-MRS non ha mostrato concentrazioni di GABA+ sufficientemente alterate nei pazienti con schizofrenia rispetto ai pazienti di controllo nella corteccia mediale frontale, parieto-occipitale o nel corpo striato. Un'assenza in vivo di grandi differenze rilevabili di concentrazione potrebbe riflettere una normalizzazione eseguita da meccanismi compensatori a livello cellulare o di network. Questo studio non ha tenuto conto di diverse differenze metodologiche che potrebbero aver impattato la qualità dei dati (Egerton et al., 2017),

3.4 Disturbi dell'umore e dell'ansia

Disturbi dell'umore condividono il fenomeno della riduzione del GABA. Pazienti che soffrono di depressione clinica non trattata presenta livelli minori di GABA nella corteccia dorso mediale, dorsale e anterolaterale prefrontale e nella corteccia occipitale. Un decremento GABAergico si è notato in pazienti depressi sia nella corteccia occipitale che nella cingolata anteriore. Pazienti che soffrono di disturbi di panico possiedono livelli di GABA molto minori rispetto ai soggetti di controllo.

In un esperimento che prevedeva un pericolo di shock, Hasler et al utilizzando la spettroscopia MR hanno mostrato che pazienti sani dimostrano una riduzione media del 18% del GABA prefrontale causato da questo scenario di stress acuto. Siccome l'ansia è legata al pericolo percepito, questo studio suggerisce che il GABA media la paura, un decremento di esso potrebbe permettere l'innescamento di una risposta motoria ad un pericolo percepito come tale (Levy, Degnan, 2013).

3.5 Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è una patologia progressiva neurodegenerativa, nella quale lievi disturbi del metabolismo cerebrale possono precedere anche di decenni la presenza di sintomi clinici come la demenza (Salminen et al., 2016).

Alterazioni dei livelli di glucosio, Glu e dei loro metabolismi possono influire in modo significativo sul GABA. I neuroni inibitori sono essenziali per il controllo corretto e la coordinazione delle reti neurali dentro e tra le diverse regioni cerebrali. Lo squilibrio tra inibizione ed eccitazione che porta a variazioni dell'attività neurale delle popolazioni neurali è stato suggerito essere un meccanismo della disfunzione cognitiva che contribuisce significativamente al meccanismo patologico della AD. La disfunzione della segnalazione GABAergica negli uomini con AD è stata spesso trascurata anche se la compromissione dei neuroni inibitori e le alterazioni in EEG (elettroencefalogramma), livelli di GABA, recettori del GABA etc. sono state riscontrate in pazienti con AD e in modelli sperimentali. Sembra in generale che un'inibizione della segnalazione GABAergica nel AD avvenga in diverse regioni cerebrali (Czapski, Strosznajder, 2021).

Il GABA shunt è un percorso metabolico conservato evolutivamente. È stato ben caratterizzato nelle piante e nei microorganismi ma è anche presente nei vertebrati, ed anche nel cervello umano. Lo GABA shunt consiste in tre reazioni enzimatiche catalizzate dal GAD, dal GABA-T e dalla SSADH. Il principale ruolo del GABA shunt è di fornire un percorso alternativo per fornire l'acido carbossilico al ciclo di Krebs e potenziare la produzione di energia in tempi di stress. Diversi report indicano che questo percorso possa venire attivato dopo danni da ischemia/riperfusion e crisi epilettiche. L'ippocampo sembra essere la regione maggiormente vulnerabile a lesioni ischemiche, similmente a come accade nella AD. Ci sono prove convincenti che il metabolismo di GABA e Glu sia compromesso nella AD ma la connessione tra il GABA shunt e la patogenesi della AD deve ancora essere chiarificato (Salminen et al., 2016).

Il ruolo del GABA ed il controllo della GABA-T nella AD sono ancora inconcludenti. È difficile ottenere risultati affidabili da campioni post-morte, specialmente da metaboliti come il GABA che hanno una breve durata di vita e non sono ugualmente metabolizzati tra i cervelli di pazienti di controllo e di pazienti con AD. Diversi studi hanno rilevato un decremento del GABA nelle regioni corticali affette da AD come nelle corteccie temporali, frontali ed occipitali hanno anche mostrato che l'attività enzimatica del GABA-T era significativamente depressa nelle stesse corteccie (Salminen et al., 2016).

3.6 EPILESSIA

L'epilessia è una malattia neurologica sistemica caratterizzata da convulsioni ricorrenti. Crisi epilettiche sono caratterizzate da segni o sintomi che portano ad un'attività neurale nel cervello anomala. Questo disturbo neurologico con una predisposizione persistente causa le crisi epilettiche. Queste crisi si possono sviluppare a causa del relativo squilibrio dei neurotrasmettitori eccitatori ed inibitori. L'epilessia è emersa come un problema di salute globale poiché affligge circa 70 milioni di persone nel mondo. Nonostante la rapida progressione della ricerca clinica e preclinica, la sua patogenesi rimane incerta. La principale medicazione anti-convulsioni (ASM) fornisce solamente un sollievo sintomatico e non ferma il progredire della patologia. Le medicine attuali puntano a recuperare l'equilibrio tra i neurotrasmettitori agendo sui canali ionici, i trasportatori ed i ricettori. Tra i diversi fattori che contribuiscono alla formazione delle convulsioni, i neurotrasmettitori svolgono un ruolo importante (Akyuz et al., 2020).

Una disfunzione del GABA è stata postulata da tempo essere un contribuente all'attività compulsiva. Livelli ridotti del GABA dovrebbero permettere attività eccitatoria neurale senza limitazioni. In linea con questa ipotesi, le ASMs svolgono il compito di aumentare l'attività GABAergica e ridurre i livelli di GABA nel CSF. Uno studio sul GABA utilizzando spettroscopia MR ha dimostrato che i pazienti con una più recente ricorrenza di convulsioni presentano concentrazioni molto minori di GABA rispetto ai pazienti che non presentano sintomi da un tempo maggiore (Levy, Degnan, 2013).

Il numero di ASMs che funzionano almeno in parte potenziando la trasmissione GABAergica sono aumentate nel tempo. Molti degli ASMs sul mercato attualmente agiscono sul sistema del GABA ma solo tre di questi (Vigabtrin, Trigabine, Ganaxolone) furono progettati per esercitare un effetto GABAergico (Perucca, White, Bialer, 2023).

Cambiamenti tra il glutammato, principale stimolante, ed il GABA, principale soppressore, svolgono nei neuroni un ruolo critico nell'equilibrio nell'eccitabilità della cellula. Diversi modelli preclinici in vitro ed in vivo di convulsioni hanno mostrato che l'equilibrio tra il GABA ed il glutammato è distrutto, risultando nell'occorrenza di convulsioni.

Danneggiamenti nella trasmissione del GABA sono statti associati con varie forme di epilessia. Mutazioni nei geni del GABA distruggono l'eccitabilità del recettore, portando ad eventi epilettici. Diversi complessi meccanismi cellulari sono coinvolti nel processo, ciò include la degradazione del reticolo endoplasmatico (ER), "nonsense" degradazione di mRNA mutato, perdita intracellulare di

ioni e stress della ER. Specifici variant del GABA-A gene sono stati associati con un precoce esordio di epilessia (Akyuz et al., 2020).

3.7 Disturbi dello spettro dell'autismo

La sotto regolazione del recettore GABA-A e GABA-B è stata proposta come un potenziale meccanismo fisiopatologico nell'autismo. Harada et al hanno svolto la prima valutazione del GABA in bambini autistici attraverso l'utilizzo della spettroscopia RM, che ha mostrato livelli significativamente più bassi della concentrazione del GABA nei lobi frontale e nel rapporto GABA/Glu, che suggerisce una diminuzione dell'attività GABAergica mentre l'attività glutammica è eccessiva. Queste riduzioni nel GABA potrebbero spiegare il danneggiamento cognitive ed il rischio aumentato di convulsioni inerenti all'autismo (Levy, Degnan, 2013).

3.8 Sclerosi multipla

La sclerosi multipla (MS) è una patologia neurologica invalidante acquisita che colpisce principalmente giovani adulti (20-40 anni), influenzando circa 2.3 milioni di persone nel mondo. È prevalente principalmente in Europa (108 casi ogni 100.000 abitanti) ed in Nord America (140 casi ogni 100.000 abitanti).

La MS è una malattia infiammatoria del sistema nervoso centrale che provoca un insieme eterogeneo di sintomi a causa di un differente coinvolgimento del sistema motorio, sensoriale, visivo ed autonomo. Ricadute avvengono a causa di demielinizzazione di aree focali che evolvono nell'arco di 24 ore e persistono per giorni o settimane prima che, generalmente, ci siano dei miglioramenti. (Doshi Chataway, 2016)

La Scala di Invalidità Espansa (Expanded Disability Status Scale, EDSS) è una scala che ha lo scopo di valutare il livello di disabilità delle persone con SM; va da 0, corrispondente a un esame neurologico normale, a 10. All'interno contempla livelli intermedi e sempre maggiori di invalidità. Il punteggio si ottiene sommando i punteggi parziali dei diversi sistemi funzionali legati all'attività del sistema nervoso. ([EDSS - Scala | AISM | Associazione Italiana Sclerosi Multipla](#)). La scala EDSS è il metodo più utilizzato per misurare la progressione della disabilità causata dalla MS, però metodo presenta delle limitazioni. I risultati della EDSS possono variare a causa delle complesse regole per calcolare il punteggio e della natura soggettiva dell'esame neurologico poiché esiste il rischio che differenti medici possano dare un punteggio diverso. ([Expanded Disability Status Scale \(EDSS\) | MS Trust](#))

La EDSS ha la tendenza a enfatizzare le ripercussioni sulle capacità di camminare, sottovalutando quelli riguardanti altri aspetti. Aspetti come i disturbi cognitivi (disturbi che riguardano l'attenzione, il ragionamento, la memoria, la percezione, ecc.), la fatica primaria mentale e fisica (cioè, quella che deriva direttamente dalla malattia), il dolore neuropatico (ossia il dolore causato da un danno al sistema nervoso), la funzionalità degli arti superiori (delle braccia). ([Scala EDSS Sclerosi Multipla per Valutare la Disabilità \(contactsrl.it\)](#))

Scala EDSS

- **0.0:** Persona che non ha alcun problema legato alla sclerosi multipla;
- **Da 1 a 3.5:** Persona in grado di camminare autonomamente, ma presenta alcuni deficit neurologici in alcuni sistemi funzionali, di grado lieve o moderato, con un parziale impatto sulla sua autonomia;
- **4.0:** Individuo autonomo, capace di camminare senza aiuto e senza riposo per circa 500 metri;
- **4.5:** Paziente autonomo, che ha delle minime limitazioni alle attività giornaliere. Può camminare in autonomia e senza riposo per circa 300 metri;
- **5.0:** Paziente non completamente autonomo, ha modeste limitazioni nelle attività giornaliere. Cammina senza aiuti e senza pause per circa 200 metri;
- **5.5:** Persona non del tutto autonoma, ha limitazioni evidenti alla sua attività quotidiana. Può camminare, da solo, senza aiuti e senza pause, per 100 metri circa;
- **6.0:** Individuo che ha bisogno di assistenza occasionale o costante da un solo lato, allo scopo di poter percorrere 100 metri circa senza sosta;
- **6.5:** Paziente che ha bisogno di assistenza costante da entrambi i lati, per camminare per circa 20 metri senza pause;
- **7.0:** Persona che non è capace di camminare per più di 5 metri circa, anche se viene aiutato. Ha bisogno di una sedia a rotelle, ma riesce a spostarsi dalla stessa in autonomia;
- **7.5:** Paziente in grado di fare solo qualche passo. Deve per forza usare la sedia a rotelle, e per sedersi sulla stessa, o alzarsi, potrebbe aver bisogno di aiuto;
- **8.0:** Persona costretta a letto ma non per l'intera giornata, oppure sulla sedia a rotelle. Di norma usa bene una o entrambe le sue braccia;
- **8.5:** Individuo obbligato a letto, mantiene alcune funzioni di auto assistenza, con un buon uso di una o entrambe le braccia;
- **9.0:** Persona costretta a letto e non autosufficiente. Può soltanto comunicare;
- **9.5:** Paziente costretto a letto, completamente dipendente;
- **10.0:** Decesso causato dalla malattia.

Il decorso della sclerosi multipla può essere differenziato in 4 tipi diversi (Lublin et al,2014):

- **Clinically isolated syndrome (CIS).** La CIS si riferisce al primo episodio di comparsa dei sintomi neurologici causati da infiammazione e demielinizzazione nel sistema nervoso centrale.
- **Relapsing-remitting MS (RRMS).** La RRMS è il decorso più comune della MS e mostra chiaramente attacchi di sintomi neurologici nuovi o in aumento; questi attacchi sono chiamati ricadute e sono seguiti da periodi di parziale o completa remissione.
- **Secondary progressive MS (SPMS).** La sclerosi secondaria progressiva segue il decorso iniziale ricaduta-remissione.
- **Primary progressive MS (PPMS).** Con la MS primaria progressiva le funzioni neurologiche peggiorano o le disabilità si accumulano non appena appaiono i sintomi senza precedenti casi di ricadute e remissioni.

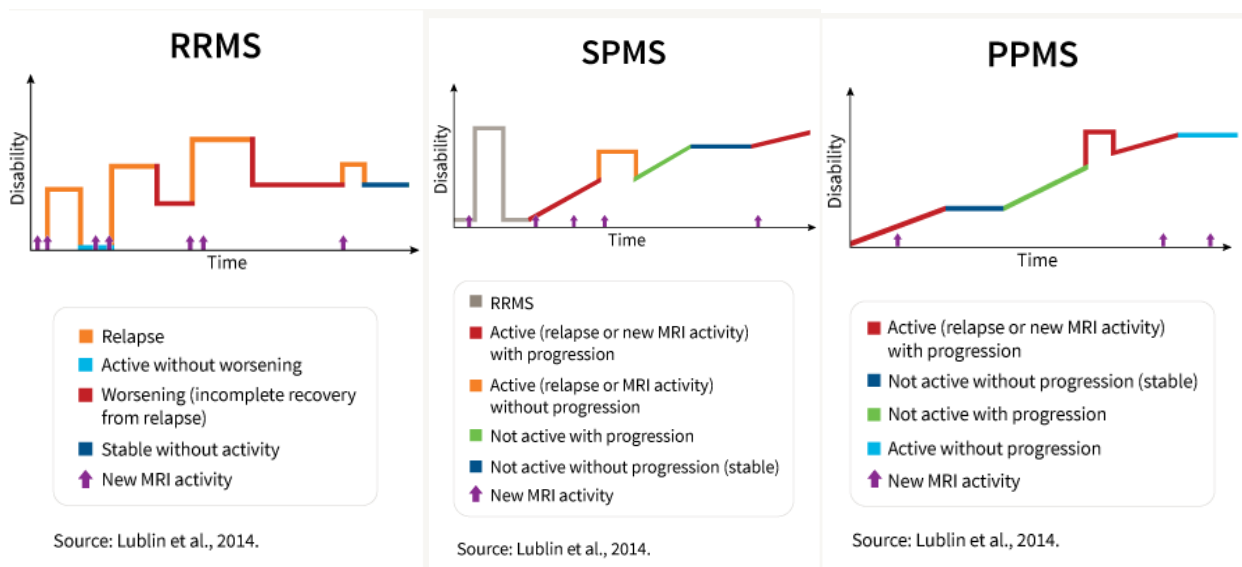


Figura 10 Andamento delle diverse forme di MS (Lublin et al., 2014)

Pochi studi hanno investigato i livelli di GABA nel cervello di persone affette da MS nonostante il suo rapporto funzionale e strutturale con il glutammato. Questo può essere attribuito alle difficoltà associate nel misurare i livelli di GABA con campi magnetici standard (3T). Inoltre, l'analisi dei dati e la sua interpretazione è complicata nei confronti di una malattia neurologica a causa di fattori come il tempo di rilassamento dell'acqua che è conosciuto essere anormale in lesioni e l'apparenza normale dei tessuti cerebrali di persone affette da sclerosi multipla (Nantes et al., 2017).

Diversi studi con MRS non hanno mostrato variazioni significative di GABA+ o glutammato tra i diversi gruppi. Studi sulla MS hanno mostrato livelli di questi metaboliti minori, identici ed alcune volte anche maggiori nella materia grigia (GM) (Huiskamp et al., 2023).

Tra le persone con la forma recidivanti-remittenti di MS Bhattacharyya et al. (2013) una maggiore concentrazione di GABA nella regione sensorimotoria correlata con una peggiore prestazione motoria fine. Cawley et al. (2015) hanno riportato che la concentrazione di GABA sensorimotorio possa essere anormalmente bassa tra le persone che soffrono della forma secondaria progressiva di MS ed una concentrazione minore di GABA possa essere implicata in una funzione motoria peggiore. Alterazioni delle molecole causate dalla patologia, però, non possono essere escluse come la causa degli apparenti deficit di GABA (Nantes et al., 2017).

Il decadimento cognitivo (cognitive impairment, CI) avviene nel 45-60% delle persone affette da MS e può essere connesso ad alterazioni nella neurotrasmissione di GABA e Glu. Non sono state osservate differenze nelle concentrazioni di GABA o Glu tra persone con MS e pazienti di controllo o tra persone senza CI, con CI ed i gruppi di controllo. Sebbene le concentrazioni dei due metaboliti siano rimaste uguali, una maggiore densità di recettori del GABA è stata osservata nei pazienti con MS senza decadimento rispetto ai pazienti con anche CI. Inoltre, la densità dei recettori del GABA è correlata con la cognizione. Questo potrebbe indicare la densità dei recettori del GABA è sovra regolata nella fase della MS in cui è preservato il mantenimento cognitivo come un mezzo per regolare la neurotrasmissione e preservare potenzialmente il funzionamento cognitivo. L'incremento della densità dei recettori del GABA nei pazienti senza decadimento potrebbe essere una risposta alla neuroinfiammazione. L'infiammazione ed il sistema GABAergico sono stati descritti interagire ampiamente sia in cervelli sani che affetti da MS. Se un'incrementata densità di recettori del GABA fosse causata dall'infiammazione, ci si aspetterebbe una relazione negativa con la cognizione invece che positiva. Gli effetti della sola infiammazione non sono sufficienti per descrivere questi risultati. L'incremento della densità dei recettori è presente nella fase della malattia in cui non è ancora iniziato il CI ma non in pazienti affetti da MS con CI, questo potrebbe indicare che l'incremento della densità dei recettori in questa fase sia un processo transitorio che può essere mantenuto solo per un periodo limitato di tempo o per una quantità limitata di patologia, quando la patologia super il limite è possibile che la densità torni ai suoi valori normali (Huiskamp et al., 2023).

3.9 DEPRESSIONE

Episodi depressivi maggiori sono definiti dal DSM-5 da una varietà di segni e sintomi. Pazienti che soffrono di grave depressione esibiscono alterazioni in alcune funzionalità critiche, come il ciclo del sonno, appetito, attività psicomotoria, cognizione ed umore. La depressione è la causa maggiore di suicidi, adesso nella top ten delle cause di morte negli stati uniti, con quasi 50000 casi di suicidi registrati ogni anno. Una grave depressione è associata con una riduzione della durata di vita. In parte a causa dei suicidi, in parte a causa ad un incremento alla vulnerabilità di disordini medici. Oltre ad essere più vulnerabili a determinate patologie, anche i trattamenti per esse risultano essere di minor efficacia. Fattori di rischio per la depressione includono una storia familiare pregressa (circa il 35% del rischio è ereditario), abusi subiti durante l'infanzia, abbandono così come essere di sesso femminile e recenti fattori di stress. (Beurel, Toups, Nemeroff, 2020)

Malattie mediche contribuiscono al rischio di depressione, soprattutto malattie metaboliche ed autoimmuni. (Beurel, Toups, Nemeroff, 2020)

Il trattamento della depressione può avvenire attraverso 3 modi: antidepressivi ed altri farmaci che incrementano la funzione antidepressiva, psicoterapia come la CBT (cognitive-behavior-therapy), trattamenti somatici non farmacologici come la terapia elettroconvulsiva (ECT), stimolazione del nervo vago (VNS) e la simulazione magnetica recettiva transcranica (rTMS). (Beurel, Toups, Nemeroff, 2020)

Molti sintomi della depressione e dell'ansia sono simili. Una lieve ansia può essere difficile da riconoscere rispetto ad una lieve depressione. La depressione è comune in pazienti affetti da ansia e sintomi ansiolitici sono spesso riportati in pazienti che soffrono di depressione. (Kalueff AV, Nutt DJ 2007)

La disfunzione del sistema centrale del GABA è stata da lungo associata con disordini di ansia. Sia negli studi svolti sugli animali che in quelli svolti sull'uomo, modulatori positivi dei recettori del GABA generalmente possiedono attività ansiolitica mentre, modulatori negativi producono effetti ansiogeni. Consistente con questo, diversi analoghi del GABA ed agenti che influenzano il metabolismo del trasmettitore per potenziare il tono GABAergico sono stati riportati causare gli stessi effetti ansiogeni. (Kalueff AV, Nutt DJ 2007)

In circa un terzo dei pazienti la malattia non entra in remissione, anche dopo quattro trattamenti terapeutici adeguati, in questi casi si parla di depressione resistente al trattamento (TRD) anche se non esiste ancora un consensus unico per la sua definizione. (Vecera CM et al., 2023)

La depressione è spesso associata con un decremento della funzione GABAergica mentre diversi antidepressivi tendono, invece, ad aumentarne. Una bassa funzione di GABA è indicato essere un marker biologico per la vulnerabilità alla depressione. Modulatori positivi dei recettori GABA-A possono svolgere azioni antidepressive (AD), mentre modulatori negativi spesso causano depressione. (Kalueff Av, Nutt DJ, 2007)

La ridotta funzione GABAergica è una scoperta ben replicata nella depressione, con risultati che ricoprono molteplici scale biologiche sia in soggetti vivi sia negli studi del cervello post-mortem. Bassi livelli di GABA sono stati riscontrati nel liquido cerebrospinale ed anche nel plasma di pazienti con depressione clinica. Studi di MRS hanno dimostrato un'estesa riduzione dei livelli di GABA, mentre i livelli del glutammato risultavano praticamente non alterati. Deficit di GABA non sono stati riportati sistematicamente ma appaiono più robusti in pazienti che soffrono di MDD con anedonia. Analisi specifiche delle regioni cerebrali hanno mostrato carenze di GABA nella corteccia occipitale (pazienti trattati e non trattati), nella PFC e nella corteccia cingolata anteriore (ACC) di pazienti depressi. In ACC i livelli di glutammato/glutamina risultano ridotti anch'essi; perciò, la riduzione del GABA come spiegazione di uno squilibrio di eccitazione/inibizione potrebbe non essere corretto. (Prévot T, Sibille E, 2021)

La MDD e lo stress cronico sono associati con un disequilibrio di eccitazione-inibizione (E: I) nella corteccia prefrontale (PFC), generato da una mancanza di trasmissione sinaptica inibitoria sui principali neuroni glutamatergici. I pazienti con MDD ed animali cronicamente stressati mostrano una riduzione dei livelli di GABA e GAD67 nel cervello, una ridotta espressione di marcatori interneuronali GABAergici ed alterazioni nei recettori GABA-A e GABA-B. Inoltre, animali geneticamente modificati con la cancellazione di specifiche sottounità di recettori del GABA o funzioni di interneuroni mostrano comportamenti di tipo depressivo. (Frontiers | Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions (frontiersin.org))

I neuroni GABAergici hanno un ruolo importante nella terminazione della risposta allo stress attraverso la regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e l'interruzione di questa risposta regolatoria contribuisce agli effetti anormali di esposizione cronica allo stress. Lo stress cronico causa la sotto regolazione del cotrasportatore della membrana K-Cl (KCC2), rendendo gli inputs del GABA inefficaci per l'inibizione sinaptica dell'asse HPA. La cancellazione o la mutazione, inoltre, della sottounità $\gamma 2$ dei recettori GABA-A risultano in un legame ridotto con i recettori GABA-A ed

una conseguente iperattività dell'asse HPA che portano a comportamenti ansiogeni e pro-depressivi. (Frontiers | Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions (frontiersin.org))

La TRD è associata a diverse caratteristiche di comorbilità che includono una prolungata disfunzione fisica e mentale, un incremento della spesa sanitaria, peggiori outcome clinici e un maggior rischio di suicidio. Disfunzioni GABAergiche e Glutammatergiche nella corteccia prefrontale (PFC) e nella corteccia cingolare anteriore sono state estensivamente implicate sia nella MDD che nella TRD. Il default mode network (DMN), uno dei maggiori network di comunicazione del CNS è implicato in questa dinamica. La disinibizione corticale GABAergica nei disordini depressivi avviene insieme ad un incremento dell'espressione del gene glutammatergico nel DMN.

Un disequilibrio tra il Glu ed il GABA è emerso avere un ruolo chiave nella fisiopatologia del TRD. I modulatori del GABA più promettenti appaiono essere neuro steroidi sintetici “analoghi” con positiva modulazione dei recettori GABA-A (come il brexanolone) (Vecera CM et al., 2023).

La figura 11 mostra il meccanismo proposto per il funzionamento di medicinali a base di GABA e chetamina nel ristabilimento dell'equilibrio corticale E: I. La disfunzione GABAergica disturba l'equilibrio ottimale E: I nel cervello e compromette l'integrità dei neuro circuiti, contribuendo allo sviluppo della MDD, oltre che ad altre patologie legate allo stress. Lo squilibrio E: I può essere invertito attraverso l'utilizzo di medicinali attraverso diversi meccanismi connessi al GABA. Bassi dosaggi di chetamina inducono un burst di glutammato nella PFC attraverso il blocco dei recettori N-metil-D-aspartato (NMDA) locati negli interneuroni GABAergici. La chetamina facilita effetti mediati dal GABA, invertendo i deficit di GABA causati da esposizione cronica allo stress. Infine, l'attivazione di recettori GABA-B post-sinaptici da agonisti o modulatori allosterici positivi (PAMs) così come l'attivazione della sub unità $\alpha 5$ -GABA-A dai PAMs e di altre sottounità dei recettori GABA-A da parte di neuro steroidi possono reclutare l'espressione e la segnalazione del fattore neurotrofico cerebrale (BDNF) che può contribuire ad una risposta antidepressiva (Frontiers | Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions (frontiersin.org)).

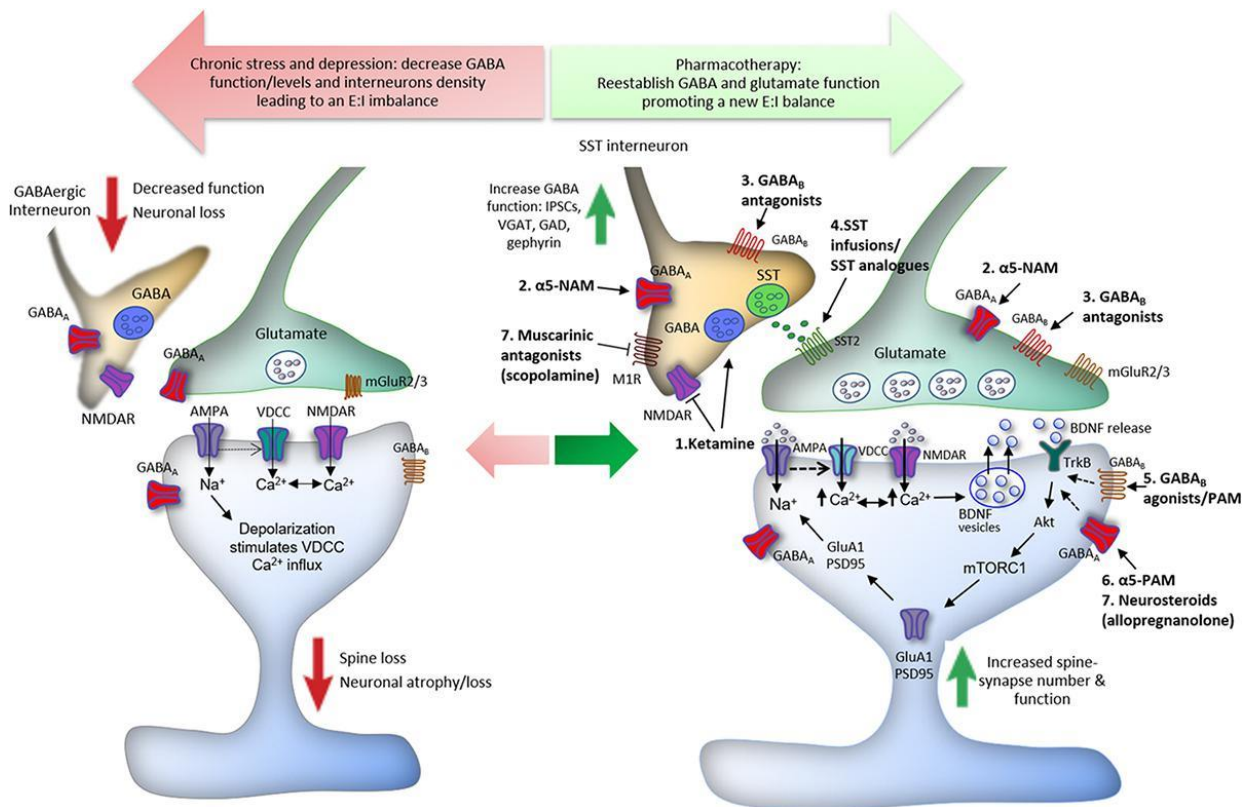


Figura 11 Meccanismo proposto che mostr il funzionamento di medicinali basati su chetamina e GABA per il ristabilimento dell'equilibrio corticale (E: I. *Frontiers | Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions* (frontiersin.org))

3.10 Apprendimento motorio

L'apprendimento motorio descrive il processo nel quale cambiamo e ci adattiamo nelle nostre interazioni con il mondo esterno. L'abilità di apprendere nuove capacità è fortemente associata in cambiamento dell'organizzazione sia strutturale che funzionale della corteccia motoria primaria (M1). Studi suggeriscono che la pratica ripetuta di un compito motorio porta cambiamenti è associata con cambiamenti topografici della regione. (Kolasinski et al., 2019).

La M1 è fondamentale per l'apprendimento motorio, le sue interazioni con le altre aree cerebrali durante l'apprendimento rimane non chiaro. Una riduzione nel tono inibitorio corticale è critica per l'induzione della plasticità M1 legata all'apprendimento (Maruyama et al.,2021).

L'acquisizione di nuove skill motorie è dipendente dai cambiamenti dei circuiti locali all'interno di M1. È stato ipotizzato che questa riorganizzazione possa essere facilitata da una riduzione dell'inibizione locale attraverso una modulazione del GABA ma questo link non è stato dimostrato in modo conclusivo nell'uomo (Kolasinski et al., 2019).

L'apprendimento motorio guidato dal controllo cognitivo è associato con variazioni locali nel GABA/Glu nella M1 che regola la connettività remota con il network fronto parietale FPN, costituendo il network di apprendimento motorio M1 centrato (Maruyama et al.,2021).

I cambiamenti osservati nella concentrazione di GABA associata con l'apprendimento motorio non è stato rispecchiato nelle concentrazioni di Glu, entrambe ottenute con MRS a 7T. Oltre all'inibizione fasica GABAergica centrale per meccanismi come l'inibizione laterale, l'attività tonica dal GABA extracellulare si ritiene possa mediare un livello basale di tono inibitorio. Quest'attività inibitoria dell'ambiente agisce attraverso recettori GABA-A extra sinaptici, alterando proprietà come il periodo refrattario della membrana (Kolasinski et al., 2019).

La riduzione della concentrazione di GABA in M1 in momenti subito dopo un task (at an early time point in the task) e la grandezza del successivo apprendimento motorio (Kolasinski et al., 2019).

Utilizzando uno specifico compito di tempo di reazione seriale (SRTT), Kolasinski et al. (2019) hanno osservato una significativa riduzione del GABA in M1 durante l'apprendimento (Maruyama et al.,2021). In contrasto Bell et al. (2023), però, non hanno trovato variazioni significative di GABA+ durante il loro esperimento.

Comprendere i processi fisiologici che guidano i cambiamenti strutturali e funzionali osservati in M1 per supportare l'apprendimento motorio sono necessari per lo sviluppo di approcci terapeutici per

promuovere plasticità adattiva dopo lesione cerebrali, come in un ictus, attraverso la facilitazione del riapprendimento delle capacità motorie compromesse da una patologia cerebrale (Kolasinski et al., 2019).

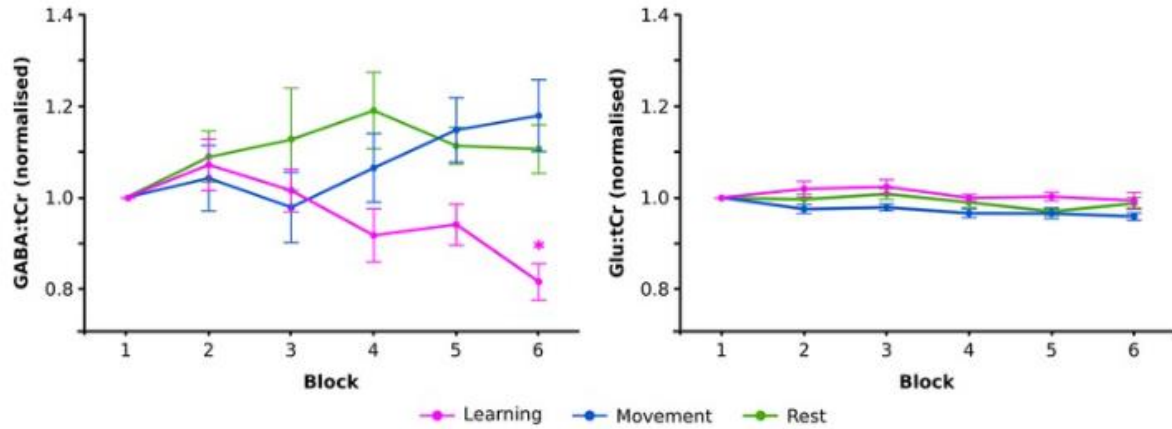


Figura 12 La figura mostra la media del gruppo per le concentrazioni di GABA:tCr e Glu:tCr (rapporto con la Cr totale) normalizzate per sei acquisizioni seriali di MRS misurate durante l'esecuzione del compito. Durante la sequenza di apprendimento motorio, una riduzione della concentrazione di GABA:tCr nella corteccia motoria è osservata (rosa) che non è visto in un compito motorio di uguale durata, privo di una sequenza apprendibile (blu) né durante un compito di riposo passivo della stessa durata (verde). Misure equivalenti del Glu non hanno mostrato prove di cambiamenti specifici al gruppo di apprendimento (Kolasinski et al., 2019).

Capitolo 4

4. Materiali e metodi

Lo scopo di questo progetto di tesi è quantificare il GABA utilizzando una sequenza di spettroscopia a 3T e verificare se è possibile discriminare il GABA da altri metaboliti, prima di poter procedere, nel caso, al vivo.

L'attività è consistita in diverse fasi. La prima fase è stata la creazione di fantocci ad-hoc con composizioni note di metaboliti e l'acquisto di un fantoccio standard di riferimento. Parallelamente si è svolta la messa a punto della sequenza di acquisizione, per procedere successivamente con la fase di acquisizione vera e propria delle immagini dei fantocci.

Infine, ho proceduto a selezionare diversi software per l'analisi di spettroscopia per confrontarne l'analisi.

4.1 Fantocci utilizzati negli esperimenti

Le analisi di spettroscopia si sono svolte su 4 fantocci diversi, uno acquistato e 3 preparati appositamente per questo progetto di tesi.

4.1.1 Fantocci preparati

Sono stati progettati 3 fantocci con concentrazioni di metaboliti note, utilizzando delle flask per la coltura cellulare da 250 ml. La creazione delle soluzioni, utilizzate poi per riempire ogni singolo phantom è avvenuta nel Dipartimento di Chimica dell'Università di Genova. Ogni fantoccio contiene una soluzione di tampone bifosfato per impedire variazione del pH all'interno dei fantocci (pH 7.00, cioè neutro). Il primo fantoccio creato (Fantoccio_tampone) contiene solamente soluzione tampone, mentre un secondo fantoccio (Fantoccio_GABA) ha in aggiunta un'elevata concentrazione di metabolita GABA (25mM). Il terzo fantoccio è stato creato con concentrazioni di tre metaboliti (GABA, Glu e Gln). Le concentrazioni dei metaboliti presenti nei tre fantocci sono riassunte in Tabella 1. L'obiettivo con questi fantocci è di riuscire a rilevare la presenza di GABA nel fantoccio che lo contiene e di evitare falsi positivi nel fantoccio che non lo contiene e di appurare se è possibile discriminare tra basse concentrazioni di metaboliti con spettri vicini per verificare la corretta

esecuzione dell'analisi. I fantocci, opportunamente conservati in un frigorifero apposito prima dell'utilizzo, sono stati inseriti insieme nella bobina e acquisiti separatamente con sequenze individuali, scegliendo voxel verso il centro del fantoccio per evitare possibili artefatti dovuti ai bordi del fantoccio.

Tabella1

Fantocci	GABA (mM)	Glu (mM)	Gln (mM)
Fantoccio_tampone	0	0	0
Fantoccio_GABA	25	0	0
Fantoccio_GABA+Glx	2	8	3

La Tabella 1 mostra le concentrazioni dei metaboliti presenti nei fantocci preparati

4.1.2 SPECTRE

L'ultimo fantoccio utilizzato è il phantom SPECTRE (**Spectroscopy Reference, Gold Standard Phantom, uk-** in figura 15). Lo SPECTRE è un fantoccio commerciale, costituito da una sfera che contiene sette dei più comuni metaboliti presenti nel tessuto cerebrale a livelli e concentrazioni di pH fisiologici (Figura 13 e 14).

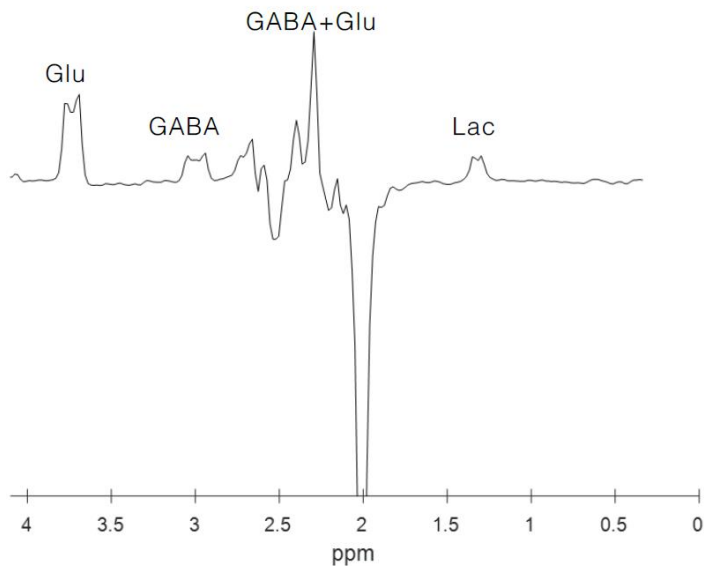


Figura 13 Spettro qualitativo dello SPECTRE (SPECTRE - Gold Standard Phantoms)

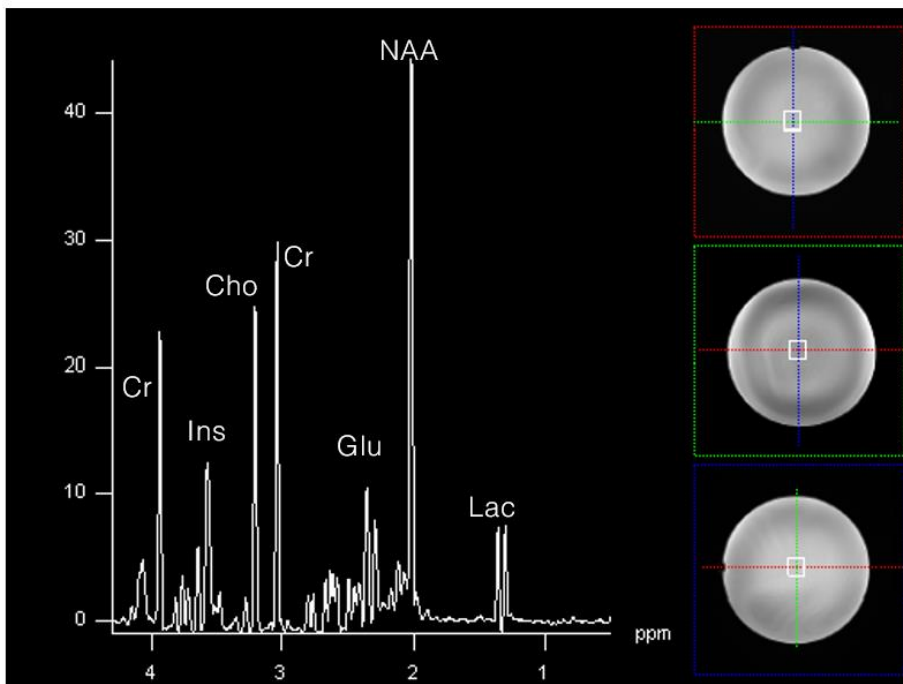


Figura 14 Esempio di spettro acquisito con campo magnetico di forza 3T e TE=30ms SPECTRE - Information Sheet 2023 - Outlined (goldstandardphantoms.com)

Tabella 2

Metabolita	Concentrazione
NAA	12.5 mM
Cr	10.0 mM
Cho	3.0 mM
Ins	7.5 mM
Glu	12.5 mM
Lac	5.0 mM
GABA	2.0 mM

Tabella 2 concentrazioni dei metaboliti presenti nello SPECTRE



Figura 15 Forma del phantom SPECTRE

4.2 Macchinario Siemens

I dati per le analisi dei fantocci sono stati acquisiti sul tomografo di risonanza magnetica operante a campo magnetico 3T (MAGNETOM Prisma, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany), installato presso l'ospedale San Martino di Genova.



Figura 16 Il tomografo MAGNETOM Prisma installato presso l'Ospedale San Martino utilizzato per questo studio

4.2.1 Sequenza di acquisizione utilizzata

La sequenza utilizzata è una MEGAPRESS per la quale sono stati variati alcuni parametri per la quantificazione assoluta del GABA e un'ottimale soppressione dell'acqua (Mikkelsen M et al., 2017) (Mikkelsen M et al., 2019). Sono stati selezionati i parametri ritenuti potessero fornire i migliori dati possibili.

I parametri inseriti sono i seguenti:

- Posizione voxel (30,30,30)
- TR = 2000ms
- TE = 68ms
- Medie = 160
- Flip angle di eccitazione 90 °
- Flip angle di rimessa a fuoco 180 °
- VAPOR Enabled
- VAPOR suppr. Water suppr.
- Water s. BW = 135 Hz
- Water s. delta pos. = 0,00 ppm
- Editing pulse freq. [1] 1,90 ppm
- Editing pulse freq. [2] 7,46 ppm

I parametri per la sequenza di soppressione dell'acqua sono invece:

- Posizione voxel (30,30,30)
- TR = 2000ms
- TE = 68ms
- Medie = 16
- Flip angle di eccitazione 90 °
- Flip angle di rimessa a fuoco 180 °
- VAPOR Only RF of
- VAPOR suppr. Water suppr.
- Water s. BW = 135 Hz
- Water s. delta pos. = 0,00 ppm
- Editing pulse freq. [1] 1,90 ppm
- Editing pulse freq. [2] 7,46 ppm

4.3 Files di spettroscopia

Ogni produttore di scanner di risonanza ha il proprio formato di file (possono anche avere diversi formati di files) per esportare i dati ottenuti con l'utilizzo di MRS per l'elaborazione offline. Gli scanner Siemens (come quello utilizzato per queste acquisizioni) permettono l'esporto di dati in quattro formati differenti:

- *.dcm. Estensione che indica il file DICOM, il quale è un formato classico di archiviazione dei dati per la spettroscopia.
- *.ima. È un file di proprietà strutturato come il DICOM.
- *.rda. È un altro formato di file di proprietà della Siemens con un file header seguito "data binary points".
- *.dat. L'estensione indica il formato TWIX, un formato di proprietà progettato per memorizzare dati grezzi ottenuti da ogni singola bobina individualmente. Questo formato richiede nettamente il maggior spazio di archiviazione.

Lo standard DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine) definisce le modalità con cui le immagini biomediche e i relativi metadati vengono archiviati e trasferiti tra vari dispositivi come gli scanner, le stazioni di lavoro e i server. È uno degli standard più comuni per la spettroscopia ed è stato il formato utilizzato principalmente per analizzare i dati nel suo formato Siemens *.ima.

4.4 Software utilizzati

4.4.1 Gannet

Gannet ((GABA Analysis Toolkit – Edden RA et al., 2014) è un software gratuito open-source basato su MATLAB (The MathWorks Inc, Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc. <https://www.mathworks.com>) per analizzare dati ottenuti utilizzando tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica ad idrogeno a voxel singolo editata. Gannet è pensato appositamente per l'analisi di dati editati di MRS del GABA. Strumenti che sono stati originariamente progettati per l'analisi di dati a voxel singolo con TE brevi hanno diversi presupposti di base. Gannet è pensato per eseguire un'analisi batch di un intero dataset con un intervento minimo dell'utilizzatore. Per poter utilizzare questo software sono necessarie solamente delle conoscenze basiche di MATLAB. Le sue funzioni disponibili coprono tutti gli steps essenziali delle moderne analisi di MRS:

- Caricare i dati grezzi
- Preelaborazione
- Modellamento del segnale
- Co-registrazione del voxel con immagini strutturali di MR
- Stima della concentrazione basata sulla composizione del tessuto

Diversi pacchetti software esistenti per l'analisi di dati di MRS richiedono un grande input da parte dell'utilizzatore oppure offrono una grande selezione di opzioni di processamento. Gannet, invece, fornisce agli utilizzatori un canale completamente automatizzato senza il bisogno di significativi input da parte dell'user.

Le due funzioni più importanti di Gannet sono:

- GannetLoad. Carica i dati grezzi esportati dallo scanner e li pre processa; mostra come grafico lo spettro editato e fornisce informazione sulla durata dell'esperimento.
- GannetFit. Modella i segnali dei metaboliti di interesse nello spettro di differenza e nei composti di referenza; grafica i dati ed il fit del modello e fornisce risultati di quantificazione basica ed informazioni sulla qualità dello spettro. Nel caso di analisi di dati ottenuti da phantoms invece che in vivo invece di utilizzare la funzione "GannetFit" si utilizzare la funzione "GannetFitPhantom" che funziona nello stesso modo ma è stata ideata appositamente per analisi su fantocci.

Il primo passo da compiere per poter utilizzare Gannet è di lanciare la funzione **GannetPreInitialise.m**. Il toolkit possiede diverse “routines” che permettono di riconoscere automaticamente il formato dei dati, le sequenze ed i parametri di acquisizione dai dati contenuti negli headers file ma alcune impostazioni devono essere impostate dall’utente per poter un’analisi corretta. Le impostazioni di default inizializzano una analisi standard per dati ottenuti da un’analisi in vivo GABA editata con tecnica MEGAPRESS. Per poter analizzare dati acquisiti con diversi metodi, selezionare un diverso metabolita come target oppure analizzare dati ottenuti attraverso l’utilizzo di fantocci (come nel mio caso) bisognerà apportare delle modifiche a questo file (come si può vedere in Figura 17).

Una delle impostazioni principali da fornire alla funzione pre initialise è quale metabolita si sta cercando nell’analisi. Se i dati sono stati acquisiti su fantoccio utilizzando una sequenza MEGAPRESS i metaboliti ricercabili sono: GABA, Glx, Gsh, Lac, EtOH (etanolo). Questi metaboliti possono essere selezionati solamente uno alla volta, impedendo quindi di poter analizzare più metaboliti contemporaneamente e riducendo di molto i possibili metaboliti analizzabili.

Il formato IMA (strutturato DICOM) della Siemens salva ogni transitorio in un file separato, perciò per un’acquisizione da 128 transitori esisteranno 128 files IMA. I dati di ogni acquisizione dovrebbero essere salvati in un’apposita cartella. I files contenenti i dati dei metaboliti ed i dati sulla water reference devono essere salvati in cartelle separate ed un singolo file IMA è selezionato per caricare i dati.

Il comando per poter utilizzare questi dati è il seguente:

```
MRS_struct = GannetLoad({'metab/file1.ima'}, {'water/file1.ima'});  
MRS_struct = GannetFit(MRS_struct);
```

I formati RDA di Siemens sommano i files transitori editati ON e OFF e li esportano sottoforma di singoli files. Questo formato non è raccomandato per l’utilizzo di Gannet siccome diversi step di pre-processing non possono essere lanciati. Il comando per analizzare questi files è:

```
MRS_struct = GannetLoad({'OFF.rda', 'ON.rda'});  
MRS_struct = GannetFit(MRS_struct);
```

Alcuni formati di dati grezzi di MRS salvano i dati senza la combinazione di bobine; nello specifico questi files sono: GE P-file (.7), NIFTI-MRS (se i dati sono grezzi), Philips. raw, e Siemens TWIX

(.dat) data. Se i files sulla water reference sono forniti questi dati verranno utilizzati come references for signal weighting and phasing of the coil data.

Il metodo convenzionale di calcolare la media è semplice. Tutte le n coppie di sottospettri acquisiti Xi (tutti gli spettri ON ed OFF editati) sono averaged utilizzando la media aritmetica.

```
function MRS_struct = GannetPreInitialise(MRS_struct)

% Acquisition parameters
MRS_struct.p.target = {'GABA'}; % Edited metabolite(s) of interest; permitted options are:
                                % If MEGA-PRESS:
                                %   {'GABA'}, {'GABAGlx'}, {'GSH'}, {'Lac'}, or {'EtOH'}
                                % If HERMES:
                                %   {'GABAGlx','GSH'}, {'Lac','GSH'}, or {'EtOH','GABA','GSH'}
                                % If HERCULES:
                                %   {'GABAGlx','GSH'}
                                % If phantom data:
                                %   and MEGA-PRESS: {'GABA'}, {'Glx'}, {'GSH'}, {'Lac'}, or {'EtOH'}
                                %   and HERMES: {'GABA','GSH'}, {'Glx','GSH'}, {'Lac','GSH'}, or {'EtOH','GABA','GSH'}
MRS_struct.p.seqorig = 'JHU'; % Origin of Philips MEGA-PRESS or GE HERMES sequences;
                                % options are 'JHU' or 'Philips' if Philips, or 'Lythgoe' if GE (for HERMES only)

% Analysis parameters
MRS_struct.p.LB = 3; % Exponential line-broadening (in Hz)
MRS_struct.p.water_ECC = 1; % 1 = YES, perform eddy current correction on water data
MRS_struct.p.metab_ECC = 0; % 1 = YES, perform eddy current correction on metabolite data (requires a water reference)
MRS_struct.p.water_removal = 1; % 1 = YES, remove residual water signal in DIFF spectrum using HSVD
MRS_struct.p.alignment = 'none'; % Alignment method; options are 'RobustSpecReg' (recommended), 'SpecReg', 'SpecRegHERMES',
                                % 'Cr', 'Cho', 'NAA', 'H2O', 'CrOFF', or 'none' (recommended for phantom data)
MRS_struct.p.use_prealign_ref = 0; % 1 = YES; in some cases, using RobustSpecReg to align HERMES/HERCULES data can result in
                                % worse alignment compared to the pre-aligned data; setting this parameter to 1 will
                                % make RobustSpecReg use the averaged pre-aligned subspectra as references to align the
                                % averaged post-aligned subspectra, which may improve the final alignment
MRS_struct.p.vox = {'vox1'}; % For naming voxels in PRIAM data, e.g. {'anterior','posterior'}, {'right','left'}, etc.
MRS_struct.p.fit_resid_water = 0; % 1 = YES, fit the residual water signal in the OFF spectrum to calculate a water suppression factor
MRS_struct.p.weighted_averaging = 1; % 1 = YES, average subspectra using weighted averaging
```

Figura 17 Un pezzo della funzione GannetPreInitialise con i parametri da settare

4.4.2 Osprey

Osprey (G Oeltzschner et al., 2020) è un software per il processamento e l'analisi quantitativa dei dati ottenuti con MRS in vivo.

Osprey funziona in ambiente MATLAB per ogni versione dalla 2017 in poi.

Ogni funzione di Osprey ha bisogno, per poter funzionare, di un job file poiché il job file è l'unico punto di contatto diretto tra l'utilizzatore ed il software. Il job file permette che tutti i passaggi possano essere svolti in maniera indipendente dall'operatore e riproducibile.

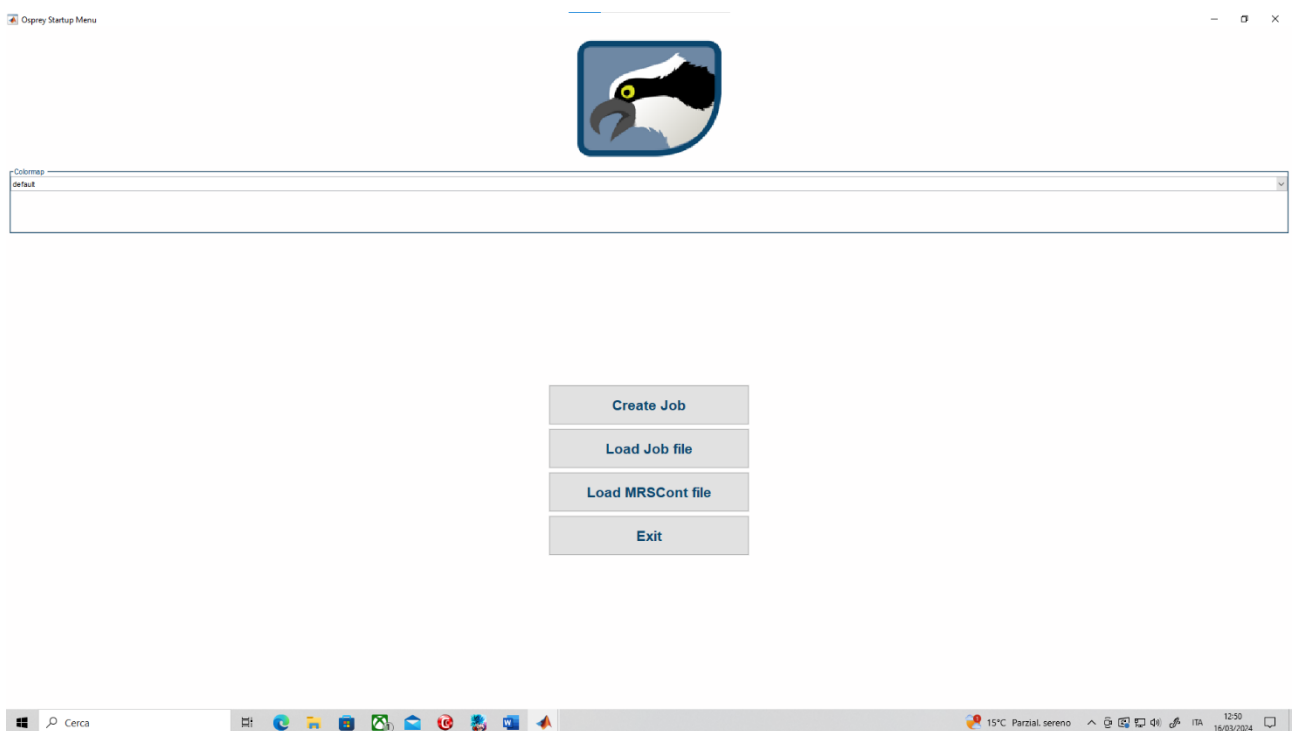


Figura 18 Interfaccia grafica di Osprey

Per creare il file job bisogna inserire i parametri della sequenza di acquisizione, dei modelli spettrali dei vari metaboliti che si desidera quantificare (i così detti basis set) per l'analisi, i files da analizzare, i metaboliti da ricercare e quali altri metaboliti ricercare, oltre a fornire una cartella per salvare l'output fornito dal software. Finita la preparazione premendo create Job partirà l'analisi.

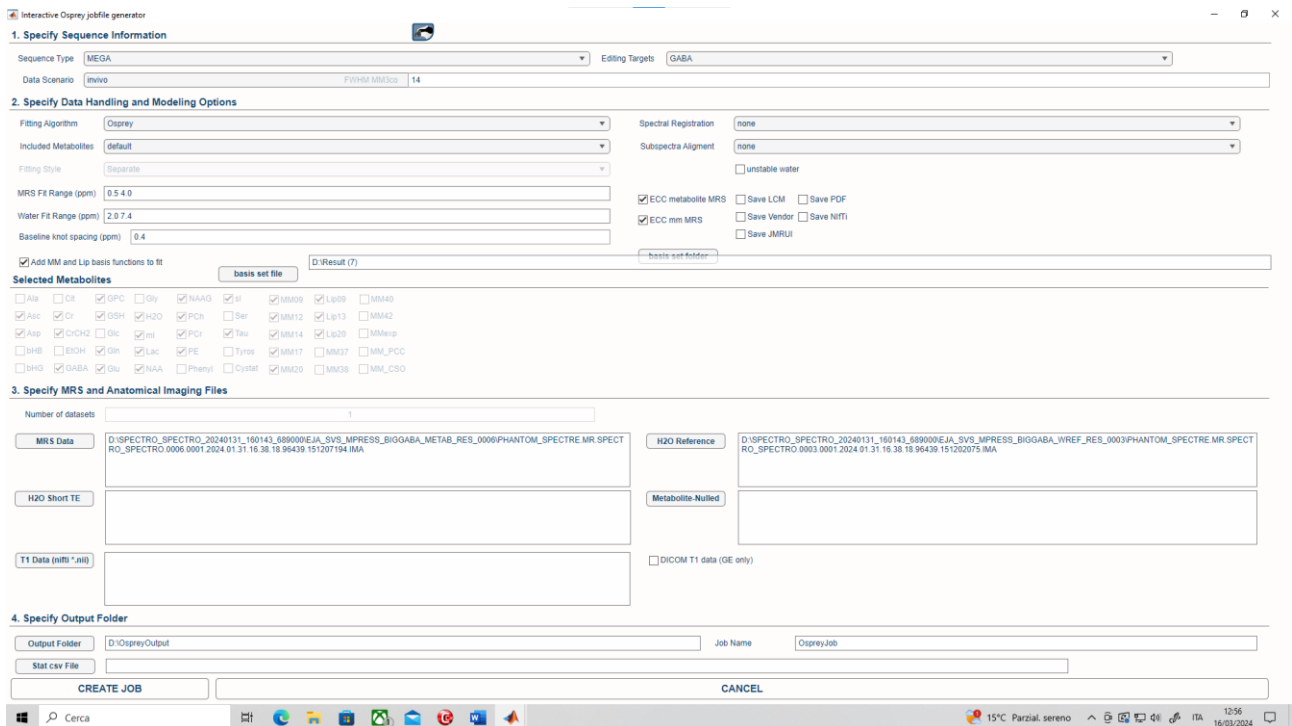


Figura 19 Interfaccia di Create Job con parametri già inseriti

Una volta creato il Job file verrà salvato e potrà essere riutilizzato selezionando Lod Job file che aprirà l'interfaccia che si vede in figura 20.

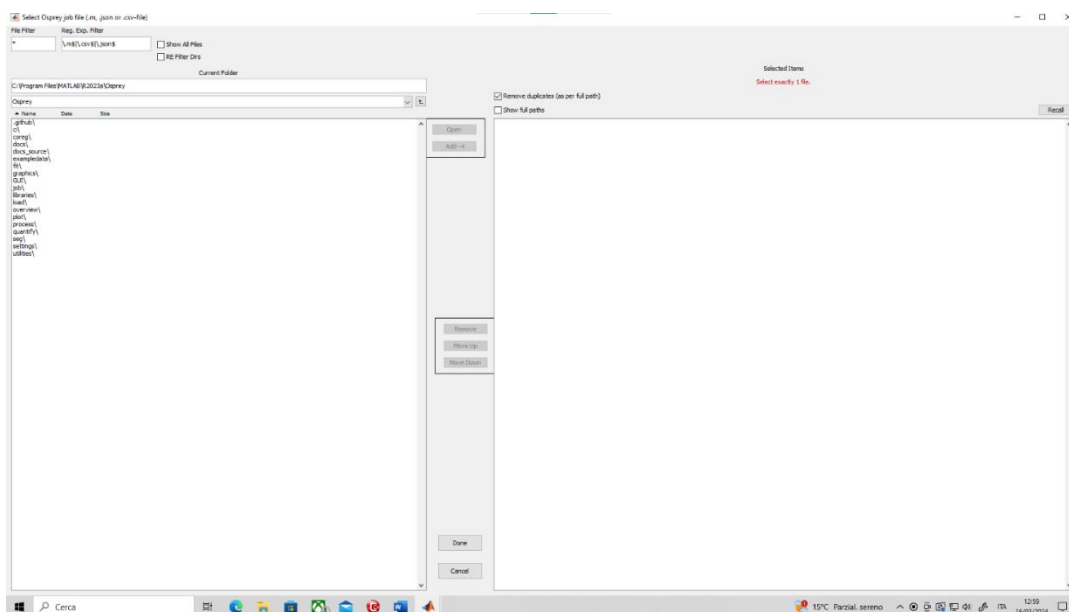


Figura 20 Interfaccia di Load Job file

4.5 Basis set

Nella fase di fit i software presentati necessitano dei modelli a priori. Nel caso di Osprey è necessario fornire dei basis set, ovvero dei modelli spettrali dei vari metaboliti adatti per poter eseguire analisi su dati di spettroscopia riguardanti il GABA, soprattutto se ottenuti attraverso l'impiego della sequenza di spettroscopia MEGAPRESS a meno che non si decida di creare un file basis set vuoto per poter comunque eseguire l'analisi. Per poter rimediare a questo problema i basis set necessari devono venire acquistati oppure possono essere progettati, si è deciso di optare per la seconda scelta. I basis set sono stati progettati manualmente attraverso l'utilizzo dei parametri selezionati per avviare la sequenza di spettroscopia di acquisizione e selezionando tra i metaboliti disponibili quelli di interesse (i metaboliti che erano presenti nel/nei phantom/s che si vogliono analizzare). Per la progettazione dei basis set è stato utilizzato il [MRICloud | Brain Mapping](#).

BrainGPS (Brain Geodesic Positioning System) è una delle applicazioni all'interno del sito. Questo sistema utilizza risorse di supercalcolo per fornire ai propri utilizzatori tecniche di analisi di immagine all'avanguardia- Al momento questo SaaS (Software as a Service) include:

1. Segmentazione multi-atlante di immagini pesate in T1.
2. Elaborazione DTI e segmentazione multi-atlante di materia bianca.
3. Calcolo di mappe quantitative di suscettibilità e segmentazione multi-atlante dei nuclei profondi.
4. Analisi fMRI allo stato di riposo ed analisi di connettività basate su atlante.
5. Calcolo di mappe di reattività cerebrovascolari e strumenti di quantificazione regionale basati su atlante.
6. Calcolo di mappe di reattività cerebrovascolari da dati fMRI allo stato di riposo.
7. Calcolo di mappe ASL (arterial spin labeling) e strumenti di quantificazione regionale basati su atlante.
8. Generazione di basis set per dati di spettroscopia MR a 3T.

Il punto 8 è l'applicazione necessaria per generare i basis set e può essere raggiunto selezionando "MRSCloud" sul sito. Nella pagina (visualizzabile nella figura sottostante) si inseriranno i parametri necessari e si procederà in seguito all'invio del job che porterà alla creazione del basis set.

MRS Simulation

To start over, refresh the page.

To check status of your job, go to "My job status" page.

METABOLITES TO BE INCLUDED IN THE BASIS SET

<p>Common metabolites for healthy brain</p> <input type="checkbox"/> Select All	<p>Metabolites for specific interests</p> <input type="checkbox"/> Select All	<p>Exogenous Compounds</p> <input type="checkbox"/> Select All	<p>List of abbreviations</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2-Hydroxyglutarate (2HG) 2. Acetate (Ace) 3. Acetoacetate (AcAc) 4. Acetone (AcO) 5. Alanine (Ala) 6. Ascorbic Acid (Asc) 7. Aspartic Acid (Asp) 8. Choline-containing Compounds (PCh) 9. Citrate (Cit) 10. Creatine (Cr) 11. Cystathionine (Cystat) 12. Ethanol (EtOH) 13. Ethanolamine (EA) 14. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) 15. Glutamate (Glu) 16. Glutamine (Gln) 17. Glutathione (GSH) 18. Glycine (Gly) 19. Inositol (Ino) 20. Lactate (Lac) 21. Lysine (Lys) 22. Methionine (Met) 23. Lactate (Lac) 24. Lysine (Lys) 25. Methyl-sulfonyl-methane (MSM) 26. Myo-Inositol (mi) 27. N-Acetyl Aspartate (NAA) 28. N-Acetyl Aspartyl Glutamate (NAAG) 29. Phenylalanine (Phenyl) 30. Phosphocreatine (PCr) 31. Phosphorylethanolamine (PE) 32. Pyruvate (Pyr) 33. Scyllo-Inositol (sl) 34. Serine (Ser) 35. Succinate (Suc) 36. Taurine (Tau) 37. Threonine (Thr) 38. Tryptophan (Tryp)
<input type="checkbox"/> Asc <input type="checkbox"/> Gln <input type="checkbox"/> NAAG <input type="checkbox"/> Asp <input type="checkbox"/> Glu <input type="checkbox"/> PCh <input type="checkbox"/> Cr <input type="checkbox"/> Gly <input type="checkbox"/> PCr <input type="checkbox"/> EA <input type="checkbox"/> H2O <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> GABA <input type="checkbox"/> Lac <input type="checkbox"/> Ser <input type="checkbox"/> GPC <input type="checkbox"/> ml <input type="checkbox"/> sl <input type="checkbox"/> GSH <input type="checkbox"/> NAA <input type="checkbox"/> Tau	<input type="checkbox"/> Ala <input type="checkbox"/> Lys <input type="checkbox"/> Gua <input type="checkbox"/> Ace <input type="checkbox"/> Thr <input type="checkbox"/> iLe <input type="checkbox"/> AcO <input type="checkbox"/> bHG <input type="checkbox"/> Pyr <input type="checkbox"/> AcAc <input type="checkbox"/> Tyros <input type="checkbox"/> Suc <input type="checkbox"/> Cit <input type="checkbox"/> Val <input type="checkbox"/> Tryp <input type="checkbox"/> Cystat <input type="checkbox"/> Phenyl <input type="checkbox"/> HCar <input type="checkbox"/> bHB	<input type="checkbox"/> EtOH <input type="checkbox"/> MSM	

(Cystat, HCar, iLe and Lys have complex J coupling spin systems and will significantly increase the simulation time)

*bHG = 2-Hydroxyglutarate(2HG)

LOCALIZATION

PRESS

VENDOR

GE

EDITING

UnEdited

TE (ms)

68

DESCRIPTION: (e.g. AD_subject1)

write job description here

Progress

Submit

Figura 21 Pagina dove inserire i parametri

Una volta che sono stati selezionati i parametri, entro un'ora il file, in assenza di errori nella progettazione da parte del sistema (in quel caso il job presenterà a fianco la dicitura "failed" e non sarà ovviamente utilizzabile) verrà generato e potrà essere utilizzato per le analisi.

Job Status

Warning: Due to limited storage space, all jobs and their results will be deleted from our server after 60 days from submission date, please download results in time.

Warning: Every user has a monthly quota of 50 job submissions.

Most failed jobs are due to improperly formatted data. If you experience failed jobs, please follow the submission instruction and resubmit. If problem persists, please contact the person on the submission page with corresponding job ids or md5sums.

LIST OF YOUR JOBS 1

ID	md5sum (if any)	Submission Date	Job Type	Description	Status	Action	Delete
79985		2024-02-19 15:17:39 UTC	MRSCloud		submitted	please check back later	Delete

Figura 22 Schermata che mostra lo stato del job

Capitolo 5

5. Risultati

I fantocci sono stati analizzati usando i software Gannet ed Osprey precedentemente descritti. Il primo fantoccio analizzato è stato il Fantoccio_tampone poiché non conteneva alcun metabolita ma solamente soluzione tampone. È stato il primo fantoccio poiché è il più semplice da analizzare in modo da analizzare successivamente fantocci con crescente numero di metaboliti; quindi, più complessi fino a giungere allo SPECTRE, il fantoccio mima le concentrazioni fisiologiche dei principali metaboliti rilevabili in aree cerebrali ed è quindi il più complesso.

Se i dati sono stati acquisiti con sequenza MEGAPRESS; Gannet, permette di analizzare solo determinati metaboliti ed uno alla volta. Scelto un metabolita target ed eseguita l'analisi, bisogna cambiare il target nella funzione GannetPreInitialise.m (descritta a pagina 55, sezione 4.4.1) con un nuovo target e ripetere l'analisi per poter quantificare il nuovo metabolita.

5.1 Water reference

La figura 23 mostra la frequenza osservata media per media dell'andamento della water reference e le linee tratteggiate rappresentano la deviazione standard. Spostamenti delle frequenze oltre questi limiti indicano offset sopra media che portano problematicità sulla fedeltà dei dati acquisiti ed in questo caso non succede.

La figura 24 invece rappresenta lo spettrogramma per la Cr media per media, non essendo presente il metabolita all'interno di questi fantocci lo spettrogramma non dà informazioni sulla distorsione spaziale.

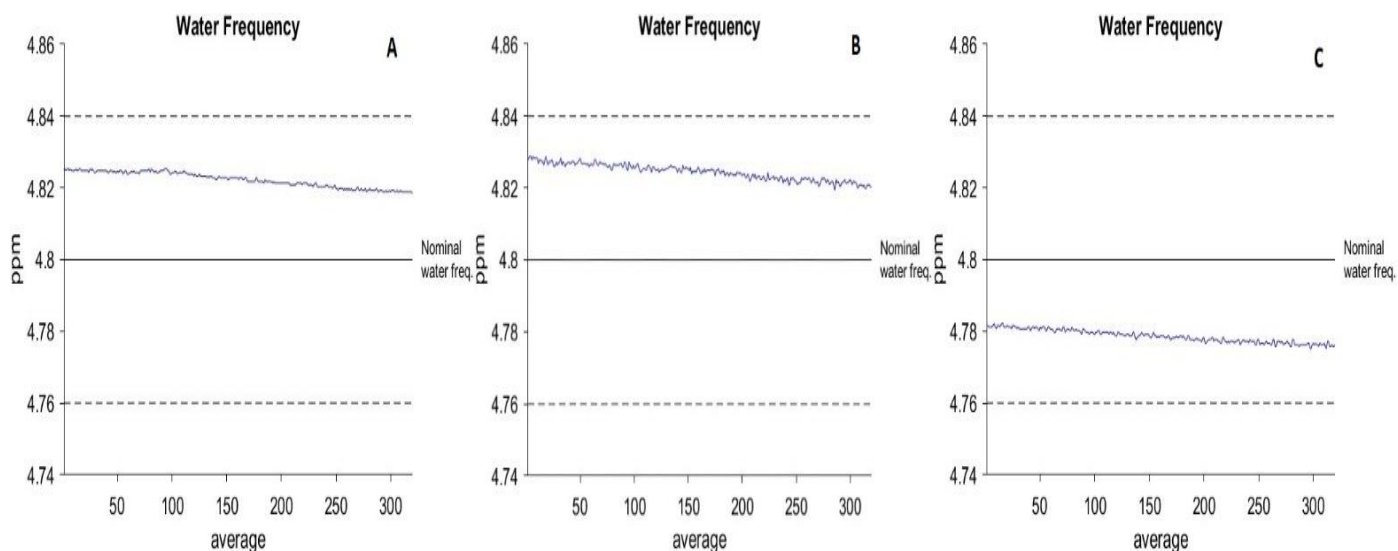


Figura 23 Andamento della water reference per i tre fantocci. Il pannello A fa riferimento al Fantoccio_tampone, il B al Fantoccio_GABA, il C al Fantoccio_GABA+Glx

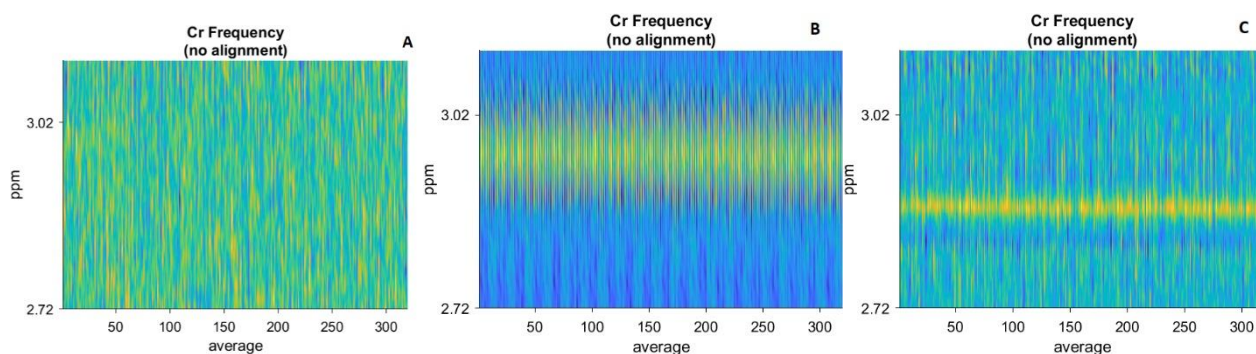


Figura 24 La figura mostra gli spettrogrammi per la Cr a 3 ppm. A indica il Fantoccio_tampone, B il Fantoccio_GABA, C il Fantoccio_GABA+Glx

5.2 Fantoccio_tampone

I primi risultati sono stati quelli ottenuti analizzando il fantoccio tampone che conteneva solo soluzione tampone per poter verificare che lo spettro ottenuto con Gannet desse come risultato delle concentrazioni di GABA e Glx un valore di 0 mM. I risultati hanno confermato questa ipotesi, mostrando non solo le concentrazioni nulle ma anche come i dati del Fantoccio_tampone non coincidessero con i modelli per i metaboliti GABA e Glx, come auspicabile visto che il fantoccio contiene solamente soluzione tampone.

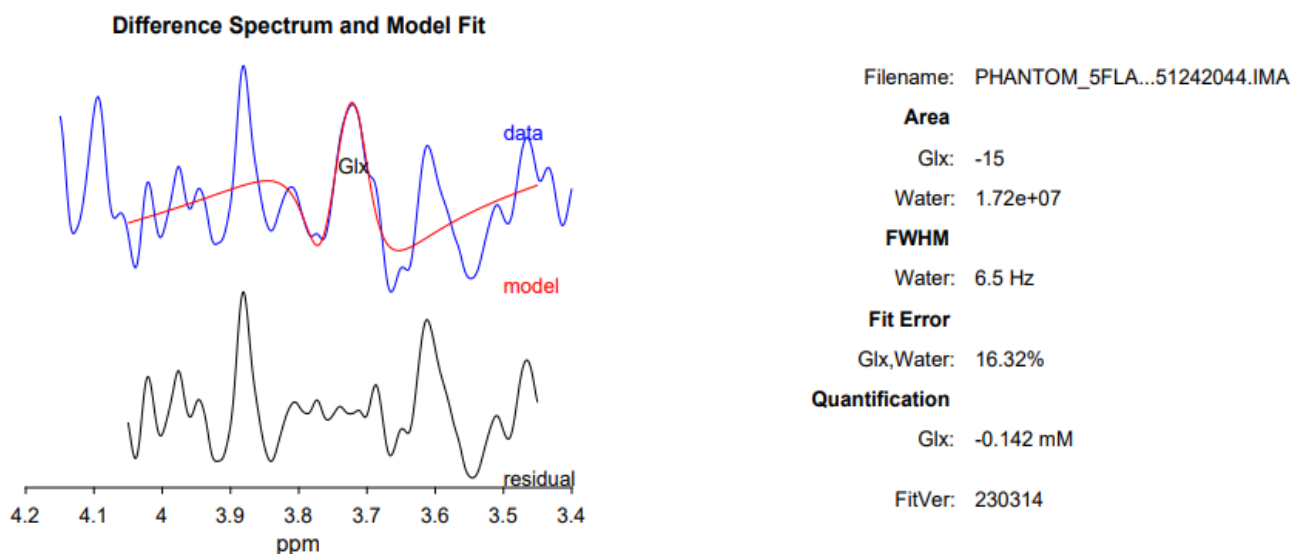
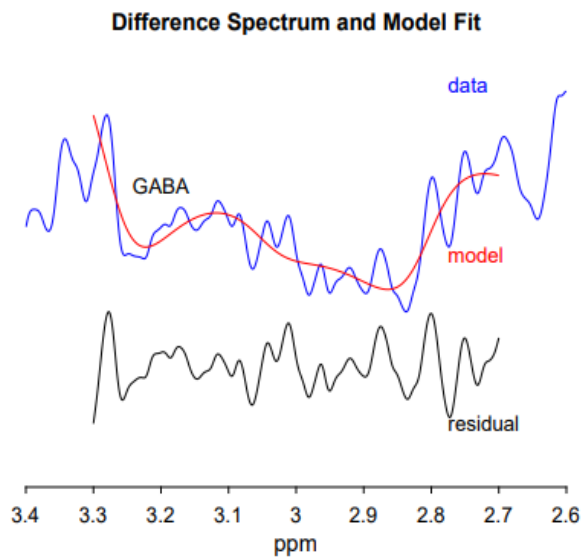


Figura 25 L'analisi del metabolita Glx del Fantoccio_tampone mostra come la sua concentrazione sia sostanzialmente nulla (Quantification = -0.142 mM)



Filename: PHANTOM_5FLA...51242044.IMA

Area
 GABA: -2.2
 Water: 1.72e+07

FWHM
 Water: 6.5 Hz

Fit Error
 GABA, Water: 43.32%

Quantification
 GABA: -0.012 mM

FitVer: 230314

Figura 26 L'analisi del metabolita GABA del Fantoccio_tampone mostra come la sua concentrazione sia sostanzialmente nulla (Quantification = -0.012 mM)

5.3 Fantoccio_GABA

Eseguite le prime analisi si è deciso di analizzare dei fantocci che contenessero GABA, il primo fantoccio analizzato è stato il Fantoccio_GABA poiché è l'unico fantoccio contenente GABA che non contiene altri metaboliti oltre ad esso.

Le analisi hanno mostrato qualitativamente un'ottima comparazione tra lo spettro dei dati ottenuti e lo spettro del modello per il GABA ma un valore di concentrazione minore a quello atteso (14.691 mM contro 25 mM). Sebbene il fantoccio non contenesse Glx si è eseguita un'analisi dello spettro anche per quel metabolita per poter verificare che la sua concentrazione fosse nulla.

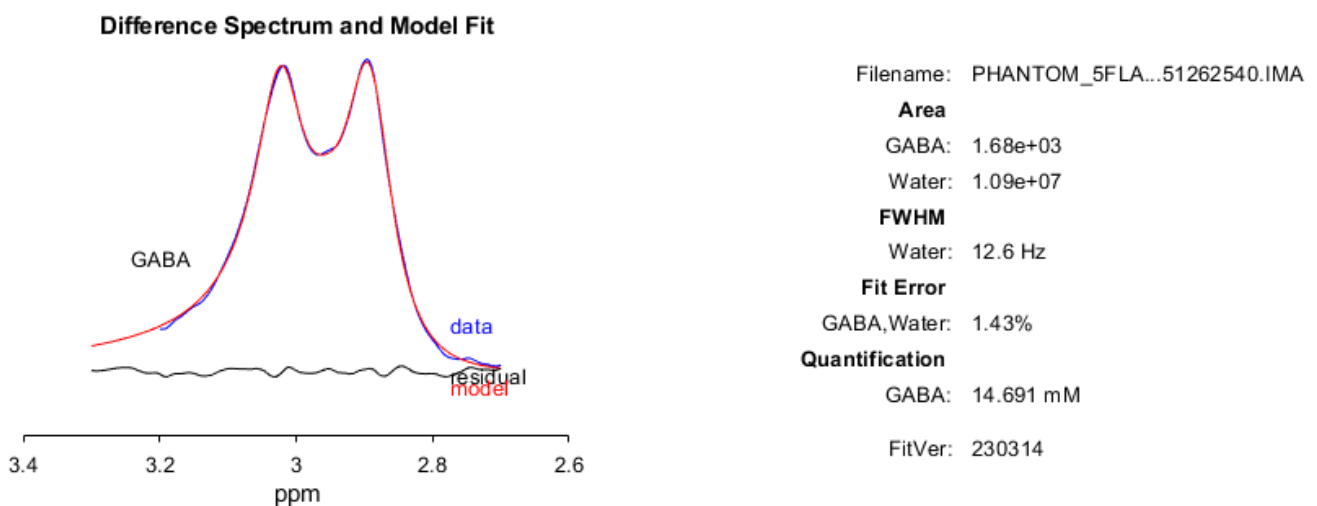


Figura 27 La figura mostra come lo spettro del modello e dei dati combacino

La figura 28 mostra come la concentrazione del Glx sia 0.702 mM, quindi trascurabile rispetto alla misura della concentrazione di GABA. Il Fit Error risulta essere molto più elevato rispetto allo stesso Error quando si è analizzato il GABA (13,79% contro 1,45%).

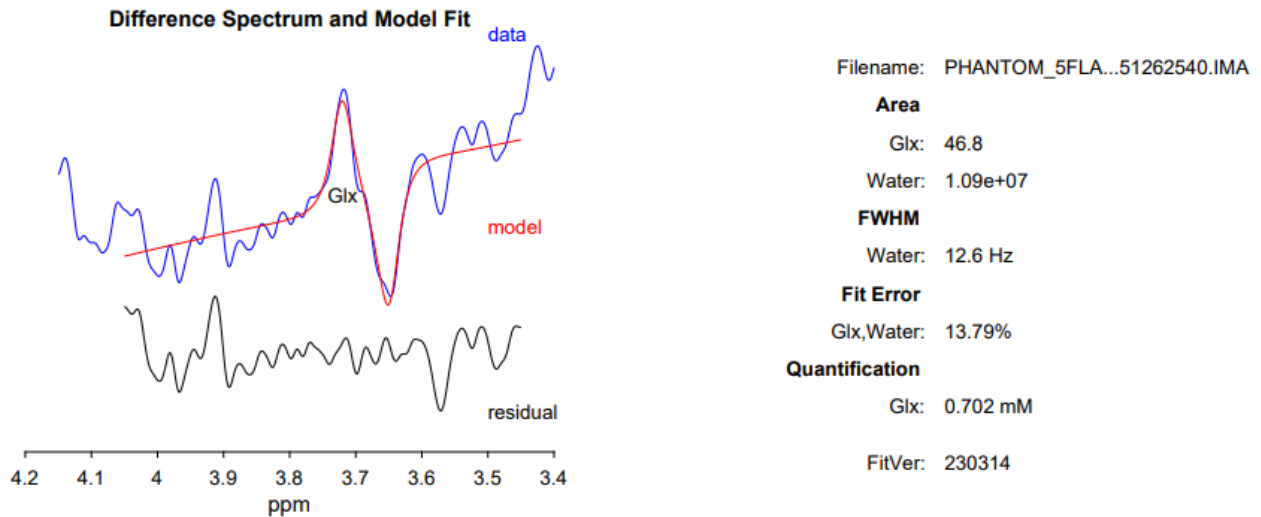


Figura 28 La figura mostra una differenza tra modello e dati ed una concentrazione di Glx vicina allo 0

La figura 29 mostra lo spettro relativo al Fantoccio_GABA ottenuto con il software Osprey. Il software non indica a quale metabolita si riferisce ciascun picco

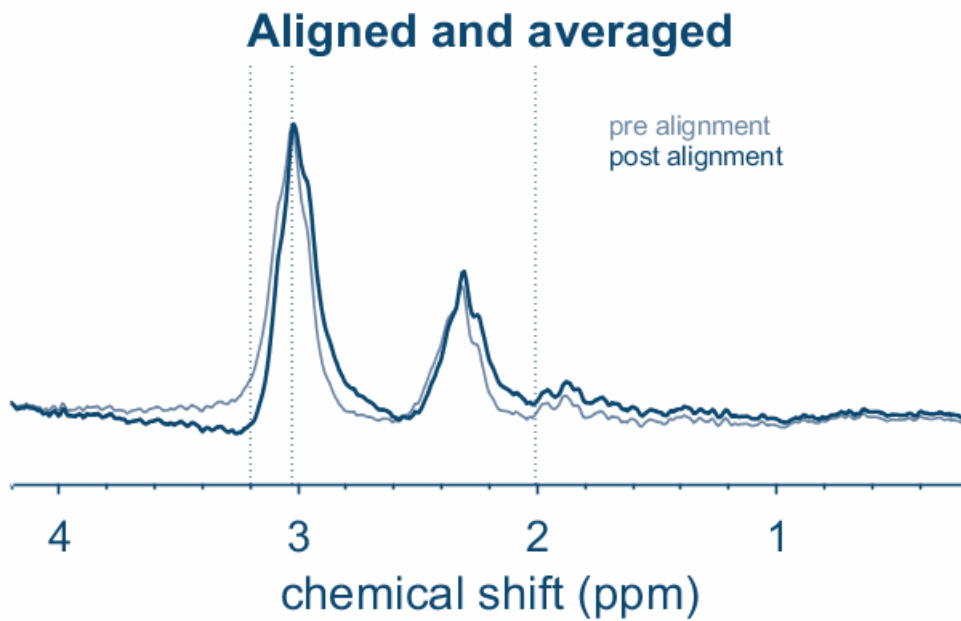


Figura 29 La figura mostra lo spettro del Fantoccio_GABA ottenuto con Osprey

5.4 Fantoccio_GABA+Glx

Il Fantoccio_GABA+Glx contiene oltre al GABA anche Glu e Gln, identificati come Glx poiché Gannet non è in grado di separarli. L'analisi sulla concentrazione del GABA all'interno della flask ha portato ad un risultato simile a quello ottenuto per il Fantoccio_GABA, il modello del GABA del software fitta correttamente con i dati ma la concentrazione del metabolita risultava minore rispetto alla concentrazione attesa.

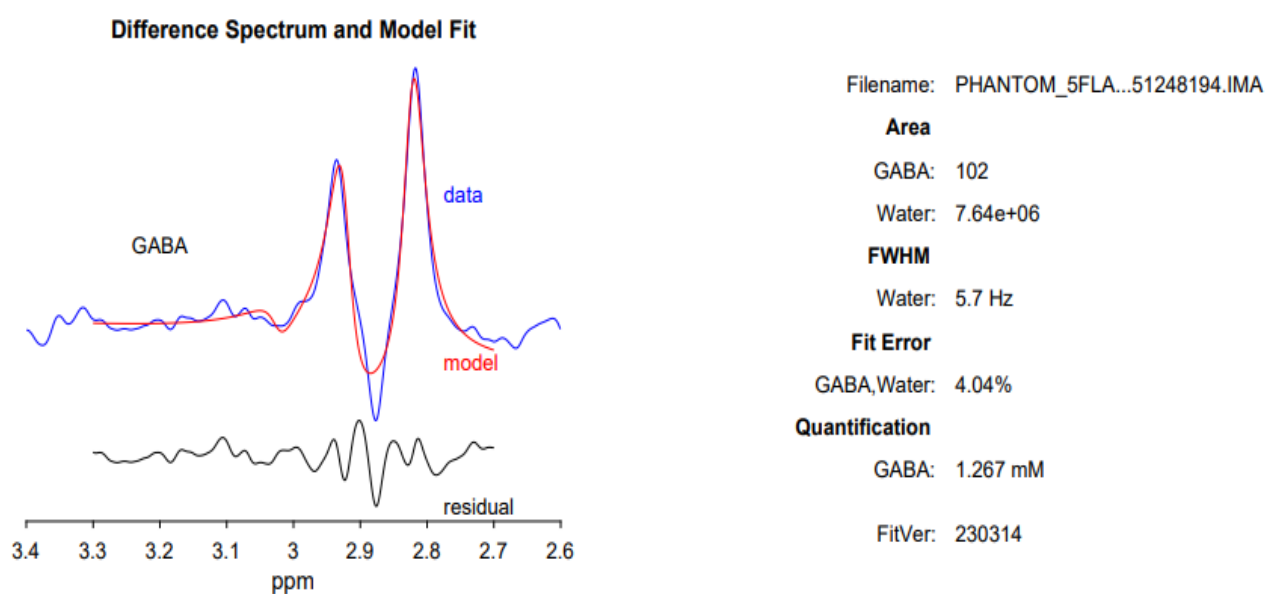


Figura 30 La figura mostra lo spettro del Fantoccio_GABA+Glx e la concentrazione di GABA misurata

Il rapporto tra la concentrazione di GABA del Fantoccio_GABA e del Fantoccio_GABA+Glx riflette correttamente quello delle concentrazioni originali.

5.5 SPECTRE

Visto che lo scopo di questo progetto di tesi era di riuscire a quantificare completamente il GABA per valutare se in futuro sia fattibile effettuare esperimenti in vivo su animali e/o persone, l'ultimo fantoccio analizzato è stato lo SPECTRE, fantoccio dalla composizione molto più complessa rispetto ai precedenti poiché contenente tutti i principali metaboliti che si possono riscontrare in vivo nelle aree cerebrali.

5.5.1 Analisi dello SPECTRE con Gannet

SPECTRE water reference e Cr

L'analisi sui dati acquisiti con lo SPECTRE effettuata con Gannet mostra un buon allineamento e nessuna distorsione del segnale. La figura 31 mostra gli spettri di differenza modificati dopo allineamento di fase e frequenza.

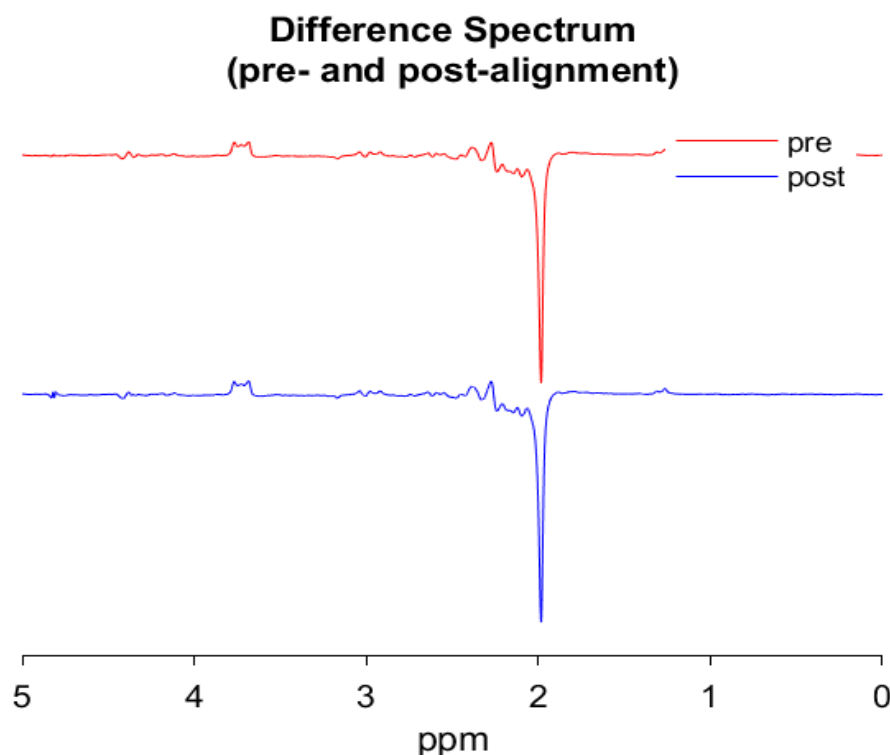


Figura 31 Spettro di differenza pre e post allineamento

Nella figura 32 si mostra come lo spettrogramma della Cr, essendo un metabolita presente nel fantoccio, sia migliore rispetto agli spettrogrammi precedentemente mostrati dei fantocci.

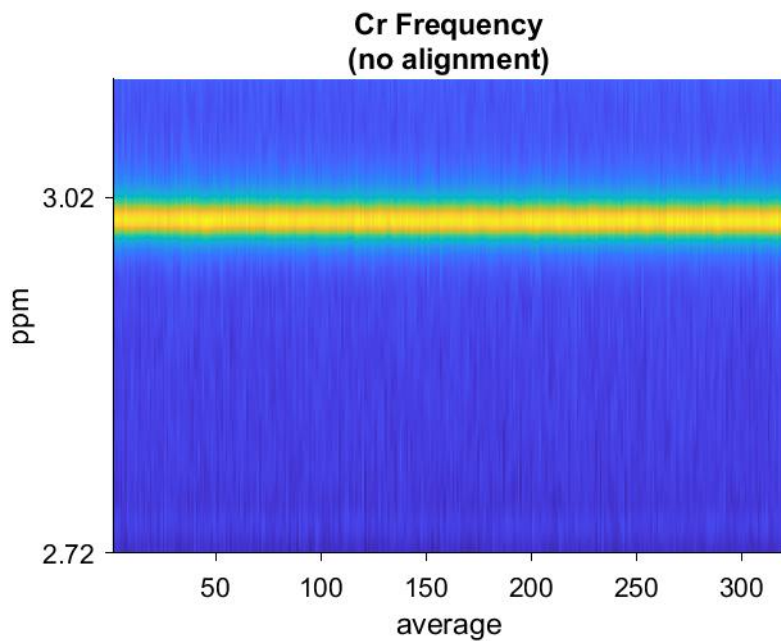


Figura 32 Spettrogramma della Cr per lo SPECTRE

La figura 33 mostra come le precedenti figure un buon andamento della frequenza dell'acqua che è indice di una buona fedeltà dei dati acquisiti.

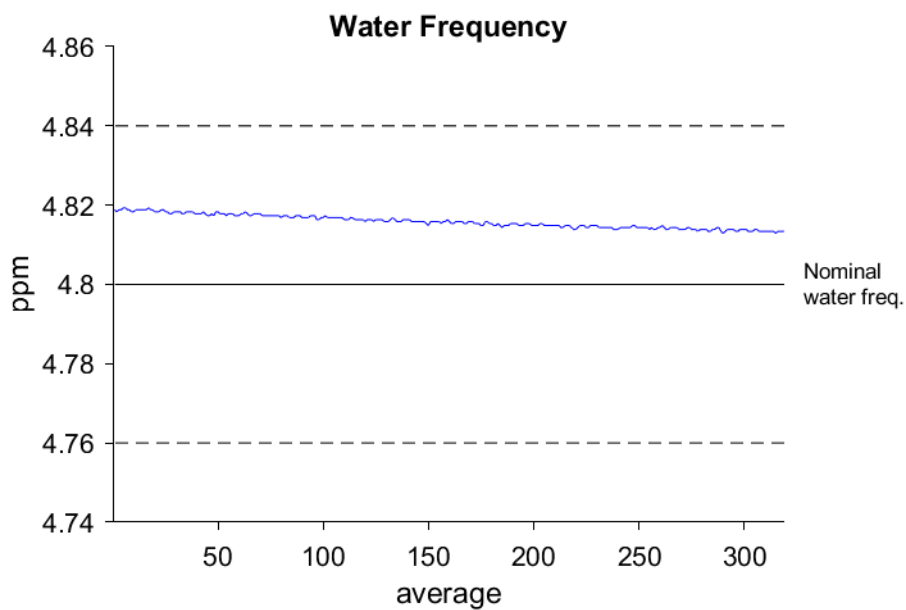


Figura 33 Andamento della frequenza dell'acqua media per media

Quantificazione del lattato nello SPECTRE

Il lattato è uno dei metaboliti presenti all'interno del phantom SPECTRE quantificabile con Gannet che mostra una caratteristica particolare nei modelli di spettroscopia, ovvero due accoppiamenti deboli nella MRS che risultano in un doppietto.

Nella figura 34 si mostra come lo spettro dei dati SPECTRE e del modello combacino ed il lattato abbia i picchi del doppietto rispettivamente a 1.31 ppm e 1.26 ppm. Per le acquisizioni è stato utilizzato un TE= 68ms che non è il TE adatto, poiché il migliore TE per vedere i picchi del Lac è 144ms, o 288ms per poter vedere il doppietto invertito.

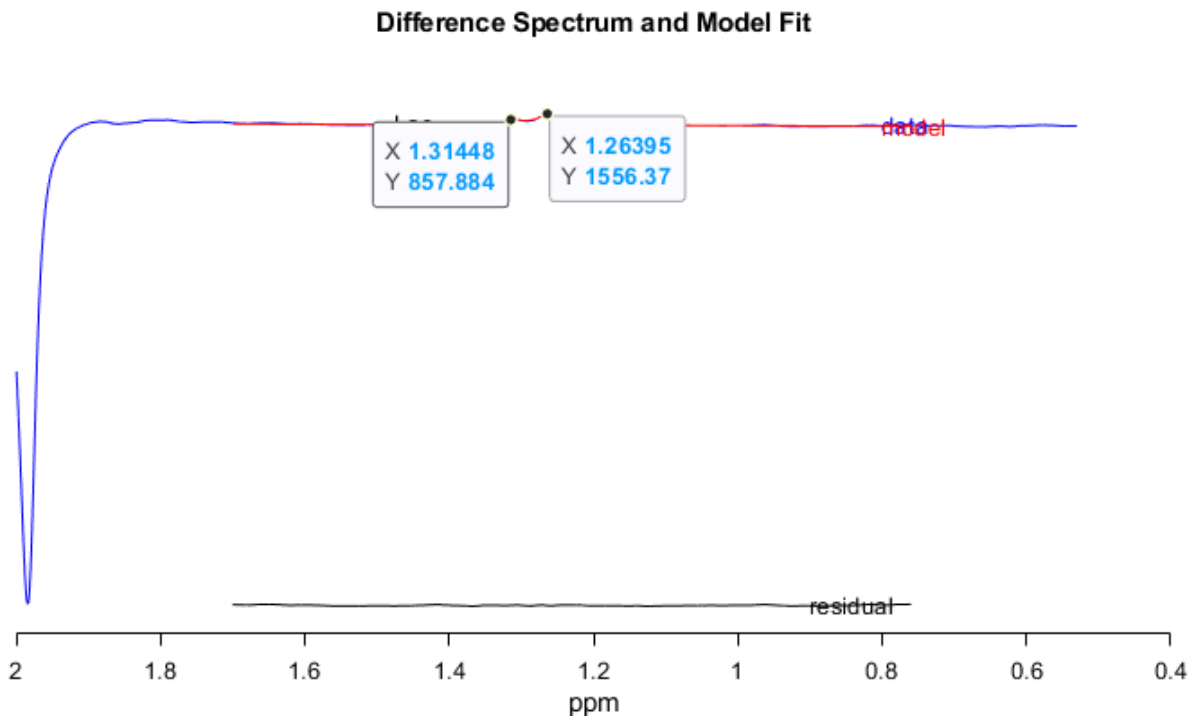


Figura 34 La figura mostra i due picchi del lattato rispettivamente a 1.31ppm e 1.26 ppm

Quantificazione del GABA nello SPECTRE

La quantificazione del GABA non ha rispecchiato i valori presenti nello SPECTRE, anche perchè, come si può notare in figura 35, i dati non fittavano correttamente il modello. Il valore di concentrazione di GABA rilevato da Gannet è stato di 0.031 mM che è un valore trascurabile; quindi, la nostra analisi non è riuscita a rilevare la concentrazione di GABA in presenza di altri metaboliti. Questa netta differenza rispetto alle analisi effettuate sugli altri fantocci potrebbe essere data dalla complessità dello SPECTRE rispetto agli fantocci che o contenevano GABA o pochi altri metaboliti di interesse.

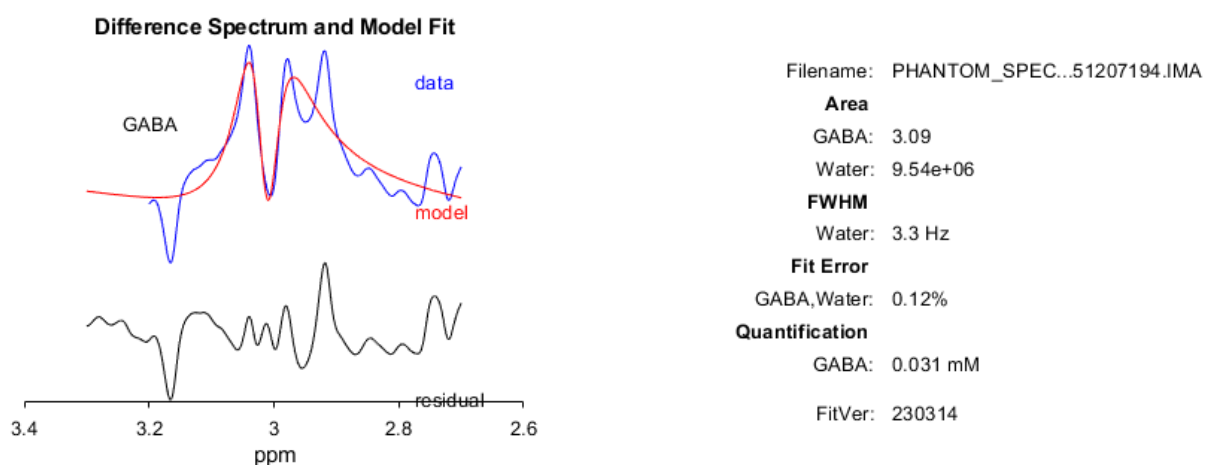


Figura 35 In figura la comparazione tra il modello dei dati ed il modello del GABA del software

5.5.2 Analisi dello SPECTRE con Osprey

L'analisi quantitativa dello SPECTRE effettuata con il software Osprey ha fornito gli spettri visualizzabili in figura 36 che sono comparabili con i metaboliti presenti nel fantoccio. Poichè Osprey considera più metaboliti insieme nella sua analisi è possibile confrontare l'output ottenuto (mostrati in Figura 36) con lo spettro riportato nel fantoccio e mostrati precedentemente (Figura 13 e 14 – capitolo 4.1.2).

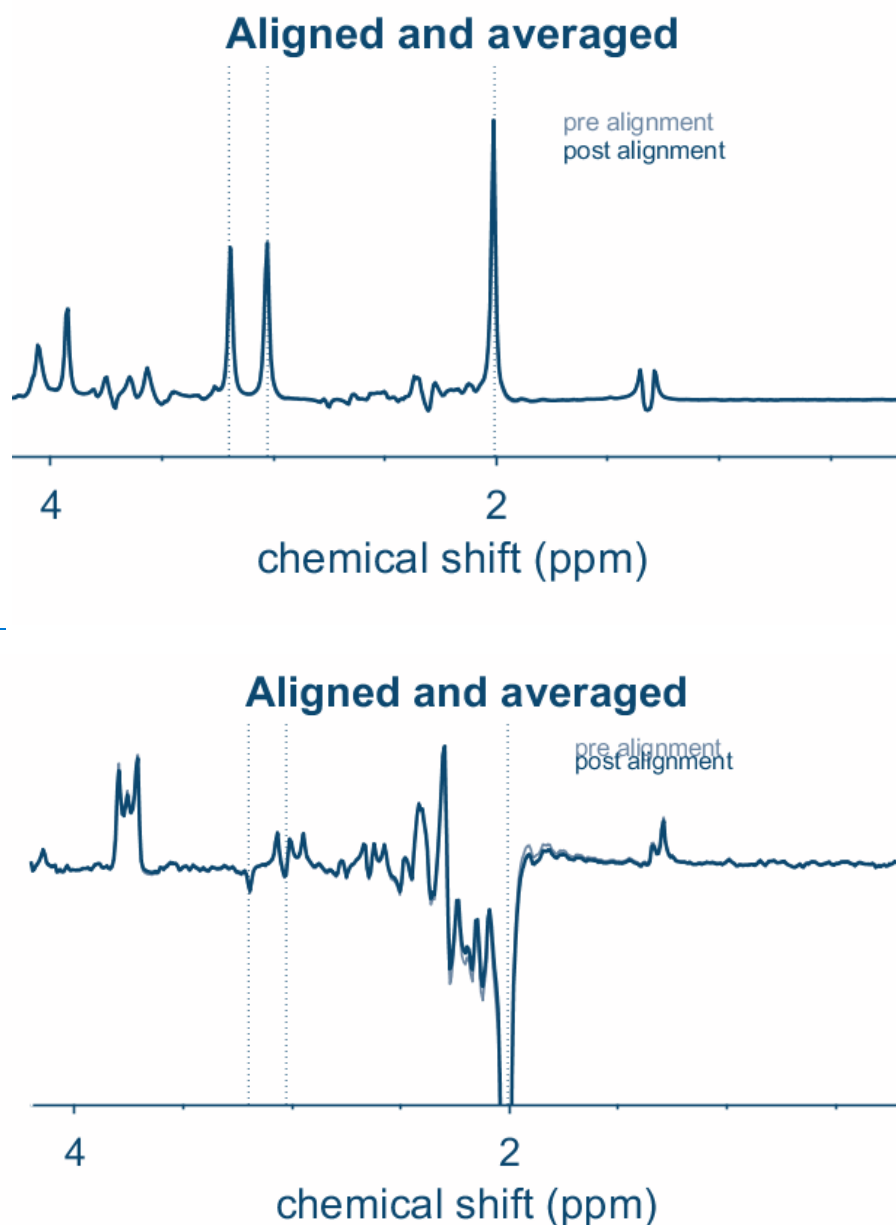


Figura 36 Mostra lo spettro quantitativo dello SPECTRE

Capitolo 6

6. Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi era l'implementazione e l'ottimizzazione di una procedura per l'acquisizione e l'analisi di dati di spettroscopia a risonanza magnetica per la rilevazione del GABA. In particolare, mi sono concentrato su l'analisi di fantocci, nell'ottica di una ricerca traslazionale orientata al vivo. Lo scopo ultimo sarà in futuro riuscire a rilevare le concentrazioni del GABA con tomografi di risonanza magnetica per l'utilizzo clinico potrebbe portare grandi benefici nello studio e nella cura di diverse patologie neurologiche le cui cause scatenanti risultano ancora poco note. I risultati ottenuti sono contrastanti e non ci hanno permesso di indicare un software di analisi palesemente superiore all'altro, poichè entrambi hanno presentato aspetti positivi e criticità. In particolare, con Gannet è stato possibile ottenere dei fit verosimili sui fantocci, in particolare per quanto riguarda quelli di composizione semplice poiché contenenti pochi metaboliti. I modelli e i dati sono risultati in accordo e il rapporto tra le quantificazioni del GABA nei diversi fantocci è risultato coerente. I limiti sono apparsi quando si è svolta l'analisi sullo SPECTRE, il fantoccio più complesso in quanto contenente tutti i principali metaboliti cerebrali rilevabili con MRS. Non è stato possibile ottenere nessuna quantificazione qualitativa delle concentrazioni dei metaboliti ma solamente una quantificazione quantitativa. È possibile che Gannet abbia delle performance migliori quando i metaboliti presenti sono pochi, dato che per costruzione stessa del software va indicato a priori un modello singolo, in particolare quando si tratta del solo GABA, che è lo scopo principale per cui è stato sviluppato il software.

Al contrario Osprey sembra riuscire a proporre dei modelli spettrali più simili al dato tanto più esso è complesso; infatti, è risultato migliore per l'analisi dei dati dello SPECTRE, ma non indica a quali metaboliti i picchi appartengono.

I dati comunque suggeriscono che la sequenza MEGAPRESS, seppur migliorabile in quanto ancora sperimentale, sia adeguata poiché i dati ottenuti rispecchiano il modello per i fantocci semplici. Anche la soppressione dell'acqua è risultata essere ottimale poiché in tutte le analisi effettuate i valori sono sempre risultati all'interno dei limiti della deviazione standard e nell'analisi dello SPECTRE, unico fantoccio contenente Cr non mostravano distorsione spettrale.

Le difficoltà riscontrate, per mia ipotesi, sono legate principalmente dai software utilizzati. Questi software sono pensati per eseguire delle analisi su dati di MRS in vivo e non su fantoccio. La maggior parte delle funzioni di Gannet sono pensate per un'analisi in vivo, anche se la sua specificità per il GABA, oggetto di nostro interesse, ci ha portati a valutarne comunque le funzionalità. Anche il software Osprey, come citato nel suo manuale, è finalizzato alla quantificazione di dati di spettroscopia in vivo.

Sebbene non sia stato possibile misurare con precisione il GABA, ritengo che in futuro si possa utilizzare la sequenza MEGAPRESS con i parametri precedentemente descritti (paragrafo 4.1.1) e rianalizzare lo SPECTRE con altri software, usando modelli specifici per l'analisi di fantocci. Una possibile direzione futura, inoltre, è quella di cercare dati in vivo in database open-source per poter testare l'analisi utilizzando i software citati.

Ringraziamenti

Vorrei innanzitutto ringraziare i miei relatori, prof.ssa Laura Bonzano e prof.re Mauro Costagli oltre che la correlatrice dott.ssa Monica Biggio per la costante disponibilità mostratami e per i loro preziosi consigli che mi hanno aiutato nello svolgere questo lavoro di tesi. Voglio ringraziare Chiara Lambruschini del dipartimento di chimica e Francesca Saviola per la disponibilità mostrata verso le mie richieste. Vorrei anche ringraziare la mia famiglia e i miei amici per avermi supportato in questo lungo viaggio ma soprattutto vorrei ringraziare mio padre Marco Cantelli che, anche se non c'è più, rimane per me una costante fonte di ispirazione e sostegno nonché la persona principale che mi ha motivato nell'intraprendere il percorso ingegneristico.

Bibliografia

- 1) Akyuz E, Polat AK, Eroglu E, Kullu I, Angelopoulou E, Paudel YN. Revisiting the role of neurotransmitters in epilepsy: An updated review. *Life Sci.* 2021 Jan 15;265:118826. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118826. Epub 2020 Nov 28. PMID: 332598
- 2) Bell TK, Craven AR, Hugdahl K, Noeske R, Harris AD. Functional Changes in GABA and Glutamate during Motor Learning. *eNeuro.* 2023 Feb 24;10(2):ENEURO.0356-20.2023. doi: 10.1523/ENEURO.0356-20.2023. PMID: 36754626; PMCID: PMC9961379.
- 3) Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron.* 2020 Jul 22;107(2):234-256. doi: 10.1016/j.neuron.2020.06.002. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32553197; PMCID: PMC7381373.
- 4) Bhattacharyya PK, Phillips MD, Stone LA, Bermel RA, Lowe MJ. Sensorimotor cortex gamma-aminobutyric acid concentration correlates with impaired performance in patients with MS. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013 Sep;34(9):1733-9. doi: 10.3174/ajnr.A3483. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23493890; PMCID: PMC7965622.
- 5) Bogner, Wolfgang & Hangel, Gilbert & Esmaeili, Morteza & Andronesi, Ovidiu. (2016). 1D-spectral editing and 2D multispectral in vivo(1)H-MRS and (1)H-MRSI - Methods and applications. *Analytical biochemistry.* 529. 10.1016/j.ab.2016.12.020.
- 6) Boecker, H. Imaging the Role of GABA in Movement Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13, 385 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0385-9>
- 7) Caire MJ, Reddy V, Varacallo M. Physiology, Synapse. [Updated 2023 Mar 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526047/>
- 8) Cawley N, Solanky BS, Muhlert N, Tur C, Edden RA, Wheeler-Kingshott CA, Miller DH, Thompson AJ, Ciccarelli O. Reduced gamma-aminobutyric acid concentration is associated with physical disability in progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2015 Sep;138(Pt 9):2584-95. doi: 10.1093/brain/awv209. PMID: 26304151; PMCID: PMC4643627.
- 9) Chan KL, Ouwerkerk R, Barker PB. Water suppression in the human brain with hypergeometric RF pulses for single-voxel and multi-voxel MR spectroscopy. *Magn Reson Med.* 2018 Oct;80(4):1298-1306. doi: 10.1002/mrm.27133. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29446118; PMCID: PMC6092253.
- 10) Chen C, Zhou X, He J, Xie Z, Xia S, Lu G. The Roles of GABA in Ischemia-Reperfusion Injury in the Central Nervous System and Peripheral Organs. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Nov 11;2019:4028394. doi: 10.1155/2019/4028394. PMID: 31814874; PMCID: PMC6878816.

- 11) Czapski GA, Strosznajder JB. Glutamate and GABA in Microglia-Neuron Cross-Talk in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 28;22(21):11677. doi: 10.3390/ijms222111677. PMID: 34769106; PMCID: PMC8584169.
- 12) Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond).* 2016 Dec;16(Suppl 6):s53-s59. doi: 10.7861/clinmedicine.16-6-s53. PMID: 27956442; PMCID: PMC6329568.
- 13) Edden RA, Puts NA, Harris AD, Barker PB, Evans CJ. Gannet: A batch-processing tool for the quantitative analysis of gamma-aminobutyric acid–edited MR spectroscopy spectra. *J Magn Reson Imaging.* 2014 Dec;40(6):1445-52. doi: 10.1002/jmri.24478. Epub 2013 Nov 13. PMID: 25548816; PMCID: PMC4280680.
- 14) Egerton A, Modinos G, Ferrera D, McGuire P. Neuroimaging studies of GABA in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. *Transl Psychiatry.* 2017 Jun 6;7(6):e1147. doi: 10.1038/tp.2017.124. PMID: 28585933; PMCID: PMC5537645.
- 15) Farley A, Johnstone C, Hendry C, McLafferty E. Nervous system: part 1. *Nurs Stand.* 2014 Apr 2-8;28(31):46-51. doi: 10.7748/ns2014.04.28.31.46.e7004. PMID: 24689422.
- 16) (Frontiers | Cortical GABAergic Dysfunction in Stress and Depression: New Insights for Therapeutic Interventions (frontiersin.org))
- 17) Firbank MJ, Parikh J, Murphy N, Killen A, Allan CL, Collerton D, Blamire AM, Taylor JP. Reduced occipital GABA in Parkinson disease with visual hallucinations. *Neurology.* 2018 Aug 14;91(7):e675-e685. doi: 10.1212/WNL.0000000000006007. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30021920; PMCID: PMC6105043.
- 18) G Oeltzschner, HJ Zöllner, SCN Hui, M Mikkelsen, MG Saleh, S Tapper, RAE Edden. Osprey: Open-Source Processing, Reconstruction & Estimation of Magnetic Resonance Spectroscopy Data. *J Neurosci Meth* 343:108827 (2020).
- 19) Gujar SK, Maheshwari S, Björkman-Burtscher I, Sundgren PC. Magnetic resonance spectroscopy. *J Neuroophthalmol.* 2005 Sep;25(3):217-26. doi: 10.1097/01.wno.0000177307.21081.81. PMID: 16148633.
- 20) Guo J, Gang Z, Sun Y, Laine A, Small SA, Rothman DL. In vivo detection and automatic analysis of GABA in the mouse brain with MEGA-PRESS at 9.4 T. *NMR Biomed.* 2018 Jan;31(1). doi: 10.1002/nbm.3837. Epub 2017 Nov 3. PMID: 29105210.
- 21) Hyman SE. Neurotransmitters. *Curr Biol.* 2005 Mar 8;15(5):R154-8. doi: 10.1016/j.cub.2005.02.037. PMID: 15753022.
- 22) <https://byjus.com/biology/neurons/>
- 23) <https://goldstandardphantoms.com/products/spectre/>

- 24) <https://it.mathworks.com/>
- 25) <https://mricloud.org/>
- 26) <https://mstrust.org.uk/a-z/expanded-disability-status-scale-edss>
- 27) <https://radiopaedia.org/articles/spin-echo-sequences>
- 28) <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/Radiology-Safety/MR-Safety/MRGlossary.pdf>
- 29) https://www.aism.it/edss_scala
- 30) <https://www.contactsrl.it/sclerosi-multipla-invalidita-documento-valutazione/>
- 31) Huiskamp M, Yaqub M, van Lingen MR, Pouwels PJW, de Ruiter LRJ, Killestein J, Schwarte LA, Golla SSV, van Berckel BNM, Boellaard R, Geurts JGG, Hulst HE. Cognitive performance in multiple sclerosis: what is the role of the gamma-aminobutyric acid system? *Brain Commun.* 2023 May 3;5(3):fcad140. doi: 10.1093/braincomms/fcad140. PMID: 37180993; PMCID: PMC10174207.
- 32) Jansen JF, Backes WH, Nicolay K, Kooi ME. 1H MR spectroscopy of the brain: absolute quantification of metabolites. *Radiology.* 2006 Aug;240(2):318-32. doi: 10.1148/radiol.2402050314. PMID: 16864664.
- 33) Kalueff AV, Nutt DJ. Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety.* 2007;24(7):495-517. doi: 10.1002/da.20262. PMID: 17117412.
- 34) Klose U. Measurement sequences for single voxel proton MR spectroscopy. *Eur J Radiol.* 2008 Aug;67(2):194-201. doi: 10.1016/j.ejrad.2008.03.023. Epub 2008 Jul 2. PMID: 18599235.
- 35) Kolasinski J, Hinson EL, Divanbeighi Zand AP, Rizov A, Emir UE, Stagg CJ. The dynamics of cortical GABA in human motor learning. *J Physiol.* 2019 Jan;597(1):271-282. doi: 10.1113/JP276626. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30300446; PMCID: PMC6312422.
- 36) Kousi E, Tsougos I, Eftychi K. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of the Central Nervous System [Internet]. *Novel Frontiers of Advanced Neuroimaging.* InTech; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/53892>
- 37) Lange T, Dydak U, Roberts TP, Rowley HA, Bjeljac M, Boesiger P. Pitfalls in lactate measurements at 3T. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2006 Apr;27(4):895-901. PMID: 16611787; PMCID: PMC8133981.
- 38) Lapin I. Phenibut (beta-phenyl-GABA): a tranquilizer and nootropic drug. *CNS Drug Rev.* 2001 Winter;7(4):471-81. doi: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00211.x. PMID: 11830761; PMCID: PMC6494145.
- 39) Levy LM, Degnan AJ. GABA-based evaluation of neurologic conditions: MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013 Feb;34(2):259-65. doi: 10.3174/ajnr.A2902. Epub 2012 Jan 19. PMID: 22268095; PMCID: PMC7965110.

- 40) Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014 Jul 15;83(3):278-86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560. Epub 2014 May 28. PMID: 24871874; PMCID: PMC4117366.
- 41) Maruyama S, Fukunaga M, Sugawara SK, Hamano YH, Yamamoto T, Sadato N. Cognitive control affects motor learning through local variations in GABA within the primary motor cortex. *Sci Rep*. 2021 Sep 17;11(1):18566. doi: 10.1038/s41598-021-97974-1. PMID: 34535725; PMCID: PMC8448760.
- 42) Mikkelsen M, Barker PB, Bhattacharyya PK, Brix MK, Buur PF, Cecil KM, Chan KL, Chen DY, Craven AR, Cuypers K, Dacko M, Duncan NW, Dydak U, Edmondson DA, Ende G, Ersland L, Gao F, Greenhouse I, Harris AD, He N, Heba S, Hoggard N, Hsu TW, Jansen JFA, Kangarlu A, Lange T, Lebel RM, Li Y, Lin CE, Liou JK, Lirng JF, Liu F, Ma R, Maes C, Moreno-Ortega M, Murray SO, Noah S, Noeske R, Noseworthy MD, Oeltzschner G, Prisciandaro JJ, Puts NAJ, Roberts TPL, Sack M, Sailasuta N, Saleh MG, Schallmo MP, Simard N, Swinnen SP, Tegenthoff M, Truong P, Wang G, Wilkinson ID, Wittsack HJ, Xu H, Yan F, Zhang C, Zipunnikov V, Zöllner HJ, Edden RAE. Big GABA: Edited MR spectroscopy at 24 research sites. *Neuroimage*. 2017 Oct 1;159:32-45. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.07.021. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28716717; PMCID: PMC5700835.
- 43) Mikkelsen M, Harris AD, Edden RAE, Puts NAJ. Macromolecule-suppressed GABA measurements correlate more strongly with behavior than macromolecule-contaminated GABA+ measurements. *Brain Res*. 2018 Dec 15;1701:204-211. doi: 10.1016/j.brainres.2018.09.021. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30244020; PMCID: PMC6519711.
- 44) Mikkelsen M, Rimbault DL, Barker PB, Bhattacharyya PK, Brix MK, Buur PF, Cecil KM, Chan KL, Chen DY, Craven AR, Cuypers K, Dacko M, Duncan NW, Dydak U, Edmondson DA, Ende G, Ersland L, Forbes MA, Gao F, Greenhouse I, Harris AD, He N, Heba S, Hoggard N, Hsu TW, Jansen JFA, Kangarlu A, Lange T, Lebel RM, Li Y, Lin CE, Liou JK, Lirng JF, Liu F, Long JR, Ma R, Maes C, Moreno-Ortega M, Murray SO, Noah S, Noeske R, Noseworthy MD, Oeltzschner G, Porges EC, Prisciandaro JJ, Puts NAJ, Roberts TPL, Sack M, Sailasuta N, Saleh MG, Schallmo MP, Simard N, Stoffers D, Swinnen SP, Tegenthoff M, Truong P, Wang G, Wilkinson ID, Wittsack HJ, Woods AJ, Xu H, Yan F, Zhang C, Zipunnikov V, Zöllner HJ, Edden RAE. Big GABA II: Water-referenced edited MR spectroscopy at 25 research sites. *Neuroimage*. 2019 May

- 1;191:537-548. doi: 10.1016/j.neuroimage.2019.02.059. Epub 2019 Mar 3. PMID: 30840905; PMCID: PMC6818968.
- 45) Mlynárik V. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Anal Biochem.* 2017 Jul 15;529:4-9. doi: 10.1016/j.ab.2016.05.006. Epub 2016 May 19. PMID: 27210513.
- 46) Nantes JC, Proulx S, Zhong J, Holmes SA, Narayanan S, Brown RA, Hoge RD, Koski L. GABA and glutamate levels correlate with MTR and clinical disability: Insights from multiple sclerosis. *Neuroimage.* 2017 Aug 15;157:705-715. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.01.033. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28131894.
- 47) Ngo DH, Vo TS. An Updated Review on Pharmaceutical Properties of Gamma-Aminobutyric Acid. *Molecules.* 2019 Jul 24;24(15):2678. doi: 10.3390/molecules24152678. PMID: 31344785; PMCID: PMC6696076.
- 48) Peek AL, Rebbeck TJ, Leaver AM, Foster SL, Refshauge KM, Puts NA, Oeltzschner G; MRS Expert Panel. A comprehensive guide to MEGA-PRESS for GABA measurement. *Anal Biochem.* 2023 May 15;669:115113. doi: 10.1016/j.ab.2023.115113. Epub 2023 Mar 21. PMID: 36958511; PMCID: PMC10805000.
- 49) Perucca E, White HS, Bialer M. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: II. Treatments in Clinical Development. *CNS Drugs.* 2023 Sep;37(9):781-795. doi: 10.1007/s40263-023-01025-4. Epub 2023 Aug 21. PMID: 37603261; PMCID: PMC10501930.
- 50) Petroff OA. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist.* 2002 Dec;8(6):562-73. doi: 10.1177/1073858402238515. PMID: 12467378.
- 51) Prévot T, Sibille E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders. *Mol Psychiatry.* 2021 Jan;26(1):151-167. doi: 10.1038/s41380-020-0727-3. Epub 2020 Apr 28. PMID: 32346158.
- 52) Rhodes CJ. Magnetic Resonance Spectroscopy. *Science Progress.* 2017;100(3):241-292. doi:10.3184/003685017X14993478654307
- 53) Salminen A, Jouhten P, Sarajärvi T, Haapasalo A, Hiltunen M. Hypoxia and GABA shunt activation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2016 Jan;92:13-24. doi: 10.1016/j.neuint.2015.11.005. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26617286.
- 54) Sarasa SB, Mahendran R, Muthusamy G, Thankappan B, Selta DRF, Angayarkanni J. A Brief Review on the Non-protein Amino Acid, Gamma-amino Butyric Acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Curr Microbiol.* 2020 Apr;77(4):534-544. doi: 10.1007/s00284-019-01839-w. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31844936.
- 55) Silverthorn Dee, *Human Physiology An Integrated Approach*, 6th edition, Pearson Education, 2013

- 56) Song Y, Gong T, Edden RAE, Wang G. Feasibility of Measuring GABA Levels in the Upper Brainstem in Healthy Volunteers Using Edited MRS. *Front Psychiatry*. 2020 Aug 14;11:813. doi: 10.3389/fpsy.2020.00813. PMID: 32922319; PMCID: PMC7456914.
- 57) Song Y, Gong T, Saleh MG, Mikkelsen M, Wang G, Edden RAE. Upper brainstem GABA levels in Parkinson's disease. *MAGMA*. 2021 Oct;34(5):689-696. doi: 10.1007/s10334-021-00910-7. Epub 2021 Mar 20. PMID: 33745095; PMCID: PMC9650558.
- 58) Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol*. 2021 Jul 5;220(7):e202103052. doi: 10.1083/jcb.202103052. Epub 2021 Jun 4. PMID: 34086051; PMCID: PMC8186004.
- 59) Thau L, Reddy V, Singh P. Anatomy, Central Nervous System. [Updated 2022 Oct 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5421>
- 60) Valk, J., van der Knaap, M.S. (1989). Magnetic Resonance Spectroscopy, Basic Principles, and Application in Myelin Disorders. In: *Magnetic Resonance of Myelin, Myelination, and Myelin Disorders*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02568-0_51
- 61) Vecera CM, Courtes A, Jones G, Soares JC, Machado-Vieira R. Pharmacotherapies Targeting GABA-Glutamate Neurotransmission for Treatment-Resistant Depression. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Nov 7;16(11):1572. doi: 10.3390/ph16111572. PMID: 38004437; PMCID: PMC10675154.
- 62) Williamson JB, Lamb DG, Porges EC, Bottari S, Woods AJ, Datta S, Langer K, Cohen RA. Cerebral Metabolite Concentrations Are Associated With Cortical and Subcortical Volumes and Cognition in Older Adults. *Front Aging Neurosci*. 2021 Feb 3;12:587104. doi: 10.3389/fnagi.2020.587104. PMID: 33613261; PMCID: PMC7886995.