



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**“SPETTROSCOPIA A RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE
PER LO STUDIO DEL METABOLISMO IN VIVO”**

Relatore: Dott. Michele Schiavon

Laureanda: Alessia Del Pioluogo

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 27/09/2023

Sommario

La spettroscopia a risonanza magnetica (MRS) e l'imaging di spettroscopia a risonanza magnetica (MRSI) sono state recentemente introdotte come metodi affidabili basati sulla risonanza magnetica (RM) per mappare il metabolismo cellulare con alta precisione temporale e/o spaziale. Questi approcci consentono di monitorare il destino metabolico di una vasta gamma di substrati marcati con deuterio, tra cui il glucosio e l'acetato, attraverso tecniche RM specifiche al deuterio.

La Deuterium Metabolic Imaging (DMI) rappresenta una nuova e non invasiva prospettiva. Essa combina l'imaging spettroscopico a risonanza magnetica del deuterio con l'assunzione orale o l'infusione endovenosa di substrati non radioattivi marcati con deuterio (^2H), generando mappe metaboliche tridimensionali. La DMI si configura come una metodologia versatile, solida e semplice da implementare, richiedendo solo lievi adattamenti agli attuali strumenti di imaging a risonanza magnetica utilizzati in ambito clinico. Pertanto, la DMI possiede un grande potenziale per diventare uno strumento di rilievo nell'imaging metabolico, sia nell'ambito della ricerca (pre)clinica sia in quello clinico.

In questa tesi, dopo un'introduzione sulla tecnica DMI, verranno riportate alcune applicazioni in letteratura della DMI riguardo al mappaggio del metabolismo del cervello e del fegato di modelli animali e soggetti umani utilizzando $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio o $[^2\text{H}_3]$ acetato, evidenziando inoltre i vantaggi offerti da questa tecnica rispetto alle quelle precedentemente disponibili in letteratura.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUZIONE..... | 1 |
| 1.1 Risonanza magnetica Nucleare..... | 1 |
| 1.1.1 Fenomeno fisico..... | 1 |
| 1.1.1.1 Lo spin nucleare..... | 2 |
| 1.1.1.2 Il momento magnetico nucleare..... | 3 |
| 1.1.1.3 Nuclei in campo magnetico..... | 4 |
| 1.1.1.4 Sensibilità..... | 7 |
| 1.1.2 Generazione di immagini..... | 7 |
| 1.1.2.1 k spazio..... | 8 |
| 1.2 Spettroscopia di risonanza magnetica..... | 9 |
| 1.2.1 Spostamento chimico..... | 9 |
| 1.2.2 Generazione degli spettri..... | 11 |
| 1.2.3 Imaging spettroscopico..... | 13 |
| 1.2.4 Deuterio in spettroscopia RMN: limiti e sfide..... | 15 |
| 1.3 Obiettivo della tesi..... | 15 |
| 2. SPETTROSCOPIA METABOLICA DEL DEUTERIO..... | 17 |
| 2.1 Risonanza Magnetica: evoluzione tecnologica..... | 17 |
| 2.2 Deuterio e sue proprietà in RMS..... | 21 |
| 2.2.1 Abbondanza naturale..... | |
| 2.2.2 Substrati marcati al deuterio..... | 25 |
| 2.2.3 Effetti biologici..... | 26 |
| 2.2.4 Spostamenti chimici in RMS..... | 27 |
| 2.2.5 Rilassamento e sensibilità in RMS..... | 28 |
| 2.3 Vantaggi di RMS al deuterio..... | 31 |
| 2.4 Applicazione di RMS al deuterio in vivo..... | 37 |
| 2.4.1 DMI per la misura di marcatori tumorali nel cervello..... | 39 |
| 2.4.2 DMI per la misura di glicogeno nel fegato..... | 43 |
| 3. CONCLUSIONE..... | 47 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 49 |

1. Introduzione

1.1 Risonanza magnetica Nucleare

La Risonanza Magnetica Nucleare (RMN), o in inglese Nuclear Magnetic Resonance (NMR), è un fenomeno fisico caratteristico dei nuclei atomici esposti a un campo magnetico. Nel campo medico, questa tecnica viene chiamata TRM (Tomografia a Risonanza Magnetica) o semplicemente RM (risonanza magnetica). L'applicazione medica della RMN prende il nome di RMI (risonanza magnetica per immagini).

La RM è una tecnica diagnostica non invasiva che utilizza un campo magnetico e onde elettromagnetiche a radiofrequenza per fornire immagini dettagliate a strato sottile di tessuti del corpo umano. Infatti, questa tecnica non utilizza radiazioni ionizzanti rendendola una tecnica di imaging sicura per l'uso sugli esseri umani. Grazie ad essa, molte malattie e alterazioni degli organi interni possono essere visualizzate e quindi facilmente diagnosticate, tra cui patologie del cervello, del cuore, delle articolazioni e del sistema muscoloscheletrico.

La RM utilizza la proprietà dei nuclei atomici immersi in un campo magnetico di rispondere alle perturbazioni causate da onde elettromagnetiche ad una opportuna radiofrequenza, ovvero si concentra sull'analisi dei nuclei atomici per la determinazione della composizione chimica del campione e sul monitorare i cambiamenti nel metabolismo. Una volta allineati i nuclei atomici in seguito all'applicazione di un campo magnetico, le onde radio vengono utilizzate per perturbare questo allineamento e generare una risposta. La risposta è quindi utilizzata per creare immagini dettagliate dei tessuti interni del corpo, come organi, muscoli e ossa.

È utilizzata anche come metodo di indagine per lo studio del metabolismo in vivo, ovvero alle reazioni chimiche che avvengono all'interno degli organismi viventi, soprattutto quando si utilizzano traccianti isotopici come il deuterio, che presentando un momento magnetico nucleare, può essere rilevato utilizzando la risonanza magnetica [1].

1.1.1 Fenomeno fisico

I protoni, i neutroni e gli elettroni possiedono un momento quantistico, ovvero una proprietà fondamentale che si riferisce alla rotazione della particella. Il loro moto, in una descrizione corpuscolare, può essere rappresentato come una combinazione di una rotazione intorno ad un proprio asse e di una rotazione lungo un'orbita relativa all'elettrone. Questo momento dà origine a un momento magnetico, che si manifesta come una separazione di energie in presenza di un campo

magnetico. Questa separazione di energie può essere osservata attraverso la risonanza magnetica nucleare [2].

Il fenomeno di risonanza magnetica si verifica quando un nucleo magnetico, come ad esempio quello di un atomo di idrogeno, viene posto in un campo magnetico ed esposto a un'onda elettromagnetica a radiofrequenza. Se la frequenza dell'onda corrisponde alla frequenza di risonanza del nucleo magnetico, il nucleo assorbirà l'energia dell'onda radio e passerà ad uno stato energetico più elevato. Successivamente, quando il nucleo magnetico tornerà al suo stato originale rilascerà l'energia sotto forma di un segnale RMN. Questo segnale può essere raccolto e analizzato per fornire informazioni sulle proprietà fisiche e chimiche del campione, come la struttura molecolare, la dinamica molecolare e la concentrazione di specie chimiche specifiche.

1.1.1.1 Lo spin nucleare

La Risonanza Magnetica Nucleare si basa sul comportamento dei nuclei atomici che si muovono come se ruotassero attorno al loro asse. A ciascun nucleo atomico è associata una quantità misurabile chiamata spin, che rappresenta una proprietà fondamentale della natura come la carica elettrica o la massa. In termini classici, il momento di spin è assimilabile ad un momento intrinseco di quantità di moto rotazionale.

Il vettore momento angolare di spin P è orientato lungo l'asse della rotazione, il suo modulo è quantizzato e dipende dal numero quantico di spin I . Come si può notare dalla Figura 1, P e I sono fissi per ogni nucleo, quello che può cambiare è l'orientazione che il vettore momento di spin può assumere nei confronti di una direzione esterna z [3].

Per ogni orientazione, m rappresenta la componente del vettore P lungo z , $\hbar = h/2\pi$ dove h rappresenta la costante di Planck ($6.6256 \cdot 10^{-34} \text{ J*s}$), P_z risulta:

$$P_z = m\hbar \quad (1)$$

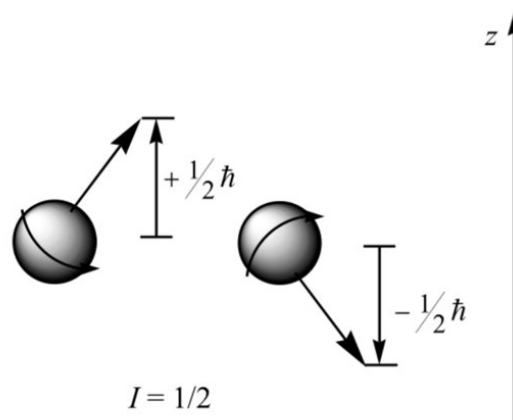


Figura 1: Vettore momento angolare di spin P con orientazioni differenti lungo l'asse z [3].

Anche questa orientazione è quantizzata e lo spin viene descritto come un numero quantistico che può essere associato a $2I + 1$ livelli energetici quando un nucleo viene sottoposto ad un campo magnetico esterno.

Se il nucleo ha un numero pari sia di protoni che di neutroni, allora lo spin del nucleo è zero. In questo caso ^{12}C e ^{16}O , che hanno $I = 0$, non sono osservabili in RM. Mentre ogni protone, elettrone e neutrone ha uno spin di $1/2$, lo spin dei nuclei assume valori multipli di $1/2$ e può essere positivo o negativo. I nuclei con $I = 1/2$, come quelli di idrogeno, sono attivi nel fenomeno della risonanza e interessanti per l'imaging RM, poiché sono caratterizzati da due soli livelli energetici. Se i protoni e i neutroni sono gli uni pari e gli altri dispari, il nucleo ha spin semi intero ($1/2, 3/2, 5/2$, ecc.). Esempi di nuclei osservabili sono ^1H , ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P e ^{15}N che hanno $I = 1/2$. Se entrambi i protoni e i neutroni hanno un numero dispari, allora il nucleo ha spin intero ($1, 2, 3, \dots$) come, per esempio ^2H e ^{14}N . In un atomo di deuterio, ad esempio, che ha un protone, un elettrone e un neutrone, lo spin elettronico totale è $1/2$ e lo spin nucleare totale è 1 , quindi il nucleo è osservabile in RM [4].

Riepilogando, solo i nuclei che hanno un momento magnetico nucleare di spin, ossia diverso da zero, sono osservabili in RM mentre i nuclei che non hanno un momento magnetico nucleare di spin non possono essere analizzati.

1.1.1.2 Il momento magnetico nucleare

Ogni carica in movimento genera un campo magnetico e ogni nucleo dotato di spin si comporta come un piccolo magnete. Secondo le leggi dell'elettromagnetismo, il moto rotatorio di una carica elettrica produce momento magnetico nucleare di spin μ legato a quello meccanico dalla relazione:

$$\mu = \gamma P \quad (2)$$

dove il rapporto giromagnetico γ è una costante caratteristica intrinseca di ogni nucleo [3].

In base alla meccanica quantistica il modulo di μ assume il valore espresso dalla seguente formula:

$$\mu = \frac{\gamma \hbar}{2p\sqrt{I(I+1)}} \quad (3)$$

dove \hbar è la costante di Planck. Per quanto sia una grandezza determinata, l'orientazione di μ , in assenza di eccitazioni esterne, è casuale per i fenomeni di agitazione termica.

Nella Figura 2 viene mostrato il momento magnetico nucleare adottando un sistema di coordinate nel quale l'asse z è lungo la direzione del campo magnetico esterno vale:

$$\mu_z = \gamma P_z = m\gamma\hbar \quad (4)$$

dove P_z è il momento angolare orientato lungo z , m è il numero quantico magnetico e $\hbar = h/2\pi$ dove h rappresenta la costante di Planck.

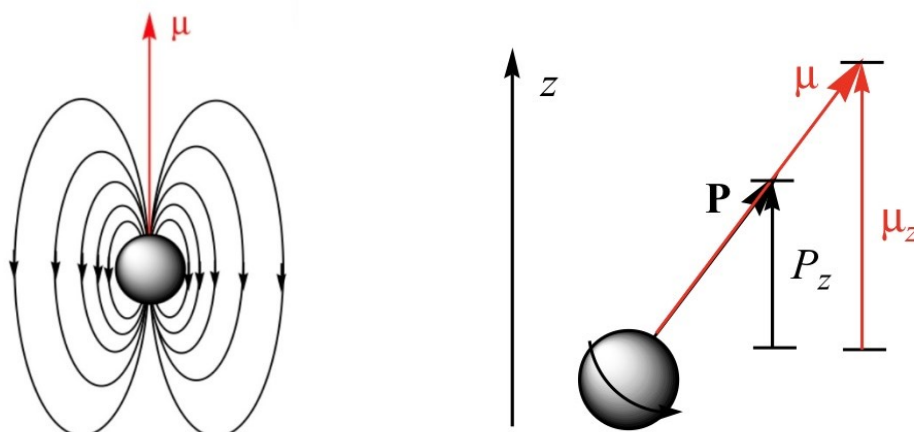


Figura 2: Momento magnetico nucleare lungo l'asse z [3].

1.1.1.3 Nuclei in campo magnetico

In presenza di un campo magnetico esterno B_0 , il singolo spin subisce due eventi: l'orientamento, ovvero l'allineamento dei vettori magnetici in verso parallelo e antiparallelo; la precessione libera, ovvero l'asse del dipolo compie un movimento di rotazione rispetto al vettore B_0 definendo un cono a velocità e frequenza definita (frequenza di precessione).

Quando un nucleo con spin viene esposto a un campo magnetico esterno, il nucleo inizia a ruotare e ad allinearsi nella direzione del campo magnetico. Le possibili orientazioni del nucleo sono determinate dal numero quantico m , che può assumere i valori da $-I$ a $+I$ (con incrementi di una unità) e quindi può assumere $2I + 1$ valori distinti [3].

Nel caso di un nucleo con spin $1/2$, ci sono solo due possibili orientamenti in presenza di un campo magnetico esterno B_0 , visibili nella Figura 3: uno con $m = +1/2$, detto stato parallelo (stato α), e uno con $m = -1/2$, detto stato antiparallelo (stato β). Il momento magnetico nucleare, rappresentato dal numero quantico m , oscilla attorno alla direzione del campo magnetico applicato B_0 ; quindi, i due possibili orientamenti del nucleo non hanno la stessa energia. Lo stato in cui il momento magnetico nucleare è allineato con il campo magnetico esterno ($m = +1/2$) ha un'energia leggermente inferiore dello stato in cui il momento magnetico nucleare è opposto al campo magnetico ($m = -1/2$). Questa differenza di energia tra i due stati α e β del nucleo è alla base del principio di risonanza magnetica nucleare.

L'energia di un nucleo in campo magnetico è data dall'interazione tra momento magnetico e campo esterno:

$$E = -mB_0 \quad (5)$$

Il prodotto scalare può essere scritto:

$$E = -m_z B_0 \quad (6)$$

Dove m_z è la componente del momento magnetico lungo l'asse z del campo magnetico ($\mu_z = m\gamma\hbar$).

Quindi:

$$E = -m\gamma\hbar B_0 \quad (7)$$

Per un nucleo con $I = 1/2$, m può essere $+1/2$ o $-1/2$, per cui i due suoi possibili livelli energetici sono:

$$E_{+1/2} = -\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0 \quad (8)$$

$$E_{-1/2} = +\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0 \quad (9)$$

La differenza di energia tra i due livelli nucleari è:

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0 \quad (10)$$

La frequenza di assorbimento risulta:

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma\hbar B_0}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (11)$$

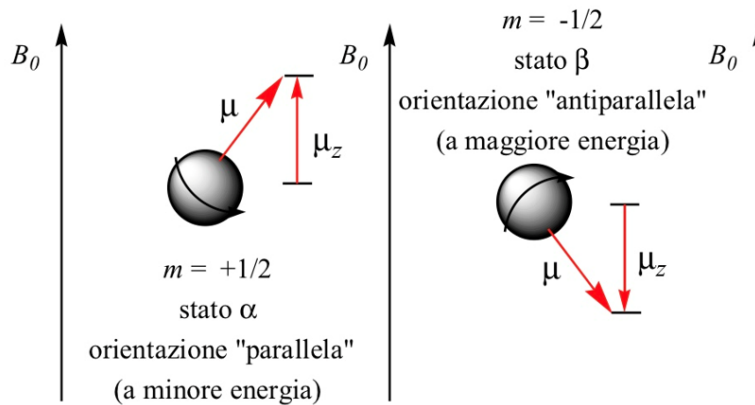


Figura 3: Orientazioni possibili di nuclei aventi spin di $1/2$, parallela e antiparallela [3].

La tecnica di RMN, quindi, permette di osservare l'effetto della precessione del momento magnetico nucleare, la cui frequenza è proporzionale al campo magnetico applicato. Il moto di precessione è mostrato in Figura 4. Come definito in precedenza, un nucleo dotato di spin ruota intorno al proprio asse e, quando è immerso in un campo magnetico B_0 , tende ad allinearsi lungo esso. In questo modo, il nucleo è soggetto a una forza torcente che lo fa precessare intorno a B_0 . La frequenza di precessione, che indica il numero di rotazioni intorno alla direzione di B_0 nell'unità di tempo, dipende dal tipo di nucleo e dall'intensità del campo magnetico. Quest'ultima può essere calcolata utilizzando la legge di Larmor, espressa dall'equazione:

$$\omega = \gamma B_0 \quad (12)$$

nella quale ω rappresenta la frequenza di Larmor (in MHz), B_0 è l'intensità del campo magnetico espresso in Tesla (T) o Gauss (G) e γ è il rapporto giromagnetico (in MHz/T e dipende dal tipo di nucleo). Il rapporto giromagnetico serve dunque a quantificare l'importanza del contributo dato dallo

spin alla quantità totale dell'energia di transizione tra i due orientamenti del nucleo: parallelo al campo magnetico (stabile) e antiparallelo ad esso (instabile).

Dalla formula vista in precedenza, si deduce che aumentando l'intensità del campo magnetico B_0 , la frequenza di Larmor ω aumenta, ovvero la velocità di rotazione dei momenti magnetici dei nuclei del campione intorno alla direzione di B_0 aumenta.

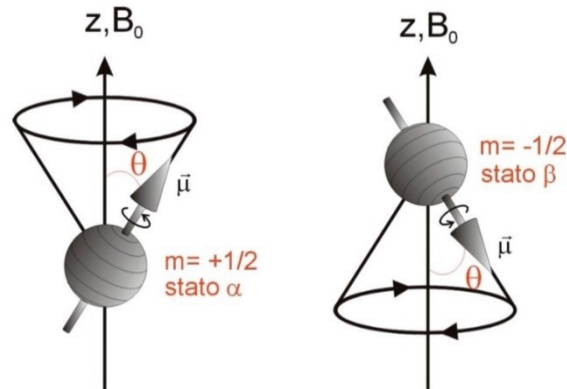


Figura 4: Moto di precessione del dipolo nucleare intorno alla direzione del campo magnetico statico B_0 [5].

Tuttavia, nella pratica, non è possibile osservare direttamente un singolo nucleo o un singolo momento magnetico. Nella Figura 5 si osserva l'effetto combinato di tutti i nuclei del campione, ovvero la magnetizzazione totale M . La magnetizzazione è una grandezza macroscopica definita come risultante dei momenti magnetici della popolazione di spin. La sua evoluzione nel tempo è influenzata dalla presenza di campi magnetici esterni e dalla presenza di altri nuclei vicini al nucleo di interesse. Le oscillazioni della magnetizzazione totale possono essere registrate e analizzate per ottenere informazioni sulla struttura molecolare e sulla dinamica dei sistemi in cui si trovano i nuclei osservati. M è data dalla somma vettoriale dei singoli momenti magnetici: $M = \sum \mu$.

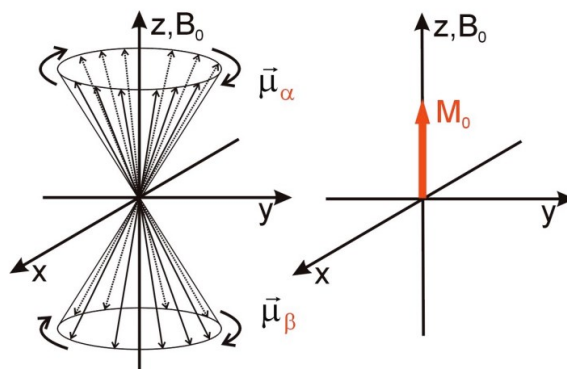


Figura 5: Magnetizzazione macroscopica ottenuta dalla sommatoria vettoriale rispetto a μ [5].

All'equilibrio c'è solo una componente lungo B_0 dovuta proprio al fatto che i momenti magnetici tendono ad allinearsi al campo magnetico esterno, prendendo come riferimento l'asse z , anche il vettore M risultante sarà lungo l'asse z [5].

1.1.1.4 Sensibilità

Il segnale generato in risonanza magnetica deriva dalla variazione dell'energia tra gli stati energetici più bassi e più alti degli spin, con una conseguente emissione di energia da quelli più alti a quelli più bassi. La quantità di segnale è direttamente proporzionale alla differenza di popolazione tra gli stati energetici. La RMN è in grado di rilevare anche differenze di popolazione estremamente piccole, grazie alla sua sensibilità discreta. La differenza di energia tra i due livelli di spin dipende dal campo magnetico statico B_0 . In conseguenza della legge di Boltzmann, che ci permette di rappresentare la distribuzione dei nuclei tra il livello energetico inferiore e superiore in funzione della differenza di energia tra questi due stati, se la differenza di energia tra gli stati α e β è molto piccola, il numero di nuclei nello stato α (N_a) sarà molto simile a quello dei nuclei nello stato β (N_b). Quindi:

$$\frac{N_b}{N_a} = e^{-\Delta E/kT} \quad (\Delta E \ll kT) \quad (13)$$

dove ΔE è la differenza energetica tra gli stati di spin, k è la costante di Boltzmann, $1.3805 \cdot 10^{-23}$ J/Kelvin; T è la temperatura in gradi Kelvin. Al diminuire della temperatura, il rapporto N_b/N_a diminuisce; all'aumentare della temperatura, il rapporto si avvicina a 1.

La sensibilità RMN è considerata relativamente bassa. Questo è dovuto dal fatto che, se i nuclei dello stato α assorbono fotoni e passano allo stato β , i nuclei nello stato β emettono fotoni per emissione stimolata e tornano allo stato α . L'assorbimento netto di radiazione elettromagnetica dipende allora dal piccolo eccesso di nuclei nello stato di energia a rispetto a quelli nello stato di energia b ($N_a - N_b$). Utilizzando l'estensione della serie di Taylor: $e^{-x} \approx 1 - x$. Di conseguenza:

$$\frac{N_b}{N_a} = e^{-\Delta E/kT} \approx 1 - (\Delta E/kT) \quad (14)$$

$$\frac{N_b}{N_a} \approx 1 - (\gamma \hbar B_0/kT) \quad (15)$$

$$\frac{N_a - N_b}{N_a} \approx (\gamma \hbar B_0/kT) \quad (16)$$

La sensibilità dell'esperimento RMN è influenzata da due fattori principali: l'aumento del campo magnetico applicato contribuisce ad aumentare la sensibilità dell'esperimento mentre, in secondo luogo, i nuclei con un rapporto giromagnetico elevato sono generalmente più sensibili rispetto ai nuclei con un rapporto giromagnetico più basso [3,6].

1.1.2 Generazione di immagini

Per formare un'immagine RMN, è necessario ottenere una codifica spaziale sovrapponendo un gradiente di campo magnetico al campo magnetico statico, in modo che l'intensità del campo

magnetico risultante sia una funzione conosciuta delle coordinate spaziali. Gli spin appartenenti alla stessa specie nucleare, localizzati in diverse posizioni nello spazio, risuonano a diverse frequenze nello spettro, consentendo così la codifica spaziale del sistema di spin, una volta noti il gradiente e la frequenza di risonanza in assenza del gradiente stesso. Dall'ampiezza dei segnali è anche possibile dedurre il numero di spin risonanti presenti in diverse regioni dello spazio. Estendendo questo concetto a due e tre dimensioni, è possibile ricostruire mappe bidimensionali e tridimensionali della densità degli spin.

Anche la dipendenza spaziale dei tempi di rilassamento può essere ottenuta utilizzando gradienti di campo magnetico. Tuttavia, per questo scopo, l'impulso di eccitazione deve essere sostituito da sequenze di impulsi più complesse, appositamente progettate per misurare i tempi di rilassamento.

Una tecnica altamente efficiente e versatile per identificare la localizzazione spaziale dei segnali RM emessi dalle diverse sorgenti all'interno del corpo in esame è l'analisi di Fourier, nella quale sono possibili costruzioni di immagini sia 2D che 3D, con diverse caratteristiche spaziali e dimensionali.

Attualmente il metodo più utilizzato per ottenere un'immagine è la doppia trasformata di Fourier (2DFT), ovvero l'applicazione della trasformata di Fourier alle due dimensioni dell'immagine. I risultati di ogni acquisizione vengono analizzati utilizzando la 2DFT. Il comportamento di una piccola popolazione di spin contenuta in un voxel (elemento di volume) può generare un singolo segnale FID. Ogni voxel è caratterizzato da tre coordinate e da un'intensità di segnale, che permettono di ricostruire l'immagine in scala di grigi. Tuttavia, la risonanza magnetica e i tomografi in generale permettono di ottenere una rappresentazione di uno strato o fetta di spessore, attraverso un sistema di questo tipo, è possibile individuare qualsiasi strato interno ad un corpo. Il segnale FID reale, generato da una fetta, non sarà costituito da una singola sinusoidale, ma dalla somma di sinusoidi in numero pari al numero di voxel in cui lo strato di tessuto indagato è suddiviso. Molte immagini RM sono rappresentate come piani 2D suddivisi in una griglia di punti, chiamati pixel. L'intensità di un pixel rappresenta l'ampiezza dei segnali RM emessi dalla corrispondente regione del corpo in esame [7].

1.1.2.1 K-spazio

Il K-spazio è importante nella formazione delle immagini RM poiché è qui che vengono memorizzati i segnali RM acquisiti: i campioni dei segnali acquisiti sono infatti i campioni della matrice del K-spazio mostrata in Figura 6.

È importante evidenziare che i dati contenuti nello spazio k non indicano direttamente la posizione dei protoni che li hanno generati, né rappresentano i voxel dell'immagine finale a risonanza magnetica, contiene invece, informazioni sull'intensità dei vari contorni dell'immagine piuttosto che sulle distribuzioni spaziali delle diverse strutture anatomiche. Ogni punto dello spazio k contiene i

dati relativi a tutte le parti dell'immagine a risonanza magnetica corrispondente: esso costituisce una matrice di dati digitali a risonanza magnetica che rappresenta l'immagine prima dell'analisi della trasformata di Fourier. La lettera k indica il numero d'onda ($k = 2\pi/\lambda$) e le sue componenti sono K_x , K_y e K_z sono dette frequenze spaziali e la loro unità di misura è cicli per unità di lunghezza. Il segnale free induction decay (FID) può essere scomposto nella somma di onde seno e coseno con diverse frequenze e ampiezze, ciascuna delle quali corrisponde a una diversa orientazione. Le immagini vengono trasformate dal K -spazio al dominio spaziale mediante una trasformata inversa di Fourier. Ogni punto del K -spazio contiene informazioni sull'intera immagine RM.

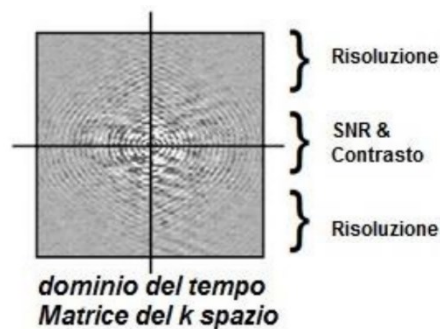


Figura 6: Schema del riempimento del K spazio nel quale diverse regioni di riempimento corrispondono a caratteristiche che si riversano sull'intera immagine risultante [8].

1.2 Spettroscopia di risonanza magnetica

La spettroscopia per risonanza magnetica (RMS) è una tecnologia non invasiva che utilizza la RM per analizzare la composizione chimica dei tessuti ed è in grado di fornire, in vivo, informazioni utili sul metabolismo e sulla funzionalità dei tessuti di interesse in una serie di processi patologici. Consente di identificare piccole molecole metaboliche esistenti in concentrazione millimolare (mM) come acidi grassi, amminoacidi e zuccheri. Questi metaboliti possono essere distinti poiché sono soggetti al fenomeno di risonanza a frequenze leggermente diverse in base al loro ambiente chimico locale. Il grado di separazione delle frequenze tra due specie molecolari è caratterizzato dal loro spostamento chimico, un numero che indica la variazione di frequenza assorbita. Le aree dello spettro relative a ciascun nucleo sono approssimativamente proporzionali al numero di nuclei in quell'ambiente chimico specifico [8].

1.2.1 Spostamento chimico

La spettroscopia RMN è un metodo potente per determinare la struttura molecolare e studiare le interazioni tra le molecole, poiché la frequenza di risonanza dipende non solo dal tipo di nucleo, ma anche dall'ambiente chimico circostante.

Tuttavia, se tutti i nuclei di un certo tipo, ad esempio tutti gli atomi di idrogeno, che hanno lo stesso dipolo magnetico μ , risuonassero alla stessa frequenza all'interno dello stesso campo magnetico B_0 , la RMS sarebbe inutile perché si avrebbe un unico segnale per tutti gli idrogeni di qualsiasi molecola. Tuttavia, questo non è il caso [4]. Come mostrato in Figura 7, i nuclei di una molecola non sono isolati, ma sono circondati da una nube elettronica che è in grado di schermare il nucleo nei confronti del campo magnetico esterno, modificando leggermente il campo magnetico a cui il nucleo stesso è sottoposto. Sono proprio gli elettroni a far sì che i nuclei chimicamente differenti risuonino a frequenze leggermente diverse, poiché subiscono campi magnetici distinti. I vari atomi assorbono a frequenze diverse l'uno dall'altro a seconda del loro ambiente chimico. Questo avviene perché, a seconda dell'elettronegatività dell'atomo a cui è legato, un nucleo può essere più o meno circondato dai propri elettroni di legame. Gli elettroni di legame, che sono particelle cariche, producono una circolazione elettronica che genera un piccolo campo magnetico indotto (b_i) opposto a quello molto più forte applicato quando sono sottoposti al campo magnetico B_0 . L'effetto risultante è che in nucleo dell'atomo risente di un campo magnetico netto leggermente differente da quello applicato esternamente. Riassumendo, in assenza di campo magnetico, gli elettroni si muovono in modo disordinato formando una nube elettronica intorno al nucleo. Quando viene applicato un campo magnetico esterno, gli elettroni si muovono in modo più ordinato, questo movimento degli elettroni produce un campo magnetico indotto, che si oppone al campo magnetico applicato all'interno della nube elettronica, schermando così il nucleo.

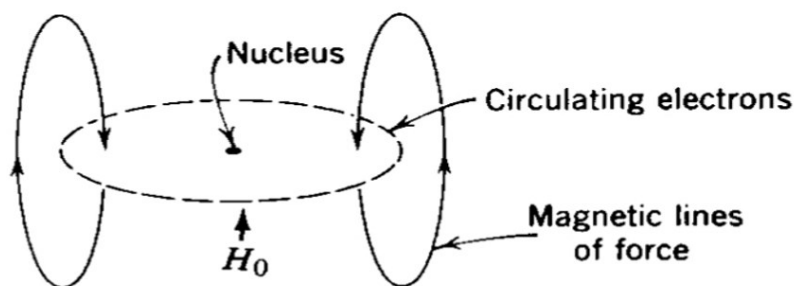


Figura 7: Uno spin circondato dalla sua nube elettronica, la quale genera un proprio campo magnetico, viene immerso in un campo magnetico esterno B_0 . Quest'ultimo induce un movimento degli elettroni all'interno della nube elettronica. Questo movimento produce un campo magnetico che all'interno della nube si oppone al campo magnetico applicato, mentre intorno alla nube elettronica si somma al campo magnetico applicato. Considerando l'intera molecola, ogni elettrone di legame produce un proprio campo magnetico [3].

Tuttavia, per poter quantificare lo spostamento chimico, è necessario individuare un riferimento al quale assegnare il valore zero della scala, dato che non è sufficiente utilizzare la frequenza di risonanza di un singolo protone in Hertz, poiché anche piccole variazioni del campo magnetico dello spettrometro possono causare discrepanze nella frequenza di risonanza dei protoni che superano di gran lunga gli spostamenti chimici osservati. Di conseguenza, è stato convenzionalmente stabilito che

gli idrogeni del tetrametilsilano ($\text{Si}(\text{CH}_3)_4$), che sono altamente schermati a causa della bassa elettronegatività del silicio, rappresentano il punto zero della scala di spostamento chimico. Di conseguenza, gli spostamenti chimici delle normali molecole organiche risultano sempre positivi (poiché meno schermati) [4]. Lo spostamento chimico assoluto è calcolato come la differenza tra la frequenza (in Hz) assorbita dall'idrogeno in esame e quella dell'idrogeno del TMS (tetrametilsilano), considerato come riferimento:

$$\text{Spostamento chimico assoluto} = \text{Hz} (H \text{ in esame}) - \text{Hz} (H \text{ TMS}). \quad (17)$$

È importante notare che lo spostamento chimico assoluto è proporzionale al campo magnetico applicato B_0 , poiché è generato dall'effetto schermante degli elettroni indotto dallo stesso campo magnetico B_0 . Di conseguenza, strumenti che utilizzano campi magnetici diversi producono spostamenti chimici differenti. Per precisare, si utilizza lo spostamento chimico relativo δ che è così definito:

$$\delta = \text{Hz} (H \text{ in esame}) - \frac{\text{Hz} (H \text{ TMS})}{\text{MHz} (H \text{ TMS})}. \quad (17)$$

Questo valore, espresso in parti per milione (Hz/MHz), rimane costante indipendentemente dall'intensità del campo magnetico applicato e quindi è uguale su tutti gli strumenti. Nell' ^1H RMN, la scala δ varia da 0 a 12 ppm, mentre nella ^{13}C RMN la scala è molto più ampia e va da 0 a 220 ppm. In generale, gli idrogeni o i carboni legati ad atomi più elettronegativi risultano meno schermati, per cui sono influenzati da un campo magnetico effettivo più intenso e subiscono la transizione a frequenze maggiori. Nello spettro, questi atomi si trovano a sinistra e presentano uno spostamento chimico più elevato.

A livello pratico in un esperimento tipico di RMS vengono scansionate le frequenze per un determinato valore di campo magnetico esterno o i valori di campo statico applicati, mantenendo costante la radiofrequenza inviata sul campione. Durante la scansione, vengono eccitati i nuclei che presentano un certo spostamento chimico (es. Fig. 8).

1.2.2 Generazione degli spettri

La risposta alla perturbazione esterna (l'impulso a radiofrequenza) del sistema di spin immerso in un campo magnetico viene quindi normalmente rappresentata sotto forma di uno spettro. Poiché i vari nuclei risuonano a frequenze molto diverse l'uno dall'altro, occorre decidere quale nucleo esaminare e la frequenza portante va collocata al centro dell'intervallo spettrale in cui risuonano le righe relative a quel nucleo. Lo spettro più semplice è quello composto da una sola riga di risonanza. Possiamo definire come primo parametro spettrale la frequenza di risonanza, definita spostamento chimico poiché è in relazione all'intorno chimico in cui si trova immerso il nucleo considerato.

In generale, uno strumento per la risonanza magnetica nucleare è costituito da diverse componenti. Nella versione più convenzionale, denominata spettrometro a onda continua, si utilizza un elettromagnete per generare il campo magnetico statico B_0 , che viene collocato tra i poli del campione. Il dispositivo che regola gradualmente l'intensità del campo magnetico è costituito da una bobina alimentata da una corrente variabile. Inoltre, c'è una sorgente di radiofrequenze e un rivelatore di radiofrequenze per misurare la radiazione emessa dal campione. Per raggiungere campi magnetici più elevati, che corrispondono anche a frequenze di risonanza più elevate, si utilizza un magnete superconduttore raffreddato con elio liquido.

Tuttavia, esiste un metodo alternativo e vantaggioso per registrare spettri RMN. Invece di misurare l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche a frequenze via via diverse, molti strumenti moderni utilizzano la trasformata di Fourier per la risonanza magnetica nucleare. La RM si ottiene sovrapponendo il debole campo oscillante B_1 al campo B_0 generato da una bobina ricevente. La produzione del segnale, che viene assorbita dai nuclei presenti, avviene tramite l'applicazione al campione di un breve e intenso impulso di energia a radiofrequenza, il quale eccita tutti i nuclei presenti contemporaneamente (indipendentemente dal loro spostamento chimico). Dopo la fine dell'impulso applicato, il campione emette segnali per un certo periodo di tempo mentre diverse transizioni ritornano al loro stato di equilibrio. Quindi i nuclei ritornano alla normale distribuzione di Boltzmann emettendo fotoni, ogni nucleo alla propria frequenza di risonanza. Successivamente, si registra l'andamento temporale del segnale di emissione generato dal decadimento dei nuclei eccitati. Il segnale risultante, noto come Induzione Libera di Decadimento (FID), è una sovrapposizione di tutte le risonanze del campione. Per ottenere i comuni spettri, le risonanze del campione devono essere decodificate. La Trasformata di Fourier decodifica le informazioni di frequenza contenute nel segnale nel dominio del tempo, rivelando uno o più picchi spettrali. Il fenomeno di spostamento chimico dà quindi origine ad uno spettro di frequenze RM costituito da nuclei che risuonano a frequenze diverse [4].

Prendendo come riferimento l'esempio in Figura 8, i picchi negli spettri RM sono anche chiamati risonanze. Alcuni metaboliti possono essere divisi in due (doppietto) o più sub-picchi. L'area al di sotto del picco è indicativa della concentrazione del metabolita, perché è approssimativamente proporzionale al numero di nuclei RMN-attivi in ogni molecola, mentre la separazione dei picchi rappresenta la differenza di spostamento chimico.

Gli spettri di composti anche semplici sono tuttavia complicati dall'effetto dell'accoppiamento tra nuclei diversi. In termini semplificati, ciò è dovuto all'influenza che lo spin di un nucleo vicino esercita su un altro nucleo, oppure all'effetto combinato degli spin dei nuclei e degli elettroni vicini. Queste interazioni, aumentano il numero di livelli energetici accessibili per un determinato nucleo, e

quindi il numero di frequenze in corrispondenza delle quali il nucleo va in risonanza. Ciò si riflette, ad esempio, nella presenza di picchi multipli di assorbimento (multipletti: doppietto, tripletto, ecc.) nel picco di risonanza magnetica nucleare del protone, corrispondenti a frequenze di risonanza leggermente diverse. Per composti più complessi, spesso lo spettro di risonanza magnetica del protone diviene eccessivamente complicato, con una moltitudine di picchi di difficile analisi, nel quale l'entità dello spostamento chimico e dell'accoppiamento è confrontabile. Esistono vari metodi che consentono di semplificarne la struttura; tra gli sviluppi più recenti della tecnica RMN vi sono le cosiddette tecniche multidimensionali, basate sul metodo a impulsi in trasformata di Fourier. In queste tecniche il campione viene sottoposto non solamente a un impulso di radiofrequenze, ma a una serie di impulsi di frequenze diverse, opportunamente programmati. Gli spettri così ottenuti forniscono importanti informazioni sulla sequenza degli atomi nel composto in esame.

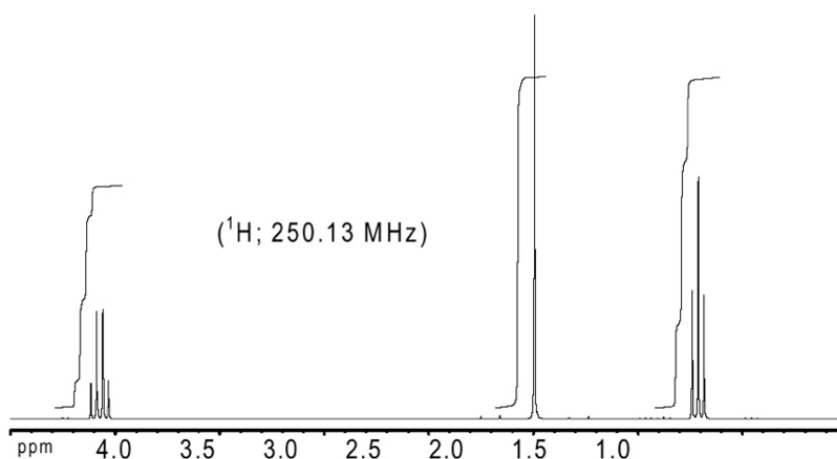


Figura 8: Esempio di uno spettro ^1H RMN del butanolo. Nell'asse x viene rappresentato lo spostamento chimico del ^1H in parti per milione, una unità di misura adimensionale che indica un rapporto tra quantità misurate di un milione a uno. La separazione dei picchi rappresenta la differenza di spostamento chimico. Una caratteristica della spettroscopia ^1H RMN è il fatto che l'intensità del segnale è proporzionale al numero di idrogeni che generano il segnale; quindi, l'area dei picchi è direttamente proporzionale al numero di idrogeni che li hanno prodotti [5].

1.2.3 Imaging spettroscopico

A meno di rare eccezioni, i tradizionali metodi di imaging fanno ampio uso della risonanza del protone, grazie alla sua notevole sensibilità spettroscopica rispetto ad altri nuclei. Nello specifico, lo spettro protonico dei tessuti biologici manifesta principalmente un intenso segnale derivante dall'acqua, solitamente accompagnato da un segnale di minore intensità proveniente dai lipidi. È cruciale che vi sia un solo segnale per la maggior parte delle tecniche di imaging, in quanto non sono in grado di distinguere segnali distribuiti su diverse frequenze da quelli provenienti da diverse regioni nello spazio. Questi metodi, non essendo in grado di discernere la differenza in frequenza tra due segnali, la traducono in una differenza spaziale, generando così artefatti di spostamento chimico, noti come immagini "sdoppiate".

Un innovativo approccio all'imaging, in grado di determinare le distribuzioni in frequenza dei nuclei localizzati in diverse regioni dello spazio, con una buona sensibilità anche per nuclei diversi dal protone, è stato proposto nel 1982 da Brown, Kincaid e Ugurbil [9]. La peculiarità di questo metodo risiede nel campionamento del FID dopo aver spento il gradiente. In questo modo, il FID contiene, senza alterazioni, le informazioni spettroscopiche, mentre dalla fase iniziale dello stesso FID è possibile estrarre le informazioni spaziali.

Nonostante si stiano studiando metodi capaci di offrire risultati in un numero maggiore di dimensioni, le mappe più comunemente utilizzate attualmente sono quelle mono e bidimensionali nello spazio.

Il primo tipo di mappa, noto come $cs1d$ ("imaging" spettroscopico monodimensionale), implementa la codifica spaziale lungo un asse, mentre sull'altro asse presenta la distribuzione in frequenza. Di conseguenza, il volume selezionato ha la conformazione di uno strato. Questa "immagine" è costituita da un insieme di macchie, dalle cui posizioni è possibile risalire sia alla natura dei composti chimici da cui sono generate, sia alla posizione dei composti stessi lungo un asse specifico. L'intensità delle macchie, invece, fornisce informazioni sulle concentrazioni dei composti stessi.

Il secondo tipo di mappa, $cs2d$, rappresenta un'immagine bidimensionale di una singola frequenza di spostamento chimico. È importante notare che l'aggiunta di una dimensione comporta un corrispondente aumento del tempo richiesto per completare una serie di acquisizioni, a scapito del rapporto segnale/rumore e della risoluzione spaziale ottenibile.

Le generiche sequenze per i due casi sono mostrate in Figura 9.

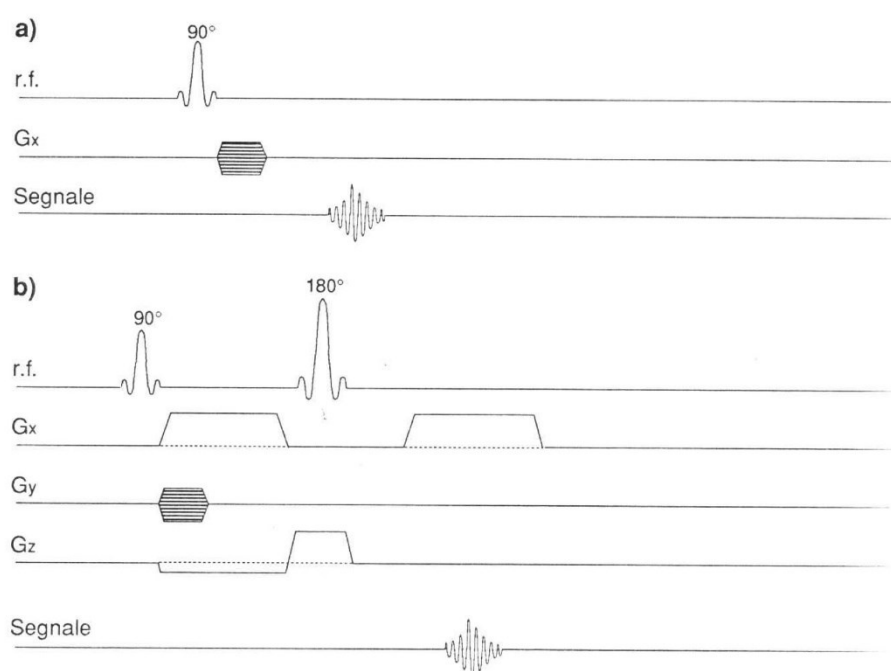


Figura 9: Sequenze di impulsi a RF utilizzati nei metodi: a) *csi1d*: impulso a RF 90° e b) *csi2d*: impulso a 180° dopo il primo a 90° (sequenza spin-echo). La localizzazione spaziale del segnale avviene creando dei gradienti di campo sugli assi x, y e z . In questo modo è possibile selezionare i piani di scansione e differenziare il segnale di ogni elemento del corpo in esame che risuona ad una frequenza leggermente diversa dagli altri. La figura mostra la codifica di frequenza lungo l'asse x durante la lettura, la codifica di fase con il gradiente y e la selezione dello strato con un gradiente lungo l'asse z . [8].

1.2.4 Deuterio in spettroscopia RMN: limiti e sfide

L'utilizzo del deuterio come tracciante isotopico nella spettroscopia presenta alcuni vantaggi rispetto ad altri isotopi. Il deuterio è un isotopo stabile, il che significa che non si decompone e quindi non genera radiazioni. Questa caratteristica lo rende sicuro per l'uso in vivo nell'uomo e negli animali. Ha una differente distribuzione rispetto all'idrogeno comune, il che permette di distinguere tra i due isotopi con una grande precisione. Ciò consente di utilizzare la spettroscopia RMN per monitorare i processi metabolici specifici nei tessuti. Inoltre, il deuterio ha una maggiore sensibilità rispetto ad altri isotopi nella spettroscopia, in quanto il suo spin nucleare è più alto, questo permette di ottenere un segnale più forte e quindi una maggiore risoluzione. Può essere facilmente incorporato nei campioni biologici e può essere utilizzato per studi in vivo, in vitro e in cellule isolate; infatti, lo rende uno strumento versatile per la ricerca biologica. Per di più, è meno costoso rispetto ad altri isotopi pesanti come il carbonio-13, azoto-15 o stagno-117 [1]. In sintesi, l'utilizzo del deuterio come tracciante isotopico nella spettroscopia RMN presenta alcuni vantaggi come la stabilità, selettività, sensibilità, facilità d'uso e costo relativamente basso, il che, lo rende uno strumento importante per lo studio dei processi metabolici in molti campi di studio.

Nonostante i suoi vantaggi, l'utilizzo del deuterio come tracciante isotopico nello studio del metabolismo in vivo presenta alcuni limiti e sfide. L'utilizzo di traccianti isotopici può interferire con i processi metabolici normali, rendendo difficile l'interpretazione dei risultati, mentre alcuni tessuti o organi possono essere difficili da studiare con il deuterio a causa delle loro proprietà fisiche o chimiche e richiede un dosaggio preciso per evitare effetti tossici. Tuttavia, i suoi vantaggi ne fanno uno strumento utile per la comprensione dei processi metabolici in vivo, infatti le prospettive future per lo studio del metabolismo con il deuterio sono molteplici e promettenti. Con lo sviluppo di nuovi traccianti isotopici derivati dal deuterio, si può aumentare la precisione nello studio dei processi metabolici e di biosintesi. Come il ^{13}C , i substrati marcati con deuterio (^2H) possono essere utilizzati per studiare il metabolismo con la RM spettroscopica in vivo.

1.3 Obiettivo della tesi

Il metabolismo svolge un ruolo chiave nell'origine o nella progressione di molte malattie. I clinici e i pazienti potrebbero quindi trarre beneficio da una modalità di imaging non invasivo facilmente

disponibile che possa fornire informazioni dettagliate sul metabolismo. Nonostante i grandi progressi di ricerca degli ultimi decenni, ad esempio ottenere immagini del corpo senza dover fare incisioni o utilizzare radiazioni, le opzioni di imaging metabolico attualmente sono molto limitate in clinica. Una modalità comune è la risonanza magnetica (RMI), che è utilizzata comunemente per ottenere immagini dei tessuti molli perché fornisce eccellenti dettagli anatomici, utilizzando una serie di meccanismi di contrasto unici come i parametri RMN intrinseci (T1, T2), diffusione, perfusione, suscettibilità e scambio. Anche se la RMI è molto utile nella medicina, il segnale riflette principalmente le proprietà dell'acqua e non fornisce informazioni sul metabolismo, ovvero non può immagazzinare il metabolismo attivo. Molti tipi di patologie, come il cancro, le malattie neurodegenerative e il diabete, sono accompagnate da alterazioni del metabolismo che potrebbero essere diagnosticate precocemente o meglio caratterizzate utilizzando tecniche di imaging che siano sensibili ai processi metabolici [1]. Pertanto, l'imaging non invasivo diventerà sempre più uno strumento indispensabile per la diagnosi e il trattamento di molte patologie.

La Deuterium Metabolic Imaging (DMI) è una recente tecnica utilizzata per visualizzare la distribuzione spaziale di metaboliti all'interno di un campione biologico. Questo tipo di imaging metabolico genera immagini che rappresentano la distribuzione spaziale dei metaboliti all'interno del campione e permettono di visualizzare le concentrazioni relative di metaboliti in diverse regioni. È particolarmente utile per lo studio di metaboliti specifici o per monitorare cambiamenti nel profilo metabolico legati a condizioni fisiologiche o patologiche [8].

L'obiettivo della tesi è quindi quello di descrivere come l'imaging metabolico con deuterio, mediante ^2H RM spettroscopica, possa generare in modo non invasivo mappe metaboliche con elevata risoluzione spaziotemporale e visualizzare il destino metabolico di diversi substrati marcati con ^2H .

2. Spettroscopia Metabolica al Deuterio

2.1 Risonanza Magnetica: evoluzione tecnologica

La teoria atomica di John Dalton del 1803 ha unito l'idea antica dell'atomo con il concetto di Antoine Lavoisier di elemento chimico: ogni elemento corrispondeva a un diverso tipo di atomo, e atomi diversi avevano pesi atomici differenti. Tuttavia, con il passare del tempo, divenne evidente che un singolo elemento poteva presentare atomi con proprietà chimiche simili ma pesi atomici diversi, ovvero costituiti da isotopi differenti. Il nuovo campo della chimica nucleare mirava all'identificazione e alla separazione degli isotopi; pochi anni dopo, gli scienziati di Berkeley sarebbero stati i primi a trasformare l'isotopo di un elemento in un isotopo del tutto nuovo. Nel caso dell'idrogeno, il cui isotopo più abbondante ^1H costituisce quasi tutta la sostanza presente in natura (99,98%), era difficile determinare persino se esistessero altri isotopi. Le differenze chimiche tra gli isotopi dello stesso elemento sono solitamente piccole, poiché il numero di protoni è chimicamente molto più importante di quello dei neutroni.

Nel 1931, Harold Clayton Urey scoprì la prova definitiva dell'esistenza di un isotopo pesante dell'idrogeno, chiamato deuterio (^2H). Il suo lavoro univa la chimica e la fisica, e insieme ad altri scienziati, costruì grafici degli isotopi conosciuti per mostrare le relazioni che influiscono sulla loro esistenza. All'epoca, il neutrone non era stato ancora scoperto, ma lo sarebbe stato l'anno successivo. Il grafico si basava sulla teoria che i nuclei atomici fossero composti da protoni ed elettroni nucleari. Il numero di protoni rappresentava il numero di massa nucleare, mentre il numero di elettroni nucleari era il numero di protoni meno il numero atomico dell'elemento [10].

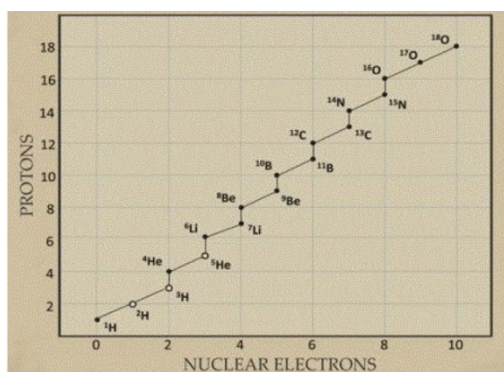


Figura 10: Grafico di Urey attraverso il quale nota che l'isotopo elio-5 non esiste e la linea sfalsata non fornisce un posto per l'isotopo elio-3 che è stato scoperto in seguito. Questo diagramma è stato utile a Urey per cercare l'isotopo pesante dell'idrogeno [10].

La struttura del grafico di Urey, illustrata in Figura 10, quando estesa fino a ^1H , suggeriva che gli atomi ^2H , ^3H e ^5H potessero esistere, poiché erano necessari per completare la struttura. Questa scoperta ha aperto la strada per ulteriori ricerche sugli isotopi e ha portato allo sviluppo di nuove tecnologie come la risonanza magnetica nucleare, che utilizza il deuterio per la diagnostica medica. Urey ha ricevuto il premio Nobel per la chimica nel 1934.

Il potenziale di ^2H come tracciante stabile per lo studio del metabolismo è stato riconosciuto nel 1932 [11]. Dopo aver utilizzato composti arricchiti con ^2H per studiare il metabolismo dinamico, Rittenberg e Schoenheimer hanno affermato che questo metodo aveva un "numero di possibili applicazioni quasi illimitate"[12]. Tuttavia, l'uso di isotopi stabili è stato presto soppiantato dall'utilizzo di isotopi radioattivi come ^3H o ^{14}C , che erano più economici da preparare e più facili da rilevare con una maggiore sensibilità mediante l'autoradiografia. Le preoccupazioni per la somministrazione di radioisotopi a soggetti umani e lo sviluppo di metodi di rilevamento sensibili per isotopi stabili hanno riaperto l'interesse per l'uso di traccianti di isotopi stabili per studiare il metabolismo.

Il 1939 è stato un anno importante per lo sviluppo della risonanza magnetica (RM). Nel 1946 i fisici americani Felix Bloch ed Edward Purcell scoprirono indipendentemente il fenomeno della risonanza magnetica nucleare studiando i protoni, e per questo ricevettero il premio Nobel per la Fisica nel 1952. Inizialmente, questo fenomeno venne utilizzato per analizzare la struttura chimica delle sostanze e misurazioni sul campo magnetico terrestre. Kellogg et al. hanno determinato il momento magnetico nucleare del deuterio utilizzando misurazioni RM a fascio molecolare, un importante passo verso lo sviluppo della spettroscopia di risonanza magnetica del deuterio [13]. Nel frattempo, Bloch [14] e Purcell [15] hanno scoperto la RMN nella materia sfusa; questa scoperta fornì un potente strumento alla chimica analitica tanto che nei vent'anni successivi si sviluppò una raffinata metodica per l'analisi non distruttiva di piccoli campioni di materia, mediante la RMN, al fine di caratterizzarne la composizione interna.

Bloembergen et al. [16] hanno brevemente descritto le proprietà di rilassamento dell'acqua pesante. Tuttavia, nonostante questi importanti sviluppi, il campo dell'RMN del deuterio era in gran parte stagnante a causa di alcune sfide tecniche, come l'allargamento della linea quadrupolare, i brevi tempi di rilassamento, la bassa abbondanza naturale e la piccola dispersione del cambiamento chimico. Inoltre, la mancanza di metodi di soppressione del solvente di alta qualità ha contribuito a rendere il deuterio la scelta standard per i solventi non protonati e il blocco del campo magnetico. Tuttavia, la RMN del deuterio è stata utilizzata per studiare molecole parzialmente orientate, membrane e formazione di complessi come esaminato da Mantsch et al. [17].

L'idea di eseguire studi con la RM sull'uomo è stata proposta da Jackson, che nel 1967 ha acquisito i primi segnali RM da un animale vivo. Nel 1971, Raymond Damadian ipotizzò che i tessuti tumorali e sani fornirebbero risposte diverse se sottoposti ad analisi RMN e suggerì l'impiego di tale tecnologia per la diagnosi del cancro. Anche se successive indagini sperimentali non confermarono tale ipotesi, l'idea di Damadian stimolò i ricercatori a considerare l'RMN per indagini cliniche. Nel 1974, Damadian registrò il primo brevetto sulle applicazioni mediche dell'RMN, che includeva l'idea di utilizzare tale tecnologia per l'analisi dell'intero corpo umano volto alla diagnosi di tessuti cancerosi. Negli anni '50 Herman Carr dichiarò di essere riuscito ad ottenere una proiezione monodimensionale con una risonanza magnetica. Stimolato dall'articolo di Damadian e dalla tecnica descritta da Carr, Paul Lauterbur migliorò la tecnica di Carr e sviluppò un metodo per generare le prime immagini 2D e 3D attraverso i gradienti, scansionando oggetti di prova come provette riempite d'acqua. La prima immagine RM di un campione contenente acqua è stata generata nel 1972 da Lauterbur. Egli si accorse dell'importanza dei gradienti applicati ai campi magnetici per ottenere immagini durante la ricerca di una soluzione ad un incidente tecnico.

L'imaging mediante RM (RMI o, in inglese, Magnetic Resonance Imaging - MRI) è un utilissimo strumento, in particolare nella chimica analitica e nella biochimica. La MRI può generare immagini con eccellente contrasto tra i tessuti molli e con alta risoluzione spaziale in ogni direzione. Analogamente ad altre tecniche di imaging, la MRI utilizza radiazioni elettromagnetiche per studiare i diversi distretti anatomici all'interno del corpo umano. Tuttavia, tali radiazioni sono a bassa energia, quindi, se utilizzate in condizioni normali, possono tranquillamente essere considerate non dannose. Nel 1974 Lauterbur ha generato la prima immagine RM di un animale vivo. Successivamente, molti gruppi hanno contribuito al miglioramento della tecnica e delle tecnologie stesse per la generazione e la ricostruzione delle immagini mediante RM, in modo più o meno indipendente. In particolare, Peter Mansfield perfezionò ulteriormente la tecnica introducendo variazioni più forti in campi magnetici più potenti, ottenendo così immagini molto più dettagliate. Solo nel 1975 Richard Ernst propose l'utilizzo di un processo di codifica in fase e frequenza e l'impiego della trasformata di Fourier, ancora oggi alla base delle moderne tecniche di RMI.

La prima volta che il deuterio è stato utilizzato in RMS per studiare il metabolismo in vivo è stato nel 1986, quando Brereton et al. [18] hanno esaminato l'incorporazione di marcatura ^2H nei trigliceridi durante e dopo la somministrazione di acqua pesante nei topi. L'anno seguente, lo stesso gruppo ha pubblicato uno studio più dettagliato sulla sintesi lipidica ^2H rilevata nei topi obesi e diabetici [19]. Ackerman et al. [20] hanno utilizzato l'acqua pesante come tracciante liberamente diffusibile per studiare il flusso sanguigno e la perfusione tissutale. Nello stesso periodo, Ewy et al. [21], Muller, Seelig et al. [22] hanno descritto i primi esperimenti di imaging RM basati su deuterio. Irving et al.

[23] hanno riferito che il deuterio RMN è insensibile ai contributi paramagnetici alla larghezza della linea di galleggiamento, consentendo così di ottenere spettri RM di alta qualità del fegato nonostante la presenza di un elevato carico di ferro.

Gli studi ^2H RMN in vivo sono stati pubblicati solo sporadicamente e sono stati oscurati dal successo degli studi ^1H , ^{13}C e ^{31}P RMN sul metabolismo. Nel frattempo, sono stati pubblicati un piccolo numero di rapporti sull'utilizzo del glucosio marcato con ^2H per studiare il metabolismo in vitro, inclusi studi sul metabolismo batterico [24,25], nelle retine [26,27,28], nel glicogeno epatico [29], nei globuli rossi e nella sua risposta alla sepsi [30]. Ben-Yoseph et al. [31] hanno identificato fonti di perdita di marcatura ^2H durante la glicolisi quando si utilizza [1- ^2H] e glucosio.

Nel 2017, Lu et al. [32] hanno pubblicato il primo studio in vivo di spettroscopia di risonanza magnetica del deuterio sul metabolismo del glucosio nel cervello di ratti. Utilizzando una magnetizzazione a 16,4 T, sono stati in grado di ottenere spettri ^2H RMN di alta qualità in soli 15 secondi (con un periodo di rilassamento di 300 ms e 50 media). Questi spettri sono stati utilizzati per acquisire dati di risonanza magnetica spettroscopica dinamici (RMS) durante e dopo un bolo di glucosio. Utilizzando la modellazione metabolica, i dati hanno fornito valori quantitativi per i flussi metabolici, incluso il ciclo dell'acido tricarbossilico. In alternativa alla RMS dinamica, De Feyter et al. [33] hanno utilizzato la sensibilità elevata della risonanza magnetica del deuterio per generare mappe metaboliche a stato stazionario (cioè senza cambiamenti di tempo) di glucosio, glutammato + glutammina (Glx) e lattato in ratti e cervelli umani. Le mappe metaboliche del lattato e del Glx ottenute attraverso DMI sono state convertite in una mappa dell'effetto Warburg (Lac/Glx) che mostra il predominio relativo del metabolismo non ossidativo su quello ossidativo. La mappa dell'effetto Warburg ha dimostrato un alto rapporto segnale-rumore tra tumore e tessuto sano. Questi studi hanno evidenziato la robustezza delle acquisizioni di ^2H RMN in vivo, che sono facili da eseguire e ora hanno una sensibilità sufficientemente alta per sfidare e superare la sensibilità della risonanza magnetica spettroscopica del carbonio-13 (^{13}C RMN) e per fornire immagini metaboliche con una sufficiente risoluzione spaziale per la ricerca e le applicazioni cliniche. Da quando sono state pubblicate le prime ricerche sulla DMS e DMI, molti ricercatori in tutto il mondo hanno iniziato a eseguire acquisizioni di ^2H RMN presso le loro istituzioni locali.

Nella ricerca di de Graaf et al. [34], è stato dimostrato che l'utilizzo della spettroscopia metabolica al deuterio (DMS) presenta una sensibilità super lineare rispetto all'intensità del campo magnetico. Ciò significa che, a intensità di campo più elevate, la DMS è in grado di fornire spettri RMN di deuterio di alta qualità dal cervello umano. Utilizzando una risoluzione spaziale di 1 ml per voxel, i ricercatori sono stati in grado di ottenere questi risultati a una intensità di campo magnetico di 7T. Inoltre, Kreis et al. [35] hanno individuato un buon equilibrio tra risoluzione temporale e spaziale per mappare

dinamicamente il flusso di glucosio nei tumori del fianco dei topi utilizzando la DMS. Riis-Vestergaard et al. [36] hanno utilizzato glucosio per distinguere tra assorbimento di glucosio e metabolismo nel tessuto adiposo bruno termoneutrale e acclimatato al freddo nei ratti. Ye et al. [37] e Mahar et al. [38] hanno utilizzato la DMS e la DMI per ottenere nuovi dati sulle vie metaboliche sottostanti. Rich et al. [39] hanno utilizzato un approccio di rilevamento inverso in cui osservavano la diminuzione del segnale di risonanza magnetica protonica (^1H RM) in seguito alla somministrazione di glucosio utilizzando la DMS. Von Morze et al. [40] hanno confrontato l'utilizzo di ^{13}C RM iperpolarizzato di piruvato con DMI di glucosio nella caratterizzazione del metabolismo energetico cerebrale. Infine, Straathof et al. [41] hanno dimostrato l'utilità della DMI in un modello di roditore di ictus ischemico.

2.2 Deuterio e sue proprietà in RMS

2.2.1 Abbondanza naturale

L'abbondanza naturale di un isotopo (NA) rappresenta la quantità media di tale isotopo presente in modo naturale sulla Terra. All'interno della tavola periodica degli elementi, il peso atomico assegnato per ciascun elemento corrisponde all'abbondanza naturale degli isotopi di quell'elemento presenti sulla Terra, ovvero è il rapporto tra il numero di atomi di un isotopo specifico di un elemento e il numero totale di atomi dell'elemento stesso.

Il deuterio, noto anche come idrogeno pesante, è un isotopo stabile dell'idrogeno che ha un peso circa doppio rispetto all'idrogeno comune. Questa differenza di peso è dovuta al fatto che il nucleo del deuterio è composto da un protone e un neutrone, mentre quello dell'idrogeno comune è composto solo da un protone. L'idrogeno è l'elemento più abbondante dell'Universo, forma fino al 75% della materia, in base alla massa, e più del 90% in base al numero di atomi.

Il neutrone presente nel deuterio non influenza la carica del nucleo né la specie chimica dell'elemento, che rimane idrogeno. Tuttavia, esso aumenta il peso dell'atomo che risulta quindi un isotopo a peso due dell'idrogeno normale infatti ha proprietà fisiche leggermente diverse, come ad esempio una densità maggiore. L'abbondanza naturale di deuterio nell'acqua è stata determinata sull'acqua oceanica media standard (SMOW) con un valore medio di 156 ppm [42]. Tuttavia, sono stati rilevati valori variabili fino al 15% per l'acqua proveniente da diverse regioni del mondo. Queste variazioni geografiche e stagionali del contenuto di deuterio sono dovute al frazionamento isotopico causato da processi di evaporazione e condensazione durante il ciclo globale dell'acqua, che coinvolge oceani, nuvole, precipitazioni e fiumi. Rossman e Taylor [43] definirono il contenuto isotopico rappresentativo del deuterio, o quantità di deuterio presente, nelle acque dolci delle zone temperate come 115 ppm e successivamente adottato dalle raccomandazioni dell'International Union of Pure

and Applied Chemistry (IUPAC) per la nomenclatura RMN [44]. La concentrazione di deuterio nell'acqua all'interno di tessuti con un contenuto d'acqua del 70% può variare da 8,9 a 12,1 mM a seconda del valore di abbondanza naturale utilizzato.

Gli spettri ^2H RMN dei tessuti in vivo sono caratterizzati da un segnale dell'acqua originato dalla presenza di deuterio in abbondanza naturale. Il segnale d'acqua deuterata (HDO) è di dimensioni sufficientemente ridotte da non richiedere la soppressione dell'acqua, inoltre, a condizione che il contenuto di acqua nei tessuti e l'abbondanza naturale di deuterio siano conosciuti, fornisce un comodo punto di riferimento di concentrazione interna. Uno studio che utilizza il metodo di marcatura con isotopi (DMI) aumenterà il contenuto di acqua deuterata. Per esempio, dopo un intervallo di tempo sufficiente dalla somministrazione di $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ -glucosio, essenzialmente tutto il deuterio del $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ -glucosio somministrato finirà nel pool dell'acqua corporea, aumentando il livello di HDO fino al 50% rispetto all'abbondanza naturale. Nel caso in cui il segnale d'acqua del tessuto deve essere utilizzato come riferimento quantitativo di concentrazione, sarà necessario determinare il contenuto di deuterio del tessuto. Dal momento che generalmente si assume che il contenuto di deuterio nell'acqua sia costante in tutto il corpo, questo valore può essere determinato misurando il contenuto di deuterio nei fluidi corporei facilmente accessibili.

Oltre ai metodi come la cromatografia a gas-spettrometria di massa (GC-MS), la RMN può essere utilizzata per quantificare la presenza di deuterio nei biofluidi [45]. Nel corso del tempo, il deuterio nell'acqua corporea tornerà gradualmente ai livelli di abbondanza naturale, poiché l'acqua viene costantemente eliminata e reintegrata dal corpo. Negli esseri umani, questi livelli di base saranno raggiunti in circa 4-5 settimane [46], mentre nei topi questo processo richiederà meno di 2 settimane [19].

2.2.2 Substrati marcati al deuterio

Il deuterio presenta caratteristiche RM che lo rendono utile per lo studio dei processi metabolici in vivo, quali il suo spin nucleare, il momento magnetico e il rilassamento magnetico più lunghi rispetto all'idrogeno normale infatti consentono una migliore visualizzazione delle strutture contenenti deuterio. Inoltre, viene utilizzato come tracciante metabolico perché è non radioattivo, non è tossico e può essere facilmente rilevato e quantificato nei tessuti biologici.

La marcatura con isotopi è una tecnica utilizzata per tracciare e studiare reazioni chimiche e processi biologici. Quando si introduce un metabolita, per esempio il glucosio, nell'organismo, diventa difficile distinguerlo da quello già presente all'interno del corpo. Pertanto, è necessario iniettare una sostanza leggermente modificata, ma con medesime proprietà chimico-fisiche della sostanza di interesse, che sia tuttavia misurabile attraverso tecniche diagnostiche, detto tracciante. Generalmente,

un tracciante isotopico è un isotopo stabile o radioattivo inserito in un sistema per monitorare o studiare il flusso, il cambiamento o il destino di una sostanza specifica all'interno del sistema. È importante considerare le proprietà degli isotopi utilizzati, il loro metodo di introduzione nel sistema e le interazioni con il sistema stesso per ottenere risultati accurati.

A differenza degli isotopi radioattivi, il deuterio è un isotopo stabile e non subisce decadimento nel tempo. La marcatura dei substrati con ^2H comporta la sostituzione di uno o più atomi di ^1H con ^2H . Tuttavia, poiché gli atomi ^2H non fanno parte della struttura delle molecole, potrebbero interagire con le molecole d'acqua circostanti attraverso processi non enzimatici, o la marcatura ^2H potrebbe andare persa in reazioni enzimatiche [1]. In ogni caso, la perdita di marcatura ^2H in vivo è minima, altrimenti non sarebbe praticabile condurre analisi basate su DMI poiché non si potrebbero identificare i metaboliti di interesse. Ottenere una quantificazione precisa delle concentrazioni di metaboliti ^2H marcati richiede la conoscenza della frazione di perdita di ^2H durante il metabolismo del substrato di interesse.

La perdita di marcatura con deuterio può essere un problema in studi di cinetica degli scambi di idrogeno, in cui il deuterio può scambiarsi con l'idrogeno normale all'interno di una molecola. Ciò può portare a un abbassamento dell'arricchimento di deuterio nel campione osservato, influenzando la precisione dei risultati. Per minimizzare questo problema, è fondamentale utilizzare tecniche di manipolazione del campione adeguate e lavorare in ambienti privi di acqua protonata. Gli agenti di stabilizzazione dell'isotopo, come il HDO (acqua deuterata), possono essere utilizzati per prevenire la perdita di marcatura. L'analisi della perdita di marcatura con deuterio può offrire informazioni preziose sulla dinamica delle reazioni chimiche e dei processi biologici, rivelando dettagli sulla velocità di scambio di idrogeno in diverse posizioni delle molecole. Queste informazioni possono essere impiegate per comprendere meccanismi di reazione, vie metaboliche e altre proprietà chimiche delle molecole in studio.

Nel tracciamento del percorso metabolico della scomposizione del glucosio [$\text{U-}^{13}\text{C}$], ossia dove gli atomi di carbonio sono uniformemente marcati con ^{13}C , la glicolisi e il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) possono essere tracciati tramite la spettroscopia ^{13}C RMN. Sebbene gran parte della marcatura ^{13}C venga incorporata negli intermedi del ciclo del TCA, la marcatura ^{13}C nelle posizioni del glucosio C3 e C4 viene persa sotto forma di anidride carbonica durante la conversione da piruvato ad acetil-CoA attraverso l'enzima piruvato deidrogenasi. La marcatura ^{13}C nelle posizioni C1, C2, C5 e C6 del glucosio viene invece trasferita agli intermedi del ciclo TCA, al glutammato, alla glutammina e ad altri composti, fornendo una visione dettagliata del metabolismo del glucosio. Nel corso del tempo, la marcatura ^{13}C da tutte le posizioni del glucosio finisce, attraverso molteplici cicli del TCA, nel pool non specifico dell'anidride carbonica.

Gli studi DMS e DMI si concentrano sulla perdita di marcatura dell'isotopo ^2H nel pool d'acqua non specifico. Gran parte delle modalità di perdita della marcatura ^2H può essere dedotta dalla stechiometria complessiva delle reazioni chimiche coinvolte, soprattutto quando ci sono riduzioni nel numero di protoni in una determinata posizione di carbonio (Figura 11). Ad esempio, durante la conversione della gliceraldeide-3-fosfato (GADP) in 1,3-bisfosfatoglicerato (1,3-BPG), un gruppo aldeidico viene ossidato e fosforilato, causando la rimozione di un protone (o deuterone) dalla posizione del glucosio C3 o C4. Il fosfoenolpiruvato (PEP) non ha protoni nelle posizioni C1 e C2, quindi la perdita della marcatura ^2H dalle posizioni C2, C3, C4 e C5 del glucosio è del 100% durante la glicolisi. Per lo studio della glicolisi e di vie metaboliche successive, è necessario deutereare il glucosio nelle posizioni C1, C6 o entrambe.

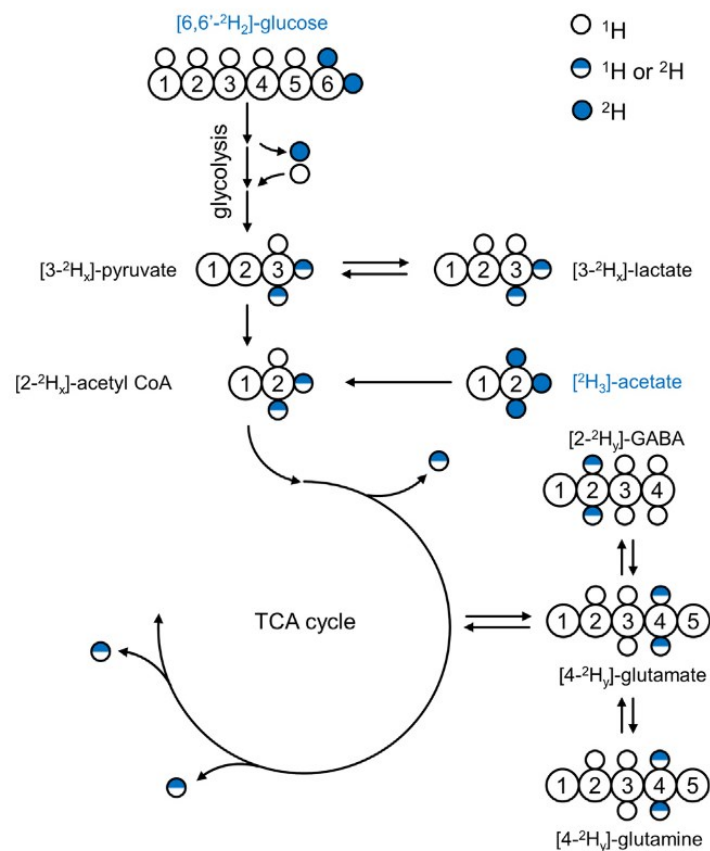


Figura 11: Flusso della marcatura del deuterio attraverso i processi metabolici della glicolisi e del ciclo di Krebs, utilizzando substrati specifici.

Attraverso l'uso di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{-glucosio}$ come substrato metabolico, si avvia il processo di trasferimento della marcatura del deuterio lungo la via glicolitica, con conseguente marcatura dei gruppi metilici del piruvato, del lattato e dell'acetil-CoA. Durante questa serie di reazioni di conversione glicolitica e di scambio, parte della marcatura del deuterio si perde nel vasto pool d'acqua non specifica, causando una relazione non stechiometrica tra il substrato marcato e il prodotto risultante (cioè, $0 < x < 2$). Successivamente, dopo l'ingresso nel ciclo di Krebs, si verifica un ulteriore processo di perdita della marcatura di ^2H . A questo punto, la marcatura del deuterio si localizza nella posizione

H4/4' del glutammato e della glutammina, oltre che nella posizione H2/H2' del GABA ($0 < y < x$). Durante il proseguimento nel ciclo di Krebs, si verifica una perdita completa della marcatura del deuterio. L'utilizzo del substrato [$^2\text{H}_3$]-acetato consente di bypassare la glicolisi e le perdite associate di marcatura del deuterio. Questo substrato entra nelle vie metaboliche direttamente a livello dell'acetil-CoA. È interessante notare che la quantità di marcatura del deuterio (y) nei prodotti successivi generalmente non è la stessa quando si utilizza [6,6'- $^2\text{H}_2$]glucosio o [$^2\text{H}_3$]-acetato come substrato. Ciò riflette le dinamiche complesse del flusso metabolico e della marcatura del deuterio attraverso i vari processi biochimici [1].

Altre perdite di marcatura ^2H sono meno evidenti e non derivano direttamente dalla stechiometria complessiva delle reazioni. In generale, conoscere la quantità esatta di perdita è essenziale per modellare quantitativamente il flusso di marcatura ^2H attraverso le vie metaboliche e determinare i flussi assoluti dei metaboliti.

Le misurazioni allo stato stazionario forniscono informazioni sulla presenza di vie metaboliche attive, mentre le misurazioni dinamiche possono anche rivelare il flusso metabolico attraverso esse, che fanno parte della branca di ricerca definita Metabolic Flux Analysis (MFA). Sebbene uno studio dinamico fornisca un maggior contenuto informativo e includa intrinsecamente la misurazione dello stato stazionario, comporta una maggiore richiesta di acquisizione e analisi dei dati DMI, una maggiore complessità logistica e una possibile riduzione della conformità del soggetto. La raccolta di dati DMI dinamici implica spesso un compromesso tra la risoluzione spaziale e temporale, poiché l'aumento della risoluzione temporale può comportare una diminuzione della risoluzione spaziale e un aumento degli effetti del volume parziale. In particolare, l'elaborazione dei flussi metabolici da dati dinamici richiede l'impiego di modelli metabolici quantitativi che tengano conto delle perdite di marcatura ^2H sia nei substrati marcati con deuterio che nei prodotti osservati. Per confermare che le perdite di marcatura ^2H siano specifiche per il percorso metabolico e indipendenti dall'organismo o dalla condizione, ulteriori indagini per diversi substrati e organismi sono necessarie.

Dal momento che le determinazioni del flusso metabolico devono coprire sia il periodo dinamico che lo stato stazionario dell'accumulo della marcatura ^2H , una scansione DMI dinamica richiederebbe generalmente più tempo e potrebbe essere meno tollerata dal paziente rispetto a una scansione DMI allo stato stazionario. Nonostante la determinazione dei flussi metabolici assoluti sia intrinsecamente preziosa, sembra che, in un contesto clinico, la praticità favorisca una misurazione allo stato stazionario con somministrazione orale di glucosio.

La DMI può impiegare un ampio spettro di substrati marcati con ^2H per esplorare una vasta gamma di processi metabolici. Oltre al glucosio deuterato, sono stati utilizzati l'acetato, la colina e la metionina per indagare il metabolismo in vivo. I substrati metabolici tradizionalmente utilizzati per gli studi di risonanza magnetica ^{13}C , sia convenzionali che iperpolarizzati, possono essere adattati al DMI con alcune precauzioni. Le principali considerazioni nel passaggio da ^{13}C a ^2H riguardano la

conservazione della marcatura ^2H e la risoluzione spettrale necessaria per distinguere i segnali del substrato da quelli dei prodotti metabolici. Ad esempio, il $[2-^{13}\text{C}]$ -glucosio è stato usato per esaminare il flusso attraverso l'anaplerosi. Tuttavia, l'analogo deuterato corrispondente, $[2-^2\text{H}]$ -glucosio, non è adatto a questo scopo poiché tutti i deuteri nelle posizioni di glucosio da C2 a C5 vengono persi durante la glicolisi [1]. Nonostante queste limitazioni, è verosimile che nuovi composti e substrati verranno ulteriormente esplorati grazie alla disponibilità di opzioni convenienti e biologicamente rilevanti.

Inoltre, è importante sottolineare che mentre la DMI può offrire vantaggi nell'indagine di specifici aspetti metabolici, come le perdite di marcatura ^2H e le dinamiche delle vie metaboliche, le misurazioni basate su isotopi di ^{13}C rimangono una risorsa preziosa per sondare i dettagli molecolari dei processi metabolici in vivo. La scelta tra l'uso di isotopi di ^2H e ^{13}C dipenderà dalle cose che si vuole indagare e dalla capacità di ciascuna tecnica di fornire informazioni dettagliate e accurate.

In questa sezione si analizzeranno in dettaglio le proprietà della risonanza magnetica del deuterio, le quali rendono possibile l'impiego di questo isotopo nel metabolismo in vivo.

2.2.3 Effetti biologici

Gli effetti biologici del deuterio sono stati oggetto di interesse sin dalla sua scoperta da parte di Urey [11]. Inizialmente, gli studi si sono concentrati sulla capacità di organismi viventi di sopravvivere in presenza di alte quantità di acqua deuterata. Alcuni microrganismi sono stati in grado di prosperare in acqua contenente più del 90% di deuterio, ma la maggior parte degli esseri viventi dei vertebrati non è sopravvissuta in presenza di arricchimenti di acqua ^2H superiori al 50%. Nonostante i meccanismi precisi non siano mai stati completamente compresi, si ritiene che livelli molto elevati di deuterio abbiano causato insufficienza multiorgano [47]. Questi primi studi probabilmente hanno contribuito all'erronea idea che bere acqua pesante fosse tossico. Tuttavia, ulteriori indagini su animali ed esseri umani con arricchimenti di ^2H inferiori al 15% hanno dimostrato pochi o nessun effetto avverso e sono stati riportati in diverse pubblicazioni [47-51].

Gli studi sull'uomo che hanno coinvolto l'uso dell'acqua deuterata hanno riguardato diverse aree [52-54], come il metabolismo del corpo intero, la proliferazione cellulare e la sintesi del DNA. In uno studio tipico, il soggetto beve 50 ml di HDO per diversi giorni o settimane, aumentando l'arricchimento di deuterio nel corpo fino al 0,5-1,5%. Queste dosi e questi livelli di arricchimento sono considerati sicuri e non hanno effetti negativi noti. Tuttavia, può verificarsi vertigine transitoria o nausea dopo l'assunzione iniziale di HDO, che è probabilmente dovuta a cambiamenti nelle proprietà del flusso di massa dell'acqua percepiti dalle cellule ciliate dell'apparato vestibolare

dell'orecchio interno, che hanno il compito di captare i suoni e i movimenti della testa e di trasmetterli poi al cervello sotto forma di impulsi nervosi.

In un tipico studio DMI in vivo su soggetti umani, viene somministrato il [6,6'-²H₂]-glucosio alla dose di 0,75 g per kg di peso corporeo. Una dose di 60 g corrisponde a 330 mmol di glucosio o 660 mmol di deuterio. Un soggetto umano di 80 kg con un contenuto di acqua del 70% contiene 716 mmol di deuterio di abbondanza naturale (0,0115%). I deuteri del [6,6'-²H₂]-glucosio, durante il loro metabolismo, finiranno principalmente nell'acqua del corpo, aumentando così il contenuto di ²H dell'acqua corporea da 716 mmol a 1376 mmol o, equivalentemente, da 115 ppm a 221 ppm di arricchimento.

La quantità relativamente limitata di ²H associata agli studi DMI basati su [6,6'-²H₂]-glucosio comporta un incremento modesto nell'arricchimento di ²H. L'esecuzione di 5 scansioni DMI in modo longitudinale mantiene l'arricchimento totale di ²H nel corpo ben al di sotto dello 0,1%, anche considerando l'ipotesi che nessun ²H esca dal corpo durante tale analisi longitudinale. Invece, nel sangue, substrati deuterati come il [6,6'-²H₂]-glucosio possono innalzare l'arricchimento di ²H durante e subito dopo la somministrazione, raggiungendo livelli adeguati superiori al 15%. A seconda della via di somministrazione (endovenosa o orale) e dei livelli iniziali di glucosio nel plasma, l'arricchimento di ²H nel glucosio ematico può raggiungere il 60-75% nell'organismo.

L'effetto isotopico cinetico (KIE) si verifica quando la sostituzione di un isotopo con un altro ha un impatto sulla velocità di una reazione chimica, ovvero le velocità di reazione in presenza di deuterio (k_D) sono ridotte rispetto a quelle che coinvolgono solo protoni (k_H). Sebbene le misurazioni disponibili su KIE in vivo siano limitate, i dati di Funk et al. [55] riguardanti [U-²H₇]-glucosio nel cuore di ratto e i risultati di [1] per l'utilizzo di [6,6'-²H₂]-glucosio nel cervello di ratto e nelle cellule tumorali [56] indicano tutti un KIE molto piccolo per il metabolismo del glucosio glicolitico. Anche se i KIE per il glucosio deuterato in vivo sembrano piccoli, è importante stabilire i valori per ogni substrato specifico e anche per ogni posizione all'interno di un substrato. Nonostante la presenza di un KIE piccolo, gli studi hanno dimostrato che il glucosio deuterato è sicuro per l'uso umano, sia negli adulti [57] che nei bambini. [58]

2.2.4 Spostamenti chimici in RMS

Nel caso del deuterio, la sostituzione di un atomo di idrogeno con un atomo di deuterio può causare uno spostamento chimico considerevole del segnale. Nella maggior parte dei composti, le differenze nelle frequenze di risonanza tra il deuterio e il protone si limitano a circa 0,06 ppm [59]. Tuttavia, se una molecola ha un legame idrogeno intramolecolare rilevante, la sostituzione del protone con il deuterio può causare uno spostamento della frequenza di risonanza fino a 0,6 ppm [60]. Inoltre, la

deuterazione di un composto può avere un piccolo effetto sulla sua costante di ionizzazione (pKa) [61], fattore importante per composti con un pKa vicino al pH fisiologico di 7 (come l'acetato o l'imidazolo). Quando la presenza di deuterio viene rilevata in modo indiretto, si ottengono spostamenti del segnale che variano in base al numero di legami che il deuterio condivide con gli altri atomi nella molecola. In particolare, si riscontrano spostamenti di circa -0,017 ppm per legami di deuterio con ^1H RMN e spostamenti di circa -0,235 ppm per deuterio con ^{13}C RMN.

2.2.5 Rilassamento e sensibilità in RMS

Il rilassamento magnetico di un nucleo di spin 1/2 come il protone o il deuterio può essere descritto da due costanti di tempo, T1 e T2. La costante di tempo T1 descrive il tempo necessario per il sistema di spin di tornare all'equilibrio magnetico, ovvero il tempo che passa prima che la magnetizzazione del sistema torni alla sua condizione di equilibrio dopo essere stata disturbata da una perturbazione. La costante di tempo T2 descrive il tempo necessario per il sistema di spin di perdere la coerenza, ovvero il tempo che passa prima che le diverse componenti della magnetizzazione cessino di evolvere in modo sincrono. Il deuterio ha un momento quadrupolare (misura di distribuzione di carica), che porta a tempi di rilassamento T1 e T2 relativamente brevi. Inoltre, il rapporto T1/T2 del deuterio è favorevole per l'analisi RMN, poiché permette di ottenere un ampio segnale di media senza perdere troppa risoluzione spettrale. Ciò significa che è possibile ottenere un buon segnale utilizzando tempi di ripetizione moderatamente lunghi, il che aumenta la sensibilità dell'analisi RMN. Tuttavia, la sensibilità del deuterio è ancora inferiore a quella del protone, poiché la frequenza di Larmor del deuterio è circa 6,5 volte inferiore a quella del protone. Ciò significa che è necessario utilizzare campi magnetici più elevati o più potenti bobine RF per ottenere una buona sensibilità del deuterio. La Figura 12 riassume i tempi di rilassamento T1 e T2 per composti deuterati in vivo e in vitro nel tessuto cerebrale [32,33]. La figura 12A descrive le costanti di rilassamento T1 del deuterio misurate per l'acqua di abbondanza naturale, glucosio e glutammato+glutamina nel cervello umano (4T) o nei ratti (11,7 T e 16,4 T) in vivo e lattato sui cervelli dei ratti post mortem (11,7T). In generale, i tempi di rilassamento T1 per l'acqua in vivo sono di circa 350 ms, senza una dipendenza significativa dall'intensità del campo magnetico. Il glucosio e Glx (derivato del glucosio) si rilassano più rapidamente, con T1 intorno a 50-60 ms e 150-200 ms, rispettivamente. Il lattato, misurato nel tessuto cerebrale post mortem in situ, ha un T1 più lungo di circa 300 ms. La figura 12B descrive le costanti di rilassamento T2 del deuterio misurate per l'acqua di abbondanza naturale, glucosio e glutammato+glutamina nel cervello umano (4T) o nei ratti (11,7 T) in vivo e lattato sui cervelli dei ratti post mortem (11,7T). Le costanti di tempo di rilassamento T2 in vivo sono generalmente inferiori a 50-60 ms per i metaboliti e circa 20-30 ms per l'acqua. Il rilassamento T2, del deuterio tende a

diminuire con l'aumento dell'intensità del campo magnetico. Il rapporto favorevole tra T1 e T2 consente di ottenere una maggiore sensibilità nella RM con il deuterio, mantenendo al contempo una risoluzione spettrale sufficientemente elevata per separare composti come l'acqua, il glucosio, il Glx e il lattato a intensità di campo magnetico adatte per la RMN in vivo. Negli studi DMS e di DMI, spesso è utilizzato un tempo di ripetizione compreso tra 140-400 ms con angoli di nutazione dell'eccitazione compresi tra 50°-90°. Tuttavia, queste impostazioni possono causare una saturazione parziale del segnale nei composti come l'acqua, il Glx e il lattato, anche se il segnale del glucosio viene completamente rilassato. Quando si cerca di effettuare studi DMS o DMI quantitativi, questo effetto deve essere considerato e corretto in base a T1 e B1, cioè, l'intensità del campo magnetico. La Figura 12C descrive le costanti del tempo di rilassamento T1 e T2 per l'acqua di abbondanza naturale in vitro (in condizioni di laboratorio) che sono simili, pari circa a 400 ms come previsto nel caso di restringimento estremo [62]. Un T2 di lunga durata è di solito indesiderabile per gli spettri realistici, ovvero modelli di riferimento di sistemi biologici, che mirano a imitare la situazione in vivo. Tuttavia, il rilassamento T2 dell'acqua può essere notevolmente ridotto, senza un effetto significativo su T1, mescolando l'acqua con agar al 1,5% o con MnCl₂ 5 mM.

I tempi di rilassamento del deuterio sono determinati principalmente da un meccanismo di rilassamento quadrupolare, con un contributo minore da rilassamento dipolare dovuto a protoni o elettroni vicini. Tuttavia, poiché il rilassamento dipolare dipende dal quadrato del rapporto giromagnetico, il contributo dipolare al rilassamento del deuterio è solo circa il 2,4% di quello del protone. Ciò è dimostrato dal fatto che è necessario utilizzare una quantità di MnCl₂ pari a 5 mM (rispetto a 0,1 mM per i protoni) per ottenere un significativo accorciamento delle costanti di tempo di rilassamento T1 e T2 del deuterio.

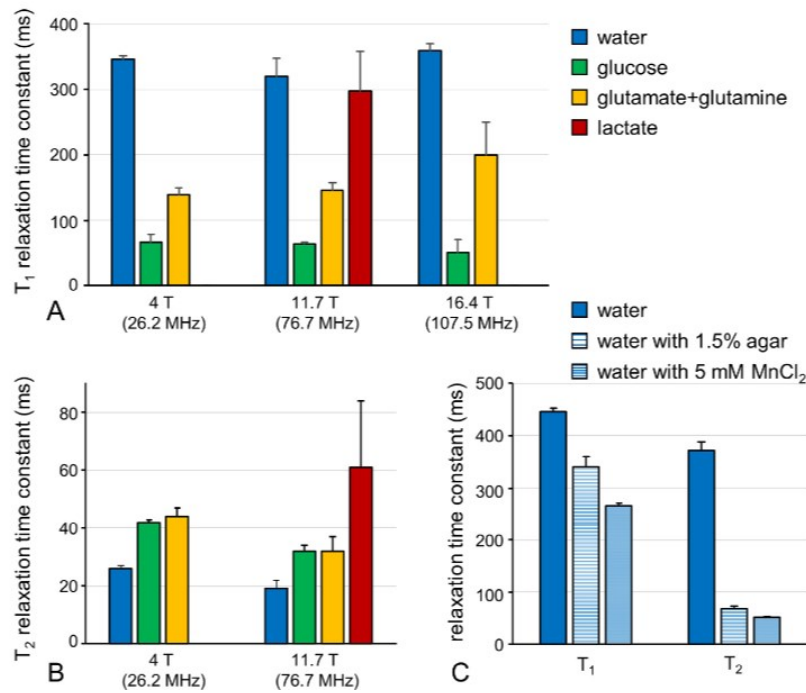


Figura 12: Costanti di tempo di rilassamento T_1 e T_2 del deuterio, sia in contesto in vivo che in vitro. (A) Costanti di tempo di rilassamento T_1 del deuterio misurate per diversi composti, tra cui l'acqua ad abbondanza naturale, il [6,6'-2H₂]-glucosio e il [4-2H]-glutammato + glutammina, sia nell'essere umano (4 T) che nel cervello del ratto (11,7 T e 16,4 T) in vivo. Inoltre, le costanti T_1 sono state determinate per il [3-2H]-lattato nel cervello del ratto post mortem (11,7 T). I valori di T_1 sono stati ottenuti utilizzando la tecnica di inversion-recovery a 4 T/11,7 T e 16,4 T, come descritto nei lavori di De Feyter et al. (5) e Lu et al. (4).

(B) Costanti di tempo di rilassamento T_2 del deuterio misurate per l'acqua ad abbondanza naturale, il [6,6'-2H₂]-glucosio e il [4-2H]-glutammato + glutammina, sia nell'essere umano (4 T) che nel cervello del ratto (11,7 T) in vivo. Inoltre, le costanti T_2 sono state valutate per il [3-2H]-lattato nel cervello del ratto post mortem (11,7 T). Tutti i valori di T_2 sono stati ottenuti mediante misurazioni di eco di spin di Hahn.

(C) Costanti di tempo di rilassamento T_1 e T_2 del deuterio per l'acqua ad abbondanza naturale in contesto in vitro, le misurazioni sono state effettuate su tre diverse tipologie di campioni: acqua deionizzata, acqua deionizzata miscelata con 1,5% di agar e acqua deionizzata miscelata con 5 mM di MnCl₂.

Le barre del grafico rappresentano la media \pm SD (deviazione standard dei valori).

Irving et al. hanno sfruttato questa caratteristica per misurare il sovraccarico di ferro nel fegato utilizzando spettri di RMN dell'acqua deuterata in vivo. Inoltre, il rilassamento T_1 del deuterio aumenta leggermente all'aumentare dell'intensità del campo magnetico, mentre il rilassamento T_2 diminuisce leggermente. Questi risultati sono in accordo a quelli ottenuti per i metaboliti del protone [63], poiché la dipendenza di T_1 e T_2 dal tempo di correlazione della rotazione e dalla frequenza di Larmor è simile sia per il rilassamento dipolare che per il quadrupolare [62].

Il rapporto segnale-rumore (signal-to-noise ratio, SNR) in risonanza magnetica è una misura della qualità del segnale che viene ricevuto. Maggiore è l'SNR, migliore è la qualità del segnale. Il SNR è più alto a campi magnetici più elevati, il che rende possibile la diffusione di metilene dell'intero cervello a 7,0 T con una risoluzione spaziale di 1 ml. La sensibilità della risonanza magnetica del

deuterio aumenta in modo lineare con l'intensità del campo magnetico B_0 [34], raggiungendo livelli prossimi al massimo teorico per bobine di ricezione in cui il rumore è dominato dalla bobina RF. Questo effetto è stato osservato sia per bobine di superficie di 30 mm di diametro a campi magnetici compresi tra 4,0 T e 11,7 T, sia per bobine di superficie di diametro maggiore di 80 mm per studi sull'uomo fino a 7,0 T. Tuttavia, la risoluzione spaziale dell'imaging metabolico, come la DMI, è sempre inferiore rispetto a quella della risonanza magnetica convenzionale, poiché si basa su segnali di metaboliti che rappresentano solo fino a 30 mM di protoni, mentre la risonanza magnetica si basa principalmente su un segnale dell'acqua che rappresenta circa 75 M di protoni. Ciò porta ad una risoluzione spaziale più bassa per l'imaging metabolico e ad un maggiore effetto del volume parziale, dove il volume spettroscopico copre più regioni spaziali visibili nella risonanza magnetica. Poiché l'effetto del volume parziale può diluire o addirittura oscurare il segnale di interesse, è importante avere aspettative realistiche riguardo alla risoluzione spaziale della misura spettroscopica in relazione alla dimensione della patologia in esame. Infine, è importante notare che il volume nominale cubico del voxel (unità di spazio tridimensionale) in MRSI è sempre inferiore alla dimensione effettiva del voxel determinata dalla funzione di diffusione del punto [63].

2.3 Vantaggi di RMS al deuterio

La tecnica di spettroscopia a risonanza magnetica in vivo con ^2H è stata precedentemente utilizzata nell'analisi del metabolismo, ma è solo negli ultimi 25 anni che ha conosciuto un rinnovato interesse, grazie agli studi su DMS ad alto campo e DMI. Per comprendere i vantaggi di queste tecniche, è utile paragonare l'imaging metabolico basato su RMS ^2H con altri metodi di RMS, quali:

- L' ^1H RMS utilizza il segnale di risonanza magnetica dell'idrogeno per ottenere immagini ad alta risoluzione (inferiore al millimetro) delle molecole del metabolismo [64]. In generale è caratterizzato da segnali di acqua e lipidi che sono ordini di grandezza più grandi dei metaboliti di interesse (Figura 13A/B). Infatti, non è ancora stato adottato in modo sistematico in contesti clinici a causa di sfide tecniche legate alla soppressione dell'acqua e dei lipidi [34], l'omogeneità del campo magnetico e la quantificazione del segnale. Inoltre, le mappe metaboliche basate su ^1H RMS mostrano pool metabolici statici (insieme di nutrienti o di prodotti del loro metabolismo, di regola appartenenti alla stessa classe), che potrebbero non riflettere i processi metabolici dinamici reali. In questa tecnica, vengono utilizzati segnali di spin di protoni selezionati per produrre immagini dettagliate di specifici tessuti biologici. L' ^1H RMS è la tecnica con maggiore sensibilità alle disomogeneità del campo magnetico; infatti, viene impiegata soprattutto negli studi cerebrali, aventi regioni anatomiche difficilmente raggiungibili, perché consente di rilevare i livelli dei metaboliti presenti. Dato che

l'alterazione metabolica precede quella strutturale, l' ^1H RMS rappresenta uno strumento diagnostico in grado di individuare precocemente diverse patologie, come neoplasie, epilessie, demenze e sclerosi multipla.

- Il ^{13}C RMS utilizza segnali di spin di atomi di carbonio-13 (^{13}C), isotopo non radioattivo del carbonio composti da 6 protoni e 7 neutroni, selezionati per produrre immagini dettagliate di specifici tessuti biologici. Questo viene fatto attraverso l'utilizzo di una sequenza di pulsazioni radiofrequenza selettive che indirizzano il segnale solo agli atomi di carbonio-13 desiderati. Questa tecnica viene utilizzata per gli studi di marcatura isotopica, ma può essere influenzata da segnali lipidici che, anche con un'abbondanza naturale del ^{13}C pari a 1,1%, possono sovrastare i segnali metabolici più piccoli (figura 13D). Per aumentare la sensibilità, vengono spesso utilizzati metodi RM avanzati come il potenziamento di Overhauser nucleare e il trasferimento di polarizzazione. Nonostante questi metodi possano migliorare la sensibilità, l'acquisizione dei dati deve essere effettuata su volumi di tessuto relativamente grandi (> 50 ml nel cervello umano) per ottenere un segnale-rumore sufficiente. Il ^{13}C RMS, in particolare se utilizzato con substrati arricchiti con ^{13}C è considerato il metodo di riferimento per il rilevamento non invasivo di vie metaboliche e flussi [65]. Tuttavia, non è ancora utilizzato in modo sistematico in contesti clinici di routine a causa della sua bassa sensibilità e della complessità tecnica, infatti in vivo è stato limitato a volumi relativamente grandi.
- Il ^{13}C RMS iperpolarizzato utilizza anch'esso il ^{13}C come nucleo attivo. Il principio fisico alla base dell'iperpolarizzazione ^{13}C è l'utilizzo di una combinazione di tecniche di polarizzazione magnetica, selezione di spin e manipolazione di spin per aumentare la quantità di ^{13}C in uno stato quantistico specifico. L'effetto di iperpolarizzazione dura solo per pochi minuti poiché gli spin iperpolarizzati tornano all'equilibrio termico. Questo aumento della polarizzazione magnetica aumenta la sensibilità del segnale RM e rende possibile l'acquisizione di immagini di alta qualità con una maggiore risoluzione. Inoltre, risolve alcuni dei problemi di sensibilità del ^{13}C RMS convenzionale creando e rilevando una grande polarizzazione di non equilibrio. Tuttavia, vi sono ancora sfide tecniche da affrontare per utilizzarlo in clinica, come l'iperpolarizzazione, la somministrazione del substrato e la rapida RMSI, nonché costi elevati e dosi di substrato sopra fisiologiche marcate.

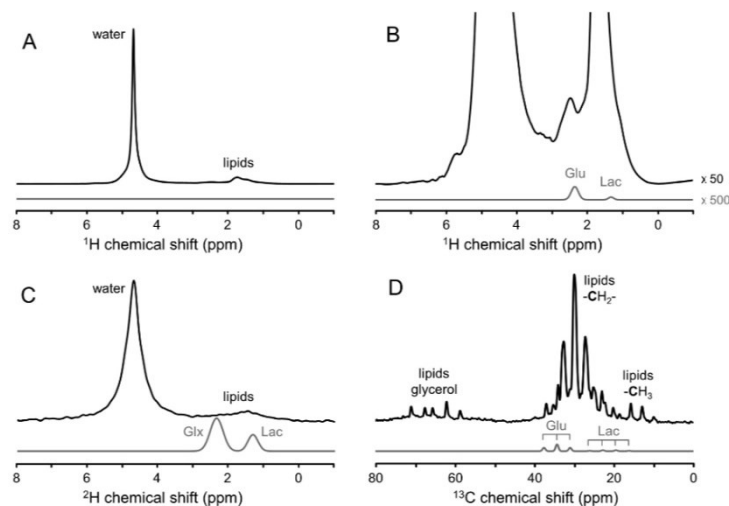


Figura 13: Differenza nell'intervallo dinamico tra i segnali di interesse (glutammato e lattato) e i segnali interferenti (acqua e lipidi) negli spettri di risonanza magnetica nucleare (RMN) a ^1H , ^2H e ^{13}C ottenuti dalla testa umana:

(A) Spettro di ^1H RMN (linea nera, $TR = 3000$ ms, 1 media). I segnali di glutammato e lattato sono indicati da linee grigio chiaro come linee gaussiane, scalate per approssimare l'abbondanza naturale del ^1H .

(B) Spettro di ^1H RMN (linea nera, $TR = 3000$ ms, 1 media) con i segnali di interesse (glutammato e lattato) rappresentati da linee grigio chiaro come linee gaussiane con ampiezze scalate di 50 volte rispetto a (A), per evidenziare meglio la distribuzione dei segnali.

(C) Spettro di ^2H RMN (linea nera, $TR = 333$ ms, 180 medie) con i segnali di interesse (glutammato + glutammina e lattato) rappresentati da linee grigio chiaro come linee gaussiane, scalate per rappresentare l'arricchimento in stato stazionario di ^2H a seguito dell'assunzione di $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ -glucosio.

(D) Spettro di ^{13}C RMN (linea nera, $TR = 3000$ ms, 128 medie) con i segnali di interesse (glutammato e lattato) rappresentati da linee grigio chiaro come linee gaussiane, scalate per rappresentare l'arricchimento in stato stazionario di ^{13}C a seguito dell'assunzione di $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -glucosio.

Inoltre, viene sottolineato che gli spettri sperimentali e simulati hanno la stessa scala verticale, ad eccezione di (B) dove gli spettri sperimentali e simulati di ^1H sono scalati rispettivamente di 50 e 500 rispetto ad (A).

Rispetto alle tecniche in precedenza, i vantaggi di ^2H DMS o DMI sono:

- L'acquisizione di dati tramite richiede l'impiego delle sequenze di acquisizione dell'impulso più semplici. Questo è principalmente dovuto alla bassa abbondanza naturale di ^2H , che porta a un segnale ridotto per composti concentrati e interferenti come l'acqua e i lipidi rispetto ai metaboliti di interesse arricchiti con ^2H [1]. Di conseguenza, il segnale RMN ^2H dei lipidi spesso è comparabile o inferiore al livello di rumore nello spettro generale, come mostrato nella Figura 13C. Sebbene entrambi gli spettri di ^1H e ^2H RMN siano sensibili alle disomogeneità del campo magnetico, la mancanza di segnali forti e la scarsità di spettri ^2H RMN limitano l'effetto di tali fenomeni. La disomogeneità del campo magnetico può causare una scarsa soppressione dell'acqua e una maggiore sovrapposizione spettrale, durante l'acquisizione di ^2H RMN; in ogni caso, questo effetto influirà principalmente sull'ampiezza

della linea. Questo è stato dimostrato attraverso spettri ^2H RMN di alta qualità ottenuti da regioni note per la loro disomogeneità del campo magnetico, come il bulbo olfattivo del ratto e la corteccia frontale umana [33].

- I metodi di acquisizione DMI sono anch'essi semplici, il che comporta una bassa deposizione di potenza RF. Negli studi RMN su ^1H e ^{13}C , i moduli di soppressione del volume esterno, gli impulsi di rifocalizzazione e il disaccoppiamento a banda larga possono rendere difficile rispettare le linee guida di sicurezza SAR (Search and Rescue). Al contrario, la lunghezza d'onda più lunga associata alla bassa frequenza di ^2H RMN fa sì che gli effetti delle onde stazionarie, che possono causare complicazioni negli studi umani di ^1H RMN ad alti campi magnetici, siano meno rilevanti.
- La tecnica di imaging metabolico DMS e DMI al deuterio dimostra di essere molto resistente alle imperfezioni sperimentali e fornisce dati di alta qualità. Sebbene possano sorgere problemi non direttamente correlati alla risonanza magnetica ^2H (come la ventilazione o le linee di infusione), l'utilizzo di questa tecnica su 15 soggetti umani e oltre 100 roditori ha raggiunto un tasso di successo vicino al 100%, con oltre il 90% dei dati acquisiti dal cervello ritenuti utili [1].

Nel condurre la RMN ^2H in vivo, ci sono tuttavia diverse considerazioni pratiche che richiedono attenzione. In particolare, l'uso di soluzioni di metaboliti, es. glucosio, marcati con deuterio può aumentare la concentrazione di deuterio nei tessuti e agevolare la rilevazione del segnale RMN ^2H . Dal momento che questo segnale è debole, potrebbe essere necessario impiegare sequenze di risonanza magnetica ad alta sensibilità come la sequenza di Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) per ottenere un segnale sufficientemente intenso. Il segnale RMN ^2H può essere influenzato dal rumore di fondo delle sequenze di risonanza magnetica, rendendo necessarie tecniche di riduzione del rumore come la media di acquisizioni multiple o l'impiego di un magnete ad alta intensità per ridurre il rumore di fondo. Poiché la concentrazione di deuterio nei tessuti è relativamente bassa, e può variare in base all'abbondanza naturale di deuterio nell'acqua e al tempo trascorso dalla somministrazione del metabolita marcante, è fondamentale considerare queste variabili nella valutazione dei dati ottenuti tramite RMN ^2H .

2.4 Applicazione di RMS al deuterio in vivo

La Deuterium Metabolic Imaging (DMI) è in grado di rilevare segnali di diversi composti marcati con deuterio all'interno di organismi viventi, attraverso lo spostamento chimico del ^2H . Un esempio di applicazione è quello riportato in Figura 14. Partendo dalla Figura 14A, si osserva il segnale rilevabile nello spettro ^2H RMN, prima della somministrazione esogena di [6,6'- $^2\text{H}_2$]glucosio,

proveniente principalmente dall'acqua con un'abbondanza naturale dello 0,0115%, equivalente a una concentrazione di ~10 mM di ^2H (cervello, 10,12 mM; fegato, 8,94 mM) [70]. Dopo sessanta minuti dall'infusione endovenosa di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{glucosio}$, in Figura 14B sono osservabili i segnali marcati con ^2H dal glucosio e dal lattato, nonché un picco sovrapposto di glutammato e glutammina (Glx) marcati con ^2H nel cervello di un ratto in vivo. Ulteriori spettri ^2H RMN sono stati acquisiti nel cervello di ratto post-mortem dopo l'infusione di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{glucosio}$ (Figura 14C) e in vivo dopo l'infusione di $[^2\text{H}_3]\text{acido acetico}$ (Figura 14D). In Figura 14E, uno spettro ^2H ottenuto dal cervello di un volontario umano sano dopo l'amministrazione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{glucosio}$ mostra gli stessi metaboliti marcati con ^2H presenti sia nel cervello umano che in quello di ratto (Figura 14B). L'acquisizione dello spettro ^2H nel cervello umano ad una minore intensità magnetica (4 T rispetto a 11,7 T) presenta una risoluzione spettrale intrinsecamente inferiore, causando una parziale sovrapposizione dei picchi. Tuttavia, la separazione dei picchi è sufficiente per consentire una quantificazione affidabile attraverso l'adattamento spettrale. Gli spettri RMN di deuterio acquisiti nel fegato di ratto e umano (Figura 14F) mostrano sovrapposizione tra le risonanze di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{glicogeno}$ e $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{glucosio}$. I valori T1 e T2 dell'acqua deuterata e del glucosio sono stati misurati in campioni di spettri d'acqua e agar, oltre che nel cervello di ratto e umano in vivo. Inoltre, sono stati misurati i parametri di rilassamento per Glx nel cervello di ratto e umano in vivo, e i valori di T1, T2 e T2* del lattato deuterato sono stati misurati nel cervello di ratto post-mortem. I valori T1 di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]\text{glucosio}$ e dei suoi metaboliti successivi variano da 60 a 350 ms. Il segnale dell'acqua mostra un rilassamento T2 biesponenziale che probabilmente riflette diversi compartimenti tissutali, con il componente T2 più lungo derivante dal liquido cerebrospinale e il componente più corto dall'acqua intracellulare, analogamente a quanto riportato in precedenza nel cervello del gatto [70].

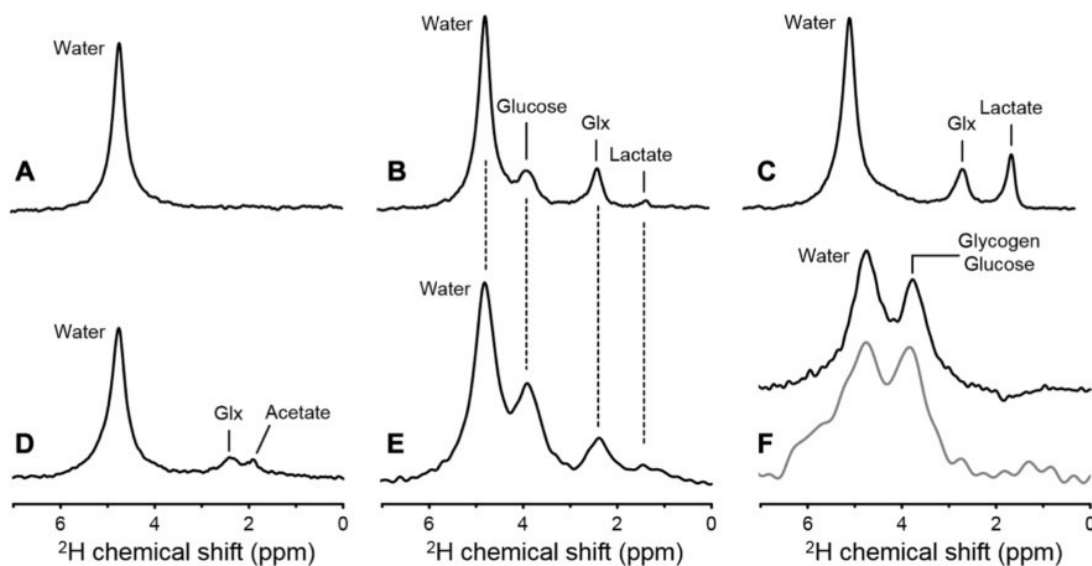


Figura 14: Spettri ^2H RMN acquisiti senza localizzazione da varie fonti:

(A) Spettro ^2H RMN del cervello di ratto in vivo a 11,7 T prima dell'infusione di qualsiasi substrato marcato con ^2H .

(B) Spettro ^2H RMN del cervello di ratto dopo l'infusione di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio in vivo.

(C) Spettro ^2H RMN del cervello di ratto dopo l'infusione di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio post-mortem.

(D) Spettro ^2H RMN del cervello di ratto dopo l'infusione di $[^2\text{H}_3]$ acetato in vivo.

(E) Spettro ^2H RMN acquisito dal cervello umano a 4 T, 60 minuti dopo l'amministrazione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio.

(F) Spettri ^2H RMN dal fegato di ratto (in alto, nero) e umano (in basso, grigio) dopo somministrazione endovenosa ed orale di glucosio marcato con ^2H , rispettivamente. Ciascuno degli spettri rappresentati è una media del segnale di 1 minuto.

Nonostante il campo magnetico inferiore utilizzato negli studi umani porti a una risoluzione spettrale proporzionalmente inferiore (confrontare ad esempio (B) e (E)), la limitata presenza di spettri ^2H RMN in combinazione con l'assenza di segnali di acqua o lipidi di ampia entità consente ancora un'identificazione e una quantificazione affidabile dei segnali metabolici.

2.4.1 DMI per la misura di marcatori tumorali nel cervello

In questa applicazione, viene utilizzata la tecnica DMI per studiare la differenza tra i livelli di glucosio deuterato e lattato marcati nel tessuto cerebrale normale e nei tumori in esperimenti effettuati sia su ratti che sull'uomo.

Per quanto riguarda lo studio sul cervello dei ratti, gli esperimenti sono stati condotti su ratti Fischer 344 (n = 9), dopo l'impianto delle cellule RG22. Queste sono state coltivate in fiaschette T75, seguendo le normali condizioni di coltura cellulare a una temperatura di 37°C e un'atmosfera del 5% di CO₂. Successivamente, le cellule RG2 sono state raccolte e circa 1250 di esse sono state sospese in 5 µl di mezzo Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) privo di siero e a basso contenuto di glucosio. Questa sospensione cellulare è stata iniettata nel cervello di ratti anestetizzati.

Il glucosio marcato da somministrare ai ratti è stato disciolto in acqua ad una concentrazione 1 M. Durante l'infusione sono stati somministrati 1,95 g di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio per kg di peso corporeo in uno studio della durata di 120 minuti. La scelta di utilizzare il glucosio marcato al sesto atomo di carbonio è stata motivata dal suo maggiore contenuto di deuterio (due atomi di ^2H) e dal costo inferiore, rispetto al $[1\text{-}^2\text{H}]$ glucosio. Inoltre, è stato preferito al $[1,2,3,4,5,6,6'\text{-}^2\text{H}_7]$ glucosio per ragioni economiche e per minimizzare la complessità degli spettri al deuterio.

Nei ratti portatori di tumore cerebrale, sono state acquisite immagini pesate in T1 dopo l'iniezione intravenosa o intraperitoneale di 200 µl dell'agente di contrasto T1 gadopentetato dimeglumina.

L'eccitazione del segnale è stata ottenuta con un impulso RF rettangolare di 90° della durata di 50 µs. Il DMI in stato stazionario del cervello animale è stato acquisito con una risoluzione spaziale nominale di 8 µl in circa 35 minuti (TR = 400 ms; otto medie).

I valori di T1 per l'acqua, il glucosio, Glx e il lattato sono stati stimati mediante tre parametri dell'ampiezza del segnale acquisito utilizzando un metodo di inversione-risposta non localizzato con 12 tempi di inversione distribuiti in modo logaritmico tra 10 e 2560 ms, e un TR di 2560 ms [66,67].

Per quanto riguarda le misurazioni globali di T2, queste sono state condotte tramite una sequenza di eco di spin non localizzato con 12 diversi tempi di eco compresi tra 6 e 400 ms. Le ampiezze dei segnali in declino sono state adattate con una funzione mono-esponenziale nel caso del glucosio marcato, Glx e lattato, e con una funzione bi-esponenziale per l'acqua marcata con ^2H . È importante notare che gli accoppiamenti scalari $^2\text{H}^2\text{H}$ sono nell'ordine di 0,1 a 0,2 Hz e pertanto non influenzano significativamente le stime di T2 dei metaboliti, che rientrano nell'intervallo tra 50 e 100 ms [68].

Le misurazioni di rilassamento T1 e T2 sono state eseguite una volta raggiunto uno stato stazionario nell'incorporazione del segnale ^2H del metabolita, tipicamente tra 90 e 150 minuti dall'inizio della somministrazione del substrato marcato con ^2H .

Gli spettri di RMN ^2H risultanti sono stati quantificati tramite un fitting lineare a minimi quadrati fino a quattro linee di Lorentz e una linea di base lineare. Dopo la stima lineare e la correzione di fase, la fase di tutti i segnali di RMN ^2H dovrebbe essere uguale e pari a zero. Similmente alla spettroscopia ^1H e ^{13}C , gli spostamenti chimici dei metaboliti marcati con ^2H sono altamente riproducibili e insensibili a piccoli cambiamenti nell'ambiente chimico. Di conseguenza, le frequenze di tutti i segnali sono state correlate allo spostamento chimico dell'acqua, permettendo un leggero aggiustamento di $\pm 0,01$ ppm per ogni risonanza. Le ampiezze delle risonanze sono state correlate alla risonanza dell'acqua, tenendo conto delle differenze nel rilassamento T2 intrinseco. Le variazioni di segnale causate da un rilassamento T1 incompleto e dall'omogeneità del campo magnetico B1+ trasmesso dall'RF sono state corrette utilizzando costanti di tempo di rilassamento T1 misurate in vivo e mappe quantitative di B1+ acquisite su uno spettro contenente acqua, agar all'1,5% e deuterossido all'1%.

Le ampiezze corrette dei picchi dell'acqua e dei metaboliti adattati sono state convertite in concentrazione (in millimoli per litro) utilizzando il picco dell'acqua pre-infusione, ad abbondanza naturale, come riferimento interno pari a 10,12 mM. Quest'ultimo è stato determinato assumendo una concentrazione di acqua di 55,5 M, un contenuto d'acqua dell'80% nel tessuto cerebrale e un'abbondanza naturale di deuterio del 0,0115% [69,70].

Le concentrazioni di substrati e metaboliti sono state riportate nei risultati come concentrazione della molecola marcata normalizzando il segnale ^2H RMN al numero medio di deuteri per molecola. Le ampiezze del segnale ^2H RMN dell'acqua e del $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio sono state normalizzate dividendo il segnale quantificato per due, mentre il segnale del lattato marcato con ^2H osservato è stato normalizzato per tre e corretto per la perdita del marcatore ^2H presumibilmente pari al 10% basato su dati dello studio in vitro. Il picco denominato Glx contiene segnali da $[4,4'\text{-}^2\text{H}_2]$ glutammato, $[4\text{-}^2\text{H}]$ glutammato, $[4'\text{-}^2\text{H}]$ glutammato, $[4,4'\text{-}^2\text{H}_2]$ glutammina, $[4\text{-}^2\text{H}]$ glutammina e $[4'\text{-}^2\text{H}]$ glutammina. Il numero medio di deuteri nella posizione C4 di Glx è sempre inferiore a due a causa della perdita di

^2H nel ciclo dell'acido citrico (TCA) durante la conversione dell'acetil-CoA in citrato. Sulla base della probabilità teorica che vengano trasferiti sia due deuteri che un solo atomo di deuterio singolo da acetil-CoA a Glx, il numero medio di deuteri di Glx sarà di 1,33. Nel caso del metabolismo dell'acetato [$^2\text{H}_3$], Glx contiene teoricamente una media di 2,00 deuteri nella posizione C4.

Come riportato in Figura 15, i risultati dell'analisi hanno evidenziato come i livelli di lattato siano più elevati nei tumori rispetto al cervello normale (tumore: $1,3 \pm 0,4$ mM; $n = 8$ voxel: cervello normale, $0,6 \pm 0,2$ mM; $P < 0,001$; $n = 45$ voxel). Contestualmente, i livelli di glucosio deuterato sono risultati inferiori nei tumori rispetto al cervello normale (tumore: $1,2 \pm 0,1$ mM; cervello normale: $1,5 \pm 0,3$ mM; $P = 0,001$).

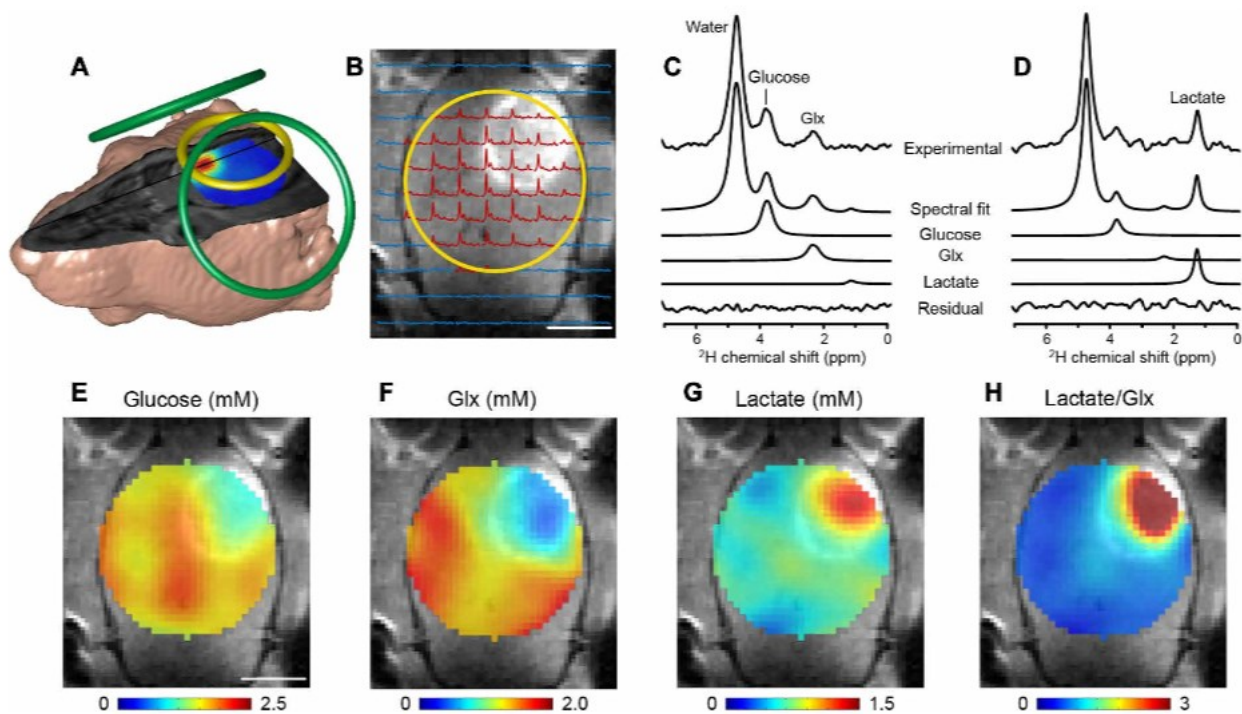


Figura 15: DMI nel cervello del ratto dopo l'infusione di $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio:

(A) Rendering 3D basato su RMI di un ratto con glioma RG2, con indicazioni sulla posizione della bobina a radiofrequenza (RF) per la RMI, il processo di shimming (cicli verdi) e la DMI (ciclo giallo). Una mappa a colori sovrapposta sull'immagine MRI 3D mostra il rapporto lattato/Glx.

(B) RMI pesata in T1 con contrasto, in cui il tumore appare iperintenso rispetto al tessuto cerebrale normale. Il cerchio giallo indica la posizione della bobina superficiale DMI. Poiché i profili di sensibilità di trasmissione e ricezione RF sono più elevati vicino alla bobina superficiale, il campo visivo del DMI è limitato al diametro della bobina RF. Gli spettri ^2H RMN localizzati, estratti da una griglia RMSI di $11 \times 11 \times 11$ voxel con volumi di $2 \times 2 \times 2$ mm³, sono sovrapposti sull'immagine RMI. Questi dati sono stati acquisiti tra 60 e 90 minuti dopo l'inizio dell'infusione di $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio. Gli spettri mostrati in rosso hanno segnali sufficienti per ulteriori elaborazioni, mentre quelli in blu sono stati scartati.

Gli spettri sperimentali ^2H RMN da (C) tessuto cerebrale apparentemente normale e (D) lesione tumorale sono mostrati successivamente, insieme ai risultati della scomposizione spettrale per i picchi individuali e il residuo di scomposizione. È importante notare che gli spettri localizzati presentano una maggiore risoluzione spettrale rispetto agli spettri non localizzati (Figura 13), grazie all'omogeneità del campo magnetico maggiore nei volumi più piccoli di $8 \mu\text{l}$.

Le mappe DMI di glucosio e metaboliti marcati con deuterio, basate sulla scomposizione spettrale dei picchi individuali, sono espresse in millimoli (E-G). Il rapporto lattato/Glx (H) evidenzia l'effetto Warburg, caratterizzato da un'elevata glicolisi e un basso metabolismo ossidativo. Le barre di scala sono di 5 mm nelle immagini (B e E).

Durante la somministrazione di [6,6' $^2\text{H}_2$]glucosio, non solo il tessuto cerebrale, ma anche i tessuti non cerebrali, produrranno piccole quantità di lattato marcato con deuterio, il quale viene successivamente rilasciato nel sangue. È stato osservato che la concentrazione di lattato marcato con ^2H nel plasma, campionato 60-75 minuti dopo l'inizio dell'infusione di [6,6' $^2\text{H}_2$]glucosio, è stata di cinque volte inferiore rispetto al livello di lattato ^2H marcato rilevato tramite DMI nella regione tumorale cerebrale.

Questo risultato è in linea con la concezione di un metabolismo energetico alterato nei tumori, noto come l'effetto Warburg. L'osservazione della marcatura nel tumore cerebrale del topo è coerente con l'idea che i tumori abbiano un elevato assorbimento di glucosio e un tasso di glicolisi elevato. Questo fenomeno comporta la riduzione dei livelli di glucosio intracellulare e la produzione di lattato, anziché l'ossidazione del piruvato derivato dal glucosio. Inoltre, questi dati confermano che la maggior parte del lattato marcato, osservato nell'area tumorale, è stato prodotto localmente e non è stato trasportato dal sangue.

Per valutare la possibilità che la DMI potesse fungere da biomarcatore di immagine per la risposta alla terapia, sono stati trattati dei ratti affetti da gliomi con dicloroacetato (DCA). Il DCA stimola l'enzima piruvato deidrogenasi, favorendo il flusso di piruvato verso i mitocondri per la successiva ossidazione, parzialmente invertendo l'effetto Warburg. L'impiego del trattamento con DCA, eseguito 90 minuti prima dell'infusione di [6,6' $^2\text{H}_2$]glucosio e seguito dalla DMI, sembra causare una riduzione sia dell'area che dell'intensità del rapporto lattato/Glx. Di conseguenza, la DMI si è dimostrata una metodologia rapida e non invasiva per monitorare gli effetti di un farmaco metabolico sul metabolismo del glucosio all'interno del tumore cerebrale.

Parallelamente a questi studi, l'acetato marcato isotopicamente è stato utilizzato come substrato metabolico per investigare il metabolismo nel cervello animale. [70]. [$^2\text{H}_3$]acetato è stato disciolto in acqua ad una concentrazione 2 M ed è stato infuso come descritto per il glucosio. In questo modo è stato somministrato un totale di 2 g/kg di peso corporeo di [$^2\text{H}_3$]acetato, anche in questo caso per la durata di 120 minuti. L'acetato è convertito in acetil-coenzima A (CoA) e ulteriormente metabolizzato nel ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA), marcando Glx attraverso uno scambio veloce con l'alfa-chetoglutarato. A differenza del glucosio, l'acetato non necessita dell'azione dell'enzima piruvato deidrogenasi per entrare nel ciclo TCA. Piuttosto, l'acetato può essere considerato un surrogato dell'ossidazione degli acidi grassi.

L'analisi della mappa di Glx marcato in un ratto con gliomi ha rivelato una distribuzione relativamente omogenea dell'ossidazione dell'acetato nei tessuti cerebrali apparentemente normali. Al contrario, il tessuto tumorale ha presentato livelli superiori di acetato marcato e livelli inferiori di marcatura di Glx rispetto al cervello normale. Questi risultati evidenziano le differenze nel metabolismo dell'acetato tra il tessuto tumorale e il tessuto cerebrale normale.

Ulteriori studi con DMI sono stati condotti su modelli di tumore cerebrale di ratto, dimostrando un contrasto distintivo tra il glioma e il tessuto cerebrale normale dopo l'infusione di [$^2\text{H}_3$]acetato. Nel particolare caso del tumore RG2, l'assorbimento di acetato avviene attraverso il trasportatore monocarbossilico 1 (MCT1), che è espressamente presente nel glioma. Questi risultati suggeriscono che i livelli di acetato marcati con ^2H potrebbero fungere da biomarcatore non invasivo dell'espressione di MCT1. È importante notare che, sebbene il modello di tumore RG2 dei roditori presenti una barriera emato-encefalica compromessa, che potrebbe influenzare l'assorbimento di acetato, l'uso del DMI continua a fornire risultati promettenti. Inoltre, la dimensione ridotta del pool di Glx nel tumore potrebbe influenzare il contrasto delle immagini ottenute con DMI.

Negli studi sull'uomo, il campione di partecipanti includeva soggetti umani sani ($n = 2$) e due pazienti con diagnosi di glioblastoma multiforme (GBM) che hanno aderito allo studio di DMI.

Ad essi è stata somministrata una dose orale di [$6,6^{2\text{H}_2}$]glucosio, precedentemente disciolto in 200-300 ml di acqua. La dose per i soggetti sani è stata calcolata come 0,75 g/kg di peso corporeo, con un massimo di 60 g, indipendentemente dal peso corporeo. Le infusioni sono state condotte attraverso una linea endovenosa nella vena femorale o una linea di infusione intraperitoneale.

In questi esperimenti, l'eccitazione del segnale è stata ottenuta con un impulso RF rettangolare di 90° della durata di 500 μs per gli esseri umani, mentre i dati DMI sono stati acquisiti utilizzando una codifica spaziale sferica del k-spazio. Al fine di coprire ampie porzioni del cervello, i dati DMI sono stati raccolti mediante l'uso di una griglia 3D di voxel con dimensioni di $2 \times 2 \times 2 \text{ cm}^3$. Con un tempo di ripetizione (TR) di 333 ms e otto medie; una tipica acquisizione DMI in stato stazionario durava circa 29 minuti.

Le massime ampiezze dei metaboliti e del glucosio sono state rappresentate attraverso mappe di concentrazione codificate a colori (Figura 16). Si è osservato che la distribuzione di Glx marcato risultava più evidente nelle regioni corticali, abbondanti di materia grigia, e meno prominente nelle aree anatomiche associate principalmente al liquido cerebrospinale. Questa distribuzione dei livelli concordava con gli spettri ^2H RMN raccolti individualmente dai voxel posizionati sia nelle cortecce sia nei ventricoli.

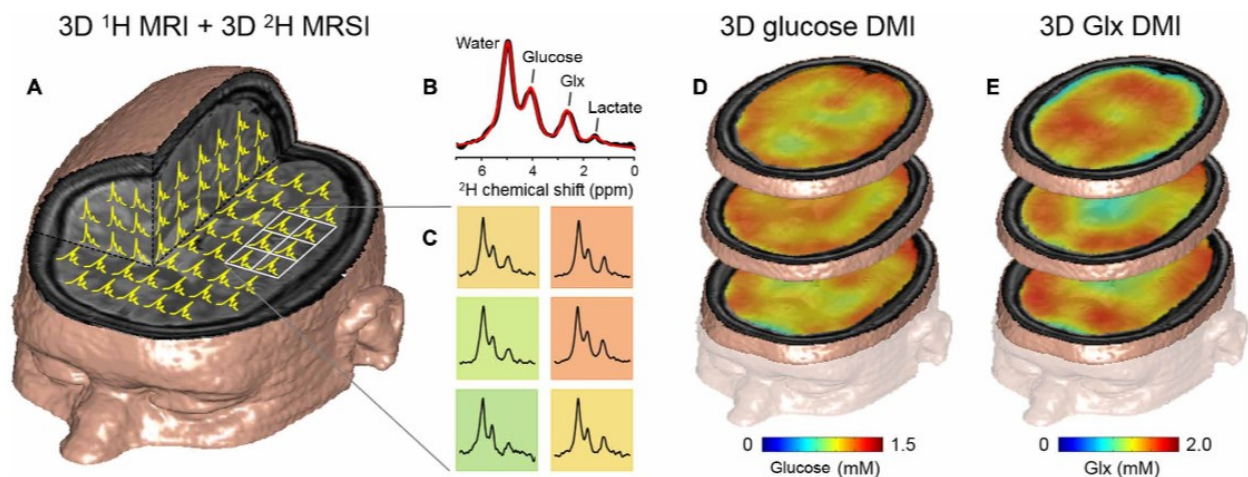


Figura 16: DMI nel cervello umano dopo l'assunzione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio.

(A) RMI 3D sovrapposta con spettri ^2H RM da un set di dati RMSI 3D (matrice $9 \times 13 \times 11$) con risoluzione spaziale nominale di $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$. Questi dati sono stati acquisiti tra 65 e 90 minuti dopo l'amministrazione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio.

(B) Spettro ^2H RMN da un singolo voxel MRSI sovrapposto con un fitting spettrale (linea rossa) che indica i picchi di acqua, glucosio, Glx e lattato.

(C) Griglia (2×3) estratta dalla RMSI con i dati codificati a colori dall'intensità di Glx.

(D) Mappe 3D del glucosio cerebrale marcato con ^2H .

(E) Mappe 3D dei livelli di Glx in millimoli, ottenuti dall'extrapolazione dalla RMSI 3D alla griglia RMI 3D. Si nota una riduzione apparente dei livelli di Glx nelle aree corrispondenti ai ventricoli cerebrali.

Inoltre, è stata eseguita la DMI 60-75 minuti dopo l'assunzione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio (0,60 g/kg) su due pazienti affetti da GBM. I dati DMI relativi ad uno dei due pazienti sono rappresentati in Figura 17. Nelle regioni cerebrali che appaiono normali (come ad esempio una regione nel lobo occipitale), il DMI ha evidenziato una distribuzione relativamente uniforme di glucosio e Glx marcato, simile ai dati ottenuti da soggetti sani (Figura 16). Le concentrazioni di glucosio e Glx ^2H -marcato nei tessuti cerebrali normali del paziente malato descritto erano leggermente inferiori rispetto a quelle dei soggetti sani, verosimilmente a causa della minore dose di glucosio somministrata oralmente (0,60 g/kg rispetto a 0,75 g/kg nei soggetti sani).

Nel caso della mappatura del glucosio marcato nel paziente affetto da GBM (Figura 17), si osserva una sfumatura minima di contrasto tra la lesione tumorale e il tessuto cerebrale normale. Questo è dovuto al fatto che entrambi i tipi di tessuti, in particolare il tessuto grigio, mostrano un elevato assorbimento di glucosio. Poiché il DMI è in grado di indagare il metabolismo oltre l'assorbimento di glucosio, le mappe di Glx e lattato marcati con ^2H presentano un contrasto sorprendente. Infatti, nell'area corrispondente al tumore (lobo frontale destro), non si osserva Glx marcato, mentre il lattato marcato mostra è rilevato in grande quantità. Questo fa in modo che il rapporto lattato/Glx mostri un notevole contrasto come si può notare in Figura 17.

Queste mappe metaboliche hanno sorprendenti somiglianze con i dati DMI ottenuti dal modello di ratto affetto da GBM, evidenziando le chiare differenze nel metabolismo del glucosio tra il tessuto tumorale e quello cerebrale normale come in Figura 15. In particolare, i livelli più bassi di Glx marcati e i livelli più alti di lattato marcati nel tumore, sia nei modelli animali che nei pazienti con GBM, sono congruenti con l'effetto Warburg. Attraverso il DMI, è quindi possibile mappare l'effetto Warburg in modo non invasivo utilizzando il rapporto di lattato/Glx marcati con ^2H .

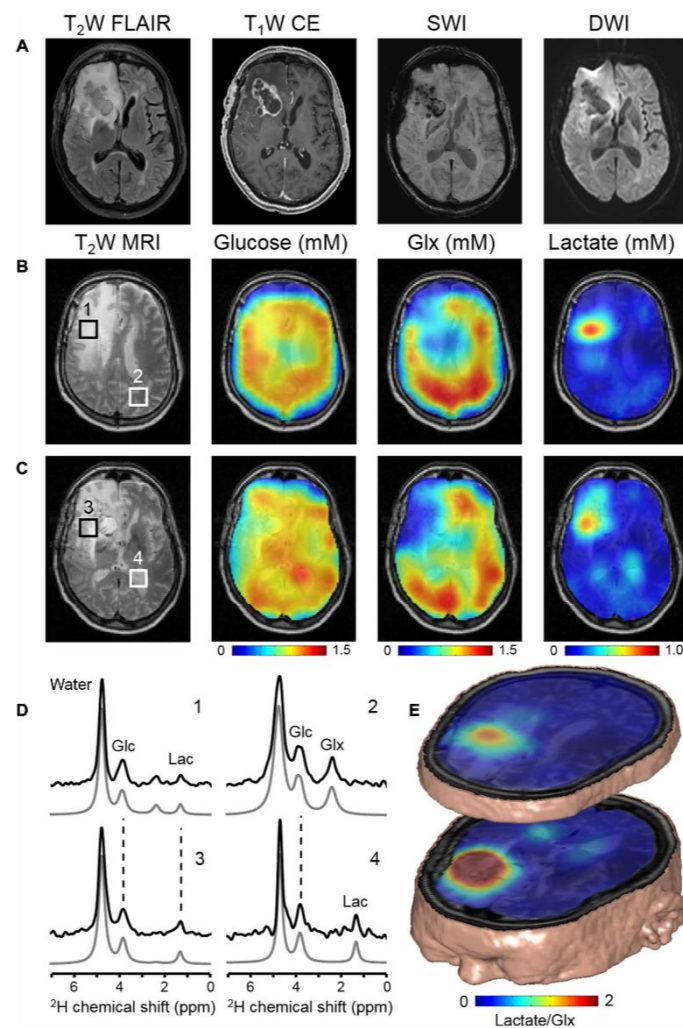


Figura 17: DMI nell'analisi dell'effetto Warburg in un paziente affetto da glioblastoma multiforme (GBM) dopo l'assunzione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio:

(A) Immagini cliniche di risonanza magnetica (RM) ottenute come parte della cura standard per un paziente con diagnosi di GBM nel lobo frontale destro. Le immagini RM includono immagini pesate in T2 con recupero dell'inversione attenuata dal fluido (T2W FLAIR), immagini pesate in T1 con contrasto (T1W CE), immagini pesate sulla suscettibilità (SWI) e immagini pesate sulla diffusione (DWI). Il paziente, un uomo di 63 anni, aveva subito una resezione subtotale della lesione 9 mesi prima dello studio DMI. Era sotto trattamento in un protocollo sperimentale che comprendeva nivolumab o placebo in combinazione con chemioradioterapia standard con temozolomide, seguita da terapia adiuvante con temozolomide.

(B) e (C) Immagini RM in T2W sovrapposte alle mappe DMI in due sezioni che includono la lesione tumorale. Le mappe DMI evidenziano una distribuzione omogenea del glucosio marcato con ^2H tra le sezioni, ma presentano livelli inferiori di Glx (glutamina + glutammato) marcato con ^2H e una maggiore concentrazione di lattato marcato con ^2H nella lesione tumorale rispetto al tessuto cerebrale di aspetto normale.

(D) Spettri ^2H RMN da posizioni selezionate identificate nell'immagine RM in T2W, inclusi il tessuto all'interno della lesione (posizioni 1 e 3), il tessuto del lobo occipitale di aspetto normale (posizione 2) e il liquido cerebrospinale dal ventricolo laterale sinistro (posizione 4).

(E) Illustrazione 3D che combina RM e DMI, mostrando il rapporto lattato/Glx come rappresentazione spaziale dell'effetto Warburg. Le mappe DMI evidenziano schemi metabolici simili al modello osservato nel glioma RG2 (Figura 15).

2.4.2. DMI per la misura di glicogeno nel fegato

L'obiettivo dell'analisi è mostrare come il DMI, basato sulla ^2H SRM possa generare mappe metaboliche con elevata risoluzione spazio-temporale in modo non invasivo, consentendo di visualizzare il destino metabolico di diversi substrati marcati con ^2H .

Al fine di dimostrare la robustezza e la sensibilità del metodo in tessuti non cerebrali, è stato nuovamente somministrato glucosio marcato con deuterio. Successivamente, il DMI è stato utilizzato per mappare il glicogeno marcato sia nel fegato di ratti che in quello umano per mezzo delle stesse procedure di somministrazione descritte in precedenza [33].

Sui ratti, l'eccitazione del segnale è stata ottenuta con impulsi RF Shinnar-Le Roux di 2,0 ms (90° ; larghezza di banda, 3,0 kHz), selezionando una fetta trasversale spessa 25 mm per minimizzare gli artefatti dovuti alle pulsazioni cardiache. In questo caso, l'acquisizione delle immagini RM è stata eseguita con gating respiratorio e i dati DMI sono stati sempre acquisiti senza respirazione, nei primi 1,1 ms successivi all'eccitazione.

La minore sensibilità della bobina volumetrica ^2H ha richiesto che il DMI sul fegato degli animali fosse acquisito con una risoluzione spaziale nominale di 64 μl in circa 25 minuti (TR = 400 ms; quattro medie).

La versatilità del DMI nell'imaging del metabolismo in organi diversi dal cervello è evidenziata per esempio dalla mappatura del glicogeno marcato nel fegato (Figura 18). Poiché il fegato è l'organo primario per immagazzinare il glucosio sotto forma di glicogeno, esso gioca un ruolo cruciale nell'omeostasi glucidica dell'organismo. Come illustrato nella Figura 18D, la mappatura del glicogeno marcato ottenuta tramite DMI mostra la sua concentrazione stimata, indicando livelli di $2,7 \pm 0,3$ mM di glicogeno oltre al glucosio deuterato naturale (8,9 mM). Gli spettri ^2H RMN non rivelano altre molecole marcate, suggerendo che, in queste condizioni sperimentali, il fegato tende a immagazzinare principalmente il glucosio, piuttosto che utilizzarlo come fonte ossidativa. Tuttavia, è importante notare che il livello di glutammato nel fegato dei ratti è stato rilevato tra 2 e 3 mM, un valore significativamente inferiore rispetto a quello presente nel cervello [33]. Questa differenza potrebbe

essere attribuita al basso grado di marcatura ^2H e alla limitata presenza del pool di glutammato, che può influenzare la rilevabilità dei segnali ^2H RMN con la configurazione attuale della bobina RF.

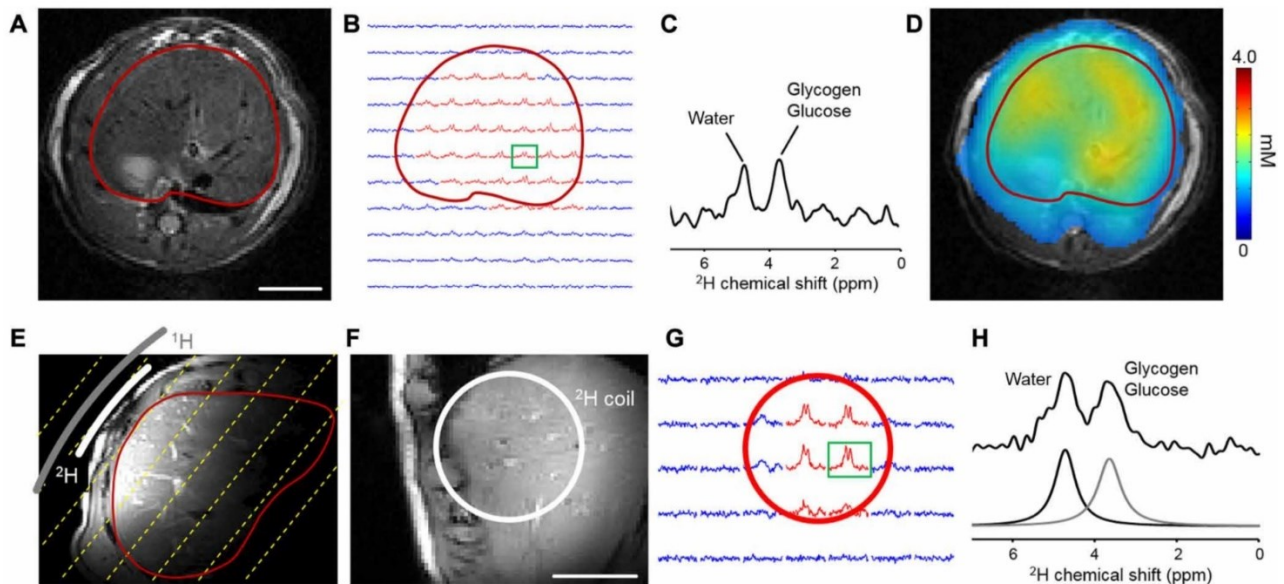


Figura 18: DMI del glicogeno epatico:

(A) Immagine RM assiale del torace di un ratto con il fegato delineato in rosso, ottenuta con gating respiratorio. La scala è di 10 mm.

(B) Spettri ^2H RMN estratti da una griglia 3D ^2H MRSI con una risoluzione di $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$. Gli spettri in rosso evidenziano segnali sufficienti per la successiva quantificazione tramite DMI, mentre quelli in blu non sono stati ulteriormente considerati.

(C) Spettro ^2H RMN proveniente dal voxel indicato in verde in (B).

(D) Mappa a colori delle unità glucosiliche marcate con ^2H (in millimoli) dopo 120 minuti di infusione di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio.

(E) Immagine RM assiale del fegato acquisita con la bobina RF posizionata sul lato laterale dell'addome. La posizione e le dimensioni delle bobine RF sono indicate in grigio (per ^1H) e bianco (per ^2H). Le linee gialle tratteggiate evidenziano una griglia MRSI 3D obliqua parallela alla bobina superficiale ^2H . La linea rossa delinea i contorni del fegato.

(F) Immagine RM acquisita parallelamente alle bobine RF, con la bobina RF ^2H (bianca) sovrapposta. La scala è di 50 mm. Come nei dati cerebrali del ratto, la sensibilità della bobina superficiale ^2H limita l'acquisizione dei dati DMI alle posizioni vicine e all'interno del diametro della bobina.

(G) Spettri ^2H RMN estratti da una griglia 3D ^2H MRSI con risoluzione di $25 \times 25 \times 25 \text{ mm}^3$, 60 minuti dopo l'assunzione orale di $[6,6'\text{-}^2\text{H}_2]$ glucosio. Gli spettri in rosso rappresentano segnali sufficienti per la quantificazione, mentre quelli in blu non sono stati ulteriormente considerati.

(H) Spettro ^2H RMN proveniente dal voxel indicato in verde in (G), con i picchi fittamente attribuiti al glicogeno + glucosio marcato con ^2H e all'acqua.

Una metodologia simile è stata adottata anche per soggetti umani sani, nella quale è stata impiegata una bobina RF superficiale posizionata lateralmente sul fegato. Negli studi sul fegato umano, l'eccitazione del segnale è stata ottenuta con un impulso RF rettangolare di 90° della durata di 500 μs , con l'acquisizione del segnale ^2H RMN eseguita nei primi 2,7 ms successivi all'eccitazione. Il DMI ha utilizzato una matrice 3D $11 \times 9 \times 9$ di ^2H RMSI con una risoluzione di $25 \times 25 \times 25 \text{ mm}^3$.

Mediante l'utilizzo del DMI, dopo l'assunzione orale di [6,6'-²H₂]glucosio, è stato rilevato il glicogeno marcato all'interno del campo visivo della bobina RF, distribuito in maniera omogenea come mostrato in Figura 18.

L'impiego del DMI per valutare la marcatura del glicogeno nel fegato successiva alla somministrazione di [6,6'-²H₂]glucosio, dimostra la sua applicabilità a organi diversi dal cervello. Come nel caso del cervello, l'applicazione del DMI al fegato si è rivelata metodologicamente semplice e robusta. La capacità di mappare il glicogeno nel fegato tramite DMI sarà preziosa per studiare il ruolo di questo organo in condizioni patologiche come il diabete di tipo 2 e la malattia epatica grassa non alcolica. Inoltre, il DMI potrebbe essere utilizzato dinamicamente per misurare il tasso di turnover del glicogeno.

3. Conclusione

Nell'ambito medico, l'adozione di metodologie di imaging non invasive sta acquisendo sempre maggiore importanza, poiché permette un approccio personalizzato al trattamento dei pazienti. La risonanza magnetica, grazie alla sua potenza e flessibilità, costituisce un punto di partenza eccellente in quanto è sensibile a una vasta gamma di parametri fisiologici rilevanti, tra cui perfusione, diffusione e ossigenazione. Sta diventando sempre più evidente che numerosi disturbi, così come i risultati degli interventi terapeutici, si manifestino in cambiamenti metabolici. Nonostante la sensibilità della risonanza magnetica sia limitata ai processi metabolici, diversi metodi di imaging metabolico basati su questa tecnologia stanno dimostrando il potenziale di colmare questa lacuna. Tuttavia, le sfide risiedono nella bassa sensibilità della risonanza magnetica e nella sua complessità tecnica, che hanno ostacolato lo sviluppo di un'immagine metabolica clinicamente valida.

In questo contesto, il Deterium Metabolic Imaging (DMI) emerge come una soluzione innovativa, vantando caratteristiche intrinseche che lo distinguono da altri metodi di imaging metabolico. Il DMI è una tecnica che genera immagini che rappresentano la distribuzione spaziale di metaboliti all'interno di un campione biologico. Ciò consente di identificare aree specifiche all'interno di un organismo in cui determinati metaboliti sono più concentrati; infatti, è utile nell'identificazione di regioni all'interno di tessuti o organi.

In primo luogo, il DMI si basa su metodologie di risonanza magnetica semplici, conferendogli una robustezza intrinseca indipendente dall'esperienza dell'operatore RM. L'assenza di soppressione dell'acqua e dei lipidi contribuisce ulteriormente alla sua affidabilità. La ridotta suscettibilità magnetica e lo spettro RM semplificato rendono questa tecnica meno sensibile alle disomogeneità del campo magnetico, mentre i tempi di rilassamento T1 e T2 favorevoli consentono una sensibilità elevata mantenendo una risoluzione spettrale adeguata. Inoltre, il DMI ha dimostrato risultati promettenti in contesti clinici rilevanti. Benché rappresenti un primo passo verso la validazione clinica, ci sono ancora sfide tecnologiche e cliniche da superare.

Anche se è prematuro concentrarsi su applicazioni specifiche, si può ipotizzare il suo impiego in ambiti come il cancro, il diabete e le malattie neurologiche, ovvero patologie con una componente metabolica predominante.

L'implementazione delle funzionalità DMI sugli scanner clinici rappresenterebbe certamente un progresso significativo, accelerando la valutazione dell'applicabilità di questa tecnica in diverse aree. Associata a un modello metabolico appropriato, l'analisi del [6,6-²H₂]-glucosio all'interno dei tessuti

in esame fornisce informazioni sul trasporto del glucosio, mentre l'identificazione dei prodotti metabolici marcati con ^2H (come il glutammato e il lattato) offre ulteriori dettagli sul metabolismo del glucosio. Sebbene il DMI offra immagini metaboliche ad alto contrasto nel cervello grazie alla sua capacità di rilevare specifici metaboliti a valle, potrebbe non essere il metodo ideale per individuare lesioni di piccole dimensioni in tessuti con basso assorbimento di glucosio di fondo. Tuttavia, i substrati marcati con ^2H attualmente reperibili in commercio, combinati con la capacità di identificare metaboliti a valle, espandono le opportunità di individuare marcatori metabolici unici specifici per determinate condizioni mediante l'utilizzo del DMI.

I risultati ottenuti in letteratura evidenziano come il DMI abbia la capacità di discriminare tra il metabolismo normale e anomalo in vivo. La sua efficacia è stata dimostrata attraverso la mappatura del metabolismo di glucosio marcato con ^2H e acetato sia nel cervello che nel fegato di modelli animali e soggetti umani. I dati ottenuti mediante DMI hanno consentito la visualizzazione del metabolismo in vivo attraverso un approccio tecnico non invasivo e non radioattivo. Ciò implica che la capacità di mappare il metabolismo con il DMI potrebbe avere un notevole impatto clinico.

Ulteriori sviluppi tecnici meritano esplorazione, tra cui l'ottimizzazione della risoluzione temporale, spaziale e spettrale del DMI, la sua integrazione con altri metodi di imaging metabolico basati sulla risonanza magnetica e l'espansione del numero di substrati deuterati di interesse. La favorevole dipendenza dal campo magnetico rende il DMI potenzialmente adatto anche a un campo di bassa intensità (7 T), evitando le complessità spesso associate alla risonanza magnetica protonica ad alto campo.

Sebbene questo studio si sia focalizzato sulla marcatura del glucosio deuterato come substrato metabolico, è importante sottolineare che il DMI può essere combinato con una vasta gamma di substrati deuterati, inclusi acetato, colina, metionina e persino composti chetonici. Le proprietà uniche del deuterio sono state riconosciute fin dagli albori della RMN. Tuttavia, nonostante l'utilizzo ampio del deuterio come marcatore per gli studi metabolici, l'idea di combinare substrati marcati con deuterio con l'imaging a risonanza magnetica in vivo ha cominciato a suscitare un notevole interesse solo recentemente. Con vari gruppi di ricerca dedicati all'investigazione degli aspetti fondamentali dell'utilizzo del deuterio e gli sforzi in corso volti ad esplorare applicazioni (pre)cliniche dell'immagine metabolica, il futuro del DMI sembra promettente e ricco di opportunità.

Bibliografia

- [1] H. M. De Feyter, R. A. de Graaf (2021). Deuterium metabolic imaging – Back to the future. *Journal of Magnetic Resonance*, **326**, 106932.
- [2] <https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/654014>.
- [3] A. Mangoni (2003). Spettroscopia NMR (V 1.0) Metodi Spettroscopici in Chimica Organica.
- [4] Spettroscopia NMR – Mauro Tonellato
- [5] G. Digilio – principi-v10 versione 6.0
- [6] [http://www.fmboschetto.it/tesine08_09principio di risonanza magnetica](http://www.fmboschetto.it/tesine08_09principio%20di%20risonanza%20magnetica)
- [7] V. Amezic, S. Copetti (2003). Tecniche di acquisizione, parametri e qualità dell'immagine in RM. Corso di formazione continuativa per T.S.R.M.
- [8] <https://mriquestions.com/index.html>
- [9] R. Canere, F. Podo (1991). Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare localizzata in vivo. Principi fisici e problemi quantitativi. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **Vol.27**, **N.4**, 675-708.
- [10] <https://keespoppinga.blogspot.com/2021/09/harold-urey-e-la-scoperta-del-deuterio.html>
- [11] H.C. Urey, F.G. Brickwedde, G.M. Murphy (1932). A hydrogen isotope of mass 2 and its concentration, *Phys. Rev.*, **40**, 1–15.
- [12] R. Schoenheimer, D. Rittenberg (1935), Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism, *Science* **82**, 156–157.
- [13] J.M.B. Kellogg, I.I. Rabi, N.F. Ramsey, J.R. Zacharias (1939), The magnetic moments of the proton and the deuteron. The radiofrequency spectrum of H₂ in various magnetic fields, *Phys. Rev.* **56**, 728–743.
- [14] F. Bloch, W.W. Hansen, M.E. Packard (1946), Nuclear induction, *Phys. Rev.* **69**, 127.
- [15] E.M. Purcell, H.C. Torrey, R.V. Pound (1946), Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid, *Phys. Rev.* **69**, 37–38.
- [16] N. Bloembergen, E.M. Purcell, R.V. Pound (1948), Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption, *Phys. Rev.* **73**, 679–712.
- [17] H.H. Mantsch, H. Saito, I.C.P. Smith (1977), Deuterium magnetic resonance, applications in chemistry, physics and biology, *Prog. NMR Spectrosc.* **11**, 211–271.
- [18] I.M. Brereton, M.G. Irving, J. Field, D.M. Doddrell (1986), Preliminary studies on the potential of in vivo deuterium NMR spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 579–584.
- [19] I.M. Brereton, D.M. Doddrell, S.M. Oakenfull, D. Moss, M.G. Irving (1989), The use of in vivo ²H NMR spectroscopy to investigate the effects of obesity and diabetes mellitus upon lipid metabolism in mice, *NMR Biomed.* **2**, 55–60.
- [20] J.J. Ackerman, C.S. Ewy, N.N. Becker, R.A. Shalwitz (1987), Deuterium nuclear magnetic resonance measurements of blood flow and tissue perfusion employing ²H₂O as a freely diffusible tracer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **84**, 4099–4102.

- [21] C.S. Ewy, J.J. Ackerman, R.S. Balaban (1988), Deuterium NMR cerebral imaging in situ, *Magn. Reson. Med.* 8, 35–44.
- [22] S. Muller, J. Seelig (1987), In vivo NMR imaging of deuterium, *J. Magn. Reson.* 72 456–466.
- [23] M.G. Irving, I.M. Brereton, J. Field, D.M. Doddrell (1987), In vivo determination of body iron stores by natural-abundance deuterium magnetic resonance spectroscopy, *Magn. Reson. Med.* 4, 88–92.
- [24] K.D. Barrow, P.L. Rogers, G.M. Smith (1986), NMR studies of [1-2H]glucose metabolism in *Zymomonas mobilis*, *Eur. J. Biochem.* 157, 195–202.
- [25] J.B. Aguayo, M.P. Gamcsik, J.D. Dick (1988), High resolution deuterium NMR studies of bacterial metabolism, *J. Biol. Chem.* 263, 19552–19557.
- [26] J.B. Aguayo, I.J. McLennan, E. Aguiar, H.M. Cheng (1987), The study of diabetic cataractogenesis in the intact rabbit lens by deuterium NMR spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 359–366.
- [27] J.B. Aguayo, I.J. McLennan, C. Graham Jr., H.M. Cheng (1988), Dynamic monitoring of corneal carbohydrate metabolism using high-resolution deuterium NMR spectroscopy, *Exp. Eye Res.* 47, 337–343.
- [28] B.A. Berkowitz, M.H. Garner, C.A. Wilson, R.J. Corbett (1995), Nondestructive measurement of retinal glucose transport and consumption in vivo using NMR spectroscopy, *J. Neurochem.* 64, 2325–2331.
- [29] M.N. Goodman, L.K. Masuoka, J.S. deRopp, A.D. Jones (1989), Use of deuterium labelled glucose in evaluating the pathway of hepatic glycogen synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 522–527.
- [30] R.S. Hotchkiss, S.K. Song, C.S. Ling, J.J. Ackerman, I.E. Karl (1990), Sepsis does not alter blood cell glucose metabolism or Na⁺ concentration: a 2H-, 23Na-NMR study, *Am. J. Physiol.* 258, R21–R31.
- [31] O. Ben-Yoseph, P.B. Kingsley, B.D. Ross (1994), Metabolic loss of deuterium from isotopically labeled glucose, *Magn. Reson. Med.* 32, 405–409.
- [32] M. Lu, X.H. Zhu, Y. Zhang, G. Mateescu, W. Chen (2017), Quantitative assessment of brain glucose metabolic rates using in vivo deuterium magnetic resonance spectroscopy, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 3518–3530.
- [33] H.M. De Feyter, K.L. Behar, Z.A. Corbin, R.K. Fulbright, P.B. Brown, S. McIntyre, T.W. Nixon, D.L. Rothman, R.A. de Graaf (2018), Deuterium metabolic imaging (DMI) for MRI-based 3D mapping of metabolism in vivo, *Sci. Adv.* 4 (8), eaat7314.
- [34] R.A. de Graaf, A.D. Hendriks, D.W.J. Klomp, C. Kumaragamage, D. Welting, C.S. Arteaga de Castro, P.B. Brown, S. McIntyre, T.W. Nixon, J.J. Prompers, H.M. De Feyter (2020), On the magnetic field dependence of deuterium metabolic imaging, *NMR Biomed.* 33, e4235.
- [35] F. Kreis, A.J. Wright, F. Hesse, M. Fala, D.E. Hu, K.M. Brindle (2020), Measuring tumor glycolytic flux in vivo by using fast deuterium MRI, *Radiology* 294, 289–296.
- [36] M.J. Riis-Vestergaard, C. Laustsen, C. Mariager, R.F. Schulte, S.B. Pedersen, B. Richelsen (2020), Glucose metabolism in brown adipose tissue determined by deuterium metabolic imaging in rats, *Int. J. Obes. (Lond)* 44, 1417–1427.
- [37] A. Ye, B. Erokwu, M. Twieg, C.A. Flask, G. Mateescu (2020), New in vivo glucose test by localized dynamic deuterium nuclear magnetic resonance, *Rev. Roum. Chim.* 65, 39–42.

- [38] R. Mahar, P.L. Donabedian, M.E. Merritt (2020), HDO production from [2H7]glucose quantitatively identifies Warburg metabolism, *Sci. Rep.* 10, 8885.
- [39] L.J. Rich, P. Bagga, N.E. Wilson, M.D. Schnall, J.A. Detre, M. Haris, R. Reddy (2020), 1H magnetic resonance spectroscopy of 2H-to-1H exchange quantifies the dynamics of cellular metabolism in vivo, *Nat. Biomed. Eng.* 4, 335–342.
- [40] C. von Morze, J.A. Engelbach, T. Blazey, J.D. Quirk, G.D. Reed, J.E. Ippolito, J.R. Garbow (2020), Comparison of hyperpolarized ¹³C and non-hyperpolarized deuterium MRI approaches for imaging cerebral glucose metabolism at 4.7T, *Magn. Reson. Med.*
- [41] M. Straathof, A.E. Meerwaldt, H.M. De Feyter, R.A. de Graaf, R.M. Dijkhuizen (2021), Deuterium metabolic imaging of the healthy and diseased brain, *Neuroscience*.
- [42] R. Hagemann, G. Nief, E. Roth (1970), Absolute isotopic scale for deuterium analysis of natural waters. Absolute D/H ratio for SMOW, *Tellus* 22, 712–715.
- [43] K.J.R. Rosman, P.D.P. Taylor (1998), Isotopic compositions of the elements 1997, *Pure Appl. Chem.* 70, 217–235.
- [44] R.K. Harris, E.D. Becker, S.M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger (2001), NMR nomenclature: nuclear spin properties and conventions for chemical shifts. IUPAC recommendations 2001, *Pure Appl. Chem.* 73, 1795–1818.
- [45] J.G. Jones, M. Merritt, C. Malloy (2001), Quantifying tracer levels of 2 H₂O enrichment from microliter amounts of plasma and urine by 2H NMR, *Magn. Reson. Med.* 45, 156–158.
- [46] F. Péronnet, D. Mignault, P. du Souich, S. Vergne, L. Le Bellego, L. Jimenez, R. Rabasa-Lhoret (2012), Pharmacokinetic analysis of absorption, distribution and disappearance of ingested water labeled with D₂O in humans, *Eur. J. Appl. Physiol.* 112, 2213–2222.
- [47] J.F. Thomson 1963, Biological effects of deuterium, in: P. Alexander, Z.M. Bacq, editors. *The Macmillan Company, New York*.
- [48] P.D. Klein, E.R. Klein (1986), Stable isotopes: origins and safety, *J. Clin. Pharmacol.* 26, 378–382.
- [49] P.J. Jones, S.T. Leatherdale (1991), Stable isotopes in clinical research: safety reaffirmed, *Clin. Sci. (Lond)* 80, 277–280.
- [50] B. Koletzko, T. Sauerwald, H. Demmelmair, Safety of stable isotope use, *Eur. J. Pediatr.* 156 (Suppl 1) (1997) S12–S17.
- [51] P.S.W. Davies, Stable isotopes: their use and safety in human nutrition studies, *Eur. J. Clin. Nutr.* 74 (2020) 362–365.
- [52] R. Busch, R.A. Neese, M. Awada, G.M. Hayes, M.K. Hellerstein, Measurement of cell proliferation by heavy water labeling, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 3045–3057.
- [53] M.L. Decaris, K.W. Li, C.L. Emson, M. Gatmaitan, S. Liu, Y. Wang, E. Nyangau, M. Colangelo, T.E. Angel, C. Beysen, J. Cui, C. Hernandez, L. Lazaro, D.A. Brenner, S. M. Turner, M.K. Hellerstein, R. Loomba, Identifying nonalcoholic fatty liver disease patients with active fibrosis by measuring extracellular matrix remodeling rates in tissue and blood, *Hepatology* 65 (2017) 78–88.
- [54] B.R. Landau, J. Wahren, V. Chandramouli, W.C. Schumann, K. Ekberg, S.C.
- [55] Kalhan, Use of 2 H₂O for estimating rates of gluconeogenesis. Application to the fasted state, *J. Clin. Invest.* 95 (1) (1995) 172–178.

- [56] A.M. Funk, B.L. Anderson, X. Wen, T. Hever, C. Khemtong, Z. Kovacs, A.D. Sherry, C.R. Malloy (2017), The rate of lactate production from glucose in hearts is not altered by perdeuteration of glucose, *J. Magn. Reson.* 284, 86–93.
- [57] R.A. de Graaf, M.A. Thomas, K.L. Behar, H.M. De Feyter, Characterization of kinetic isotope effects and label loss in deuterium-based isotopic labeling studies, *ACS Chem. Neurosci.* 12 (2021) 234–243.
- [58] D.C. Macallan, B. Asquith, Y. Zhang, C. de Lara, H. Ghattas, J. Defoiche, P.C. Beverley (2009), Measurement of proliferation and disappearance of rapid turnover cell populations in human studies using deuterium-labeled glucose, *Nat. Protoc.* 4, 1313–1327.
- [59] D.M. Bier, R.D. Leake, M.W. Haymond, K.J. Arnold, L.D. Gruenke, M.A. Sperling, D.M. Kipnis (1977), Measurement of “true” glucose production rates in infancy and childhood with 6,6-dideuteroglucose, *Diabetes* 26, 1016–1023. [jhguy](#)
- [60] P. Diehl, T. Leipert, Deuteronen-KernResonanzspektroskopie, *Helv. Chim. Acta* 47 (1964) 545–557.
- [61] R. A. de Graaf, *In Vivo NMR Spectroscopy. Principles and Techniques* (John Wiley, 2007).
- [62] D. Moskau, H. Günther (1987), $2\text{H}, 2\text{H}$ -COSY and $2\text{H}, 2\text{H}, 13\text{C}$ -RELAY NMR experiments for the analysis of deuteriated compounds. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26, 156–157.
- [63] M. Wimmer, B. Wilmering, D. Sasse (1985), The relation of rat liver wet weight to dry weight. *MHistochemistry* 83, 571–572.
- [64] 15. R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger (2002), NMR Nomenclature: Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts. IUPAC recommendations 2001. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 22, 458–483.
- [65] C. S. Ewy, J. J. H. Ackerman, R. S. Balaban (1988), Deuterium NMR cerebral imaging in situ. *Magn. Reson. Med.* 8, 35–44.
- [66] O. Warburg (1925), Über den Stoffwechsel der Carcinomzellen. *Klin. Wschr* 4, 534–536.
- [67] W. H. Koppenol, P. L. Bounds, C. V. Dang (2011), Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 325–337.
- [68] 16. V. Lebon, K. F. Petersen, G. W. Cline, J. Shen, G. F. Mason, S. Dufour, K. L. Behar, G. I. Shulman, D. L. Rothman (2002), Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy: Elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J. Neurosci.* 22, 1523–1531.
- [69] D. E. Befroy, R. J. Perry, N. Jain, S. Dufour, G. W. Cline, J. K. Trimmer, J. Brosnan, D. L. Rothman, K. F. Petersen, G. I. Shulman (2014), Direct assessment of hepatic mitochondrial oxidative and anaplerotic fluxes in humans using dynamic 13C magnetic resonance spectroscopy. *Nat. Med.* 20, 98–102.
- [70] J. T. Brosnan, K. C. Man, D. E. Hall, S. A. Colbourne, M. E. Brosnan (1983), Interorgan metabolism of amino acids in streptozotocin-diabetic ketoacidotic rat. *Am. J. Physiol.* 244, E151–E158.