

*Al Professor Luigi Donato, la sua curiosità e la sua intuizione hanno reso possibile l'inizio di questo studio pionieristico nel 2008*

*Al sistema integrato tra CNR e Regione Toscana realizzato con la Fondazione Gabriele Monasterio, un ibrido unico nel suo genere*

*Ai miei amici ed insostituibili colleghi del "Gruppo C-13", senza di loro non sarebbe stato possibile raggiungere questi risultati*

*A Dottor Massimo Lombardi che ha creduto nel C-13 fino all'ultimo*

*Al Prof. Jan Henrik Ardenkjær-Larsen, con cui abbiamo mosso i primi passi in questo ambito ed alla sua amicizia*

*A Francesca, uno dei cardini del progetto C-13 e compagna della mia vita*

Università degli Studi di Pisa



UNIVERSITÀ DI PISA

## Tesi di Specializzazione in Biochimica Clinica

Classe di Medicina Diagnostica e di Laboratorio

Titolo: “Nuovi approcci per lo studio non invasivo della cinetica enzimatica e biochimica in vivo mediante tecniche spettroscopiche di risonanza magnetica basate sull’impiego dell’iperpolarizzazione dinamica nucleare di substrati isotopicamente arricchiti con  $^{13}\text{C}$ -carbonio.”

Relatori:

Specializzando:

Prof. Antonio Lucacchini

Dr. Luca Menichetti

Prof. Aldo Clerico

*Anno Accademico 2012/2013*



## Preambolo

I risultati originali riportati in questo lavoro di Tesi sono pubblicati su riviste internazionali a partire dal 2011 fino all'anno in corso:

- "Assessment of real-time myocardial uptake and enzymatic conversion of hyperpolarized [1-C-13]pyruvate in pigs using slice selective magnetic resonance spectroscopy", **Menichetti, L\***; Frijia, F; Flori, A; Wiesinger, F; Lionetti, V; Giovannetti, G; Aquaro, GD; Recchia, FA; Ardenkjaer-Larsen, JH; Santarelli, MF; Lombardi, M, CONTRAST MEDIA & MOLECULAR IMAGING, Volume: 7 Issue: 1 Pages: 85-94, DOI: 10.1002/cmml.480, 2011
- "How the signal-to-noise ratio influences hyperpolarized 13C dynamic MRS data fitting and parameter estimation", Santarelli, MF; Positano, V; Giovannetti, G; Frijia, F; **Menichetti, L**; Ardenkjaer-Larsen, JH; De Marchi, D; Lionetti, V; Aquaro, G; Lombardi, M; Landini, L ,NMR IN BIOMEDICINE, Volume: 25 Issue: 7 Pages: 925-934, DOI: 10.1002/nbm.1813, 2011
- "Hyperpolarized C-13 MRS Cardiac Metabolism Studies in Pigs: Comparison Between Surface and Volume Radiofrequency Coils", Giovannetti, G; Hartwig, V; Frijia, F; **Menichetti,L**; Positano, V ; Ardenkjaer-Larsen, JH ; Lionetti, V; Aquaro, GD; De Marchi, D; Flori, A; Landini, L; Lombardi, M; Santarelli, MF, APPLIED MAGNETIC RESONANCE, Volume: 42 Issue: 3 Pages: 413-428, DOI: 10.1007/s00723-011-0307-4,2012
- "DNP Methods for Cardiac Metabolic Imaging with Hyperpolarized [1-C-13]pyruvate Large Dose Injection in Pigs", Flori, A; Frijia, F; Lionetti, V; Ardenkjaer-Larsen, JH; Positano, V; Giovannetti, G; Schulte, RF; Wiesinger, F ; Recchia, FA; Landini, L; Santarelli, MF; Lombardi, M; **Menichetti, L\*** ,APPLIED MAGNETIC RESONANCE, Volume: 43 Issue: 1-2 Pages: 299-310, DOI: 10.1007/s00723-012-0350-9, 2012
- "3D CMR Mapping of Metabolism by Hyperpolarized 13C-Pyruvate in Ischemia-Reperfusion", Aquaro, GD Frijia, F; Positano, V; **Menichetti, L**; Santarelli, MF; Ardenkjaer-Larsen, JH; Wiesinger, F; Lionetti, V (Lionetti, Vincenzo; Romano, SL; Bianchi, Neglia, D; Giovannetti, G; Schulte, RF; Recchia, FA ; Landini, L; Lombardi, M., JACC-CARDIOVASCULAR IMAGING, Volume: 6 Issue: 6 Pages: 743-744, DOI: 10.1016/j.jcmg.2012.11.023, 2013
- "Cardiovascular Molecular Imaging: New Methodological Strategies", Santarelli, MF; Positano, V; **Menichetti, L**; Landini, L; Landini, L; CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, Volume: 19 Issue: 13 Pages: 2439-2446, 2013
- "Real time cardiac metabolism assessed with hyperpolarized [1-13C]acetate in a large animal model" Flori, A; Liserani M; Frijia F; Giovannetti G; Lionetti,V; Casieri, V; Positano V; Aquaro,G.D; Recchia,F.A.; Santarelli,M.F.; Landini, L., Ardenkjaer-Larsen,J.H.; **Menichetti,L\***; *manoscritto accettato per pubblicazione* in CONTRAST MEDIA & MOLECULAR IMAGING, 25 Luglio 2014.

# Sommario

Preambolo .....	4
Riassunto .....	7
Introduzione .....	8
1.1 La Risonanza Magnetica spettroscopia ed il <i>chemical shift</i> .....	8
1.2 Distribuzione tra livelli energetici e densità di popolazione degli spin .....	9
1.3 Tecniche di iperpolarizzazione: Polarizzazione Dinamica Nucleare (DNP).....	10
1.4 L'iperpolarizzazione dinamica nucleare (DNP) e la sua applicazione in ambito biomedico .....	12
1.5 Spettroscopia localizzata ed imaging spettroscopico di molecole di <sup>13</sup> C-iperpolarizzate: evoluzione temporale del segnale e distribuzione spaziale del segnale spettroscopico .....	15
1.6 Stato dell'arte dello sviluppo di applicazioni DNP in ambito biologico: studi in vitro ed in vivo .....	17
1.7 Modelli cinetici per lo studio della biochimica in vivo delle molecole iperpolarizzate .....	21
1.8 Sviluppo di nuovi agenti iperpolarizzati per la ricerca biomedica.....	23
1.9 Metabolismo cardiaco: ruolo del piruvato ed dell'acetato per la fornitura di energia al muscolo cardiaco .....	24
1.10 Trasferimento in ambiente clinico della tecnica di dissoluzione-DNP per imaging diagnostico mediante spettroscopico di risonanza magnetica .....	28
1.11 Scopo della Tesi Sperimentale.....	30
Materiali e Metodi.....	31
2.1 Il sistema di dissoluzione-DNP Hypersense <sup>®</sup> .....	32
2.2 Misura della percentuale di polarizzazione allo stato solido e liquido .....	34
2.3 Impiego di scanner clinici a 3T per studi di spettroscopia localizzata ed imaging: uso di sequenze di impulso e bobine RF dedicate per l'acquisizione del segnale spettroscopico del <sup>13</sup> C-iperpolarizzato .....	34
2.4 Elaborazione dei segnali spettroscopici .....	36
2.5 Analisi della dinamica dei segnali spettroscopici del <sup>13</sup> C-iperpolarizzato: uso di modelli cinetici per l'analisi della conversione metabolica in vivo .....	37
2.6 Valutazione regionale del metabolismo mediante imaging spettroscopico: analisi delle mappe polari dei settori cardiaci .....	38
2.7 Protocolli sperimentali per la valutazione del metabolismo cardiaco mediante agenti iperpolarizzati nel maiale da esperimento .....	39
Risultati e Discussione .....	41
3.1 Ottimizzazione del processo DNP per l'iniezione di agenti iperpolarizzati nel maiale da esperimento per la valutazione del metabolismo miocardico .....	42
3.2 Studio dell'andamento dinamico dei segnali di conversione metabolica e valutazione dell'effetto inotropo sul metabolismo cardiaco mediante [1- <sup>13</sup> C]piruvato iperpolarizzato .....	42
3.3 Studi di imaging CSI cardiaco nel maiale da esperimento: valutazione globale del segnale miocardico mediante somministrazione di [1- <sup>13</sup> C] piruvato .....	46

3.4 Studio della conversione metabolica del [1- <sup>13</sup> C]piruvato iperpolarizzato in un modello di ischemia e di riperfusione miocardica nel maiale da esperimento.....	48
3.5 Studio della cinetica di conversione miocardica del [1- <sup>13</sup> C] acetato iperpolarizzato.....	51
Conclusioni .....	56
Ringraziamenti.....	57
Bibliografia.....	58

# Riassunto

Nell'ambito di questo lavoro di tesi è stato valutato l'impiego combinato di agenti iperpolarizzati e della spettroscopia di risonanza magnetica per lo studio non invasivo del metabolismo cardiaco in un modello animale di media taglia (maiale). Per garantire un adeguato rapporto segnale rumore ed una sufficiente sensibilità della metodica sono stati messi a punto ed ottimizzati i parametri chimico fisici del processo di iperpolarizzazione dei substrati, [1-<sup>13</sup>C] piruvato e acetato, e le metodiche di acquisizione del segnale spettroscopico impiegando uno scanner clinico a 3T. La somministrazione sistemica di acetato e piruvato arricchiti con [<sup>13</sup>C] iperpolarizzati si è dimostrata sicura, in termini di induzione di effetti farmacodinamici, ed ha consentito la valutazione dinamica del metabolismo cardiaco in vivo in modo non invasivo nel maiale da esperimento. È stato misurata la conversione enzimatica dei substrati iniettati nei sottoprodotti e sono state fornite le mappe cardiache 3D di distribuzione spaziale dei metaboliti e le relative curve dinamiche di conversione: in particolare, è stata fornita una stima semi-quantitativa delle costanti cinetiche di conversione del substrato nei vari metaboliti. I metodi di analisi per lo studio della conversione metabolica applicati in un modello di stress inotropo nel maiale, hanno evidenziato una buona correlazione tra la stima delle costanti apparenti di conversione e lo stato fisiologico del miocardio. La mappatura metabolica della distribuzione spaziale dei metaboliti identificati globalmente nel cuore di maiale è stata effettuata mediante studi di *Chemical Shift Imaging* con [1-<sup>13</sup>C]piruvato: sono state prodotte mappe di distribuzione spaziale del segnale spettroscopico dei metaboliti prodotti nel miocardio sano e in un modello di ischemia transitoria. Con questo approccio, è stata dimostrata la capacità della tecnica di spettroscopia di substrati iperpolarizzati in un modello di ricerca pre-clinica, di valutare in modo non invasivo la cinetica enzimatica e biochimica *in vivo*. I protocolli sperimentali e le metodologie messe a punto durante questo studio rappresentano un punto di partenza per l'applicazione di questa tecnologia, non solo nella diagnostica ad immagini cardiologica, ma anche per la caratterizzazione di modelli fisiopatologici in altri ambiti, come la valutazione metabolica del microambiente tumorale, e lo studio delle proprietà farmacologiche di nuovi composti che agiscono su una specifica via metabolica/enzimatica

# Introduzione

## 1.1 La Risonanza Magnetica spettroscopia ed il *chemical shift*

Le applicazioni spettroscopiche dell'imaging di risonanza magnetica sono basate sull'interazione degli spin nucleari<sup>1</sup> con un campo magnetico statico esterno  $B_0$  (T, Tesla). I nuclei paramagnetici con spin  $\frac{1}{2}$  come  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sono caratterizzati da un moto di precessione in direzione parallela ed antiparallela al compostati applicato ad una frequenza  $f$  tipica nel campo della radiofrequenze (RF), nota come frequenza di Larmor:

1. 
$$f = \frac{g_i}{2\pi} B$$

La frequenza di Larmor è legata è proporzionale al campo statico applicato attraverso una grandezza caratteristica degli spin definita dal rapporto giromagnetico ( $\gamma$ , MHz/T), per il protone ( $^1\text{H}$ ) = 42,576 MHz / T, mentre per il nucleo del carbonio-13 ( $^{13}\text{C}$ ) = 10.7052 MHz/T.

Il campo magnetico netto di tutti i nuclei in un dato volume di tessuto possono similmente essere specificati dal somma vettoriale dei momenti magnetici. La somma è conosciuta come la magnetizzazione nucleare, ed è denotato come  $\mathbf{M}$ . All'equilibrio, i nuclei precessione con fasi casuali, come mostrato in fig. 3. Le cui componenti trasversali si elidono e non producono alcun segnale rilevabile (fig.1): vi è, tuttavia, una piccola magnetizzazione netta,  $\mathbf{M}_0$ , nella direzione longitudinale (parallela a  $B_0$ ). Esso non può essere rilevato direttamente, perché non oscilla.

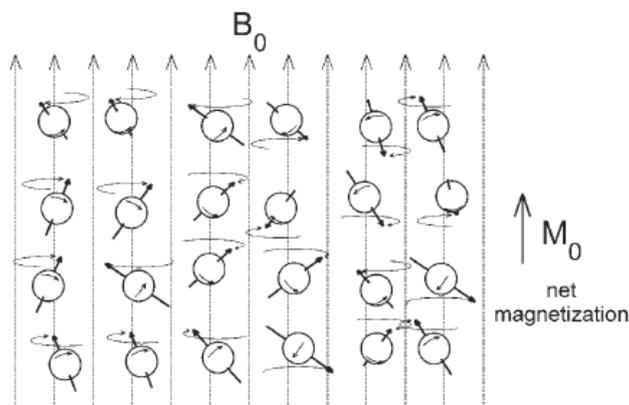


Figura 1.1: Rappresentazione del concetto di magnetizzazione netta per un sistema di spin [1].

Il valore della magnetizzazione lungo  $z$  dei nuclei, può essere misurato applicando un impulso RF alla frequenza di Larmor, di ampiezza sufficiente a spostare il vettore di magnetizzazione su un piano ortogonale ( $M_{xy}$ ) all'asse  $z$ . In condizioni di equilibrio termico, il numero di spin con moto di precessione nella direzione parallela a  $B_0$  è superiore rispetto al numero di spin in direzione antiparallela, per cui il valore del vettore di magnetizzazione netta risultante (convenzionalmente lungo l'asse  $z$ ) è diversa da zero. La durata dell'impulso RF sposta il vettore di magnetizzazione di un angolo (*flip angle*) verso il piano  $xy$ : quando il flip angle è di  $90^\circ$  la magnetizzazione è interamente ribaltata sul piano  $xy$  ( $M_z$ ).

<sup>1</sup> lo spin nucleare è una proprietà fisica di nuclei atomici descritti dal numero quantico di spin  $I$ .

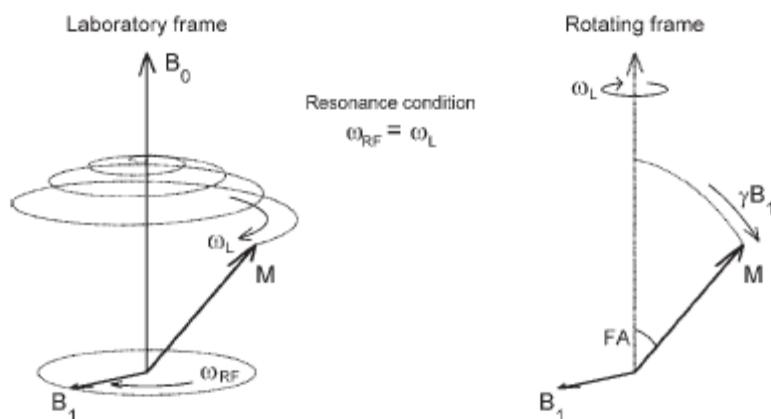


Figura 1.2: Eccitazione della magnetizzazione nucleare: applicando una radiofrequenza che corrisponde esattamente alla frequenza di Larmor  $\omega_{RF}=\omega_L$  la magnetizzazione netta è proiettata in direzione longitudinale [1].

In questo modo, dopo l'impulso RF il sistema di spin tende a recuperare la condizione termodinamica di equilibrio ed il vettore di magnetizzazione tende a ripristinare il suo orientamento parallelo al campo statico lungo z attraverso due meccanismi:

- Rilassamento longitudinale ( $T_1$ ), che descrive la dinamica con cui la componente  $M_z$  della magnetizzazione recupera la condizione di equilibrio lungo l'asse z
- Rilassamento trasversale ( $T_2$ ), che descrive la dinamica con cui la componente trasversale della magnetizzazione  $M_{xy}$  diminuisce a causa della sfasamento del spin nucleari

$B_0$  interagisce anche con gli elettroni più esterni che circondano gli spin nucleari e generando a loro volta una corrente indotta che genera una lieve diminuzione del campo statico effettivamente rilevato dallo spin nucleare. Il campo magnetico netto sperimentato dal nucleo è quindi dato dalla somma del campo esterno applicato al tessuto e campi molto più piccole generato dagli elettroni circonda il nucleo. Questi campi aggiuntivi alterano la frequenza di precessione del nucleo, generando una piccola differenza in frequenza denominata *chemical shift*: il valore del *chemical shift* è un parametro caratteristico del gruppo chimico in cui il nucleo è inserito, e fornisce quindi una informazione specifica per ogni specie molecolare. Analizzando le frequenze che contribuiscono a formare il segnale MR, si possono quindi identificare molecole diverse e quindi i metaboliti nei tessuti biologici. Questo processo costituisce la base della spettroscopia di risonanza magnetica (MRS). L'ampiezza del *chemical shift* ( $\delta$ ) viene misurata rispetto ad una frequenza di riferimento con una distribuzione elettronica ad elevata simmetria (i.e. TMS, tetrametilsilano) ed è espressa in parti per milione (*ppm*). [1]

## 1.2 Distribuzione tra livelli energetici e densità di popolazione degli spin

Il valore del segnale misurabile in MR, dato da  $M_0$ , è prodotto dalla somma vettoriale della momenti magnetici nucleari degli spin, ed è proporzionale alla differenza tra la popolazione tra i due stati di spin parallelo ed antiparallelo al campo statico applicato. La distribuzione degli spin  $I$  sui livelli energetici è associati al moto di precessione in direzione parallelo (*up*, a più bassa energia) ed antiparallelo (*down*, a più alta energia) rispetto a  $B_0$ . L'ampiezza del segnale di magnetizzazione rilevato nelle tecniche MR è quindi determinato dalla differenza di popolazione dei due livelli energetici, in condizioni di equilibrio termico. Infatti all'equilibrio, le relative popolazioni degli stati sono determinati dalla loro separazione energia,  $\Delta E$ , rispetto all'energia termica disponibile:

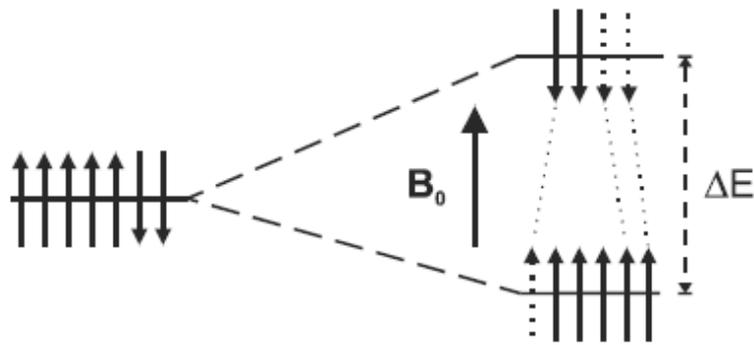


Figura 1.3: L'assorbimento di energia (microscopica): la differenza di energia  $\Delta E$  tra le due configurazioni (spin up e spin down) è proporzionale alla intensità magnetico del campo  $B_0$  e la corrispondente frequenza di precessione  $\omega_0$ .

$$3. \quad \frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

dove T è la temperatura assoluta del campione in Kelvin,  $k$  è una costante fondamentale noto come la costante di Boltzmann, con il valore  $k = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J / K}$ . Infatti, a 1.5 T (una intensità di campo tipica per gli scanner clinici) il rapporto  $\Delta E / kT$  è di circa  $10^{-5}$ . In tali condizioni, l'Eq. [3] può essere espansa come:

$$4. \quad \frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT}$$

La differenza di popolazione è quindi pari quindi  $\Delta E / kT$ , o circa 1 su 100.000 nuclei a 1.5 T. Poiché la differenza di popolazione è così bassa, all'equilibrio il valore di magnetizzazione,  $M_0$ , è molto piccolo. MR è, dunque, una tecnica intrinsecamente poco sensibile. Il valore del rapporto  $\frac{N_{\downarrow}}{N_{\uparrow}}$  è definito come valore di polarizzazione (comunemente indicato come **P** o valore percentuale %P). [1,2,3]

### 1.3 Tecniche di iperpolarizzazione: Polarizzazione Dinamica Nucleare (DNP)

La differenza di popolazione tra i due livelli energetici all'equilibrio è determinata dalla forza del campo magnetico statico  $B_0$ : maggiore l'intensità del campo magnetico, maggiore è la magnetizzazione di equilibrio. Quindi, l'impiego di campi più forti, aumenta il rapporto segnale-rumore (SNR), consentendo misurazioni MR da effettuare su campioni piccoli o con risoluzione superiore. Con un approccio diverso un enorme aumento del segnale può essere ottenuto mediante le tecniche di iperpolarizzazione degli spin, cioè aumentando artificialmente la frazione allineata nella direzione del campo magnetico, in condizioni di non-equilibrio termico.

Le tecniche di iperpolarizzazione consentono di incrementare la percentuale di polarizzazione degli spin (%P)

$$5. \quad M \propto \gamma \cdot C \cdot P$$

dove **C** è la concentrazione del nucleo di interesse e **P** la polarizzazione, espressa dall'equazione:

$$6. \quad P = \tanh\left(\frac{\gamma \cdot \hbar \cdot B_0}{2} \cdot k \cdot T\right)$$

dove la *costante di Planck*,  $k$  la costante di Boltzmann e  $T$  la temperatura; *tangh* la tangente iperbolica.

Nel caso del segnale protonico, la bassa sensibilità intrinseca della risonanza è compensata dalla elevata abbondanza naturale (99,98%) di questo nucleo e dalla elevatissima concentrazione nei tessuti biologici (molare).

Nuclei	(MHz/T)	Abbondanza isotopica naturale
$^{13}\text{C}$	10.71	1.1%
$^1\text{H}$	42.58	99.98%

Questi parametri sono meno favorevoli per altri eteronuclei come il  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^{15}\text{N}$  che sono caratterizzati da una bassa abbondanza naturale e/o o bassa concentrazione nei tessuti biologici. Per il  $^{13}\text{C}$ , la bassa abbondanza naturale (1,1%) ed il fattore giromagnetico  $\gamma_{^{13}\text{C}} = 10,705 \text{ MHz} / \text{T}$  consentono al massimo il raggiungimento di un valore di polarizzazione termica di solo 2,5 ppm a  $B_0=3\text{T}$ . Le tecniche di iperpolarizzazione consistono nella creazione di una condizione di non-equilibrio, il cosiddetto *stato iperpolarizzato*, in cui la differenza di popolazione dei 2 livelli di spin *up/down* risulta incrementata, fino a 4 ordini di grandezza.

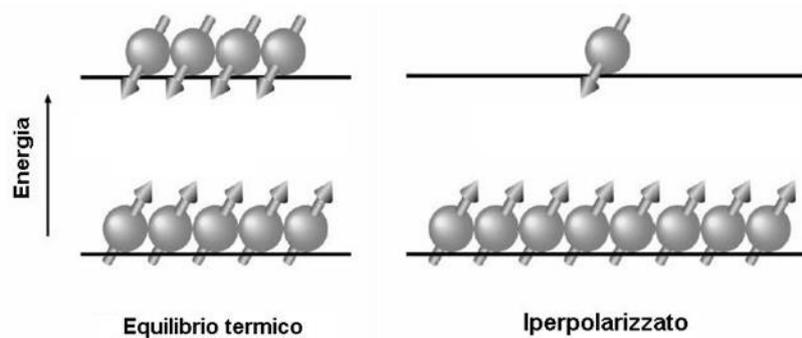


Figura: tipica rappresentazione della condizione di equilibrio termico e di stato iperpolarizzato di un sistema di spin nucleari in presenza di un campo magnetico statico  $B_0$ .

Lo *stato iperpolarizzato* non è una tuttavia una condizione di equilibrio del sistema di spin nucleare: il sistema di nuclei iperpolarizzati tende a ripristinare rapidamente la condizione di equilibrio termico attraverso il processo di rilassamento governato dal  $T_1$  e scambiando energia con il reticolo circostante. La perdita di magnetizzazione a partire dallo stato iperpolarizzato è genericamente descritta utilizzando un decadimento mono-esponenziale:

$$7. \quad M(t) = M_{0(Hyp)} e^{-\frac{t}{T_1}}$$

Il processo di decadimento dallo stato iperpolarizzato verso l'equilibrio termico è un processo irreversibile, non recuperabile da sistema. Per le molecole isotopicamente sostituite con  $^{13}\text{C}$  (tipicamente riferita a gruppi carbossilici) i tempi di rilassamento  $T_1$  caratteristici ricadono nell'intervallo di circa 10-60 s: in questo caso l'acquisizione spettroscopica deve essere eseguita, in un intervallo di tempo molto breve, non superiore ad alcuni minuti [1,2].

#### 1.4 L'iperpolarizzazione dinamica nucleare (DNP) e la sua applicazione in ambito biomedico

I primi studi sullo stato di iperpolarizzazione nucleare risale agli anni '50, con i lavori di Overhauser nel 1953 e di Abragham nel 1955. Durante il processo di iperpolarizzazione DNP l'elevata polarizzazione di elettroni spaiati in un campione viene trasferito ai loro nuclei vicini attraverso irraggiamento a microonde (MW) con conseguente guadagno enorme guadagno della magnetizzazione risultante. Il primo meccanismo di DNP descritto da Overhauser nel 1953, (chiamato l'*effetto Overhauser*), si traduce in polarizzazione nucleare di condurre solidi e liquidi: più tardi è stato dimostrato che il processo DNP ha luogo anche in campioni solidi non-conduttrici, dove viene solitamente spiegato con l'effetto solido (SE), Croce Effect (CE) o di miscelazione termica (TM) meccanismi. I primi due sono basati su sistemi di spin microscopici, basato su una descrizione meccanica quantistica, mentre TM si basa su una descrizione macroscopica, basato sul concetto termodinamico di temperatura di spin. La DNP viene in genere eseguita oggi su soluzioni contenenti radicali liberi stabili (tritiile, nitrossidi, ...) e la molecola (tipicamente un substrato metabolico) di interesse. I campioni sono iperpolarizzato allo stato solido e sono più rapidamente dissolti, con conseguente guadagno molto elevato segnale (e molto più alta del fenomeno stimato da Overhauser per sistemi conduttori [3]).

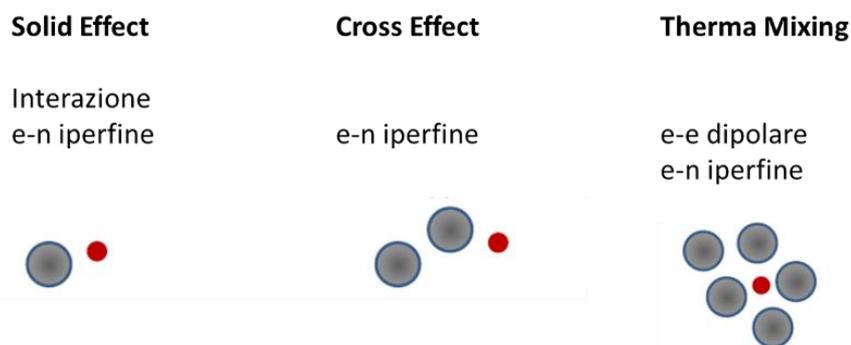


Figura 1.4: meccanismi coinvolti nel processo DNP e modelli teorici sviluppati per l'interpretazione del fenomeno di iperpolarizzazione dinamica nucleare invocando interazioni iperfini e dipolari per un sistema di spin elettronico (e) e nucleare (n).

Lo stato iperpolarizzato viene raggiunto fruttando intensità di campo magnetico elevato ( $\approx 3$  T) e temperature estremamente basse ( $\approx 1$  K): in queste condizioni gli elettroni sono quasi completamente polarizzati ( $P(e^-) > 90\%$ ) mentre la polarizzazione nucleare è ancora molto bassa ( $< 1\%$ ). Per questo nel 1953 Overhauser ipotizzò che in queste condizioni la polarizzazione degli spin elettronici di elettroni spaiati può essere trasferita agli spin nucleari. In questo modo, l'aggiunta al campione di radicali spaiati consentì il superamento del limite fisico stabilito dall'equilibrio termico, quindi da  $B_0$  e dalla temperatura (K), consentendo il raggiungimento di un incremento del segnale di magnetizzazione di un fattore  $\approx 660$ , teoricamente rappresentato dal rapporto tra il fattore giromagnetico elettronico e nucleare. [4,5,6].

Il limite per cui tale tecnica non ha avuto da allora una diretta applicazione in campo biomedico è legata principalmente alla disponibilità di tecnologie in grado di sfruttare il principio fisico scoperto e di formulazioni efficaci idonee all'uso in vivo. Sono stati necessari circa 30 anni per arrivare ad il primo prototipo di sistema DNP per imaging MRI/MRSI nei primi anni del XXI secolo. Il raggiungimento della condizione di iperpolarizzazione allo stato solido è realizzata impiegando un campione drogato con molecole radicaliche in grado di trasferire la polarizzazione dell'elettrone spaiato a 3,35 T e 1.4 K mediante eccitazione a radiofrequenza nella banda delle microonde (MW): l'irraggiamento a microonde satura le transizioni energetiche delle degli spin elettronici  $S$  e lo spin nucleare  $I$  [7,8].

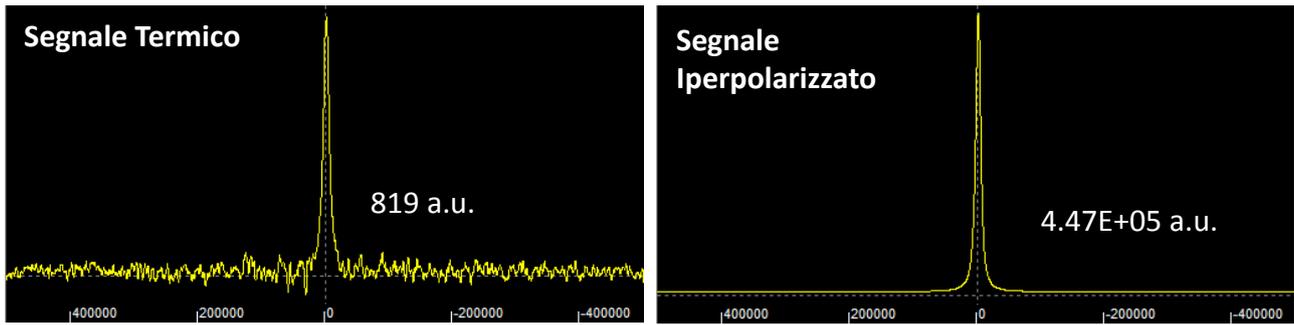


Figura 1.5: confronto tra il segnale termico ed iperpolarizzato allo stato solido di una matrice costituita da  $[1-^{13}\text{C}$ -piruvato, 15mM radicale tritile, 1mM  $\text{Gd}^{3+}$ chelate, 1.4K/3,35T (sistema Hypersense<sup>®</sup>, Pisa)

La banda corrispondente tipicamente alla frequenza di risonanza elettronica che a 3.35 T è di  $\approx 94$  GHz. Le due transizioni energetiche sono irraggiate a MW, con frequenze che corrispondono approssimativamente alla frequenza di risonanza elettronica  $\omega_s \pm \omega_l$ , i.e. la frequenza di risonanza nucleare. Il processo di polarizzazione DNP è tipicamente eseguita selezionando una frequenza caratteristica pari a  $\omega_s - \omega_l$  (definita come *transizione di doppio quanto*). In ragione del fatto che il processo DNP è effettuato a temperature estremamente basse ( $\approx 1$  K) per l'utilizzo in ambito biologico degli agenti polarizzati è stato sviluppato un sistema di estrazione e rapida dissoluzione del campione, come descritto da Ardenkjer-Larsen nel 2003 [9]. Il primo sistema per DNP (operante a 3.35 T e 1.4 K) descritto da Ardenkjer-Larsen, consentiva una rapidissima dissoluzione del campione preservando la polarizzazione del composto, precedentemente ottenuta a stato solido con DNP. Per questo la tecnica è stata spesso definita come *dissoluzione-DNP*, cioè in grado di produrre campioni iperpolarizzati allo stato liquido, che utilizzeremo anche in questo manoscritto. Con questo approccio, sono riportati valori di iperpolarizzazione per i substrati isotopicamente arricchiti con  $^{13}\text{C}$  valori dell'ordine del 30-50% ( $P=0,3-0,5$ ) [5, 9]: il guadagno ottenuto del segnale considerando il valore di polarizzazione termica, ( $B_0=3\text{T}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $P_{\text{Boltzmann}}=2,5\text{ppm}$ ), è di circa  $\approx 10^5$ .



Figura 1.6: Iperpolarizzatore DNP (Hypersense<sup>®</sup>), installato presso il laboratorio di risonanza magnetica della Fondazione CNR/Regione Toscana G.Monasterio, Pisa.

Poiché le interazioni tra gli spin elettronici e nucleari nel reticolo giocano un ruolo fondamentale per il meccanismo di trasferimento di polarizzazione, la tipologia di (mono, o bi-) radicale impiegato e la formulazione del campione giocano un ruolo fondamentale per il raggiungimento delle condizioni ottimali di iperpolarizzazione [5,10]. Il campione sottoposto a dissoluzione-DNP è tipicamente preparato come una soluzione omogenea contenente una molecola arricchita in un isotopo paramagnetico [11-12], in questo caso  $^{13}\text{C}$ , dopata con il radicale e, ove necessario, addizionata di agenti in grado di dare formulazioni stabili ed omogenee [13]. Sinora sono stati impiegati diversi tipi di radicali organici, con caratteristiche diverse nello spettro elettronico EPR<sup>2</sup> come i radicali nitrossido, con il radicale TEMPO (4-oxo-TEMPO, TOTAPOL) oppure il radicale tritile, noto come OXO63 [14-15] (fig. 1.7).

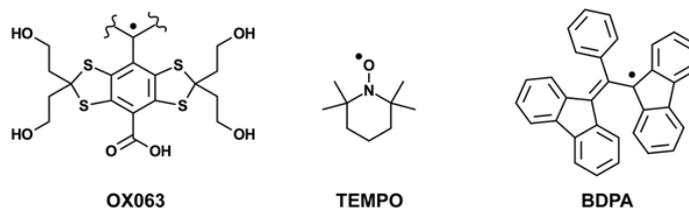


Figura 1.7: radicali organici usati per DNP [10].

Le formulazioni basate sul radicale tritile in ragione della sua stretta banda EPR e della struttura altamente simmetrica [16] sono particolarmente efficaci per DNP e sono state largamente impiegate migliorare il segnale di nuclei a basso  $\gamma$ , come il  $^{13}\text{C}$ . L'OXO63 è inoltre caratterizzato da una elevata solubilità e relativa stabilità sia acqua che in ambiente organico: la concentrazione ottimale nella miscela da iperpolarizzare con composti isotopicamente arricchiti con  $^{13}\text{C}$  è di circa 15 mM [16, 17]. L'omogeneità della matrice e la formazione di solidi vetrosi a bassa temperatura sono condizioni essenziali per la realizzazione del processo DNP: il campione deve mantenere uno stato amorfo quando viene congelato a  $\approx 1\text{K}$  a stato solido. Per le matrici che non hanno proprietà auto-vefrificanti, la strategia più comune è rappresentata dall'impiego di un solvente vetrificante, come ad esempio glicerolo o dimetilsolfossido (DMSO) che evita la precipitazione e/o (micro)cristallizzazione del campione [13, 18, 19]. Un ulteriore progresso è stato raggiunto con l'aggiunta di chelanti del gadolinio ( $\text{Gd}^{3+}$ ) e in misura minore di altri lantanidi, determina un significativo incremento delle prestazioni di iperpolarizzazione [17]: questo effetto di "enhancement" ha condotto all'introduzione di quantità dopanti (1-2mM) dei complessi stabili del gadolinio per gli studi sperimentali di dissoluzione DNP. Per la comprensione di questo fenomeno è richiamata l'azione del complesso di  $\text{Gd}^{3+}$  sulla diminuzione del tempo di rilassamento elettronico, che condurrebbe ad miglioramento della efficienza di trasferimento della polarizzazione [20-23].

La molecola più studiata in questi ultimi anni per applicazioni biologiche con dissoluzione-DNP è il [1- $^{13}\text{C}$ ] piruvato (fig.1.8): oltre al suo ruolo nel metabolismo cellulare ossidativo, per cui si è riscontrato un grosso potenziale applicativo in modelli sperimentali in vitro ed in vivo, si tratta di un composto di auto-vefrificante (è infatti impiegato come acido piruvico per la DNP) in grado di fornire soluzioni omogenee di radicale e di garantire la concentrazione più elevata di  $^{13}\text{C}$ .

<sup>2</sup> EPR = Electron Pramagnetic Resonance

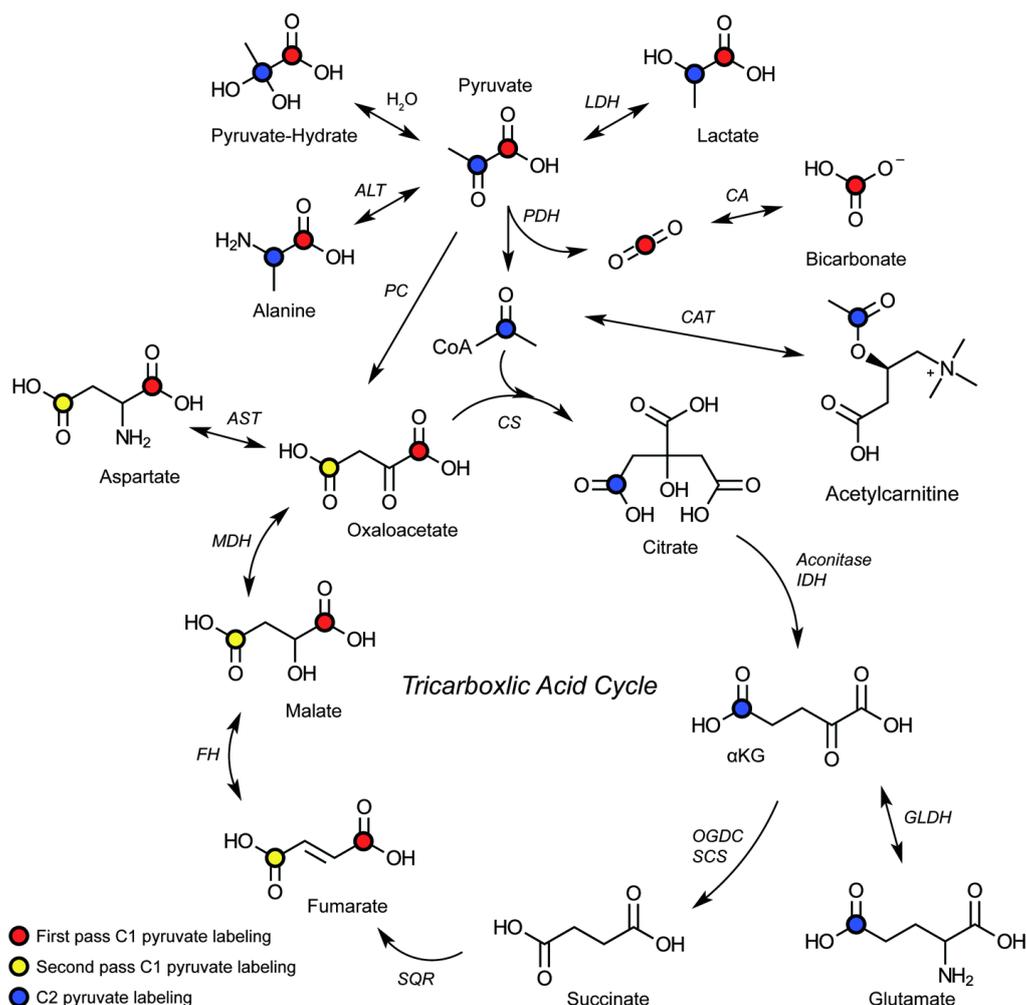


Figura 1.8: destino metabolico del  $[^{13}\text{C}]$ piruvato iperpolarizzato sostituito in posizione C1, o C2. I punti rossi indicano il primo passaggio del "labelling- $^{13}\text{C}$ " dal piruvato-C1 nel primo passaggio ed i punti gialli indicano la progressione al secondo passaggio entrare attraverso piruvato carbossilasi. I puntini blu indicano gli intermedi etichettati derivanti dal metabolismo di C2 piruvato. Abbreviazioni: LDH - lattato deidrogenasi, ALT - alanina transaminasi, CA - carbonica, PDH - complesso piruvato deidrogenasi, CAT - carnitina o-acetiltransferasi, PC - piruvato carbossilasi, CS - citrato sintasi (EC, aconitasi, IDH - isocitrato deidrogenasi, OGDC - chetoglutarato deidrogenasi complesso, SCS - succinil coenzima A sintetasi, SQR - succinato deidrogenasi, FH - fumarato idratasi, MDH - malato-deidrogenasi, AST - aspartato transaminasi, GLDH - deidrogenasi glutammato CoA - coenzima A. [ da Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 1627-1659 Chemistry and biochemistry of  $^{13}\text{C}$  hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization, Kayvan R. Keshari and David M. Wilson] [10].

### 1.5 Spettroscopia localizzata ed imaging spettroscopico di molecole di $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzate: evoluzione temporale del segnale e distribuzione spaziale del segnale spettroscopico

Lo studio di molecole iperpolarizzate isotopicamente arricchite con  $^{13}\text{C}$  ha richiesto la messa a punto di bobine di ricezione a radiofrequenza (RF) e la messa a punto di sequenze di acquisizione dedicate. Poiché il segnale iperpolarizzato è prodotto da una condizione di non-equilibrio del sistema nucleare di spin e decade rapidamente secondo il  $T_1$  caratteristico, le sequenze di acquisizione devono tenere in considerazione la

rapida perdita del segnale e l'effetto dell'eccitazione prodotta dall'impulso RF. Per questo l'elemento caratteristico per questo tipo di set-up dalla velocità di acquisizione e dall'ottimizzazione dell'impulso RF.

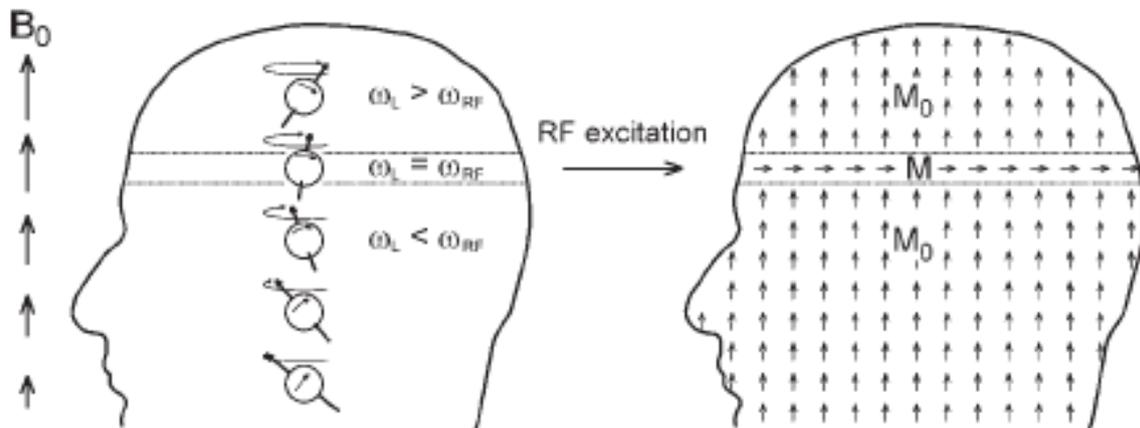


Figura 1.9: Per acquisire un'immagine di una particolare porzione di tessuto, come schematizzato in figura, gli scanner MR devono eccitare la magnetizzazione nucleare solo all'interno della fetta desiderata. L'eccitazione selettiva della fetta è ottenuta applicando un impulso a radiofrequenza RF in presenza di un gradiente del campo magnetico: il gradiente determina una variazione lineare del campo statico  $B_0$  che determina (e quindi traccia) una variazione spaziale della frequenza di Larmor. Solo gli spin la cui frequenza di Larmor,  $\omega$ , corrisponde esattamente al campo RF effettivamente applicato,  $\omega_{RF}$ , saranno eccitati. La spettroscopia selettiva su una fetta è denominata *Slice Selective spectroscopy* [1].

Nonostante il valore del segnale delle molecole iperpolarizzate sia estremamente elevato e quasi esente da rumore, per cui si ottiene un elevatissimo SNR<sup>3</sup>, la magnetizzazione non è rinnovabile e viene persa dopo ogni impulso RF in modo proporzionale al FA applicato [24]. Sono state sviluppati diversi approcci per la messa a punto di sequenze RF dinamiche e sfruttare il massimo SNR, bilanciare il valore di risoluzione spaziale e temporale. [26-32]. Le sequenze di risonanza per studi <sup>13</sup>C sono generalmente caratterizzate da un basso FA (5-10°) e da tempi di ripetizione piuttosto lunghi (TR=1-2s) per preservare il segnale di iperpolarizzazione più a lungo nell'intervallo di acquisizione stabilito. Nelle applicazioni di imaging si realizza una mappa di distribuzione dei segnali derivanti dalla molecola iperpolarizzata e dai prodotti di conversione metabolica in un volume di interesse opportunamente definito. Mentre la risoluzione temporale e spaziale sono definite a spese del segnale di magnetizzazione disponibile, la risoluzione spettrale (necessaria per separare il contributo delle varie molecole iperpolarizzate negli spettri <sup>13</sup>C acquisiti) è legata sostanzialmente al campo magnetico applicato e non può essere modificata: questo rappresenta un limite non superabile quando si vogliono studiare pattern complessi con numerosi intermedi non separati da un adeguato *chemical shift*.

Possiamo distinguere due tipi di approcci per l'analisi del segnale spettroscopico, spesso condotti in fasi successive dello stesso studio, la spettroscopia selettiva di un volume corrispondente ad un *fetta* del campo di vista, nota come *Slice-selective spectroscopy* ed l'imagin spettroscopico, mediante il così detto Chemical Shift imaging (CSI) (fig.1.9). La spettroscopia selettiva rappresenta l'approccio più semplice, e consente di rilevare l'evoluzione temporale del segnale fornendo un'informazione diretta dell'andamento dinamico dei segnali relativi ad un volume campionata su un volume definito, mentre *CSI imaging* fornisce una mappa di distribuzione dei segnali in una determinata regione di interesse, tipicamente attraverso un piano assiale dell'immagine MR. Sono state messe a punto sequenze in grado di ridurre significativamente il tempo di

acquisizione ed accelerare il campionamento del segnale spettroscopico, come le sequenze di imaging echo-planare (EPSI) [32], o le sequenze a traiettoria spirale [31]. In quest'ultimo caso, è possibile ricostruire un'immagine tridimensionale (3D) dei segnali spettroscopici ad un singolo valore temporale [37], oppure immagini 2D relative ad un numero pre-impostato di sezioni prescritte in un volume di interesse (*multi-slice approach*) [31-36]. La rapida evoluzione della tecnologia ha portato allo sviluppo di sequenze di imaging spettroscopico definite 5D in grado di fornire l'evoluzione temporale del segnale per ogni volume (*voxel*) che costituisce la griglia dell'immagine [36].

#### 1.6 Stato dell'arte dello sviluppo di applicazioni DNP in ambito biologico: studi in vitro ed in vivo

Le prime applicazioni riportate in letteratura del  $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzato in vivo sono basate sull'impiego di mezzi di contrasto iperpolarizzati nel maiale da esperimento per lo studio angiografico delle coronarie [37] and valutazione dei cateterismi angiografici [38]. Tuttavia le potenzialità della metodica sono state sviluppate solo negli studi successivi con la valutazione del metabolismo cellulare e della biochimica di conversione enzimatica in vivo in modo non invasivo con molecole-substrato iperpolarizzate (fig. 1.10-1.11) [39]. Molto rapidamente l'applicazione di questa tecnica in ambito biologico ha prodotto un numero elevato di applicazioni studi metabolici [40].

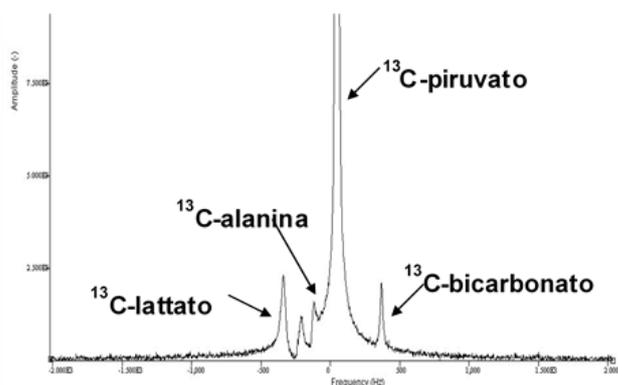


Figura 1.10: tipico spettro ottenuto per iniezione di  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato iperpolarizzato in vivo nel maiale da esperimento (tempo di acquisizione,  $t=16\text{s}$  dopo l'iniezione).

Nei primi studi è stata dimostrata la capacità della metodica di estrarre mappe metaboliche oppure curve dinamiche basate sulla stima dell'area o dell'intensità dei segnali spettroscopici in funzione del tempo, in un determinato volume di interesse. Oltre al  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato, di gran lunga il più impiegato per le sue ottime proprietà chimico-fisiche ed il suo ruolo centrale nel metabolismo cellulare come intermedio della glicolisi, sono stati testati altri substrati [5, 40-41]. Tra questi i più significativi [10]:  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato [42-44],  $[1-^{13}\text{C}]$ bicarbonato [45, 46],  $[1-^{13}\text{C}]$ lattato [47,48],  $[^{13}\text{C}-2\text{D}]$ glucosio [49],  $[1-^{13}\text{C}]$ fumarato [50],  $[1-^{13}\text{C}]$ butirrato [51].

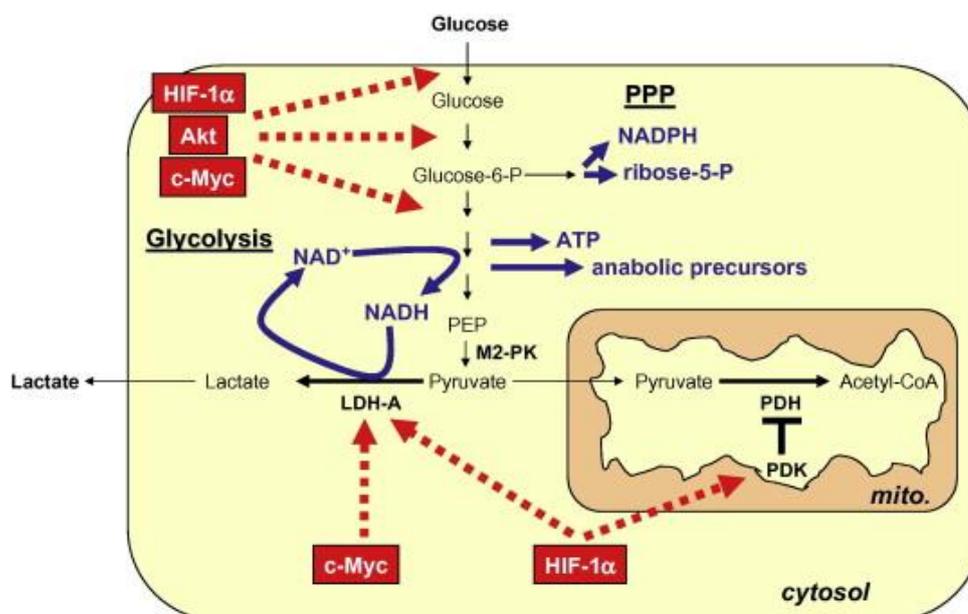


Figura 1.11: Glicolisi e riprogrammazione metabolica nelle cellule proliferanti tumorali. Flusso glicolitico genera ATP e precursori biosintetici nel citoplasma. Glucosio-6-fosfato viene anche impegnata nella via dei pentoso fosfati per generare ribosio-5-fosfato (fase ossidativa) e molecole di NADPH. Piruvato viene convertito in lattato dal lattato deidrogenasi A (LDH-A), rigenerando così NAD<sup>+</sup> dal NADH. Piruvato deidrogenasi chinasi (PDK) blocca l'attivazione dei mitocondriale piruvato deidrogenasi (PDH), limitando la conversione del piruvato in acetil-CoA e alimentando ulteriormente il ciclo TCA. Ipossia-inducibile fattore 1α (HIF-1α) stimola l'espressione di LDH-A e PDK, impedendo così l'accumulo di piruvato, un processo ulteriormente enfatizzata dalle attività rate-limiting del piruvato chinasi isoforma M2 (M2-PK). HIF-1α e AKT e c-Myc stimola il flusso glicolitico aumentando l'espressione di trasportatori di glucosio e / o enzimi glicolitici; c-Myc stimola anche LDH-A espressione. [O.Feron, *Radiotherapy and Oncology* 92, 3, 329–333,2009].

Le applicazioni oncologiche su modelli sperimentali hanno valutato le alterazioni metaboliche nella lesione tumorale rispetto al tessuto sano, in particolare valutando l'incremento del [1-<sup>13</sup>C] lattato prodotto dal piruvato iperpolarizzato, per conversione catalitica dal parte dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) [53]. La caratterizzazione metabolica del tumore è di recente tornato in auge richiamando concetti come quello di Otto Warburg secolari: il metabolismo di numerose linee tumorali risulta caratterizzato da una deplezione del metabolismo ossidativo in favore di quello riduttivo, noto come effetto *Warburg*<sup>4</sup>: questa condizione è stata studiata impiegando piruvato iperpolarizzato [40, 52, 54]. Sono riportati studi condotti su modelli in vitro [36], impiegando cellule in sospensione, e in modelli di xenotrapianto [40, 55], tra cui risultano linee cellulari di cancro della prostata [56, 57], del seno [58], del fegato [59], linee di glioma [60] e linfoma [45]. Un aspetto molto rilevante per l'applicazione del <sup>13</sup>C-iperpolarizzato è rappresentato dalla valutazione della risposta al trattamento delle lesioni [50, 54, 61] e per la valutazione della risposta precoce risposta al trattamento (fig.1.12). Il futuro del <sup>13</sup>C-DNP in campo oncologico sarà anche legata alla capacità di dimostrare un maggior efficacia rispetto con quella fornita oggi nel campo della medicina nucleare dal <sup>18</sup>F-fluorodesossiglucosio (<sup>18</sup>F-FDG).

<sup>4</sup> L'effetto *Warburg* è caratteristico di numerosi tipi di cellule tumorali che mostrano un incrementato dei livelli di glicolisi ed produzione di acido lattico nel citosol. La prima osservazione che le cellule tumorali producono alti livelli di lattato nonostante un'adeguata ossigenazione è fondamentale per le future ricerche di meccanismi e importanza fisiologica dell'effetto Warburg.

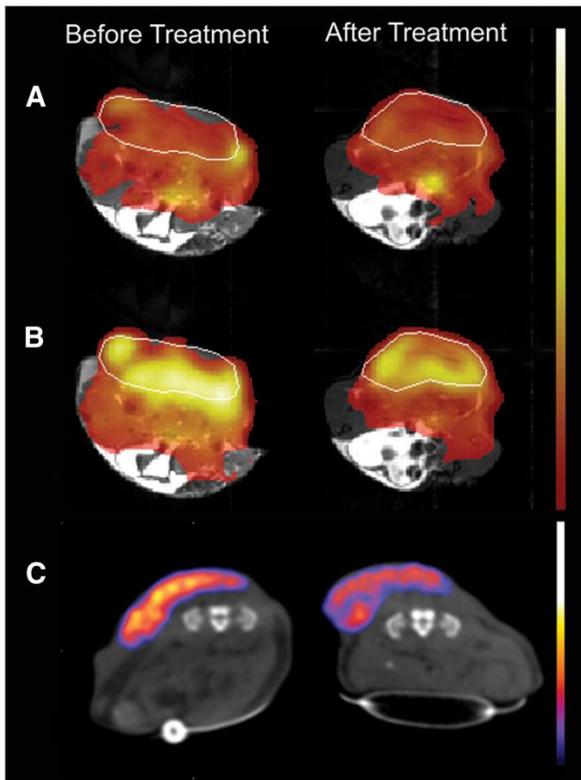


Figura 1.12 Confronto tra  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato DNP-MRS e  $^{18}\text{F}$ -FDG PET in un modello murino di linfoma. (A) Distribuzione spaziale del  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato iperpolarizzato iniettato prima e 24 ore dopo il trattamento dell'animale con etoposide (immagini protoniche coregistrate). I margini del tumore sono evidenziati con una linea bianca. (B) Distribuzione spaziale di  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato iperpolarizzato prodotto dal  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato. (C) Immagini PET acquisiti tra 80 e 90 minuti dopo iniezione di 7 MBq di  $^{18}\text{F}$ -FDG. Le immagini sono state acquisite prima e dopo le mappe di trattamento e colori sono stati sovrapposti con immagini TAC in scala di grigi. [34, 54].

Il processo principale di conversione enzimatica, che si realizza con un incremento netto del prodotto a partire dal substrato, può accadere anche uno scambio di  $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzato tra due pool, con un incremento di  $^{13}\text{C}$  per il metabolita senza un incremento della sua concentrazione totale. Il contributo del processo reversibile di scambio del  $^{13}\text{C}$  tra due pool, dipende dal processo metabolico e dal tipo di modello sperimentale osservato. Ad esempio, lo scambio tra il pool di piruvato e lattato endogeno [62] è in questo contesto è particolarmente rilevante: è stato dimostrato su modelli in vitro [63, 64] e in vivo [36, 65, 66] con linee cellulari di tumore, che la conversione metabolica osservata da  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato a lattato  $[1-^{13}\text{C}]$  era principalmente dovuta lo scambio isotopico del  $^{13}\text{C}$  del piruvato con il lattato endogeno, invece di produzione netta del metabolita. Questo effetto è probabilmente dovuto all'attività della LDH [65], alle dimensioni del pool del lattato, e quindi al prevalere dello scambio del "label"  $^{13}\text{C}$  rispetto alla ridotta conversione nel metabolita durante la breve durata dell'acquisizione del segnale [66]. La fase I di sperimentazione clinica è stato recentemente completata presso l'Università della California a San Francisco con uno studio, condotto su 31 pazienti, con  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato per la valutazione del cancro alla prostata. Lo studio era principalmente finalizzato alla valutazione della sicurezza e lo scale-up della dose del piruvato  $[1-^{13}\text{C}]$  iniettato [67] (fig.1.13).

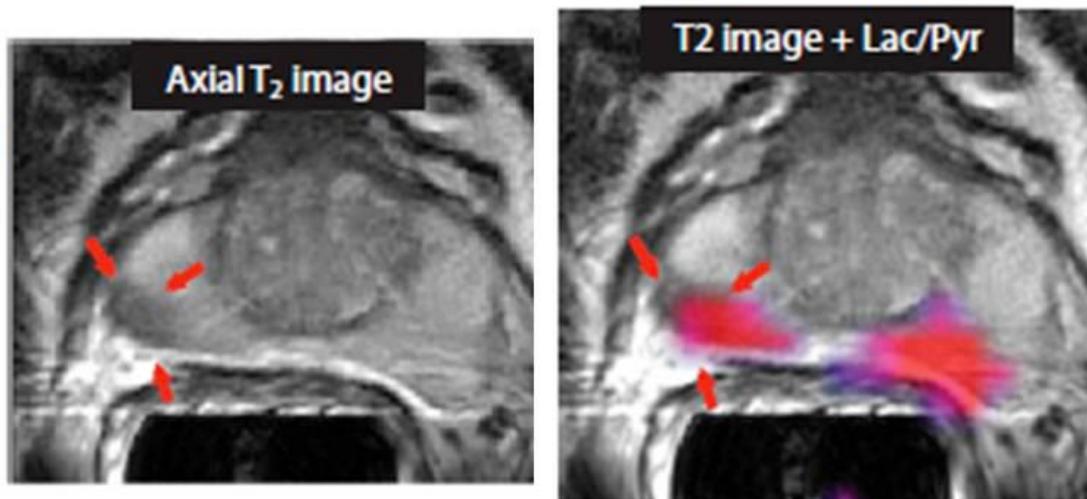


Figura 1.13: Tumore della prostata: immagine protoniche ( $^1\text{H}$ ) assiali T<sub>2</sub>-pesate (le frecce rosse identificano la lesione) ottenuto da un paziente con siero PSA di 4,5 ng/ml, iniettato con [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] piruvato (Pyr) iperpolarizzato (0,43 ml / kg). Una regione relativamente elevata di [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] lattato (Lac) iperpolarizzato è stata osservata nella stessa posizione: le regioni colorate in queste sovrapposizioni hanno un rapporto di [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] lattato / [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] piruvato  $\geq 0.2$ . [67].

Un altro ambito di sviluppo per le applicazioni di dissoluzione-DNP è fin dall'inizio lo studio del metabolismo cardiaco. Il complesso della piruvato deidrogenasi (PDH) mitocondriale catalizza la decarbossilazione ossidativa del piruvato: questa reazione collega glicolisi alle funzioni energetiche e anabolizzanti di acidi tricarbossilici (TCA). Di conseguenza, adeguato flusso attraverso PDC è particolarmente importante nei tessuti con un alto requisito ATP, come il cuore ed i tessuti coinvolti nell'esercizio muscolare (fig. 1.14) [68].

Il piruvato iperpolarizzato, sostituito isotopicamente sia in posizione [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] che [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ], ha consentito di studiare l'attività di alcuni degli enzimi chiave del metabolismo del muscolo cardiaco [5, 63], ed ha consentito di monitorare l'attività del complesso enzimatico piruvato deidrogenasi (PDH) e a valle nel ciclo di Krebs. Il piruvato [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] fornisce una informazione diretta informazioni del metabolismo ossidativo [69, 70], attraverso la conversione in  $\text{CO}_2$  e quindi bicarbonato. Parallelamente al processo ossidativo, per via spettroscopia può essere misurato il rapporto di conversione in lattato catalizzato dell'enzima attico deidrogenasi (LDH) e la conversione in alanina da parte dall'enzima alanina transaminasi (ALT). In modo complementare, il piruvato [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ] entra nel ciclo di Krebs e consente in tempo reale rilevazione degli intermedi del ciclo di Krebs, principalmente [ $5\text{-}^{13}\text{C}$ ]glutammato e [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] citrato [71, 72]. Con questo approccio sono state studiate le alterazioni metaboliche e cambiamenti nella selezione dei substrati energetici nel miocardio in modelli murini di diabete [68] e ischemia transitoria [49, 74, 75] l'ipertrofia cardiaca e scompenso cardiaco nel maiale [76, 77].

L'applicazione della dissoluzione-DNP è stata dal suo inizio applicata ai modelli porcini per lo studio metabolismo cardiaco [78]: sono state ottenute mappe metaboliche CSI del cuore maiale valutando la distribuzione spaziale di [ $^{13}\text{C}$ ] piruvato e lattato, bicarbonato ed alanina. In questo primo pionieristico studio, era selezionata una fetta di 20 mm di spessore a 1.5 T, in un modello di ischemia con di somministrazione di [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]piruvato 300 mM in bolo [79]. In questo momento è in crescita, ma ancora piuttosto limitato, il numero di studi su altri organi, come cervello, fegato [80] o rene [81]. Nel cervello sono stati testati [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] [45], [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]Piruvato [82] e [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] acetato [83]. Infine, Le molecole iperpolarizzate possono essere impiegate non solo come tracciante metabolico ma anche come mezzo di contrasto vascolare: è riportata [84] l'applicazione della  $^{13}\text{C}$ -Urea, metabolicamente inerte e con T<sub>1</sub> abbastanza lungo, per lo studio della perfusione miocardica.

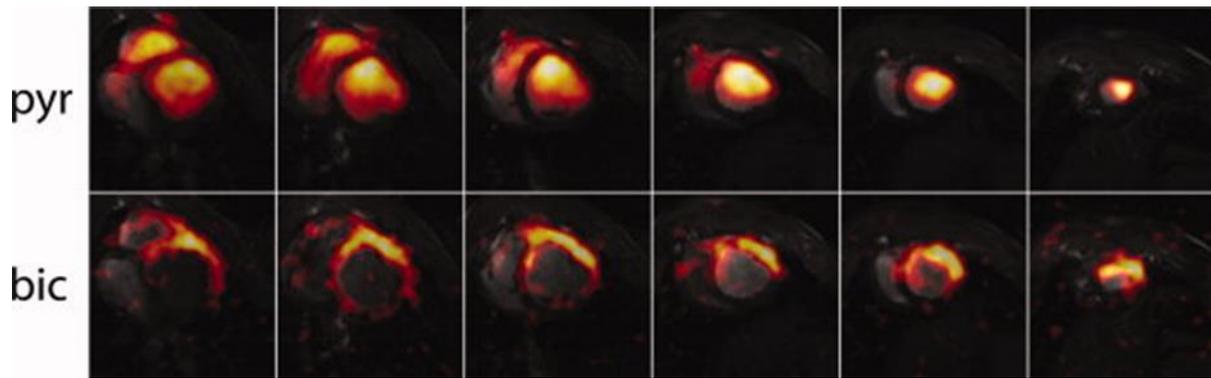


Figure 1.14: Dati in vivo acquisiti utilizzando una sequenza spirale cardiaco-gated multistrato che mostra la distribuzione spaziale dei metaboliti in un asse corto del cuore. I segnali di  $[^{13}\text{C}]$  bicarbonato (bic), lattato e piruvato (pyr) sono stati acquisiti su 9 battiti cardiaci, e la sequenza è stata ripetuta per tre punti temporali. La risoluzione delle immagini ricostruite sovrapposte è  $8.8 \times 8.8 \text{ mm}^2$  in piano con spessore di strato di 1 cm. L'intera scansione è stata completata entro 18 secondi [29].

### 1.7 Modelli cinetici per lo studio della biochimica in vivo delle molecole iperpolarizzate

Lo sviluppo di modelli per l'analisi dei cinetici consente di descrivere analiticamente la conversione dell'agente iperpolarizzato e di fornire una interpretazione semi/quantitativa delle reazioni enzimatiche e dei fenomeni di trasporto in modelli in vitro e/o in vivo.

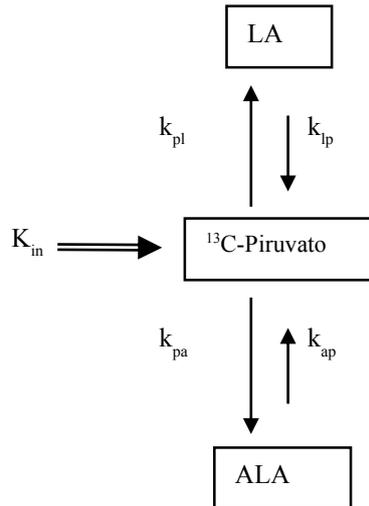
Tuttavia, l'andamento dinamico dei segnali in vivo delle molecole iperpolarizzate è determinata non solo dai flussi di conversione metabolica ma anche da altri processi fisici, tra cui il decadimento del segnale iperpolarizzato legato al  $T_1$ , la diminuzione della polarizzazione dovuta all'eccitazione RF e i fenomeni di trasporto per cui spesso i modelli prevedono più di due compartimenti per l'interpretazione dei fenomeni studiati. I modelli matematici applicati per gli studi cinetici si basano solitamente su modelli compartimentali, comunemente applicati negli studi farmacocinetici e con la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET). Da un punto di vista analitico, i modelli compartimentale sono costituiti tipicamente da sistemi di equazioni differenziali che descrivono l'andamento della di conversione del substrato iniettato in bolo nei metaboliti a valle ed il trasporto attraverso i vasi e la membrana cellulare e come accennato d la componente di fisica di riduzione del segnale. L'evoluzione temporale del segnale di magnetizzazione rilevato negli studi di risonanza magnetica utilizza un sistema modificato delle equazioni di Bloch<sup>5</sup> [85].

Con questo approccio è possibile stimare alcuni parametri caratteristici, come  $T_1$  *apparente*<sup>6</sup> i tempi e le costanti cinetiche apparenti di conversione metabolica ( $k$ ). Un esempio è dato dal seguente sistema di scambio a 3 siti per l'iniezione in vivo di  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato iperpolarizzato:

<sup>5</sup> Equazioni basate su una Interpretazione fenomenologica (classica) del moto del vettore di magnetizzazione macroscopica. Essi includono gli effetti della precessione per il campo magnetico (statico e RF) ed i tempi di rilassamento.  $T_1$  e  $T_2$  tempi di rilassamento:

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

<sup>6</sup> Il concetto di parametro *apparente* è legato all'introduzione di alcune ipotesi semplificative nel modello analitico o numerico: nonostante il sistema di equazioni può essere molto complesso, di solito c'è una componente del sistema preponderante che determinante ad esempio la velocità di conversione e che permette di considerare un fattore fattore (il termine è mutuato dal modello cinetico di *Michaelis–Menten* con una reazione ad uno o più substrati).



La soluzione del sistema di equazioni differenziali, di seguito riportato, può essere affrontata secondo diversi approcci, sia analitici (nei casi più semplici) che numerici [33, 62, 62, 64, 70].

9.

$$(1) \frac{dM_p}{dt} = K_{in} - k_{pl}M_p - k_{pa}M_p + k_{lp}M_l + k_{ap}M_a$$

$$(2) \frac{dM_l}{dt} = k_{pl}M_p - k_{lp}M_l$$

$$(3) \frac{dM_a}{dt} = k_{pa}M_p - k_{ap}M_a$$

LA = lattato ( $^{13}C$ ), ALA = alanina ( $^{13}C$ ),  $t$ =tempo (s);  $K_{ini}$ : velocità di infusione piruvato ( $^{13}C$ ) (massa / t),  $K_{PL}$ : piruvato in lattato tasso di conversione (1/t),  $k_{pa}$ : piruvato di alanina tasso di conversione (1/t),  $k_{lp}$ : da lattato a piruvato tasso di conversione (1/t),  $k_{ap}$ : da alanina a piruvato tasso di conversione (1/t),  $M_p$ : quantità di  $^{13}C$  i piruvato marcato;  $M_l$ : la quantità di  $^{13}C$  marcato lattato,  $M_a$ : la quantità di  $^{13}C$  alanina marcata.

I modelli a 2 compartimenti o di scambio a due siti rappresentano concettualmente la conversione metabolica del substrato iniettato nel prodotto metabolico, considerando i due pool separati ed il segnale derivato dalla componente intracellulare [34, 55, 58, 63, 65, 69, 71]. Modelli di scambio a 3 siti sono stati proposti per stimare i contributi intra-ed extra-cellulare del [ $^{13}C$ ] lattato [63, 66]; nel lavoro di Harrison et al [66], si impiegava l'analisi di spettrometria di massa per distinguere il lattato intra-ed extra-cellulare.

In prima approssimazione, nel breve lasso di tempo (2-3 min) di un tipico esperimento di spettroscopia con agenti iperpolarizzati ed in ragione della concentrazione relativa elevata del substrato, la reazione inversa viene trascurata, consentendo una notevole semplificazione per lo sviluppo di modelli cinetici di conversione metabolica in vivo [56, 86]. Anche la dinamica di iniezione del substrato iperpolarizzato può implementata nel disegno del modello cinetico [83, 86, 87, 88, 89]. L'impiego di a due compartimenti ha consentito di stimare le costanti di conversione cinetica apparente e quindi il flusso di [ $^{13}C$ ] lattato nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano [34, 56, 58]; analogamente sono stati applicati allo studio del metabolismo cardiaco, [86], agli studi cerebrali [90] o del tessuto epatico [80]. Più recentemente, un metodo alternativo basato sull'analisi dell'area totale sotto la curva (AUC) descritta dall'andamento dinamico del segnale spettroscopico è stata proposta per la modellazione cinetica del [ $^{13}C$ ] piruvato iperpolarizzato [83]. In questo lavoro, è stato dimostrato che il rapporto del valore dell'AUC è proporzionale

alla costante di velocità della reazione fornendo in questo modo un approccio privo di sistemi differenziali per l'analisi dei dati spettroscopici dinamici.

### 1.8 Sviluppo di nuovi agenti iperpolarizzati per la ricerca biomedica

I criteri per la selezione e lo sviluppo di nuove molecole per l'imaging del  $^{13}\text{C}$  iperpolarizzato è rappresentato dall'assenza di reazioni avverse note in letteratura e/o di tipo osservazionale su modelli murini, e dal soddisfacimento dei seguenti requisiti di natura chimico-fisica:

- polarizzazione stato liquido > 20% con un tempo inferiore a 120 min di polarizzazione
- concentrazione dopo dissoluzione > 30 mM e pH nell'intervallo 7,2-7,6
- $T_1$  di > 20 s in acqua (a campi 3T e 9.4T)
- elevata concentrazione allo stato solido e buone proprietà vetrificanti

L'acido piruvico è l'unica molecola che soddisfa tutti questi requisiti: se si considerando strutture chimiche con carbonilici, carbossilici e quaternari sostituibili con  $^{13}\text{C}$  e peso molecolare inferiore a 200 Da (in modo da garantisce un  $T_1$  sufficientemente lungo e idonee proprietà chimico-fisiche) si ottiene un pool di circa 400 molecole candidate (i risultati ottenuti interrogando banche dati tipo *Human Metabolome Database*). Tra quelle selezionate, molto approssimativamente una settantina rivestono un potenziale interesse biomedico, e di queste circa la metà sono disponibili in commercio isotopicamente arricchite con  $^{13}\text{C}$ . In genere lo sviluppo per DNP si è indirizzato verso piccole molecole data (1) facilità di sintesi (2) elevata solubilità acquosa e (3) rilevanza nel metabolismo in genere più veloce. Inoltre, per le piccole molecole  $T_1$  diminuisce in funzione della crescente tempo di correlazione<sup>7</sup> ( $t_c$ ) visto con l'aumento delle dimensioni molecolari: il  $T_1$  si riduce significativamente all'aumentare del peso molecolare, per strutture chimiche simili [10].

Tra questi riportiamo una selezione di potenziale interesse biochimico:

Compound (ppm)	P(%)	$T_1$ (s)	Solubility	In vivo biochemistry (mechanism) (ppm)
Criteria	>20	>20	>30mM	
Pyruvate (172 ppm)	40	60		lactate (184) / alanine (177)
[1- $^{13}\text{C}$ ]acetate (183)	20	50	Tris	acetyl-CoA (202), acetyl-carnitine (174)
[1- $^{13}\text{C}$ ]lactate	20	46	Water	pyruvate, alanine
[1,4- $^{13}\text{C}$ ]succinate	20	27	DMSO	fumarate (175.6)
[ $^{13}\text{C}$ ]Acetoacetate	20	50	neat	3-hydroxybutyrate
[ $^{13}\text{C}$ ]aspartate	17	29	Tris	Oxaloacetate
[ $^{13}\text{C}$ ]Malate	25	26	DMSO	Oxaloacetate/fumarate
[ $^{13}\text{C}$ ]Keto-isoleucine	33	43	Glycerol	Isoleucine
$^{13}\text{C}$ -bicarbonate (161.5)	15	60	Cs-salt	$^{13}\text{CO}_2$ (125.8)
[5- $^{13}\text{C}$ ]glutamine (178.8)	30	18	NaOH	Glutamate (182.3)
[1- $^{13}\text{C}$ ]acetylcarnitine	40	19	HCl	Acetyl-CoA/acetate

<sup>7</sup>  $T_C$  = il tempo che impiega la molecola media di ruotare un radianti (da Bloembergen, EM Purcell, RV Pound "rilassamento Effetti in Risonanza Magnetica Nucleare Absorption" Physical Review 1948, 73, 679-746).

<i>[1-<sup>13</sup>C]betaine</i>	40	37	<i>glycerol</i>	<i>Dimethyl-glycine</i>
<i>[<sup>13</sup>C]Carnitine</i>	20	54	<i>glycerol</i>	<i>acyl.-carnitine</i>
<i>[1-<sup>13</sup>C]citrate</i>	35	25	<i>Glycerol</i>	<i>Cis-aconitate</i>
<i>[1-<sup>13</sup>C]glycine</i>	30	30	<i>NaOH</i>	<i>glyoxylate</i>
<i>[<sup>13</sup>C]Glyoxylate</i>	19	45	<i>Glycerol</i>	<i>glycine</i>
<i>[<sup>13</sup>C]2-hydroxy-butyrate</i>	20	41	<i>Glycerol</i>	<i>2-oxo-butyrate</i>

*(courtesy by Prof. Jan Henrik Ardenkjaer-Larsen, GE Healthcare, dati non pubblicati, GE-Health Care property)*

### 1.9 Metabolismo cardiaco: ruolo del piruvato ed dell'acetato per la fornitura di energia al muscolo cardiaco

La connessione tra il flusso glicolitico ed quello del ciclo degli acidi tricarbossilici è regolato con una estrema efficienza funzionale dal complesso della piruvato deidrogenasi, complesso multi-enzimatico localizzato nella membrana interna e la matrice mitocondriale. L'attività di questo enzima è soggetta un controllo fine nella tappa rilevante per la cinetica del meccanismo di conversione enzimatica al crocevia tra glicolisi, gluconeogenesi e sintesi degli acidi grassi (fig. 1.15-1.16): per questo motivo lo studio della piruvato deidrogenasi ha un ruolo importante non solo nel quadro di patologie connesse ad una disfunzione dei complessi enzimatici cui sono particolarmente sensibili i tessuti altamente aerobi quali il cervello, o il tessuto muscolare, ma più in generale nel quadro dello studio fisiopatologico di alcuni organi, come il cuore.

Il cuore in risposta ad un esercizio od uno stimolo aumenta il suo tasso metabolico in modo significativo, pur mantenendo concentrazioni costanti le specie in grado di fornire energia (ad esempio, ATP, ADP e Pi): i meccanismi che regola questa risposta sono completamente così come l'alterazione di questi meccanismo in un quadro di alterazione patologica, come nelle condizioni ischemiche e nello scompenso o nel caso delle alterazioni cardiovascolari dal diabete. L'energia necessaria per garantire la funzione contrattile del cuore è fornita dall'ossidazione di diversi substrati metabolici, principalmente da acidi grassi e glucosio [91]. La selezione del substrato non dipende solo sullo stato fisiologico del miocardio, ma anche da diversi altri fattori come la concentrazione del substrati contenenti ossidabili, il flusso coronarico, lo stato nutrizionale dei tessuti e i fattori neuroendocrini [91, 92, 93]. Nel cuore umano non-ischemico, il 60-90% della spesa energetica è fornita dalla ossidazione dei FA, con la parte restante derivante dall'ossidazione del piruvato (glicolisi e ossidazione lattato), e in piccola parte da corpi chetonici [92]. Il piruvato ha un ruolo centrale nel metabolismo intermedio delle cellule del miocardio come un prodotto metabolico di glicolisi [91, 92, 93, 94]: in condizioni fisiologiche piruvato è prodotta dalla glicolisi o attraverso l'ossidazione del lattato.

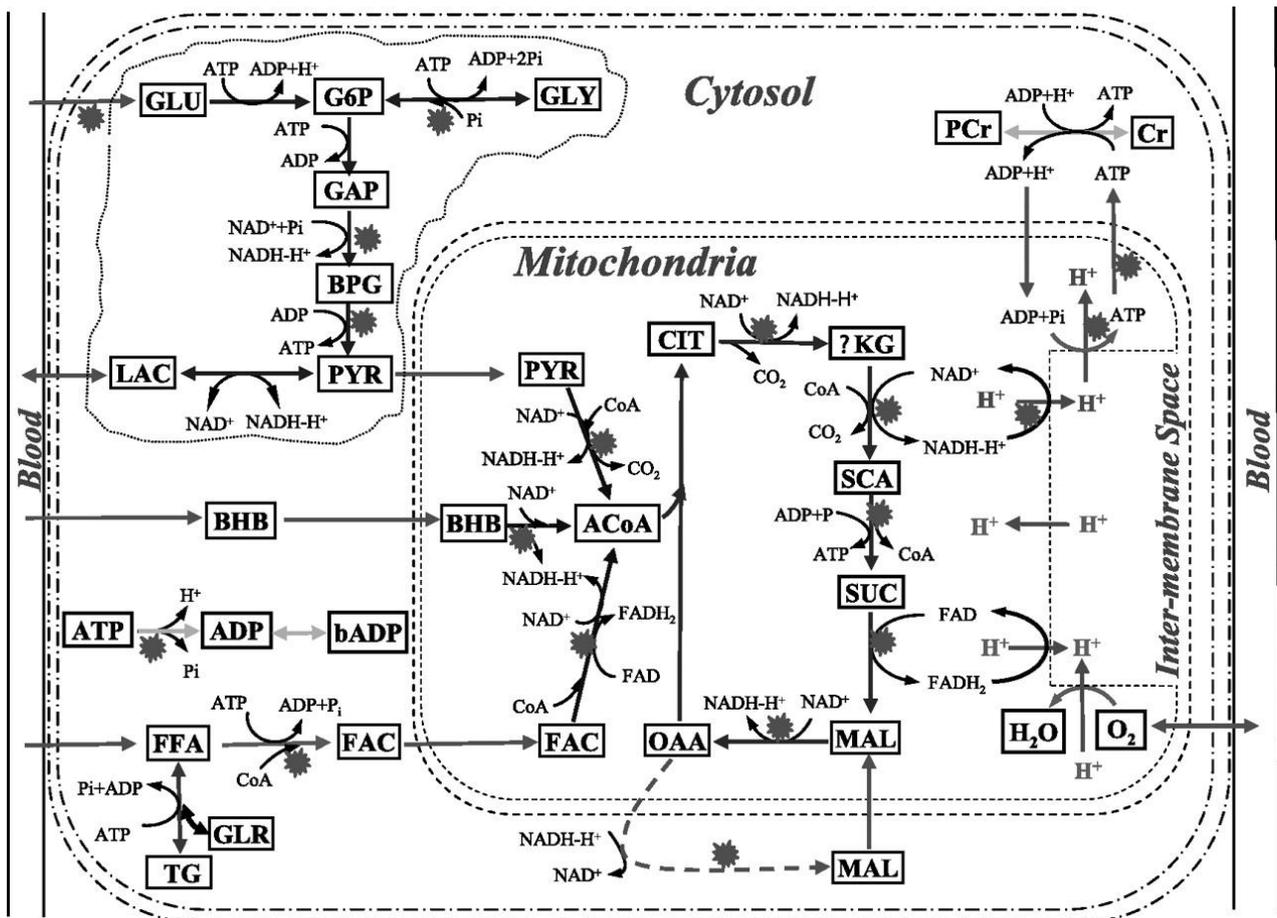


Figure 1.15: Rappresentazione schematica della via metabolica del miocardio via metabolica. Questa complessa rete comprende più importanti reazioni e percorsi biochimici coinvolti nel metabolismo cardiaco, compresi glicolisi, ossidazione del piruvato, ossidazione grassi, il ciclo degli acidi tricarbossilici, e fosforilazione ossidativa. Esso comprende anche il trasporto attraverso la membrana cellulare specie e la membrana mitocondriale, nonché afflusso e l'efflusso di protoni tra matrice mitocondriale e lo spazio inter-membrana. GLU, Glucosio; G6P, glucosio-6-fosfato; GLY, glicogeno; GAP, gliceraldeide-3-fosfate; BPG, 1,3-bisfosfato-glicerato; PYR, piruvato; LAC, lattato; TG, trigliceridi; GLR, glicerolo; FFA, libero FA; FAC, grassi acil-CoA; PCr, fosfocreatina; Cr, creatina; CIT, citrato;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -chetoglutarato; SCA, succinil-CoA; SUC, succinato; MAL, malato; OAA, ossalacetato; ACoA, acetil-CoA; BADP, ADP vincolato; ADP, ADP libero; BHB,  $\beta$ -idrossibutirrato. \* Attivazione del processo metabolico con insorgenza della spesa energetica aumento. American Journal of Physiology – 291, 1036-1046, 2006] [91].

Quest'ultima è una reazione redox associata alla riduzione stechiometrica di accettore di elettroni  $\text{NAD}^+$  in  $\text{NADH}$  [91]. In condizioni anaerobiche l'equilibrio di LDH è spostata verso la produzione di lattato mentre  $\text{NADH}$  si accumula nel citosol. Inoltre, nel citosol il piruvato subisce per transaminazione per produrre alanina. Questa è una reazione reversibile che è catalizzata dall'enzima ALT ed è associata a scomparsa stechiometrica di glutammato [93].

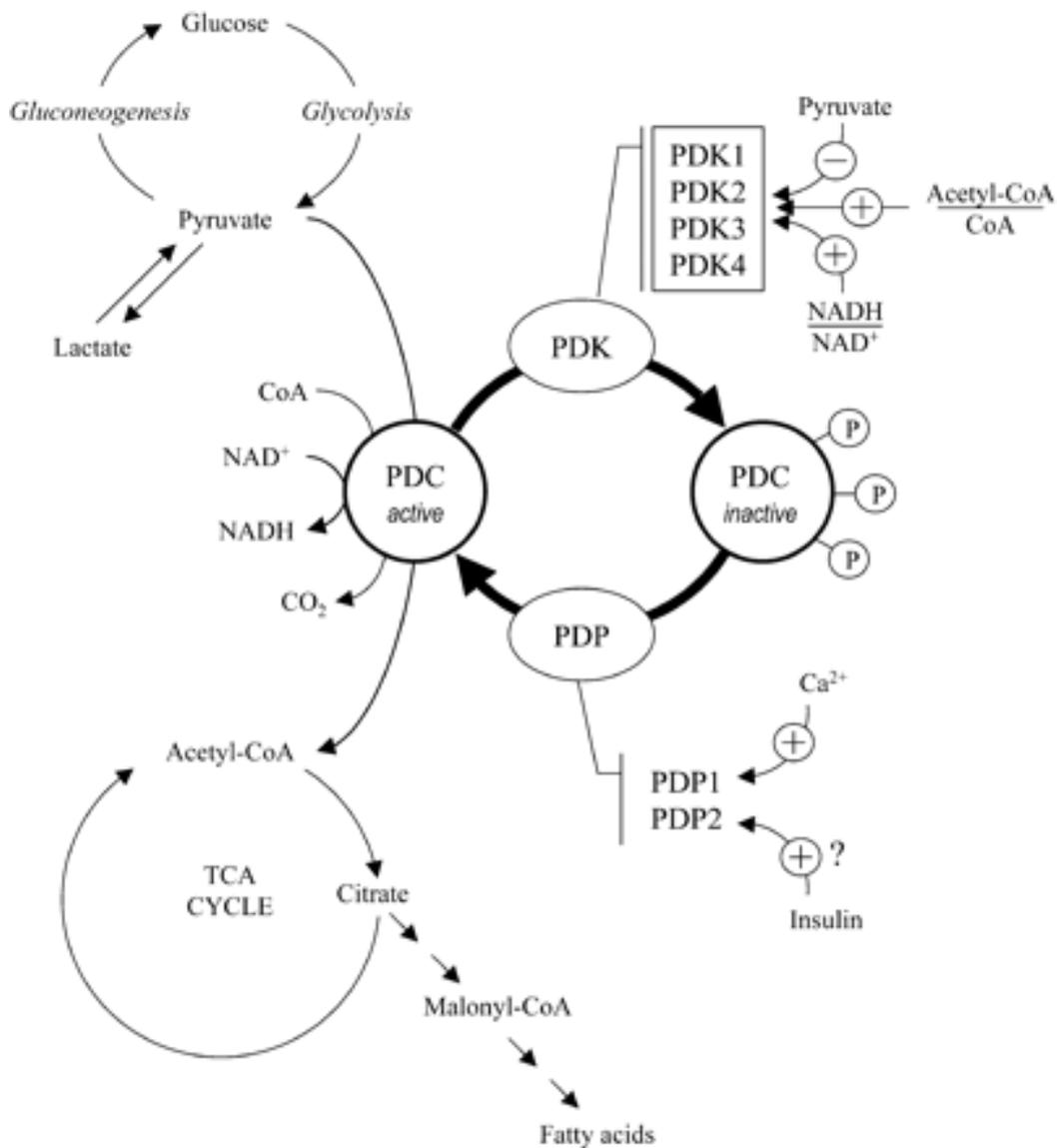


Figura 1.16: Meccanismi che regolano il complesso della piruvato deidrogenasi (PDC) dalla fosforilazione-defosforilazione, unitamente alla reazione catalizzata da PDC e i suoi collegamenti con altre vie metaboliche. PDK, piruvato deidrogenasi chinasi; PDP, piruvato deidrogenasi fosfatasi fosfato; TCA, ciclo degli acidi tricarbossilici [Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs, Mary C. Sugden, Mark J. Holness, American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 284, 855-862, 2003]

Il trasporto all'interno della cellula del piruvato è probabilmente a carico delle proteine che trasportano i composti monocarbossilati. La decarbossilazione ossidativa irreversibile del piruvato in acetil-coenzima A (CoA) è catalizzata da PDH, nella matrice mitocondriale. PDH regola l'ingresso del piruvato prodotto dalla glicolisi e quello derivato dal lattato nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) (fig. 1.16). La decarbossilazione del piruvato è associata alla riduzione di NAD<sup>+</sup> in NADH e formazione di CO<sub>2</sub>, secondo la seguente reazione:



L'acetil CoA poi entra nel ciclo TCA tramite l'enzima citrato sintasi (CSY) e viene successivamente ossidato. L'acetil-CoA / CoA libero e il rapporto delle concentrazioni intra-mitocondriale di NAD<sup>+</sup> / NADH modulano

direttamente l'attività di PDH: aumentati rapporti, legati all'accumulo dei prodotti finali della reazione, provocano l'inibizione inversa del PDH [64, 93]. Inoltre, PDH è controllato da un sistema di chinasi / fosfatasi regolata dal piruvato deidrogenasi chinasi (PDK): PDK fosforila e quindi inattiva PDH [64].

Anche l'attività PDK dipende dai rapporti di acetil CoA / CoA libero e delle concentrazioni NAD<sup>+</sup> / NADH nella matrice mitocondriale. Analogamente, aumentati i rapporti attivano PDK, quindi inibendo PDH, mentre i rapporti ridotti attivano PDH attraverso l'inibizione del PDK. Viceversa, il complesso PDH può essere attivato direttamente da un'alta concentrazione di piruvato che, in questo modo, favorisce la propria ossidazione e inattiva PDK. L'interconversione di HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> è governata dalla dall'enzima anidrasi carbonica [48]. In alternativa alla ossidazione del piruvato, anche l'ossidazione degli acidi grassi (FA) e corpi chetonici può fornire acetil CoA al ciclo TCA. In alcune condizioni si stabilisce una competizione tra FA e corpi chetonici per la fornitura di energia al cuore [94, 95].

Il tasso di ossidazione dei FA è determinata principalmente da la concentrazione plasmatica di FA non esterificati (FFA), poi trasportati nel plasma dall'albumina o legame covalente ai trigliceridi circolanti. L'ossidazione dei FA si realizza attraverso un trasporto altamente regolato all'interno dei mitocondri: alcune proteine come translocasi degli acidi grassi (FAT) o quelle di legame della membrana plasmatica degli acidi grassi (FABPpm) mediano il trasporto dei FA attraverso la membrana cellulare (sarcolemma) per l'ingresso nei cardiomiociti, che può verificarsi anche per diffusione passiva. Una volta attraversato il sarcolemma, gli FA si legano alla FABP e vengono attivati per esterificazione ad acil-CoA dalla Acil-CoA sintasi (FACS) per produrre acidi grassi a catena lunga. Poiché la membrana mitocondriale interna non è permeabile alle catene lunghe di acil-CoA, queste devono essere trasportate all'interno dei mitocondri dal citosol da un meccanismo a 3 stadi governato dalla carnitina:

1. l'enzima carnitina palmitoil-transferasi I (CPT-I) catalizza la produzione di acil-carnitina a catena lunga da acil-CoA a catena lunga tra le membrane mitocondriali interne ed esterne (quindi CPT-I controlla rigorosamente il livello di internalizzazione FA nei mitocondri);
2. la carnitina aciltranslocasi trasporta l'acilcarnitina a catena lunga attraverso la membrana mitocondriale interna scambiando carnitina libera;
3. enzima carnitina palmitoiltrasferasi II (CPT-II) riforma l'acil-CoA a catena lunga nella matrice mitocondriale.

Una volta all'interno dei mitocondri, gli FA può subire  $\beta$ -ossidazione, che costituisce un complesso meccanismo regolato dagli enzimi specifici per gli FA a catena lunga, media e catena, al fine di produrre NADH, FADH<sub>2</sub> e acetil-CoA per il successivo ingresso nel ciclo TCA. Tuttavia, l'acetil-CoA può anche sottoporsi a un altro processo, cioè lo scambio con carnitina libera nel citoplasma con rilascio di CoA libero e acetil-carnitina nel citosol. Questa reazione è catalizzata dall'enzima carnitina-acetiltransferasi (CAT), mentre il trasporto attraverso l'interno della membrana mitocondriale è mediata da carnitina acilcarnitina traslocasi (CACT) [96, 97].

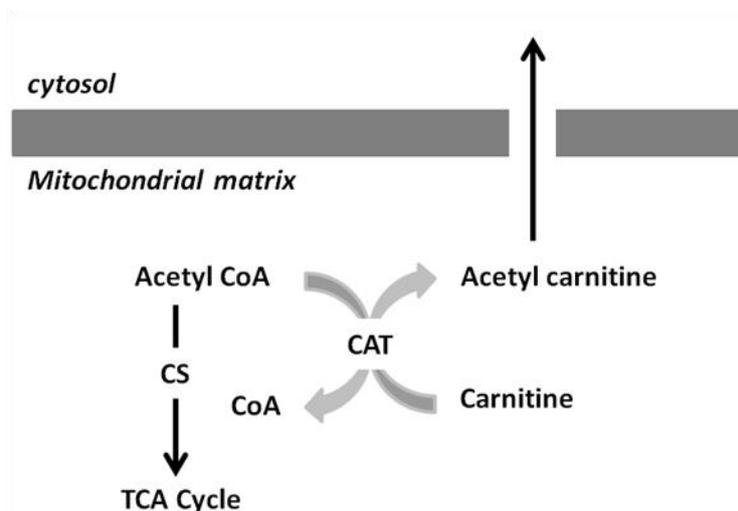


Figura 1.17: rappresentazione grafica del percorso metabolico di acetato in cellule del miocardio, dove CAT sta per l'enzima carnitina acetil-transferasi, ACS è l'enzima acetil-CoA sintetasi e CS è citrato sintasi [44].

Oltre piruvato C-1 e C-2 anche l'acetato è particolarmente interessante per lo studio del metabolismo cardiaco, in quanto è uno degli acidi grassi liberi a catena corta e per questo motivo rappresenta un substrato biologicamente molto rilevante per il muscolo cardiaco. Come accennato, gli acidi grassi rappresentano il substrato principale per il muscolo scheletrico a riposo e per il miocardio. L'acetato è estratto nei cardiomiociti e forma prontamente acetil-coenzima A (CoA), che viene poi trasportato nei mitocondri dopo coniugazione con carnitina da parte dell'enzima carnitina acetiltrasferasi, ed infine è ossidato nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) (fig.1.17).

#### 1.10 Trasferimento in ambiente clinico della tecnica di dissoluzione-DNP per imaging diagnostico mediante spettroscopico di risonanza magnetica

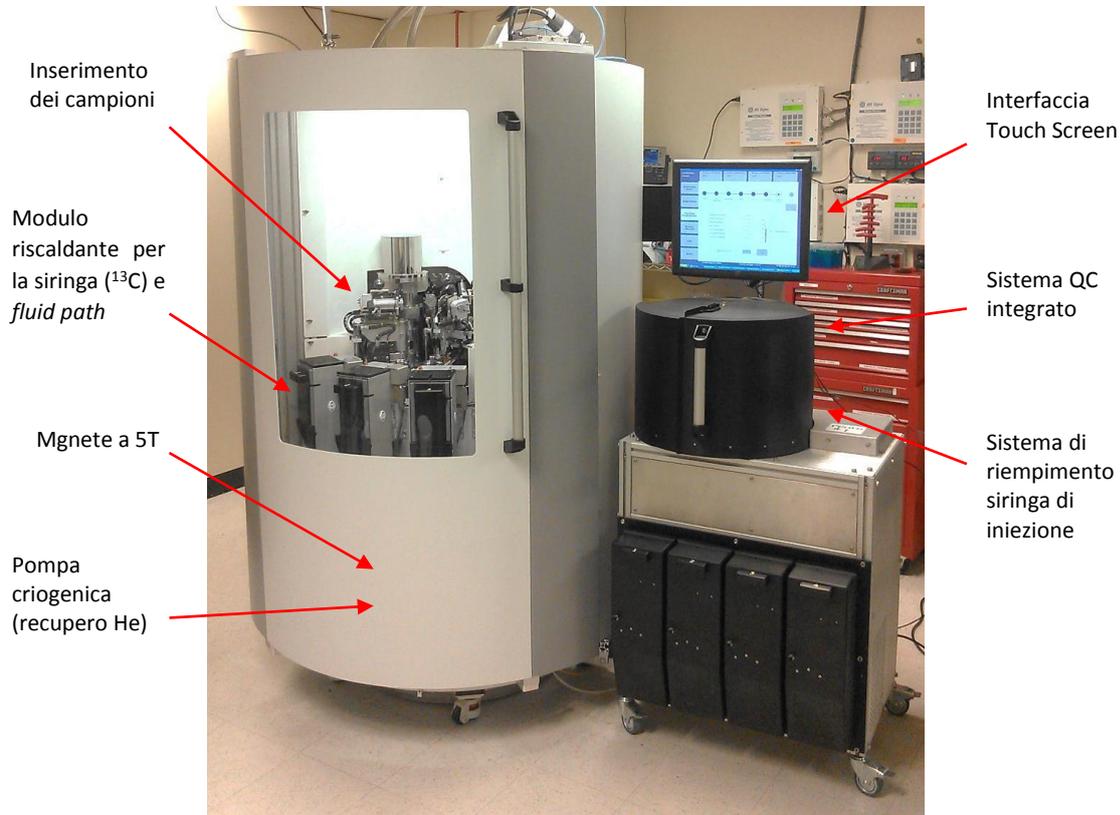
A partire dal 2012 è stato realizzato un sistema per iperpolarizzazione idoneo al trasferimento clinico della metodica, chiamato SPINlab® (GE) (fig.1.18). Il polarizzatore differisce da quelli precedentemente descritti (Hypersense®) per essere progettato con uso sterile. Le caratteristiche principali sono, l'impiego di un percorso del fluido monouso sterile, precaricato tutti le molecole/coformulanti per DNP, un sistema criogenico a ciclo chiuso progettato per eliminare il consumo di liquidi criogenici ed infine la possibilità di polarizzazione campioni multipli, ospitando quattro campioni allo stesso tempo [98].

In questo momento sono stati installati 3 SPINlab in Europa: a Cambridge, Oxford, Copenaghen e 3 in fase di installazione, Danimarca, Svizzera, e Spagna.

Il sistema SPINlab prevede l'iniezione di sostanze isotopicamente arricchite e coformulanti attraverso iniezione endovenosa su paziente: si tratta di una applicazione del tutto nuova non solo sotto il profilo scientifico ma anche normativo, non esistendo linee guida o norme che inquadrino l'uso di molecole iperpolarizzate, come i mezzi di contrasto per diagnostica (MRI, CT) oppure i radiofarmaci impiegati nella medicina nucleare. Si tratta tuttavia di una tecnica di frontiera particolarmente interessante per lo studio delle insufficienze d'organo e nell'ambito della patologia oncologica.

L'imaging metabolico mediante substrati iperpolarizzati può porsi come obiettivo la risposta a numerosi quesiti sulla patogenesi e sugli effetti terapeutici della patologia cardiovascolare oppure la definizione di un aspetto della fisiologia o del metabolismo cardiovascolare di potenziale interesse farmacologico [99, 100].

I modelli più interessanti per l'applicazione nell'ambito della ricerca clinica della tecnica appaiono lo cardiomiopatia dilatativa, lo studio della lesione post infartuale, lo studio delle tecniche rigenerative, lo studio degli aspetti metabolici delle mitocondriopatie genetiche, della cardiomiopatia ipertrofica.



*Figura 1.18: Il sistema per uso clinico (SPINlab®) è concepito come un sistema chiuso, integrato con un sistema di controllo qualità (QC) in linea, che fornisce una misura di pH, temperatura, il volume, la concentrazione piruvato, il livello di polarizzazione e radicale dopo la rimozione (in questo caso per filtrazione). Il polarizzatore consente di produrre automaticamente l'agente iperpolarizzato in siringa per la somministrazione al paziente.*

In campo oncologico, ci sono molte aspettative per l'inizio dei primi protocolli autorizzati in una serie di studi monocentrici con iperpolarizzato  $^{13}\text{C}$ -piruvato su pazienti con metastasi epatiche, glioma, linfoma, tumore dell'ovaio e della mammella. Lo scopo di questi *trial* è determinare se il  $^{13}\text{C}$ -piruvato iperpolarizzato può mappare il metabolismo alterato delle cellule tumorali rispetto alle cellule sane in particolare monitorando le variazioni nel rapporto di  $^{13}\text{C}$  lattato vs piruvato. In questo ambito, la possibilità di valutare il *follow up* e la diagnosi precoce di lesioni ad alto impatto come il cancro alla prostata, il linfoma ed il cancro alla mammella rappresenterà il vero banco di prova per stabilire l'efficacia della metodica in un contesto clinico.

### 1.11 Scopo della Tesi Sperimentale

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è rappresentato dalla messa a punto di una metodica basata sulla dissoluzione-DNP e la spettroscopia di risonanza magnetica per lo studio del metabolismo cardiaco.

La combinazione di sofisticate tecniche di spettroscopia di risonanza magnetica del  $^{13}\text{C}$  e di metodi in grado di produrre molecole/substrato iperpolarizzate costituisce un nuovo approccio per lo studio non invasivo e semi/quantitativo della cinetica biochimica e enzimatica, potenzialmente trasferibili in ambiente clinico di ricerca. In particolare è stato condotto uno studio su modelli sperimentali nell'animale di media taglia (maiale da esperimento) finalizzati alla quantificazione delle alterazioni metaboliche misurabili con sonde iperpolarizzate, rappresentate in questo studio da  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato e  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato.

In ragione del carattere innovativo della metodica sono stati messi a punto i principali aspetti legati alla formulazione dei substrati metabolici iperpolarizzati per l'uso in vivo e sono stati sviluppati modelli di analisi dei segnali per la comparazione di parametri efficaci di conversione enzimatica in vivo.

Il  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato è stato utilizzato come sonda metabolica del metabolismo ossidativo, mentre  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato è stato selezionato come substrato del metabolismo degli acidi grassi del muscolo cardiaco.

# Materiali e Metodi

## 2.1 Il sistema di dissoluzione-DNP Hypersense<sup>®</sup>

Nell'ambito di questo lavoro di Tesi, è stato impiegato un sistema di dissoluzione-DNP commerciale (*Hypersense<sup>®</sup>*, Oxford Instruments, UK). Concettualmente il sistema è composto da due parti principali -il polarizzatore DNP, operante allo stato solido e bassissima temperatura ( $\approx 1.4\text{K}$ ) - il sistema di dissoluzione per ottenere agenti iperpolarizzati in soluzione

La polarizzazione dinamica nucleare del campione avviene nello stato solido, a 3.35 T e 1.4 K, all'interno del polarizzatore costituito da un magnete superconduttore operante 3.35 T immerso in un criostato He/N<sub>2</sub> liquidi. La camera di irraggiamento è realizzata all'interno della zona di omogeneità del magnete e monta una guida d'onda coassiale (MW) ed una bobina a radiofrequenza per la misura della polarizzazione del campione. Le bobine sono sintonizzate alla frequenza <sup>13</sup>C NMR di 35.89 MHz. Il circuito di dissoluzione è stato progettato per sciogliere rapidamente il campione da circa 1K allo stato liquido, preservando la sua polarizzazione: la dissoluzione si realizza iniettando un fluido surriscaldato ad alta pressione (tipicamente 10 bar/180°C) mediante una bacchetta di iniezione che aggancia la capsula del campione (fig.2.1)

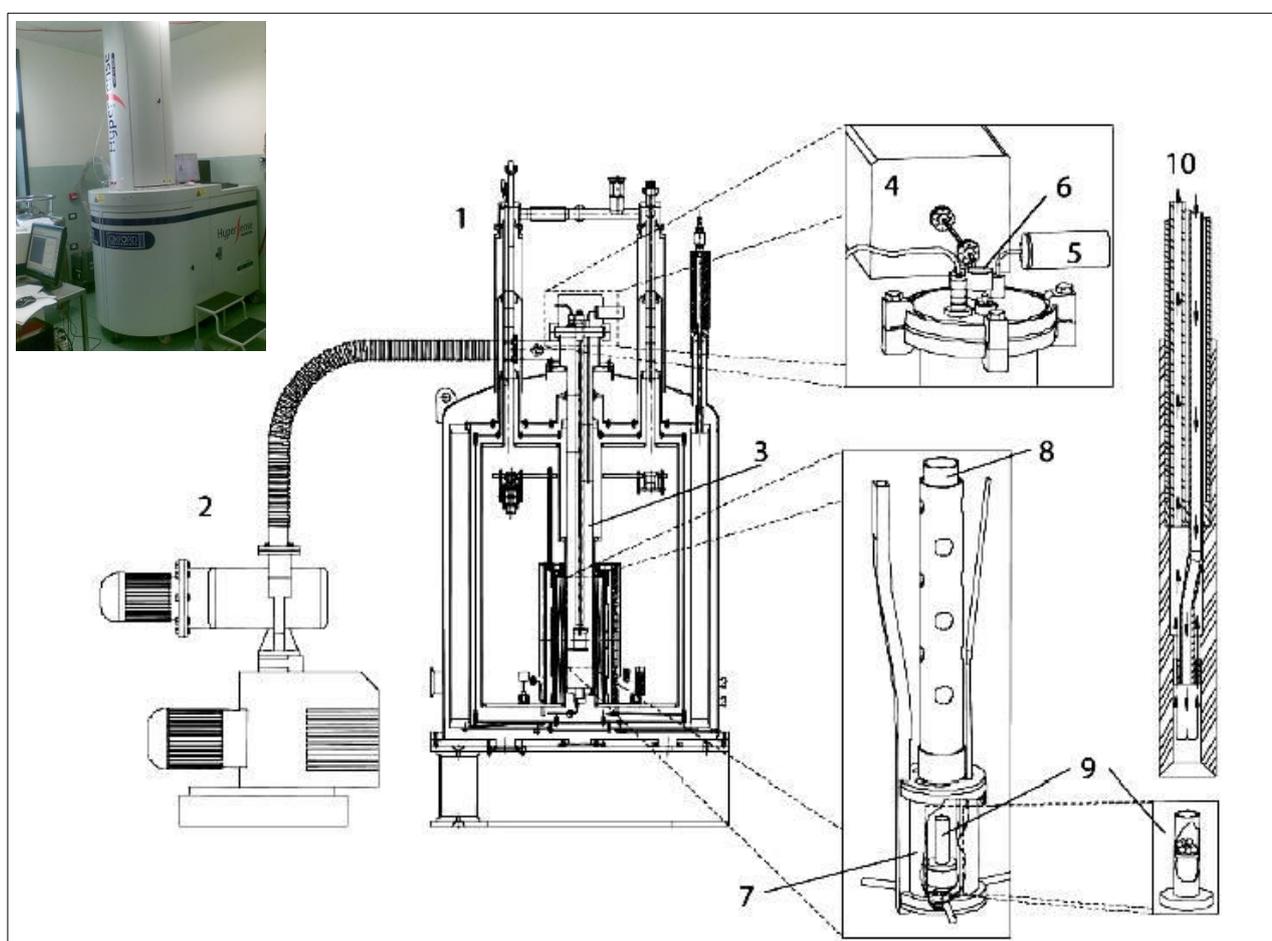


Figura 2.1: Sistema commercial per dissoluzione-DNP (*Hypersense<sup>®</sup>* Oxford Instrument, UK) installato presso FTGM, (Pisa); (b) Rappresentazione schematica del sistema per dissoluzione-DNP *Hypersense<sup>®</sup>*: 1) Polarizzatore DNP; 2. Pompa a vuoto; 3. Inserto a temperature variabile; 4. Sorgente a microonde (MW); 5. Trasduttore di pressione; 6. Ingresso del campione; 7. Cavità risonante a microonde; 8. Sample holder; 9. Sample container; 10. Bacchetta di dissoluzione[9].

Il sistema *Hypersense* è commercializzato per esperimenti con campioni dell'ordine di pochi mg, fino a circa 50 $\mu\text{L}$  di volume caricato. Per gli esperimenti condotti in questo studio sono state apportate delle modifiche al sistema al fine di garantire un incremento del volume/dose di circa 20 volte.

Sono state impiegate delle capsule di caricamento di 800µL di capacità, che per la prima volta hanno consentito di iperpolarizzare la dose necessaria per l'animale di grossa taglia (maiale da esperimento 35±3 Kg). [33,44]. Conseguentemente è stato sostituito il sistema di aggancio della capsula ed i valori di regolazione di pressione/temperatura di dissoluzione.

#### **Messa a punto della formulazione e dissoluzione DNP per il [1-<sup>13</sup>C] piruvato:**

E' stata sviluppata una procedura a 3 passaggi per la polarizzazione e dissoluzione di grandi volumi di [1-<sup>13</sup>C] piruvato [33] e [1-<sup>13</sup>C] acetato [44], applicata negli esperimenti modelli animali di grandi dimensioni:

1. Iperpolarizzazione stato solido: il campione (da 400 fino a 800 µl) è iperpolarizzato a  $\approx 1,4$  K/2.8 mbar/a 3,35 T con irraggiamento alla frequenza di risonanza dell'elettrone compresa tra 94,120-94,150 GHz. Il tempo tipico di iperpolarizzazione che varia a seconda della formulazione del campione ed è di circa 40'-1 ora.
2. Rapida dissoluzione: alla fine del processo DNP a stato solido, il campione disciolto in un volume di circa 10 ml di soluzione acquosa contenente alcuni agenti stabilizzanti a 180°C/10 bar.
3. Neutralizzazione e la formulazione finale: in un circuito esterno al sistema viene raccolto il campione disciolto ed addizionato per garantire pH ed osmolarità nel range fisiologico (10-12 ml di soluzione tampone a 4-8°C): il volume finale è di circa 21 ml per il controllo di qualità e lo studio in vivo/in vitro.

L'intervallo richiesto per l'intero processo di dissoluzione è inferiore ai 18±3s.

La formulazione ottimale per la dissoluzione-DNP di dosi idonee all'impiego nel maiale del [1-<sup>13</sup>C] piruvato è di seguito specificata:

- 380-440 mg, corrispondenti a 300-350µl, di una miscela contenente [1-<sup>13</sup>C] acido piruvico (PA), 15 mM OX063, 1 mM di Gd<sup>3+</sup>-chelato (tipo Dotarem®, Guebert).

Alla fine della polarizzazione a stato solido, la miscela contenente [1-<sup>13</sup>C] PA è stata sciolta con 10 ml di 0,27 Na<sub>2</sub>EDTA mM con acqua ultrapura (Milli-Q, Millipore). Nella fase finale 12 mL di una soluzione contenente NaOH 40 mM e 200 mM Trizma ((idrossimetil-aminometano TRIS, Fluka) a 4°C riporta la soluzione nel range fisiologico ed pH/temperatura controllati. La soluzione iniettabile ha un contenuto finale di:

- 230 mM [1-<sup>13</sup>C] piruvato, 109 mM tampone Tris, 0,12 Na<sub>2</sub>EDTA mM e 16 nM Gd<sup>3+</sup>-chelato [35].

#### **Messa a punto della formulazione di [1-<sup>13</sup>C] acetato:**

Analogamente, sono stati messi a punto i parametri ottimali per la formulazione di [1-<sup>13</sup>C] acetato: la formulazione dell'acetato si basa sulla dissoluzione di Na [1-<sup>13</sup>C]acetato (Cambridge Isotope Laboratories Inc.) con radicale trityl (OX063, Oxford Instr. Ltd) e Gd<sup>3+</sup>-chelato (Dotarem®, Guebert) in una soluzione 60:40 v:v: di una miscela costituita da acqua ultrapura (MQ)/ glicerolo [44].

Si tratta della formulazione che consente di ottenere la massima concentrazione di acetato e la massima stabilità della soluzione: l'omogeneità della miscela è stata ottenuta fondendo il campione a 60° C per circa 25 min mediante bagno a ultrasuoni. La formulazione finale [1<sup>3</sup>C-acetato] ha la seguente composizione:

- 7,3 M [1-<sup>13</sup>C]acetato, 25 mM tritile (OX063), 1.4 mM di Gd<sup>3+</sup>-chelato (Dotarem®, Guebert).

La dissoluzione del Na [1-<sup>13</sup>C] acetato è stata effettuata utilizzando 5 ml di tampone Tris pH=7.6/4°C per la dose piccola (fino a 60µl) e 21 ml per la dose grande (400-600 µl).

E' stata testata anche una formulazione basata sull'impiego di un altro controione, Tris [1-<sup>13</sup>C]acetato, ottenuta aggiungendo 1 g di [1-<sup>13</sup>C] acido acetico (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) una soluzione 0,54 M di Tris-base (Sigma- Aldrich) fino ad un pH 7,4-7,8. La soluzione ottenuta è stata liofilizzata liofilizzato overnight per ottenere il sale Tris [1-<sup>13</sup>C]acetato solido. Il campione DNP è stata preparata miscelando Tris [1-<sup>13</sup>C] acetato, tritile (OX063) (181 mol / g soluzione), e 50 Gd<sup>3+</sup> -chelato (Dotarem®, Guebert) in una soluzione 65/35 v: v di acqua (mQ) / glicerolo. La miscela è stata sonicata a 60° C per 10 min fino a completa dissoluzione. I valori di concentrazione finali erano [<sup>13</sup>C-acetato] sono:

- 4,7 M [1-<sup>13</sup>C]acetato, , 15 mM tritile (OX063), 0.93 mM di Gd<sup>3+</sup> -chelato (Dotarem®, Guebert).

La dissoluzione del Tris [1-<sup>13</sup>C] acetato iperpolarizzato non differisce dalla procedura descritta per Na [1-<sup>13</sup>C] acetato.

## 2.2 Misura della percentuale di polarizzazione allo stato solido e liquido

La misura del valore di *build up* e del rilassamento longitudinale T<sub>1</sub> del <sup>13</sup>C allo stato solido è si condotta impiegando lo spettrometro istallato sull'*Hypersense*, attraverso una sequenza di impulsi RF con flip angle (FA) basso e TR sufficientemente lungo (tipicamente FA= 5° , TR di 300 s sono utilizzati per le misure a stato solido). Il T<sub>1</sub> è ottenuto mediante un fitting mono-esponenziale delle curve di decrescita del segnale corrette per i parametri di acquisizione [101].

Mentre la polarizzazione (% LSP) e tempo di rilassamento longitudinale T<sub>1</sub> allo stato liquido sono stati stimati a mediante un polarimetro a 1,05 T e 40 ° C, (Minispec MQ, Bruker BioSpin GmbH, Germania).

Il segnale spettroscopico del composto iperpolarizzato allo stato liquido viene acquisito nel tempo (200s) utilizzando una sequenza tipo *pulse-and-acquire* standard come descritto in precedenza, con FA=5s , TR = 5 s, tempo totale di acquisizione tempo di 200 s, guadagno del ricevitore 40 dB.

Si procede quindi acquisendo il segnale termico del campione utilizzando una sequenza modificata tipo *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG): tempo di Echo = 2 ms, il numero di echi = 600, tempo di ripetizione, = 180 s, il numero di scansioni = 20, ricevitore guadagno = 94 dB. La polarizzazione allo stato liquido, % POL, si calcola come rapporto del segnale iperpolarizzato sul segnale termico del composto, in base alla seguente equazione:

$$11. \quad \%POL = \frac{P_0 \cdot f \cdot hyp}{TH - BK} \cdot 100$$

*hyp* è il segnale iperpolarizzato mentre *TH* sta per il segnale termico e *BK* il segnale di sfondo misurato. P<sub>0</sub> è il valore della polarizzazione di Boltzmann teorica, calcolata utilizzando i parametri sperimentali B<sub>0</sub> = 1.05 T e T = 313,15 K. Il fattore *f* corregge il flip angle (FA) e il guadagno del ricevitore (dB).

## 2.3 Impiego di scanner clinici a 3T per studi di spettroscopia localizzata ed imaging: uso di sequenze di impulso e bobine RF dedicate per l'acquisizione del segnale spettroscopico del <sup>13</sup>C-iperpolarizzato

Le bobine RF impiegati negli esperimenti con <sup>13</sup>C iperpolarizzato sono state progettate appositamente per gli studi sull'animale di piccola taglia (*rat coil*) ed sul maiali (*pig coil*) da Rapid biomedical (Wurzberg, Germania). La bobina <sup>13</sup>C per il maiale di tipo *birdcage* è una cosiddetta bobina volume in quadratura: questa tipologia di bobine fornisce una migliore omogeneità del segnale all'interno della bobina (fig.2.2).

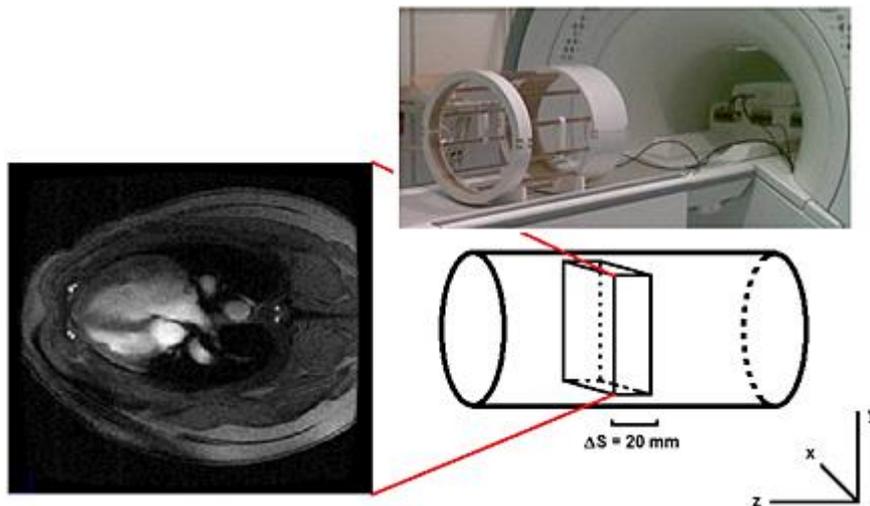


Figura 2.2: Immagine del tomografo MRI a 3T e della Bobina  $^{13}\text{C}$  di tipo birdcage impiegata per gli studi di spettroscopia localizzata ed imaging CSI. E' riportato a scopo esemplificativo il volume anatomico cardiaco nel maiale da esperimento in genere selezionato negli studi spettroscopici. Lato sinistro: Immagine SSFP assiale cardiaco-dipendenti (campo di vista, 35 cm, flip angle  $45^\circ$  eco / tempi di ripetizione, 1.71/3.849 ms). Lato destro:  $^{13}\text{C}$ -quadratura bobina birdcage e lo schema semplificato della fetta acquisizione posizionato attraverso il torace dell'animale (spessore fetta assiale di 20 mm). Le dimensioni interne della bobina sono: raggio = 18,2 cm, lunghezza = 36 cm n° di elementi= 12. [70]

Le sequenze di acquisizione per la spettroscopia ed imaging del  $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzato non sono commerciali: nell'ambito di un rapporto di collaborazione scientifica con *GE Healthcare Global Research Center* di Monaco di Baviera, sono state messe a punto ed ottimizzate diverse di sequenze RF.

In particolare sono state testate due tipologie sequenze: a) per la rilevazione dell'evoluzione nel temporale del segnale spettroscopico in un volume (per cui è stata selezionato un piano di immagine definito); b) per la mappatura della distribuzione del segnale spettroscopico in un distretto anatomico (con e senza codifica temporale). Nell'ambito dello studio sono stati ottimizzati i parametri delle sequenze per la spettroscopia ed l'imaging cardiaco nel modello di maiale da esperimento.

Le immagini protoniche di riferimento sono stati acquisite mediante sequenze commerciali con trigger respiratorio tipo SSFP (FOV =  $\text{cm}^2$  35x35, flip angle FA=  $45^\circ$ , TE / TR = 1.71ms/3.849 ms), o di tipo 2D TOF FSPGR sequenza (FOV =  $30 \times 30 \text{ cm}^2$ , TE / TR = 2.7ms/16ms, matrice 288x192).

La rilevazione dell'andamento temporale del segnale iperpolarizzato in una *fetta* ricavata da un piano di immagine selezionato, è stata effettuata mediante una sequenza di impulsi-ed-acquisizione selettiva (tipo *pulse-and-acquire*) che fornisce un'elevata risoluzione temporale senza alcuna codifica spaziale. Tipicamente negli esperimenti per lo studio del metabolismo cardiaco nel maiale, è stata selezionata una *fetta* assiale di 20 cm per  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato e 40 cm per  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato nel volume cardiaco del maiale ed il segnale spettroscopico è stato acquisito con una frequenza di 2s, per un tempo di acquisizione totale di 120 s, con un impulso di eccitazione di tipo *soft pulse* con un basso flip angle (FA=  $5^\circ$  o  $10^\circ$ ) ed una larghezza di banda impulso = 2200 Hz (corrispondete ad un numero di punti = 2048, banda del ricevitore = 5000 Hz). La frequenza centrale dell'impulso è stata impostata sulla base della frequenza di risonanza del  $^{13}\text{C}$  tipica dei composti studiati,  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato o  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato. L'acquisizione dei dati spettroscopici fornisce una curva metabolica di conversione e formazione dei prodotti metabolici.

Gli studi di imaging (CSI) riportati in questa tesi sperimentale sono stati condotti impiegando una sequenza di tipo spirale denominata CSI 3D-IDEAL [102]. In questo modo è stato possibile rilevare la spaziale distribuzione del segnale spettroscopico iperpolarizzato  $^{13}\text{C}$  nei tessuti in vivo, ed in particolare mappare la conversione cardiaca dei substrati iperpolarizzati. La sequenza 3D CSI IDEAL fornisce uno strumento relativamente veloce e robusto per l'acquisizione del segnale spettroscopico in vivo: per l'imaging del

volume cardiaco del maiale è stata è stato impiegato campo di vista (FOV) di 30x30 cm<sup>2</sup> e uno spessore della fetta di 100 mm, e sono stati prescritti 11 tempi di eco, ed uno *shift* relativo tra i tempi di eco di 0,9 ms con un flip angle FA=7°. La risoluzione spaziale è di 15 mm, l'acquisizione totale richiede 17 s.

## 2.4 Elaborazione dei segnali spettroscopici

Per l'elaborazione dei segnali spettroscopici sono stati impiegati alcuni *tool* di elaborazione disponibili alla comunità scientifica e molto diffusi per l'analisi di segnali NMR, *id est* jMRUI 3.0, e sono stati sviluppati alcuni codici di elaborazione in ambiente *Matlab* (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA). Il software jMRUI 3.0, è recentemente diventato uno strumento standard per l'analisi dei segnali spettroscopici nella ricerca clinica e sperimentale [102]. In particolare, per questo studio è stato impiegata l'analisi mediante metodo *Amares*<sup>8</sup>, per lo studio del segnale spettroscopiche e dinamico <sup>13</sup>C iperpolarizzato. Il metodo *Amares* permette l'introduzione di alcuni parametri (definite *control variables*, definite dall'operatore sulla base dei sistemi impiegati per la misura e le condizioni di acquisizione, tipo di impulso, la forma e la larghezza della linea spettrale e la frequenza di picco del composto selezionato), al fine di stimare correttamente le diverse componenti spettrali [103]. I parametri impostati in *jMRUI / Amares* per le molecole iperpolarizzati sono [44, 70]:

- [<sup>1-13</sup>C] piruvato: forma di linea gaussiana, spessore della linea = 0,0-20,0 Hz, [<sup>1-13</sup>C]: frequenza piruvato = 0.0 Hz, lattato = 390 Hz, alanina = 179 Hz, bicarbonato = -320 Hz.
- [<sup>1-13</sup>C] acetato: forma di linea gaussiana, spessore della linea = 0,0-20,0 Hz, [<sup>1-13</sup>C]: frequenza acetato = 0.0 Hz, acetil-carnitina = 276 Hz.

L'approccio basato sull'analisi mediante *jMRUI / Amares* è stato confrontato con un approccio alternativo di analisi spettrale, chiamato *LSFIT (Linear Least-Square Fitting)* [35], implementato in ambiente *Matlab* e sviluppato in questo progetto nell'ambito della collaborazione con il *GRC di GE Healthcare* di Monaco. In sintesi, in base all'approccio *LSFIT* [104,105] i FID<sup>9</sup> del segnale spettroscopico  $S(tn)$  sono espressi in una forma discretizzata come somma sui segnali singole ampiezze del metabolita ( $a_m$ ):

11.

$$S(tn) = \sum_m a_m CS_{mn} LS_{mn}$$

Dove **CS** è la matrice *chemical shift* e **LS** è la matrice linea-forma, secondo:

12.

$$CS_{mn} = e^{-i\omega_m t}$$

Con  $rm = 1$  per una forma della linea spettrale di tipo Lorentziano, e  $rm = 2$  Gaussiano.

<sup>8</sup> *Amares* è stato implementato in *JMRUI* [102, 103] ed è un metodo interattivo avanzato per la stima dei parametri di segnali MRS, che opera sulla base di un fitting lineare dei minimi quadrati nel dominio del tempo.

<sup>9</sup> La curva di decadimento del segnale (*Free Induction Decay*) è generata dal rilassamento degli spin: il FID si riferisce alla componente di magnetizzazione degli spin sul piano trasversale XY, che decade verso lo zero con un tempo  $T_2$  caratteristico (o  $T_2^*$ ). I picchi delle echi di segnale cadono su questa curva di decadimento  $T_2$ , mentre ad ogni tempo di eco il picco del segnale inizia si degrada secondo il  $T_2^*$  caratteristico. La trasformata di Fourier del FID genera uno spettro di frequenza del segnale NMR.

I risultati ottenuti con i due approcci per l'analisi spettrale sono stati confrontati utilizzando un parametro rappresentativo detto errore residuo normalizzato ( $E_{res}$ ) definito come:

13.

$$E_{res} = \frac{\bar{R}}{M_{pyr}}$$

$$R = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{n-1} |S_{ti} - \hat{S}_{ti}|$$

dove  $M_{pyr}$  è il valore massimo del picco di ampiezza piruvato sull'intervallo di acquisizione complessiva e  $R$  è la media de residuo  $R$  calcolata per ogni FID (con  $N$  è il numero di punti spettrali).

## 2.5 Analisi della dinamica dei segnali spettroscopici del $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzato: uso di modelli cinetici per l'analisi della conversione metabolica in vivo

Per lo studio dinamico dei segnali spettroscopici e la stima semi-quantitativa delle costanti cinetiche di conversione dei substrati iperpolarizzati sono stati risolti i sistemi di equazioni differenziali in modo analitico o mediante un approccio numerico, impiegando i codici di calcolo che sono stati sviluppati in ambiente *Matlab*.

E' stato impiegato un modello a due compartimenti [65] o *modello di scambio di due-siti* [52], riferito alla conversione metabolica di  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato in  $[1-^{13}\text{C}]$ - lattato, - alanina e - bicarbonato iperpolarizzati nel tessuto miocardico [106,107]. La soluzione analitica, prevede la soluzione di un sistema di equazioni differenziali, come riportato:

14.

$$\begin{cases} \frac{dM_z^P}{dt} = -\frac{1}{T_{1,P\,eff}} M_z^P - k M_z^P + h(t-t_0)^{\alpha-1} e^{-b(t-t_0)} \left( \frac{1}{t-t_0} - b \right) \\ \frac{dM_z^x}{dt} = -\frac{1}{T_{1,P\,eff}} M_z^x + k_{Px} M_z^P \end{cases}$$

dove  $M_z$  indica l'intensità del segnale (magnetizzazione lungo l'asse z), la lettera x corrisponde a lattato (L), alanina (A) o bicarbonato (B), ottenuti da piruvato (P).

La velocità di conversione metabolica è governata dalle costanti di velocità *apparenti*  $k_{Px}$ ; analogamente sono stati impiegati tempi di rilassamento *efficaci*  $T_{1x,eff}$ , per cui è stato considerato sia il decadimento  $T_1$  e che l'effetto delle eccitazione RF sulla magnetizzazione. In questo modello la reazione inversa di conversine non è stata presa in considerazione. Nel modello analitico è stata anche inclusa come funzione di ingresso, che in questo caso descrive l'arrivo dell'agente iperpolarizzato e dipende dal tempo di iniezione e dal flusso arterioso, assumendo un andamento caratteristico che può essere modellizzato Impiegando una funzione  $\gamma$ -variata [88, 108]:

15

$$I(t) = h(t - t_0)^\alpha e^{-b(t-t_0)}$$

dove  $h$  è l'ampiezza,  $t_0$  è il tempo di arrivo del bolo,  $\alpha$  è l'asimmetria della forma e funzione  $b$  la scala tempo.

Questo approccio analitico è stato quindi confrontato con un modello di fitting numerico chiamato KIMO t (*Kinetic MOdel fitting*) [70]. KIMO è implementato in *Matlab* e rappresenta l'estensione del metodo LSFIT per l'analisi spettrale per la stima delle costanti cinetiche apparenti [35]: KIMO t e LSFIT sono quindi stati integrati nello stesso ambiente. In KIMO il sistema di equazioni differenziali è stato approssimato stimando in modo numerico il valore differenziale dei segnali:

16.

$$\frac{\Delta M_{x,n}}{\Delta t_n} = -\frac{1}{T_{1,x\,eff}} M_{x,n} + k_{P_x} M_{P,n}$$

Dove  $P$  è piruvato e  $x = L, A$  e  $B$  rappresentano alanina e bicarbonato ed  $n$  è l'indice di misura,  $\Delta t_n$  corrispondente al passo temporale [35].

L'andamento dinamico del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato è stato condotto mediante un fitting mono-esponenziale della funzione  $\gamma$ -variata, ed è stato applicato un metodo basato sulla stima di area totale sotto la curva (AUC) [43, 66]. In riferimento a quanto già pubblicato per la conversione di  $[1-^{13}\text{C}]$ - piruvato ( $P$ ) in lattato ( $L$ ), il rapporto AUC è proporzionale alla costante di velocità apparente: applicando lo stesso approccio è stato quindi analizzato il segnale dinamico di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e del prodotto di conversione  $[1-^{13}\text{C}]$ acetilcarnitina (AcCar) ed è stato calcolato, il rapporto della AUC. Con opportune semplificazioni [46, 83] si ottiene:

17.

$$\frac{AUC_L}{AUC_P} = \frac{k_{PL}}{r_{1L,eff} + k_{LP}}$$

dove  $L$  e  $P$  rappresentano lattato e piruvato, e  $k_{PL}$  è la reazione diretta di conversione,  $k_{LP}$  la reazione inversa,  $r_{1L}$  è il rilassamento lattato ( $= 1/T_1$ ) per un modello di scambio di due siti.

Applicando un modello a due compartimenti che non discernere tra il segnale intra ed extra-cellulare e trascurando la reazione all'indietro, si ottiene:

18.

$$\frac{AUC_{AcCar}}{AUC_{Acetato}} = \frac{k_{Acetato \rightarrow AcCar}}{r_{1,AcCar\,eff}}$$

Per cui possono essere stimati i valori della costante apparente di conversione ( $k$ ) *Acetato*->*Acetilcarnitina* ed il valore efficace della rilassività (espressa come  $r_1=1/T_1$ ) dell'aceti-carnitina in vivo [44].

## 2.6 Valutazione regionale del metabolismo mediante imaging spettroscopico: analisi delle mappe polari dei settori cardiaci

E' stata valutata la distribuzione spaziale regionale cardiaca del segnale del piruvato iperpolarizzato e dei suoi metaboliti. La ricostruzione dei dati spettroscopici è stata effettuata utilizzando una tecnica di

inversione di matrice del chemical shift seguita da una tecnica di ricostruzione *Gridding* implementata in Matlab [35]. Questo approccio ha permesso di ottenere mappe di distribuzione spaziale che sono state successivamente riorientate secondo gli assi cardiaci, utilizzando una proiezione in asse corto (SA) e successivamente sovrapposti alle immagini anatomiche protoniche. La fusione delle immagini  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  è stata fatta utilizzando il software PMOD (PMOD Technologies Ltd. Zurigo, Svizzera). E' stato studiato un modello di ischemia transitoria e riperfusione, e sono state fornite delle mappe di distribuzione impiegando la rappresentazione nota come "occhio di bue", un metodo impiegato per l'analisi quantitativa segmentale in cardiologia [109].

Le mappe polari del cuore sono state prodotte impiegando un software sviluppato appositamente (HIPPOC13) in ambiente IDL 8.0 (ITT Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA): le fette ottenute dalle proiezioni cardiache in asse corto sono state classificate come basale, medio o apicale e il miocardio è stato diviso in sei sezioni (basali e medie) o quattro segmenti equiangoli (fette apicali). Le corrispondenti mappe polari sono stati estratti dalle mappe metaboliche ed i valori dei segnali sono stati mediati per ognuno dei 16 segmenti equi-angolari ottenuti (seguendo la classificazione della *American Heart Association*) [110]. L'analisi semi/quantitativa della distribuzione segmentale dei metaboliti è stata effettuata prendendo in considerazione la zona a rischio (che corrisponde in questo caso alla zona ischemica) della parete del ventricolo sinistro (LV); il segnale globale del  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato è stato successivamente calcolato facendo la media del segnale nella regione miocardica tra tutte le sezioni in asse corto che coprono il ventricolo sinistro.

Nell'ambito di questo studio è stato definito un indice di variazione del segnale segmentale cardiaco come:

19.

$$\Delta S_i = 100 \cdot (S_i - S_g) / S_g$$

dove  $S_i$  ( $i = 1, \dots, 16$ ) è il segnale relativo metabolita nel segmento  $i$  e  $S_g$  è il segnale metabolita relativa media sull'intera LV [111]. Al fine di valutare la differenze tra differenti condizioni metaboliche e/o dopo uno stimolo (ad esempio basale, occlusione, riperfusione), il parametro di *Mismatch* dell'Attività Metabolica tra due mappe variazione segmentale può essere definito come:

20.

$$MAM = \frac{100 \cdot (S_{ai} - S_{bi}) / (S_{ai} + S_{bi})}{2}$$

dove  $S_{ai}$  e  $S_{bi}$  sono i valori relativi del segnale del metabolita in condizione di a e b nel segmento [111].

## 2.7 Protocolli sperimentali per la valutazione del metabolismo cardiaco mediante agenti iperpolarizzati nel maiale da esperimento

Gli studi in vivo sono stati condotti utilizzando maiali di allevamento maschi ( $35 \pm 3\text{kg}$ ). Prima dello studio di spettroscopia con  $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzato, gli animali sono mantenuti a digiuno e sono quindi sedati con un cocktail di tiletamina cloridrato e zolazepam cloridrato ( $8 \text{ mg/kg im}$ ) e pre-medicato con atropina solfato ( $0,1 \text{ mg / kg}$ ) [65]. Per la somministrazione dell'agente iperpolarizzato viene inserito un catetere in polietilene nella vena marginale dell'orecchio. Durante gli esperimenti, gli animali sono sedati con infusione continua di propofol 1% ( $1$  o  $2 \text{ mg/kg/h}$ ) e lasciato in respiro spontaneo. Gli agenti iperpolarizzati sono iniettati manualmente nella vena dell'orecchio in bolo ad una velocità di circa  $2\text{ml/s}$ . Durante lo studio viene registrata e monitorata la frequenza cardiaca, ritmo e pressione arteriosa media, utilizzando un sistema compatibile per risonanza magnetica. I protocolli sperimentali sono stati preliminarmente approvati dal Comitato competente del Ministero della Salute in applicazione della legge *DL-116, 27 gennaio, 1992*), ed in conformità con la *Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio*.



# Risultati e Discussione

### 3.1 Ottimizzazione del processo DNP per l'iniezione di agenti iperpolarizzati nel maiale da esperimento per la valutazione del metabolismo miocardico

E' stato standardizzato e caratterizzato [33] l'impiego di dosi comprese tra 350 - 650  $\mu\text{l}$  di miscela contenente i substrati isotopicamente arricchiti allo stato solido (definita come *large dose* rispetto alla dose tipicamente impiegata nell'animale di piccola taglia, *small dose*), e di grandi volumi di dissoluzione. Come riportato in [33] sono stati anche caratterizzati i parametri ottimali di irraggiamento a microonde (MW) per questa tipologia di campioni, ricavando il parametro ottimale di MW=100 mW di potenza di irradiazione.

Per il  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato è riportato di seguito confronto tra i parametri caratteristici di iperpolarizzazione a stato- -solido e liquido e le prestazioni DNP, confrontando i parametri della costante di *build up*, il valore *normalizzato plateau*, il tempo di rilassamento T1 e la percentuale di polarizzazione allo stato liquido (fig. 3.1) [33]. Risultati analoghi sono in corso di pubblicazione per la formulazione contenete  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato [47], analizzando anche la variazione delle prestazioni di polarizzazione allo stato solido e liquido anche in termini di concentrazione di radicale tritile [OX63].

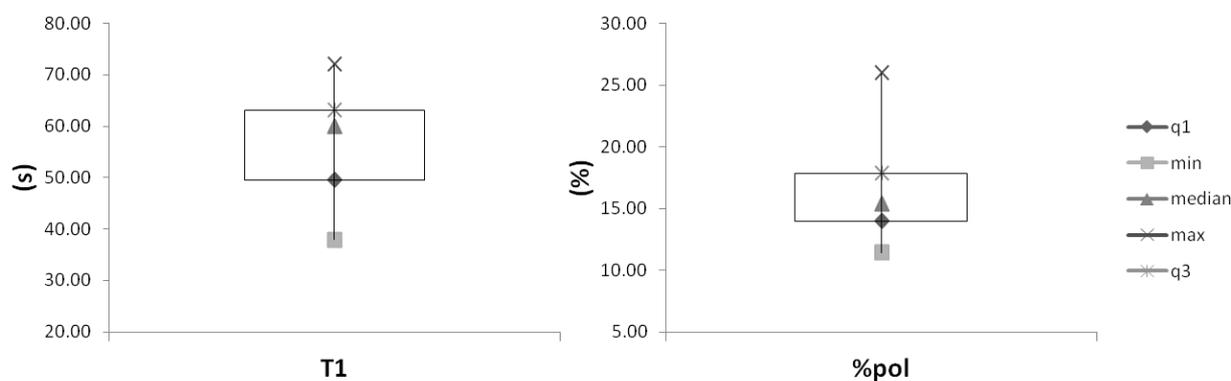


Figura 3.1: valori tipici di rilassamento T1 e di % di polarizzazione (P) allo stato liquido della formulazione messa a punto per lo studio nel maiale (*large dose*) di  $[1-^{13}\text{C}]$ acido piruvico dopo dissoluzione; Q1 e Q3 si riferiscono al primo e terzo quartile del set di dati (n=16) [33].

### 3.2 Studio dell'andamento dinamico dei segnali di conversione metabolica e valutazione dell'effetto inotropo sul metabolismo cardiaco mediante $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato iperpolarizzato

La prima valutazione di fattibilità a 3 T della modulazione enzimatica dopo iniezione di  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato nel maiale è stato pubblicato in [70]: in questo primo lavoro sono confrontati i risultati di due differenti approcci di analisi dei dati spettroscopici dinamici durante stress inotropo, indotto mediante iniezione di dobutamina (20 mg/kg/min per 5 minuti) rispetto al metabolismo basale cardiaco. Come riportato nella sezione *materiali e metodi* gli approcci proposti si basano sull'analisi dei dati mediante il metodo *Amares* implementato nella piattaforma jMRUI ed sul metodo numerico chiamato *LSFIT + KIMOfit*, sviluppato nell'ambiente Matlab. Lo studio è stato condotto nel maiale a digiuno, mantenendo l'animale sotto costante infusione di glucosio (ad una concentrazione plasmatica di glucosio di 120 mg / dl) per la durata dell'esperimento. Sono stati acquisiti singoli FID ogni 2 secondi in una fetta di 20 mm di spessore opportunamente posizionata nel volume cardiaco, selezionata mediante le corrispondenti immagini protoniche. Sono stati iniettati 0,13 mmol / Kg di  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato iperpolarizzato a riposo (basale) e durante l'infusione di dobutamina. Attraverso questo approccio è stato possibile definire un andamento tipico delle

curve metaboliche in vivo dei segnali cardiaci di  $[1-^{13}\text{C}]$ : piruvato (0 ppm), lattato (12,6 ppm), alanina (5,9 ppm), bicarbonato (-9,7 ppm) e piruvato idrato (forma idrato di piruvato, 8,4 ppm) (fig3.2).

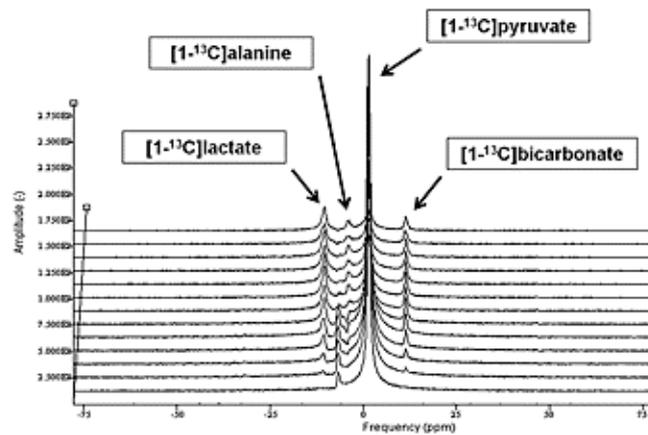


Figura 3.2: Tipico andamento degli spettri dinamici in vivo dopo iniezione di  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato iperpolarizzato in un maiale digiuno sotto costante infusione di glucosio (concentrazione plasmatica di riferimento glucosio 120 mg / dl); acquisizione di singoli FID in una fetta disposta secondo un piano assiale corrispondente ad uno (pseudo)asse corto cardiaco ( $FA = 10^\circ$ , tempo di ripetizione, 2 s, 20 millimetri di spessore fetta assiale) [70].

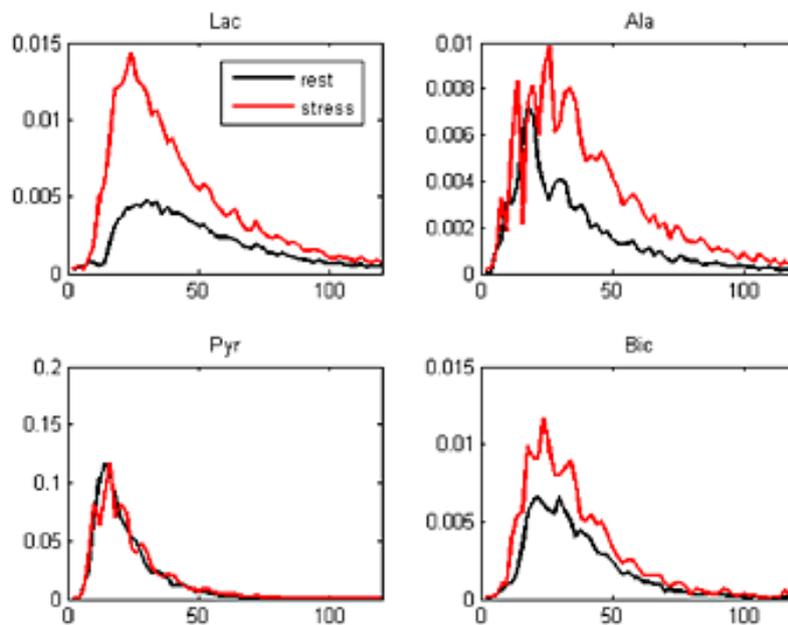


Figura 3.3: Andamenti temporale del segnale del spettroscopico per i vari metaboliti dopo iniezione di piruvato iperpolarizzato  $[1-^{13}\text{C}]$  a) in un maiale digiuno sotto costante infusione di glucosio (concentrazione plasmatica di riferimento glucosio 120 mg / dl) in condizioni basali (prima iniezione, basale) e durante lo stress inotropo (seconda iniezione, stress), ottenuto dalla misure di spettroscopia localizzata ( $FA = 10^\circ$ , il tempo di ripetizione = 2 s, 20 millimetri di spessore fetta assiale). Lac,  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato; Ala,  $[1-^{13}\text{C}]$  alanina; Pyr,  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato; Bic,  $[1-^{13}\text{C}]$  bicarbonato [70].

Sono caratterizzati i tempi di salita (*rise time*,  $RT$ , definiti come il tempo dall'arrivo al picco della curva metabolica):  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato  $RT= 12-16$  s, mentre per  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato e  $[1-^{13}\text{C}]$  alanina le intensità massime corrispondono a  $RT=12-20$  s e per  $[^{13}\text{C}]$  bicarbonato  $RT=8-16$  dopo il massimo del piruvato. Il massimo del

segnale spettroscopico del [1-<sup>13</sup>C] piruvato iniettato era tipicamente un ordine di grandezza superiore rispetto ai picchi di metaboliti. L'alterazione del segnale spettroscopico in condizione di stress rispetto alla condizione basale è stata valutata confrontando i valori delle costanti cinetiche efficaci di conversione ( $k_{Px, eff}$ ) e della forma delle curve dinamiche.

Durante lo stress inotropo, si registra rapido incremento del segnale di [1-<sup>13</sup>C] lattato e [1-<sup>13</sup>C] bicarbonato, diversamente dal segnale della [1-<sup>13</sup>C] alanina che è incrementato ma ritardato rispetto alla condizione basale. (fig.3.3-3.4)

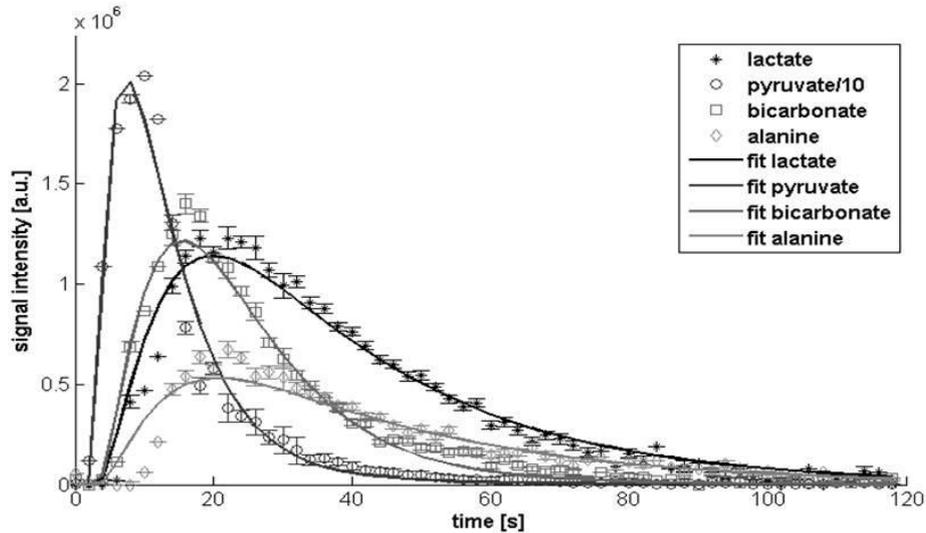


Figura 3.4: Risultato del modello di fitting dei segnali dinamici spettroscopici utilizzando jMRUI / Amares implementando la funzione  $\gamma$ -variata; iniezione di [1-<sup>13</sup>C] piruvato e spettroscopia selettiva come riportato [70].

Al fine di evidenziare l'effetto indotto dallo *stress* inotropo è stato calcolato il rapporto tra le costanti cinetiche di conversione  $k_{Px}$ , ( $X = L, A, B$ , rispettivamente per [1-<sup>13</sup>C]-lattato, -alanina e -bicarbonato) ( $n = 3$ ), come

20.

$$r_{k_{Px}} = \frac{k_{Px, STRESS}}{k_{Px, REST}}$$

Analogamente è stata valutata la variazione relativa dei tempi di rilassamento  $T_1$  efficaci ( $T_{1x, eff}$ ):

21.

$$r_{T_{1, eff}} = \frac{T_{1, eff, STRESS}}{T_{1, eff, REST}}$$

In condizioni di *stress* inotropo i valori stimati delle costanti di velocità apparente è aumentato per tutti i metaboliti rilevati in vivo, come riportato di seguito (Tab. 3.1):

Method	Lactate		Bicarbonate		Alanine	
AMARES/JMRUI with $\gamma$ -variate	$k_{PL} (s^{-1})$	Basal	$k_{PB} (s^{-1})$	Basal	$k_{PA} (s^{-1})$	Basal
		0.0038 $\pm$ 0.0001		0.0046 $\pm$ 0.0016		0.0016 $\pm$ 0.0007
		Stress		Stress		Stress
LSFIT + KIMOFIT	$k_{PL} (s^{-1})$	Basal	$k_{PB} (s^{-1})$	Basal	$k_{PA} (s^{-1})$	Basal
		0.0052 $\pm$ 0.0007		0.0041 $\pm$ 0.0021		0.0012 $\pm$ 0.0005
		Stress		Stress		Stress
		0.0114 $\pm$ 0.0031		0.0078 $\pm$ 0.0031		0.0033 $\pm$ 0.0011

Tabella 3.1: Valori medi di  $k_{px}$  per [1-13 C]: lattato, alanina e bicarbonato, ottenuto a) con jMRUI / Amares con funzione di ingresso g-variata, b) metodi LSFIT / KIMOfit (n = 3 studi nei suini sani con acquisizioni basale e stress inotropo).

Nonostante la numerosità del campione (n=3), le differenze rilevate sono risultate statisticamente significative nella condizione di stress rispetto al valore basale per [1-<sup>13</sup>C] bicarbonato [1-<sup>13</sup>C] alanina sia ( $p < 0,05$ ), mentre per il [1-<sup>13</sup>C] lattato si registra una tendenza verso la significatività ( $p = 0.067$ ). Analogamente per i tempi di rilassamento efficaci sono stati ottenuti i seguenti risultati (Tab.3.2):

Method	Lactate		Bicarbonate		Alanine	
AMARES/ JMRUI + $\gamma$ - variate	$T_{1L}$ (s)	Basal	$T_{1B}$ (s)	Basal	$T_{1A}$ (s)	Basal
		34.3 $\pm$ 3.2		16.1 $\pm$ 4.5		33.7 $\pm$ 6.4
		Stress		Stress		Stress
LSFIT + KIMOFIT	$T_{1L}$ (s)	Basal	$T_{1B}$ (s)	Basal	$T_{1A}$ (s)	Basal
		36.2 $\pm$ 9.4		23.9 $\pm$ 7.6		39.0 $\pm$ 15.2
		Stress		Stress		Stress
		28.7 $\pm$ 8.8		19.9 $\pm$ 9.3		35.5 $\pm$ 13.1

Tabella 3.2: Valori tipici del  $T_{1x}$  efficace (pannello in alto) Rapporti medi di  $k_{px}$  (pannello in basso) stress vs condizione basale,  $k_{px}$  (stress) /  $k_{px}$  (riposo), stimato per ogni animale con jMRUI / Amares con g-variata e metodi LSFIT / KIMOfit per[1-13C]: lattato, alanina e bicarbonato (n = 3, studi nei suini sani con basale e durante infusione di dobutamina)[111]

Method	$k_{PX} (stress)/k_{PX} (rest)$		
	Lactate	Bicarbonate	Alanine
AMARES/JMRUI + $\gamma$ - variate fitting	2.13 $\pm$ 0.60	1.88 $\pm$ 0.58	3.03 $\pm$ 0.34
LSFIT + KIMOFIT	2.22 $\pm$ 0.49	2.25 $\pm$ 0.41	3.99 $\pm$ 0.89

La variazione relativa del valore delle costanti efficaci  $k_{px}$  è stato correlato con il parametro di variazione frequenza-pressione definito come *Rate Pressure Product* (RPP, mmHg x battiti / min) per determinare il carico di lavoro cardiaco e la risposta emodinamica, calcolati per ogni iniezione:

22.

$$RPP = MAP \cdot HR$$

MAP = pressione arteriosa media (mmHg) e HR = frequenza cardiaca (battiti / min). Il parametro MAP è stato calcolato sulla base dei valori della frequenza (f) cardiaca:

23.

$$MAP = [(2 \cdot f_{DIASTOLICA}) + f_{SISTOLICA}]/3$$

		Mean (n = 3)	SD
Rest	HR (beats/min)	95.5	17.6
	MAP (mmHg)	110.8	29.8
	RPP (mmHg × beats/min)	10077.0	4019.8
Stress (dobutamine)	HR (beats/min)	161.3	39.3
	MAP (mmHg)	114.8	33.4
	RPP (mmHg × beats/min)	18249.7	6491.3
Stress vs rest	Δ% (RPP)	46.0	10.8

Tabell 3.3: Medie della pressione arteriosa media (MAP), la frequenza cardiaca (HR) e tasso di pressione prodotto (RPP) ottenuto per n = 3 studi nel maiale da esperimento, a riposo e durante lo stress inotropo [111].

Come riportato in tabella, si registra un incremento del 46% del parametro RPP dopo l'infusione di dobutamina che conduce al raddoppio del rapporto relativo delle  $k_{px}$  per i prodotti di conversione cardiaci del  $[1-^{13}C]$  piruvato (Tab.3.3).

### 3.3 Studi di imaging CSI cardiaco nel maiale da esperimento: valutazione globale del segnale miocardico mediante somministrazione di $[1-^{13}C]$ piruvato

Gli studi CSI con  $[1-^{13}C]$  piruvato iperpolarizzato sono stati eseguiti mediante la sequenza 3D-IDEAL, come riportato in [33]. In questo lavoro è stata condotta una caratterizzazione spettroscopica del segnale  $[1-^{13}C]$  piruvato valutando la sua distribuzione globale cardiaca ed il valore massimo raggiunto nel ventricolo sinistro (LV), per n = 12 maiali (fig.3.4-3.5). Al fine di misurare un indice che tenesse in considerazione la variabilità dei parametri di somministrazione nel singolo animale (principalmente la %P di polarizzazione al momento dell'iniezione e peso dell'animale) i valori estratti dalle mappe CSI sono stati normalizzati per un il valore della *dose standard inietta*, ( $D_{STD}$ , mmol / Kg) definito come:

24.

$$D_{STD}\% = \frac{D \cdot \%LSP}{W}$$

dove D è la quantità iniettata (mmol), % LSP è la polarizzazione allo stato liquido e W è il peso dell'animale (Kg).

La variazione dei segnali regionali nel volume cardiaco è stata valutata utilizzando statistiche descrittive riferite al valore massimo del segnale del  $[1-^{13}C]$  piruvato iperpolarizzato nel ventricolo sinistro (LV).

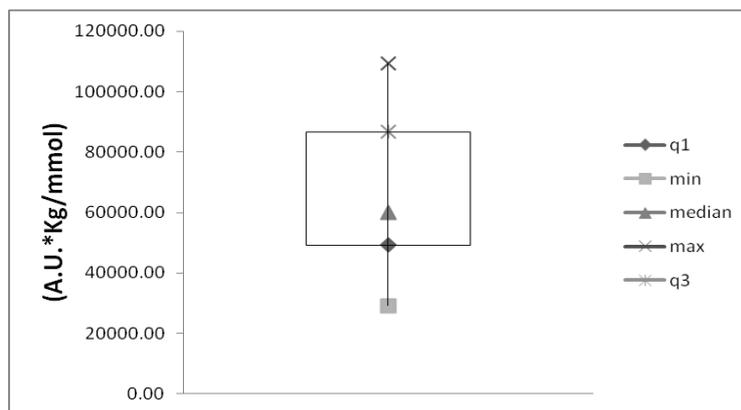


Figura 3.4: rappresentazione diagrammatica della variabilità massima del segnale  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato nel LV,  $n = 12$  studi nel maiale da esperimento [33].

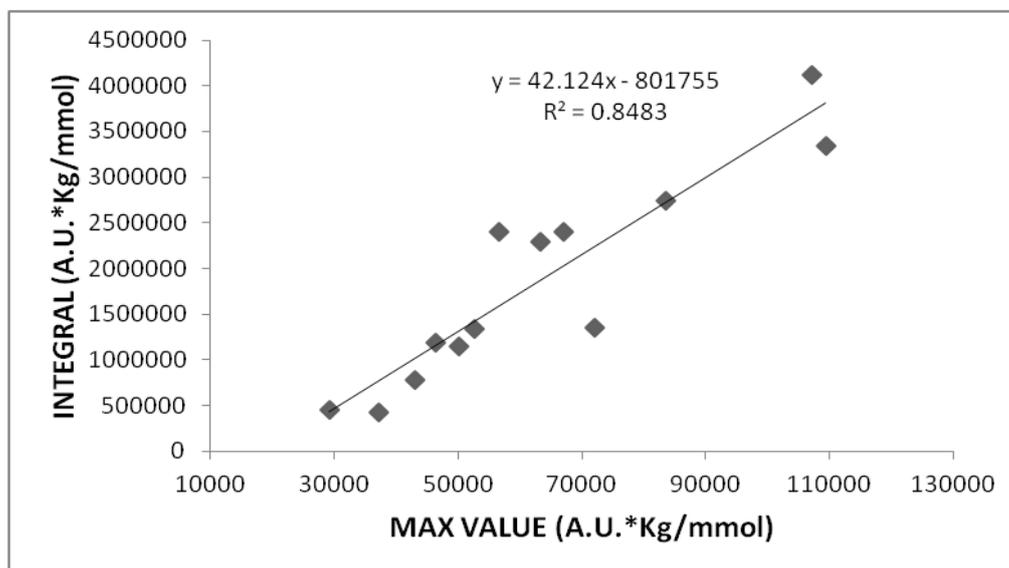


Figura 3.5: Correlazione tra il valore massimo del segnale normalizzato del  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato ed il segnale globale del piruvato nel ventricolo sinistro (LV), valutata calcolando la media del segnale nella regione miocardica tra tutte le sezioni SA che coprono il ventricolo sinistro. I dati sono stati normalizzati per il DSTD per ogni acquisizione [33].

La correlazione tra il valore globale ed il valore valori massimo normalizzati del  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato/LV, mostrano una correlazione significativa ( $R^2 = 0,84$ ,  $p < 0.0001$ ).

Nello stesso studio [33] sono state prodotte le mappe rappresentative di distribuzione dei metaboliti rispetto agli assi cardiaci: in particolare, la distribuzione spaziale dei metaboliti iperpolarizzati è stata valutata in asse corto cardiaco (vista in asse corto SA,  $n = 10$  fette). I parametri di acquisizione per la sequenza spirale 3D-I DEAL sono: FOV =  $30 \times 30 \text{ cm}^2$ , spessore di strato = 10 cm, ottenendo una risoluzione in piano di 14 mm. Le mappe rappresentative in asse corto confermano la netta separazione dei segnali tra muscolo e cavità cardiache di  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato e  $[1-^{13}\text{C}]$  bicarbonato (fig.3.6).

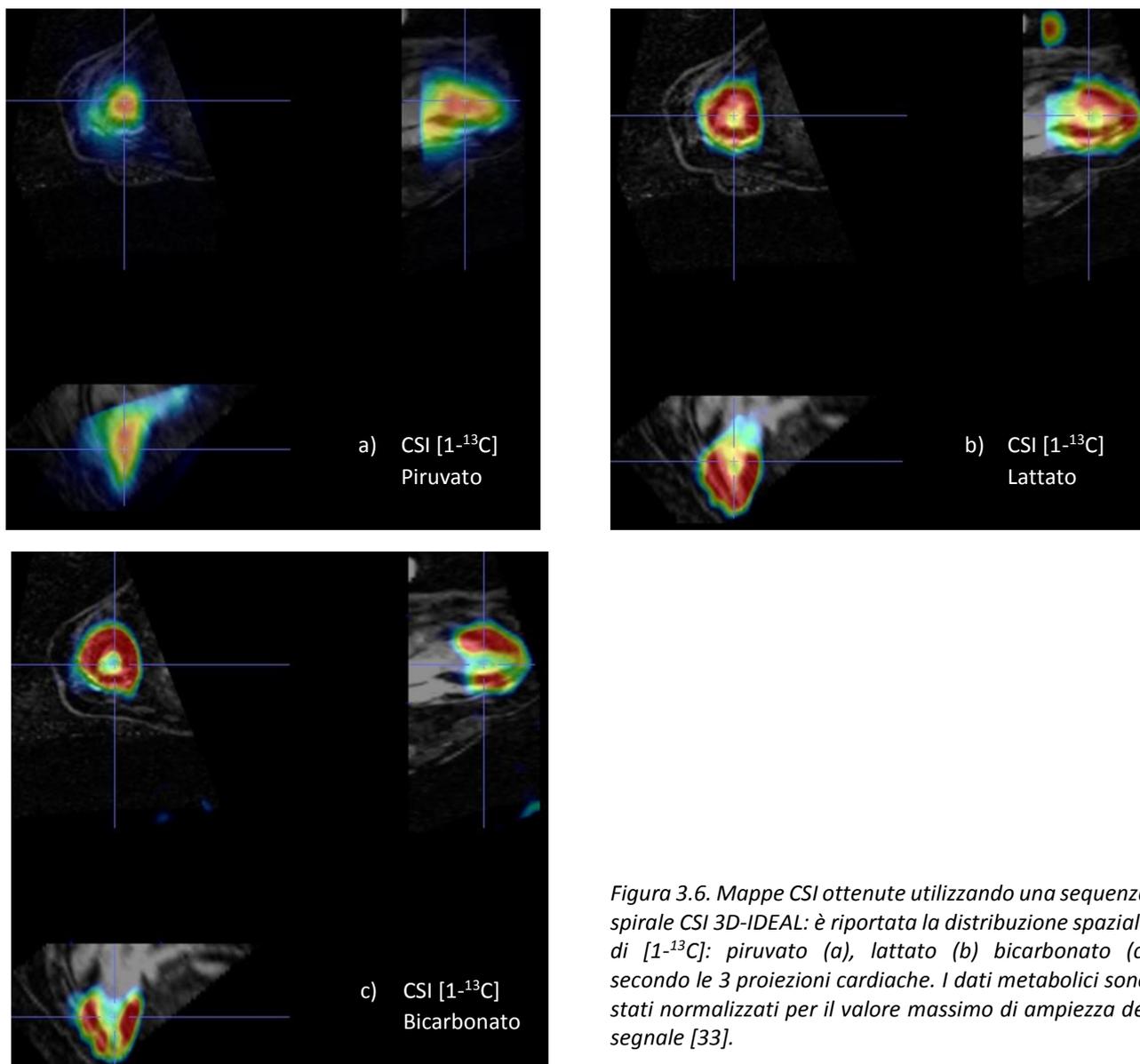


Figura 3.6. Mappe CSI ottenute utilizzando una sequenza spirale CSI 3D-IDEAL: è riportata la distribuzione spaziale di [ $1-^{13}\text{C}$ ]: piruvato (a), lattato (b) bicarbonato (c) secondo le 3 proiezioni cardiache. I dati metabolici sono stati normalizzati per il valore massimo di ampiezza del segnale [33].

### 3.4 Studio della conversione metabolica del [ $1-^{13}\text{C}$ ]piruvato iperpolarizzato in un modello di ischemia e di riperfusione miocardica nel maiale da esperimento

L'applicazione piruvato iperpolarizzato è stato applicato in un modello di ischemia transitoria e riperfusione nel maiale: in questo caso l'obiettivo dello studio è rappresentato dalla valutazione dell'alterazione della distribuzione regionale in funzione di una alterazione transitoria della perfusione miocardica. E' stata valutata la distribuzione spaziale del segnale spettroscopico a 3T in condizioni basali e durante occlusione coronarica reversibile e riperfusione, attraverso mappe polari come precedentemente descritto [111].

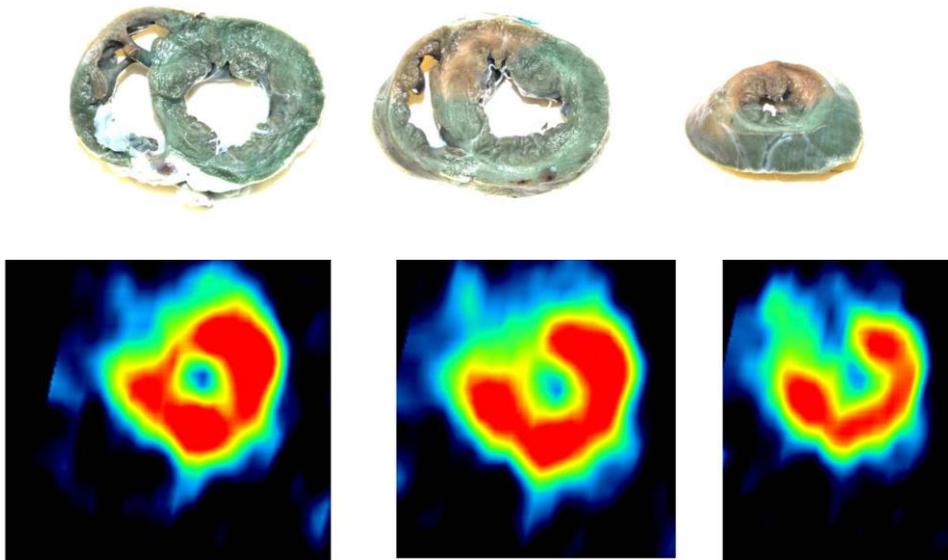


Figura 3.7: Confronto tra l'analisi istologica, con metilen-blu (pannelli superiori) e la mappa CSI del [1-<sup>13</sup>C] lattato (pannelli inferiori). Nelle sezioni cardiache asportate colorate dal blu di metilene la porzione incolore corrisponde all'area a rischio (zona di ischemia indotta), dei segmenti anteriore centrale e apicale, e segmenti miocardici anteroseptali. Questi segmenti sono abbinati alla regione con assenza di segnale nel <sup>13</sup>C-lattato ricostruiti dalle immagini CSI. (Dati non pubblicati, manoscritto in fase di sottomissione) [111].

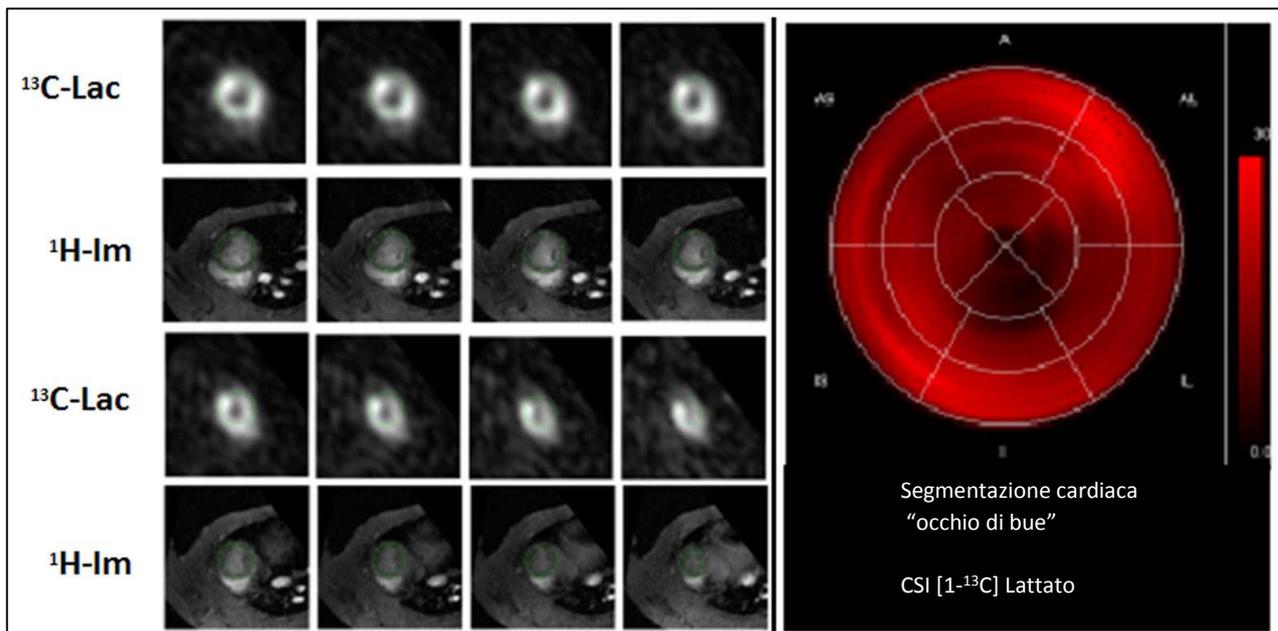


Figura 3.8: Illustrazione della procedura di analisi di immagine: 1) (nei pannelli di sinistra), proiezioni di due sezioni cardiache in asse corto del [1-<sup>13</sup>C] lattato (<sup>13</sup>C-Lac) e le immagini (Im) anatomiche protone (<sup>1</sup>H-Im); nelle immagini anatomiche, sinistra ventricolo è stato segmentato e questa segmentazione è stato riprodotto automaticamente nelle mappe [1-<sup>13</sup>C]-lattato. Utilizzando questa segmentazione ad "occhio di bue" per il [1-<sup>13</sup>C]-lattato è stato generato (pannello di destra). [Dati non pubblicati, manoscritto in fase di sottomissione alla data di stampa della TESI].

Durante ischemia, è stata registrata una significativa diminuzione del segnale spettroscopico di  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato e bicarbonato è stato rivelato nella regione a rischio a valle dell'occlusione, rispetto alla condizione basale. Durante la riperfusione è stato registrato un aumento del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato è nella regione ischemica, mentre il segnale di bicarbonato  $[1-^{13}\text{C}]$  rimane ancora depresso in corrispondenza della regione miocardica interessata dall'occlusione. La valutazione istologica della zona a rischio è stata eseguita sul cuore del maiale dopo lo studio di spettroscopia con  $^{13}\text{C}$ -iperpolarizzato: i risultati delle sezioni cardiache corrispondenti ai settori ischemici visualizzato con mediante il colorante blu di metilene, mostrano una buona correlazione topografica (fig.3.7-3.8). L'analisi dei dati spettroscopi nella condizione pre/post ischemia e riperfusione hanno consentito di quantificare le differenze elative ottenute per i singoli settori attraverso la valutazione del *mismatch*, definito come Mismatch di attività metabolica (MAM) calcolata per ogni segmento miocardico (come descritto nella sezione *Materiali e Metodi*) (fig.3.9-3.10).

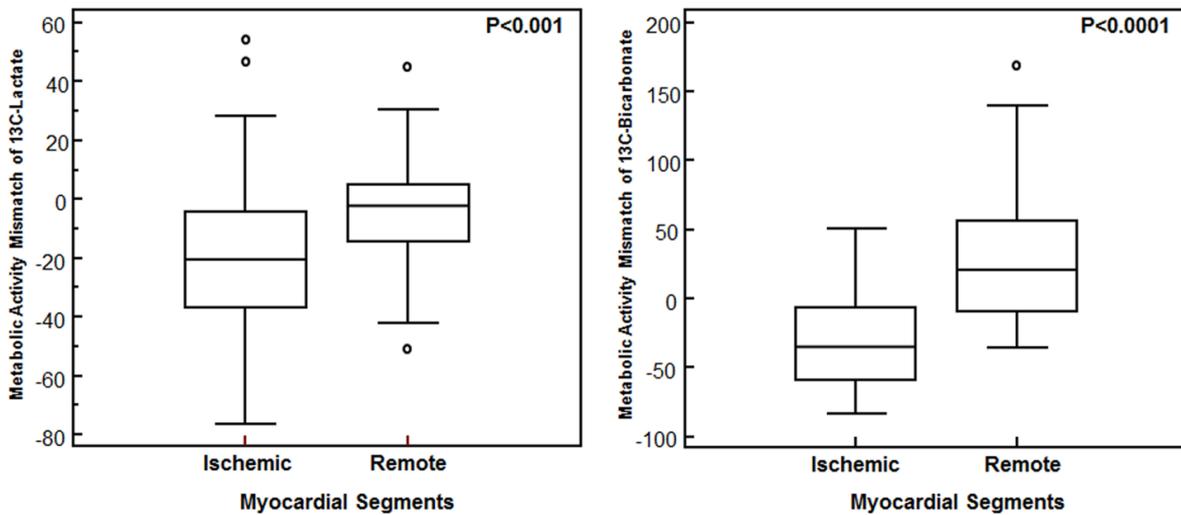


Figura 3.9: Metabolic Activity Mismatch (MAM) durante l'occlusione: si registra un calo significativo di entrambi i segnali del  $[1-^{13}\text{C}]$ -lattato (a sinistra) e  $[1-^{13}\text{C}]$ -bicarbonato (a destra) in segmenti miocardici con evidenza anatomica di assenza di blu di metilene rispetto a segmenti miocardici controlaterali. [111]

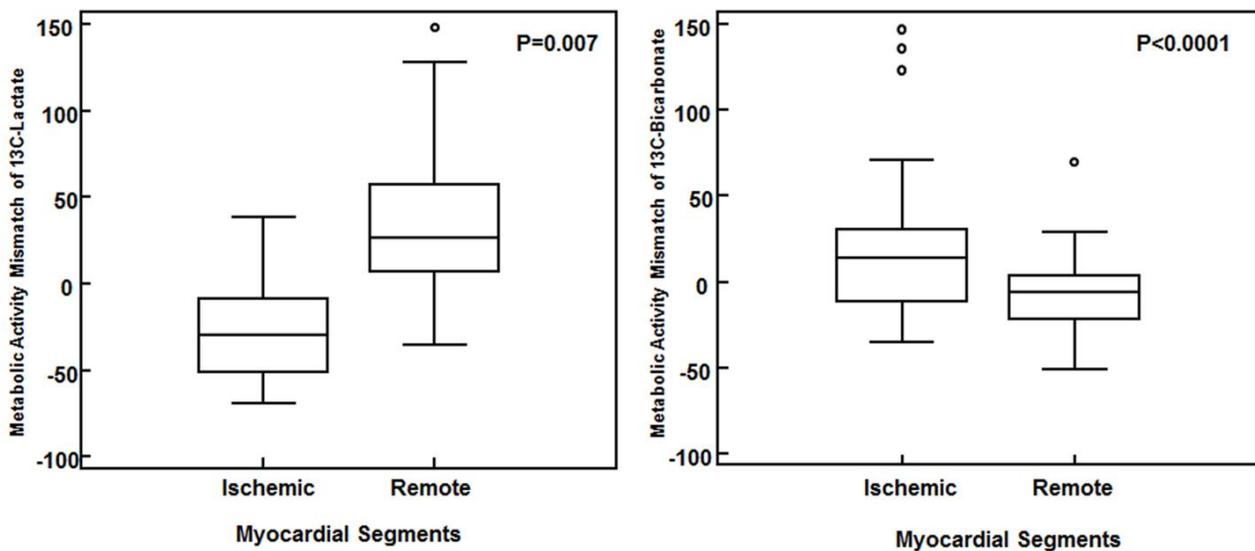


Figura 3.10: Metabolic Activity Mismatch (MAM) dopo riperfusione dopo 10 minuti occlusione: si evidenzia un significativo aumento di segnale  $[1-^{13}\text{C}]$ -lattato (sinistra) e una diminuzione significativa del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$ -bicarbonato (a destra) in segmenti miocardici con evidenza istologica di assenza di blu di metilene (sito occlusione) che nei segmenti miocardici controlaterali [111].

Durante l'occlusione come atteso, si registra una del segnale il segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato ( $-21\pm 26\%$  vs  $3\pm 16\%$ ,  $p < 0,0001$ ) e bicarbonato ( $-29\pm 34\%$  vs  $33\pm 52\%$ ,  $p < 0,0001$ ) nella regione ischemica (*area a rischio*) valutato rispetto alla regione non interessata dalla l'occlusione (regione distale, controlaterale).

Significativamente durante la riperfusione è stata registrata una riduzione persistente del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$  bicarbonato nella regione ischemica rispetto alla regione controlaterale ( $-38\pm 27\%$  vs  $36\pm 51\%$ ,  $p < 0,0001$ ): al contrario il segnale lattato  $[1-^{13}\text{C}]$  aumentata rispetto alla regione del miocardio non ischemica ( $20\pm 42\%$  vs  $-7\pm 22\%$ ,  $p = 0,0007$ ). I segmenti apicali 13-16 e parzialmente medio-anteriore segmenti 7 e 8 sono interessati da ischemia transitoria e hanno evidenziato una ridotta segnale durante l'occlusione entrambi i metaboliti. Durante riperfusione il segnale di bicarbonato era ancora diminuita per gli stessi segmenti (7,8,13-16), mentre lattato è stata aumentata e paragonabile al segnale rilevato nei segmenti remoti.

Sulla base di questi risultati possiamo ipotizzare che, dopo 5 minuti di riperfusione successivi ai 10 minuti di occlusione, il metabolismo ossidativo non si è ancora ristabilito, e mostra alterazioni tipiche associate all'ischemia acuta. Questa tecnica non consente una valutazione quantitativa della concentrazione dei metaboliti, ma solo l'apprezzamento delle variazioni relative di piruvato e dei suoi metaboliti. In questo studio è stato valutato il segnale di ciascun segmento del miocardio nelle mappe metaboliche ricostruite: questi risultati dimostrano quindi che è possibile condurre una valutazione tridimensionale del metabolismo cardiaco mediante  $^{13}\text{C}$ -piruvato iperpolarizzato in un modello di ischemia e riperfusione nel grosso animale. L'indice MAM è stato usato per valutare le variazioni di segnale metabolita dello stesso segmento miocardica in condizioni diverse (sia di occlusione coronarica o riperfusione rispetto al basale). Dal punto di vista tecnico, in questo studio abbiamo utilizzato una sequenza di imaging CSI spirale di tipo 3D, diversa dagli approcci precedentemente presentati in cui si analizzava una proiezione del miocardio [78]. La sequenza IDEAL ha quindi consentito di ottenere una mappa 3D ed un buon SNR nel breve tempo di acquisizione (17 secondi). Riteniamo che questi risultati siano rilevanti per trasferimento della metodica in una fase successiva nell'uomo.

### 3.5 Studio della cinetica di conversione miocardica del $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato

Per lo studio della cinetica di conversione nel muscolo cardiaco del Na  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato iperpolarizzato è stata messa a punto ed ottimizzata una metodica di preparazione della dose per il grosso animale: dopo la dissoluzione, sono state iniettati manualmente in bolo (2 ml/s) nella vena dell'orecchio dell'animale 20 ml di soluzione corrispondente ad una concentrazione di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato 150 mM. La dose efficace totale iniettata corrisponde a 0,08 mmol  $^{13}\text{C}/\text{Kg}$ . L'analisi degli spettri dinamici ha consentito di stimare la conversione metabolica del  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato nei suoi metaboliti,  $[1-^{13}\text{C}]$  acetil-carnitina,  $[1-^{13}\text{C}]$  AcCar, in vivo. Il segnale spettroscopico di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetil-CoA e di altri metaboliti (citrato) non possono essere rilevati con questo approccio sperimentale, in ragione dell'insufficiente SNR e della limitata risoluzione spettroscopica a 3T (fig.3.11).

L'analisi dei segnali è stata condotta mediante una acquisizione dinamica in un volume corrispondente ad una fetta di 40 millimetri di spessore centrata su una delle proiezioni assiali dell'immagine protonica.

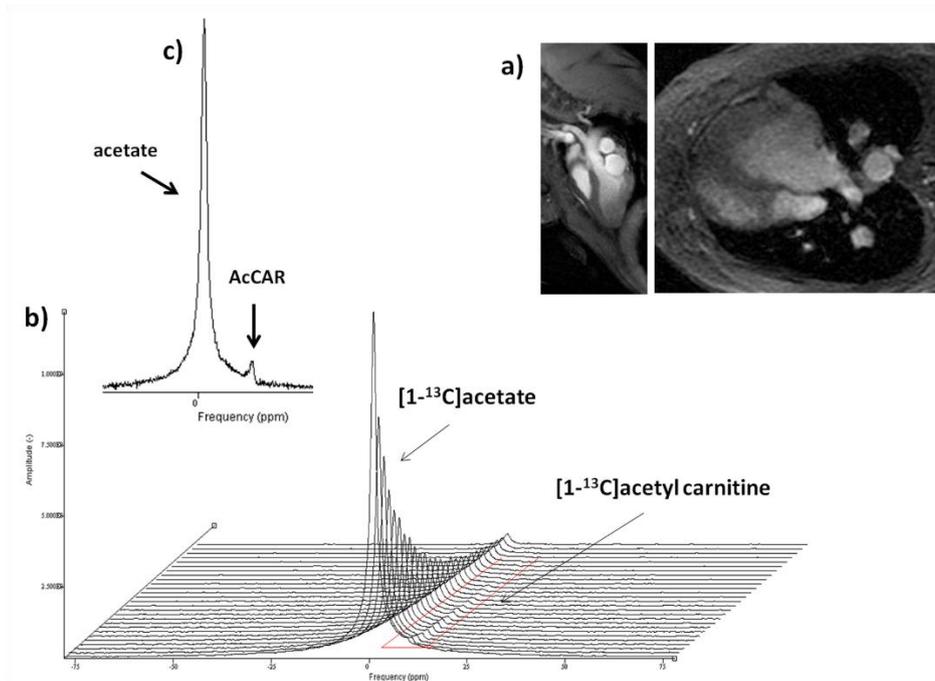


Figura 3.11: a) localizzazione anatomica per gli studi MRS: è stata selezionata una fetta attraverso il volume cardiaco del maiale (spessore = 40 mm); b) l'evoluzione dinamica nel tempo di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e  $[1-^{13}\text{C}]$  Segnali AcCar spettroscopiche rilevato dopo bolo di 150mm di Na  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato iperpolarizzato, c) gli spettri di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e  $[1-^{13}\text{C}]$  AcCar durante l'intervallo di acquisizione di 20-36 s dopo l'iniezione [44].

Bastiaansen e collaboratori avevano applicato un approccio basato sul rapporto relativo di metaboliti, per indagare la conversione metabolica di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato in  $[1-^{13}\text{C}]$  AcCar in nel muscolo scheletrico nel ratto [43].

Il segnale dell'AcCar è risultato molto basso, definendo come:  $R = \left[ \frac{SNR_{acetato}}{SNR_{AcCar}} \right]_{^{13}\text{C}}$

si ottiene un valore di  $R = 1:25$  per la coppia acetato/AcCar, ed il valore dell'area dell'area del picco dell'AcCar è tipicamente 2 ordini di grandezza inferiore al picco del  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato.

A partire dagli spettri dinamici  $^{13}\text{C}$ , sono state prodotte le curve metaboliche, analizzando l'evoluzione temporale del segnale spettroscopico delle specie iperpolarizzate. I risultati ottenuti hanno mostrato l'andamento tipico del segnale dell' $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e la crescita del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$  AcCar, definendo i tempi di salita del segnale (*rise time*) caratteristici per le due specie.

L'evoluzione temporale del segnale di acetato mostra un tipico andamento bifasico, che è stato modellizzato utilizzando un funzione  $\gamma$ -variata per la prima componente, ed una funzione mono-esponenziale per la seconda parte. Con questo approccio, sono stati stimati alcuni parametri caratteristici della curva tra cui il rilassamento longitudinale efficace  $T_{1\text{eff}}$ . Il  $T_{1\text{eff}}$  è stato calcolato mediante il fitting della componente mono-esponenziale, correggendo per la deplezione del segnale dovuta alle ripetute eccitazioni RF: il valore tipico di  $T_{1\text{eff}}$  è risultata pari a  $T_{1\text{eff}} = 17.6 \pm 1.7$  s (fig.3.12-3.13).

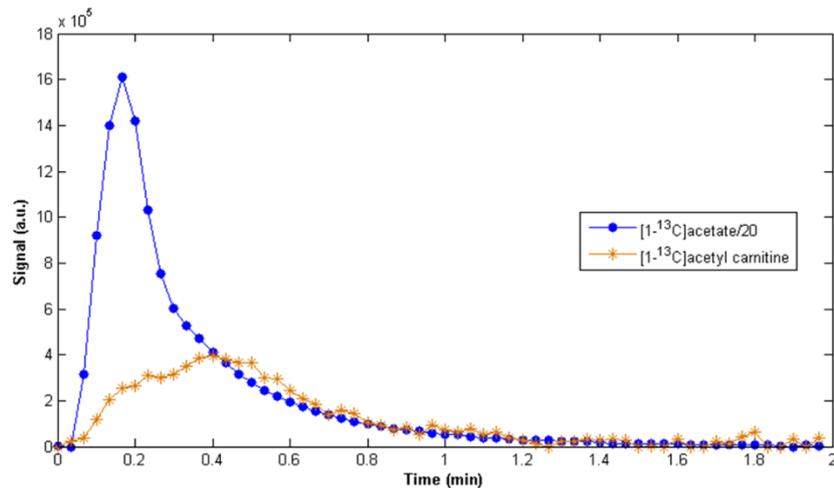


Figura 3.12: tipiche curve metaboliche dinamiche di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e  $[1-^{13}\text{C}]$  Acetilcarnitina ottenuto a  $3T$  dopo l'iniezione in bolo di  $150\text{mM}$  di  $\text{Na } [1-^{13}\text{C}]$  acetato iperpolarizzato nel modello di maiale sano [44].

Analogamente allo studio precedentemente condotto con  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato, è stato impiegato il modello di stress inotropo ottenuto per induzione farmacologica con dobutamina. In questo caso l'analisi dei segnali dinamici di conversione sono stati effettuati utilizzando un metodo basato sulla area totale sotto la curva di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e AcCar [43, 66]. In condizioni di stress inotropo è stata registrata una diminuzione del segnale dell'acetato ed è stato rilevato un incremento del segnale nella seconda fase della curva dinamica. L'andamento della curva metabolica di  $[^{13}\text{C}]$  AcCar non mostra una significativa variazione in condizioni di stress, mentre la misura quantitativa dei valori della AUC di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e AcCAR e del loro rapporto  $[^{13}\text{C}]$  AUC AcCAR / AUC Acetato mostrano una significativa. Questo effetto è verosimilmente dovuto alla diminuzione del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato durante lo stress inotropo (fig.3.14).

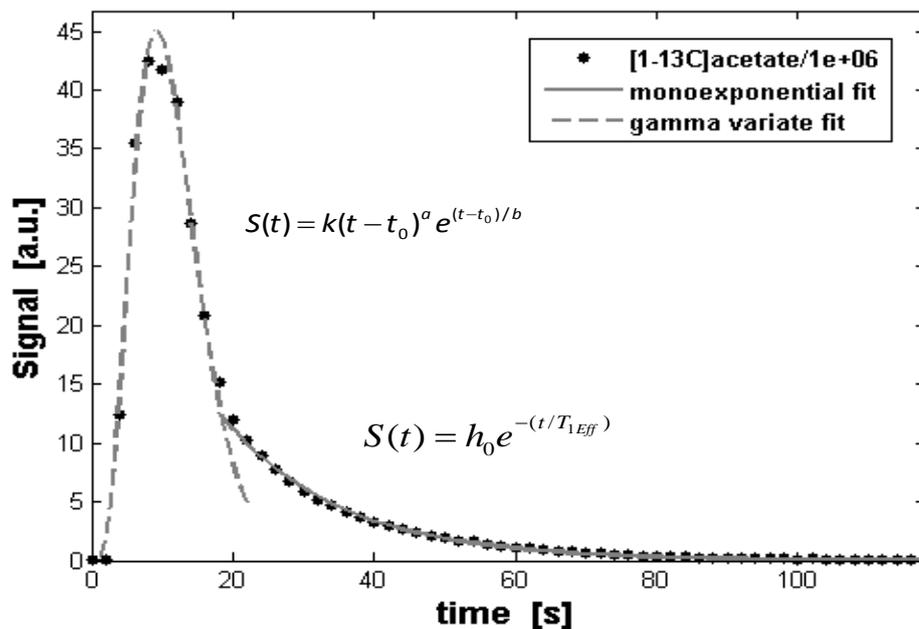


Figura 3.13: Rappresentazione schematica dell'andamento bifasico della curva del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato costituita da una prima componente modellizzata con una funzione  $\gamma$ -variata e la seconda mediante una funzione mono-esponenziale [44]

Una buona correlazione ( $R^2 = 0,9974$ ,  $n = 4$ ) è stata trovata tra il rapporto dei valori delle aree AUC di [1 -  $^{13}\text{C}$ ] AcCar / acetato ed il rapporto della costante cinetica apparente di conversione metabolica da [1 -  $^{13}\text{C}$ ] acetato diviso per il valore di  $r_1$  della AcCar, come riportato in figura:

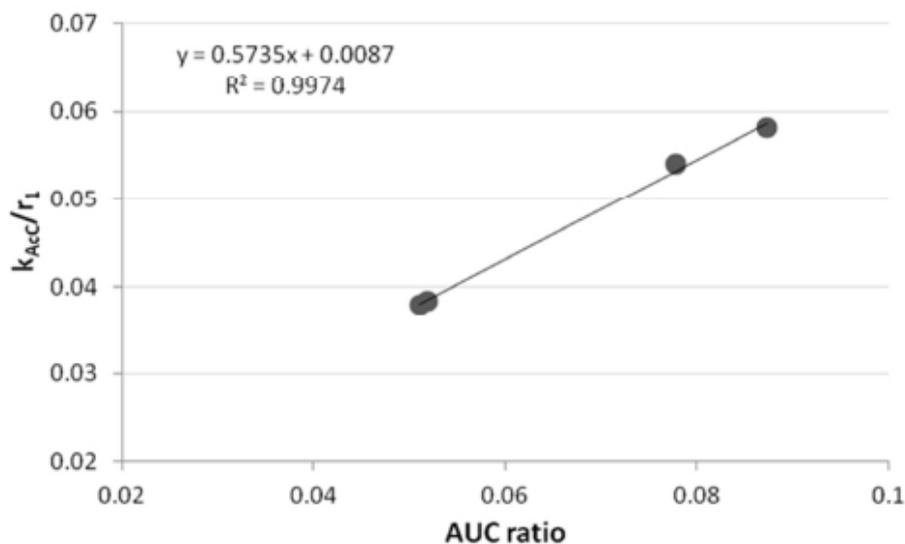


Figura 3.14: Correlazione tra il rapporto delle aree AUC AcCar/ acetato e quella tra la costante cinetica apparente di conversione metabolica  $k/r_1$ . [44].

I valori della correlazione tra i rapporti delle aree e quello di  $K/r_1$  sono riportati in tabella:

$\frac{k_{AcCar}}{r_1}$	$\frac{\overline{AUC}_{AcCar}}{\overline{AUC}_{Acetato}}$	$\Delta\%$
0,054	0,078	36
0,038	0,052	30
0,038	0,051	30
0,058	0,087	40

$$\Delta\% = \frac{\frac{\overline{AUC}_{AcCar}}{\overline{AUC}_{Acetato}} - \frac{k_{AcCar}}{r_1}}{0.5 \cdot \left| \frac{\overline{AUC}_{AcCar}}{\overline{AUC}_{Acetato}} + \frac{k_{AcCar}}{r_1} \right|}$$

Questi risultati suggeriscono che il segnale spettroscopico dell'acetato, rilevato nella seconda fase (mono-esponenziale) della curva, derivi principalmente dalla componente intracellulare, con un contributo ridotto della componente plasmatica (prevalente invece nella prima fase della curva). Con questo approccio si possono avere informazioni differenziali sui due pool (quello plasmatico e quello tissutale relativo all'acetato internalizzato nel muscolo cardiaco). La limitazione principale dello studio deriva tuttavia dalla mancanza della codifica spaziale e segnatamente dal basso SNR: questo in parte è legato dall'utilizzo di una

bobina volume (meno sensibile di una bobina di superficie) e dall'impiego di una quantità limitata di  $^{13}\text{C}$ ,  $\approx$  5-6 volte inferiore nei maiale rispetto agli studi sui piccoli animali. Attualmente infatti, nonostante le modifiche apportate al sistema Hypersense, non è possibile polarizzare volumi maggiori di 600  $\mu\text{L}$  [33, 112]. Il limitato SNR rappresenta l'ostacolo più importante per il passaggio ad esperimenti di imaging CSI mediante sequenze di tipo spirale 3D IDEAL. I risultati preliminari ottenuti con TRIS-acetato hanno consentito infatti di ottenere delle mappe di distribuzione cardiaca unicamente del  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato (volume iniettato = 20 ml,  $\approx$  0,039 mmol / kg): in questo caso il segnale dell'AcCar era al di sotto il limite di sensibilità della metodica [113] (fig.3.15).

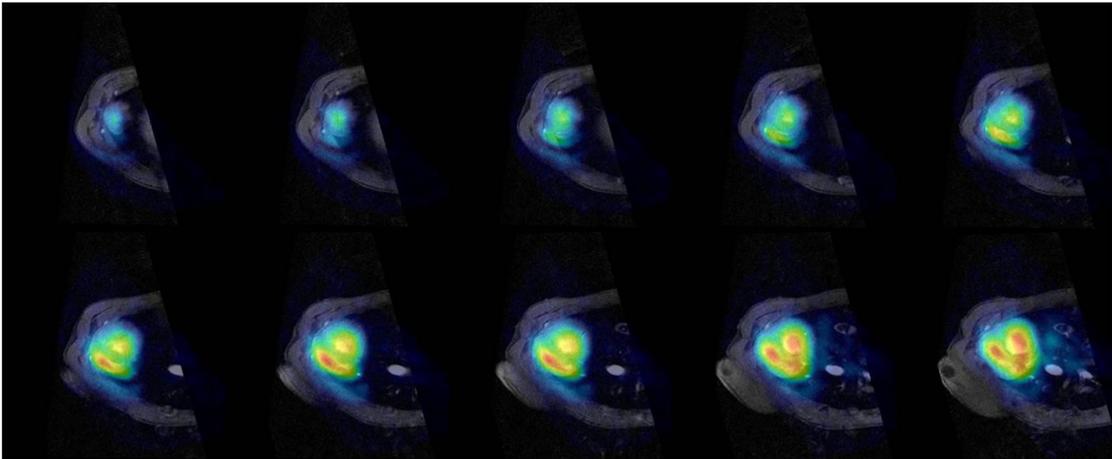


Figura 3.15: Mappe del Tris  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato a 3 T rappresentate in asse corto (SA), colocalizzate con le immagini protoni anatomiche nel maiale da esperimento [113].

Alcune di limitazioni potrebbero essere superate con l'impiego del sistema per uso clinico *SPINlab* [98], in grado probabilmente di incrementare la *dose efficace* somministrata: tuttavia permangono alcuni interrogativi sulla cinetica di conversione dell'acetato nel muscolo cardiaco e sulla criticità legata al breve intervallo di acquisizione per gli studi mediante agenti iperpolarizzati (non superiori a 1-2 minuti). Questo breve lasso di indagine potrebbe rappresentare un ostacolo non sormontabile per l'impiego dell'acetato per applicazioni diagnostiche e di ricerca clinica mediante la tecnica di dissoluzione-DNP e l'imaging spettroscopico.

# Conclusioni

Lo studio nel grosso animale ha richiesto l'ottimizzazione delle procedure per la preparazione, dissoluzione e formulazione della dose dei due substrati metabolici,  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato ed acetato. Nonostante l'impiego di dosi efficaci sovra-fisiologiche, la procedura è risultata sicura per l'animale e non ha prodotto significative modifiche farmacodinamiche. L'evoluzione temporale e la distribuzione spaziale del segnale spettroscopico dei segnali del  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato e dei suoi metaboliti  $[1-^{13}\text{C}]$  lattato, alanina e bicarbonato sono state affrontate sviluppando procedure di analisi dei dati spettroscopici e con l'impiego di modelli cinetici in grado di fornire una stima delle costanti cinetiche apparenti di conversione ( $k_{px}$ ), e dei tempi di rilassamento efficaci ( $T_{1x, \text{Eff}}$ ) della molecola/substrato e dei metaboliti, in condizioni basali e sotto stimolo. È stata dimostrata la capacità della metodica di stimare la modulazione dell'attività catalitica del complesso della PDH in condizioni metaboliche di stress inotropo, sotto infusione di glucosio: questo approccio ha permesso di misurare un incremento della produzione di  $[^{13}\text{C}]$  bicarbonato rispetto alle condizioni basali. I risultati si sono dimostrati stabili all'approccio analitico e numerico impiegato per la soluzione dei sistemi di equazioni differenziali del modello cinetico. È stata inoltre studiata la conversione metabolica del  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato, in quanto rappresentativo degli acidi grassi liberi a catena corta e substrato energetico del muscolo cardiaco. È stata studiata la captazione dell'acetato nel muscolo cardiaco e la sua coniugazione catalitica con la carnitina da parte dell'enzima carnitina acetil-trasferasi. È stato impiegato un metodo basato sulla stima del totale AUC del metabolita in un modello stress inotropo del miocardio. Lo sviluppo di metodi di analisi semi/quantitativa dei dati spettroscopici ha consentito la correlazione dei parametri cinetici con i valori emodinamici (prodotto  $\text{PA} \cdot \text{FC}_{\text{sistolica}}$ ).

L'imaging spettroscopico del miocardio se ristretto ad una finestra temporale molto breve, come nel caso degli agenti iperpolarizzati, è particolarmente critico in ragione della contrattilità del muscolo cardiaco: nell'ambito di questo lavoro di tesi sono state verificati diversi approcci impiegando di sequenze di tipo 3D CSI (IDEAL) e multistrato (SPCSI). La messa a punto di metodiche di imaging spettroscopico cardiaco ha consentito di mappare le alterazioni metaboliche regionali del tessuto miocardico in un modello transitorio di ischemia e riperfusione. I risultati ottenuti nel cuore dopo ischemia sono in linea con la riduzione prevista del flusso del piruvato ad opera del complesso PDH e della significativa depressione del metabolismo ossidativo subito dopo la riperfusione (seguita a 10 minuti di occlusione). L'approccio 3D e l'analisi segmentale (rappresentata con le mappe *ad occhio di buca*) condotta in questo studio, rappresentano un avanzamento dello stato dell'arte per la valutazione regionale delle alterazioni del metabolismo cardiaco nel modello del grosso animale.

Nel loro insieme, i risultati di questa Tesi ottenuti impiegando le due molecole/substrato più promettenti per lo studio del metabolismo cardiaco, hanno evidenziato le potenzialità di questa nuova tecnologia per lo studio del metabolismo regionale cardiaco ed i suoi limiti verso l'applicazione in un contesto di ricerca clinico. La produzione di "traccianti" clinici richiede una interpretazione modellistica dei dati ed una rigorosa validazione biologica: d'altra parte la storia recente ci insegna che la PET ha richiesto diversi decenni per essere accettata diffusamente in ambiente clinico, per questo lo studio su modelli traslazionali e le prossime fasi di sperimentazione di fase I nell'uomo potranno aiutare ad accelerare traduzione della tecnologia di dissoluzione DNP e MRSI in uno strumento di imaging clinico di routine.

# Ringraziamenti

I risultati riportati in questa tesi di specializzazione sono stati ottenuti nell'ambito di un sistema integrato costituita dalla Fondazione CNR/Regione Toscana *G. Monasterio*, che ha finanziato gran parte del progetto, e l'Istituto di Fisiologia Clinica del C.N.R. di Pisa durante gli anni 2009-2013.

Desidero esprimere la mia gratitudine al Professor Luigi Donato per il supporto al progetto C-13 e l'interesse costante dimostrato per questo progetto di ricerca.

Mi sento in debito con il Prof. Aldo Clerico per la sua generosità e per essere stato sempre costruttivo e rassicurante durante tutto il percorso di specializzazione.

Sono grato al Dr. Luciano Ciucci, per l'attenzione dimostrata in questi anni e per aver supportato un progetto pionieristico come il C-13.

Devo i miei più sinceri ringraziamenti al Dr. Massimo Lombardi per avermi dato la possibilità di lavorare in un atmosfera stimolante e accogliente. Ho avuto l'occasione di condividere con il Dr. Lombardi lunghe discussioni sul C-13... e per il suo senso dell'umorismo! Grazie, Massimo, per l'amicizia e per il percorso fatto insieme...

Esprimo riconoscenza per il Dr. Michele Emdin per il suo atteggiamento sempre costruttivo: lo ringrazio per il tempo che mi ha dedicato e per aver condiviso con me alcuni momenti significativi di questi studi.

Devo i miei sinceri ringraziamenti al Prof. Jan Henrik Ardenkjær-Larsen per la sua amicizia e per il supporto scientifico straordinario in tutti questi anni.

Estendo la mia gratitudine al professor Luigi Landini per la sua costante ed attenta presenza in questo gruppo di lavoro.

Ho avuto la fortuna di avere tanti ottimi co-autori e amici carissimi: non posso dimenticare le lunghe sessioni sperimentali in questi anni e l'*aneddotica* che via via si è creata nel laboratorio... Sono grato a tutti loro per il clima di collaborazione e l'entusiasmo con cui abbiamo lavorato insieme! Una menzione speciale ai miei giovani colleghi e collaboratori, Alessandra e Matteo, per il loro impegno instancabile e le migliori energie dedicate a questo progetto.

Non posso esprimere a parole la gratitudine per i miei genitori, li ringrazio per avermi incoraggiato e sostenuto attraverso tutti i passaggi più importanti della mia vita.

# Bibliografia

- [1] Magnetic Resonance Imaging, Methods and Biologic Applications, Edited by Pottumarthi V. Prasad, ISSN 1543-1894, Humana Press Inc., 2006
- [2] M. Van der Graaf. In vivo magnetic resonance spectroscopy: basic methodology and clinical applications. *Eur. Biophys. J.*, 39:527-540, 2010.
- [3] Shimon D1, Hovav Y, Feintuch A, Goldfarb D, Vega S Dynamic Nuclear Polarization in the solid state: a transition between the cross effect and the solid effect. *Phys Chem Chem Phys.* 2012 Apr 28; 14 (16): 5729-43. doi: 10.1039/c2cp23915a. Epub 2012 Mar 14.
- [4] K. Golman, L.E. Olsson, O. Axelsson, S. Mansson, M. Karlsson, and J.S.Petersson. Molecular imaging using hyperpolarized  $^{13}\text{C}$ . *Brit. J. Radiol.* 76: S118 S127, 2003.
- [5] R.E. Hurd, Y.-F. Yen, A. Chen, and J.H. Ardenkjaer-Larsen. Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  metabolic imaging using dissolution dynamic nuclear polarization. *J. Magn. Reson. Imag.*, 36:1314 1328, 2012.
- [6] V.A. Atsarkin and A.V. Kessenikh. Dynamic nuclear polarization in solids: The birth and development of the many-particle concept. *Appl. Magn. Reson.* 43 (1-2):7 19, 2012.
- [7] K.H. Sze, Q. Wu, H.S. Tse, and G. Zhu. Dynamic nuclear polarization: New methodology and applications. *Top. Curr. Chem.*, 326:215-242, 2012.
- [8] C. Ramanathan. Dynamic nuclear polarization and spin diffusion in non-conducting solid. *Appl. Magn. Reson.*, 34:409{421, 2008.
- [9] J.H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M.H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, and K. Golman. Increase in signal-to noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 100:10158-10163, 2003.
- [10] K.R. Keshari and D.M. Wilson. Chemistry and biochemistry of  $^{13}\text{C}$  hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization. *Chem Soc. Rev.*, 43:1627-1659, 2014.
- [11] S. Reynolds and H. Patel. Monitoring the solid-state polarization of  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{29}\text{Si}$  and  $^{31}\text{P}$ . *Appl. Magn. Reson.* 34:495 {508, 2008.
- [12] C. Cudalbu, A. Comment, F. Kurdzesau, R.B. Van Heeswijk, K. Uffmann, S. Jannin, V. Denisov, D. Kirik, and R. Gruetter. Feasibility of in vivo  $^{15}\text{N}$  MRS detection of hyperpolarized  $^{15}\text{N}$  labeled choline in rats. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12:5818 -5823, 2010.
- [13] S. Bowen and J.H. Ardenkjaer-Larsen. Formulation and utilization of choline based samples for dissolution dynamic nuclear polarization. *J. Magn. Reson.* 236: 26-30, 2013.
- [14] L. Lumata, A.K. Jindal, M.E. Merritt, C.R. Malloy, A. Dean Sherry, and Z. Kovacs. Dnp by thermal mixing under optimized conditions yields >60,000 fold enhancement of  $^{89}\text{Y}$  NMR signal. *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (22): 8673 {8680, 2011.
- [15] K.-N. Hu. Polarizing agents and mechanisms for high field dynamic nuclear polarization of frozen dielectric solids. *Sol. St. Nucl. Magn. Reson.* 40:31,41, 2011.
- [16] L. Lumata, Z. Kovacs, A. Dean Sherry, C. Malloy, S. Hill, J. van Tol, L. Yu, L. Song, and M.E. Merritt. Electron spin resonance studies of trityl ox063 at a concentration optimal for dnp. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:9800{9807 2013.
- [17] J.H. Ardenkjaer-Larsen, S. Macholl, and H. Johannesson. Dynamic nuclear polarization with trityls at 1.2 k. *Appl. Magn. Reson.*, 34:509{522, 2008.
- [18] F. Kurdzesau, B. van den Brandt, A. Comment, P. Hautle, S. Jannin, J.J. van der Klink, and J.A. Konter. Dynamic nuclear polarization of small-labelled molecules in frozen water-alcohol solutions. *J. Phys. D Appl. Phys.*, 41:155506{155516, 2008.
- [19] L. Lumata, Z. Kovacs, C. Malloy, A.D. Sherry, and M. Merritt. The effect of  $^{13}\text{C}$  enrichment in the glassing matrix on dynamic nuclear polarization of  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate. *Phys. Med. Biol.*, 56:N85-N92, 2011.
- [20] J.W. Gordon, S.B. Fain, and I.J. Rowland. Effect of lanthanide ions on dynamic nuclear polarization enhancement and liquid-state  $T_1$  relaxation. *Magn. Reson. Med.*, 68:1949 1954, 2012.
- [21] L. Lumata, M.E. Merritt, C.R. Malloy, A. Dean Sherry, and Z. Kovacs. Impact of  $\text{Gd}^{3+}$  on dnp of  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate doped with trityl OX063, bdpa, or 4-oxo-tempo. *J. Phys. Chem. A*, 116:5129-5138, 2012.
- [22] L. Friesen-Waldner, A. Chen, W. Mander, T.J. Scholl, and C.A. McKenzie. Optimisation of dynamic nuclear polarisation of  $[1-^{13}\text{C}]$  pyruvate by addition of gadolinium-based contrast agents. *J. Magn. Reson.*, 223:85{89, 2012.
- [23] C. Gabellieri, M.O. Leach, and T.R. Eykyn. Modulating the relaxivity of hyperpolarized substrates with gadolinium contrast agents. *Contrast Media Mol. Imaging*, 4:143-147, 2009.

- [24] G.D. Reed, C. von Morze, R. Bok, B.L. Koelsch, M. van Criekinge, K.J. Smith, H. Shang, P.E.Z. Larson, J. Kurhanewicz, and D.B. Vigneron. High-resolution c-13 MRI with hyperpolarized urea: In Vivo T<sub>2</sub> mapping and n- 15 labeling effects. *IEEE Trans. Med. Imaging*, pages 1-11, 2013. DOI 10.1109/TMI.2013.2285120.
- [25] P.E.Z. Larson, R. Bok, A.B. Kerr, M. Lustig, S. Hu, A.P. Chen, S.J. Nelson, J.M. Pauly, J. Kurhanewicz, and D.B. Vigneron. Investigation of tumor hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]-pyruvate dynamics using time-resolved multiband RF excitation echo-planar MRSI. *Magn. Reson. Med.*, 63:582-591, 2010.
- [26] C.H. Cunningham, A.P. Chen, M. Lustig, B.A. Hargreaves, J. Lupo, D. Xu, J. Kurhanewicz, R. E. Hurd, J.M. Pauly, S.J. Nelson, and D.B. Vigneron. Pulse sequence for dynamic volumetric imaging of hyperpolarized metabolic products. *J. Magn. Reson.*, 193:139-146, 2008.
- [27] D. Mayer, Y.S. Levin, R.E. Hurd, G.H. Glover, and D.M. Spielman. Fast metabolic imaging of systems with sparse spectra: Application for hyperpolarized <sup>13</sup>C imaging. *Magn. Reson. Med.*, 56:932-937, 2006.
- [28] Y.F. Yen, S.J. Kohler, A.P. Chen, J. Tropp, R. Bok, J. Wolber, M.J. Albers, K.A. Gram, M.L. Zierhut, I. Park, V. Zhang, S. Hu, S.J. Nelson, D.B. Vigneron, J. Kurhanewicz, H.A. Dirven, and R.E. Hurd. Imaging considerations for in vivo <sup>13</sup>C metabolic mapping using hyperpolarized <sup>13</sup>C-pyruvate. *Magn. Reson. Med.*, 62:1-10, 2009.
- [29] A.Z. Lau, A.P. Chen, N.R. Ghugre, V. Ramanan, W. W. Lam, K.A. Connelly, G.A. Wright, and C.H. Cunningham. Rapid multislice imaging of hyperpolarized <sup>13</sup>C pyruvate and bicarbonate in the heart. *Magn. Reson. Med.*, 64(5):1323-1331, 2010.
- [30] D. Mayer, Y.-F. Yen, J. Tropp, A. Pfeiffer, R.E. Hurd, and D.M. Spielman. Application of subsecond spiral chemical shift imaging to real-time multislice metabolic imaging of the rat in vivo after injection of hyperpolarized <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-pyruvate. *Magn. Reson. Med.*, 62:557-564, 2009.
- [31] S.J. Kohler and Y. Yen, J. Wolber, A.P. Chen, M.J. Albers, R. Bok, V. Zhang, J. Tropp, S. Nelson, D.B. Vigneron, J. Kurhanewicz, and R.E. Hurd. In vivo <sup>13</sup>C metabolic imaging at 3T with hyperpolarized <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-pyruvate. *Magn. Reson. Med.*, 58:65-69, 2007.
- [32] K. Golman, R. in't Zandt, and M. Thaning. Real-time metabolic imaging. *PNAS*, 103(30):11270-11275, 2006.
- [33] A. Flori, F. Frijia, V. Lionetti, J.H. Ardenkjaer Larsen, V. Positano, G. Giovannetti, R.F. Schulte, F. Wiesinger, F.A. Recchia, L. Landini, M.F. Santarelli, M. Lombardi, and L. Menichetti. Dnp methods for cardiac metabolic imaging with hyperpolarized pyruvate large dose injection in pigs. *Appl. Magn. Reson.*, 43:299-310, 2012.
- [34] S.E. Day, M.I. Kettunen, F.A. Gallagher, D.-H. Hu, M. Lerche, J. Wolber, K. Golman, J.H. Ardenkjaer-Larsen, and K.M. Brindle. Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Nature Med.*, 13:1382-1387, 2007.
- [35] Wiesinger, I. Miederer, M.I. Menzel, E. Weidl, M. Janich, J.H. Ardenkjaer-Larsen, M. Schwaiger, and R.F. Schulte. Metabolic rate constant mapping of hyperpolarized <sup>13</sup>C pyruvate. In *Proceedings of the 18th Annual Meeting ISMRM*, page 3282, Stockholm, Sweden, August 28-31 2010.
- [36] S. Hu, M. Lustig, A.P. Chen, J. Crane, A. Kerr, D.A.C. Kelley, R. Hurd, J. Kurhanewicz, S.J. Nelson, J.M. Pauly, and D.B. Vigneron. Compressed sensing for resolution enhancement of hyperpolarized <sup>13</sup>C yback 3d-mrsi. *J. Magn. Reson.*, 192:258-264, 2008.
- [37] L.E. Olsson, C.-M. Chai, O. Axelsson, M. Karlsson, K. Golman, and J.S. Petersson. Mr coronary angiography in pigs with intraarterial injections of a hyperpolarized <sup>13</sup>C substance. *Magn. Reson. Med.*, 55:731-737, 2006.
- [38] P. Magnusson, E. Johansson, S. Mansson, J.S. Petersson, C.-M. Chai, G. Hansson, O. Axelsson, and K. Golman. Passive catheter tracking during interventional MRI using hyperpolarized <sup>13</sup>C. *Magn. Reson. Med.*, 57:1140-1147, 2007.
- [39] K. Golman and J.S. Petersson. Metabolic imaging and other applications of hyperpolarized <sup>13</sup>C<sub>1</sub>. *Acad. Radiol.*, 13:932-942, 2006.
- [40] F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, and K.M. Brindle. Biomedical applications of hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance imaging. *Prog. Nucl. Magn. Reson.* 55:285-295, 2009.
- [41] M. Karlsson, P.R. Jensen, J.F. Duus, S. Meier, and M.H. Lerche. Development of dissolution DNP-MR substrates for metabolic research. *Appl. Magn. Reson.* 43(1-2):223-236, 2012.
- [42] P.R. Jensen, T. Peitersen, M. Karlsson, R. in 't Zandt, A. Gisselsson, G. Hansson, S. Meier, and M.H. Lerche. Tissue-specific short chain fatty acid metabolism and slow metabolic recovery after ischemia from hyperpolarized NMR in vivo. *J. Bio. Chem.*, 284(52):36077-36082, 2009.
- [43] J.A.M. Bastiaansen, T. Cheng, M. Mishkovsky, J.M.N. Duarte, A. Comment, and R. Gruetter. In vivo enzymatic activity of acetylcoa synthetase in skeletal muscle revealed by <sup>13</sup>C turnover from hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]acetate to [1-<sup>13</sup>C]acetylcarnitine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830:4171-4178, 2013.
- [44] A. Flori, M. Liserani, F. Frijia, G. Giovannetti, V. Lionetti, F.A. Recchia, G.D. Aquaro, A. Dushpanova, V. Positano, M.F. Santarelli, L. Landini, J.H. Ardenkjaer-Larsen, M. Lombardi, and L. Menichetti. Real-time cardiac metabolism assessed with hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]acetate in a large animal model. Accepted for publication in *Contrast Media Mol. Imaging.*, 25 Jul.2014

- [45] F.A. Gallagher M.I. Kettunen, S.E. Day, D.-E. Hu, J.H. Ardenkjaer-Larsen, R. in't Zandt, P.R. Jensen, M. Karlsson, K. Golman, M.H. Lerche, and K.M. Brindle. Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labelled bicarbonate. *Nature*, 453:940{944, 2008.
- [46] M.A. Schroeder, P. Swietach, H.J. Atherton, F.A. Gallagher, P. Lee, G.K. Radda, K. Clarke, and D.J. Tyler. Measuring intracellular pH in the heart using hyperpolarized carbon dioxide and bicarbonate: a <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy study. *Cardiovasc. Research*, 86:82-91, 2010.
- [47] D. Mayer, Y.-F. Yen, S. Josan, J.M. Park, A. Pfe\_erbaum, R.E. Hurd, and D.M. Spielman. Application of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]lactate for the in vivo investigation of cardiac metabolism. *NMR Biomed.*, 25:1119 1124, 2012.
- [48] S. Hu, M. Zhu, H.A.I. Yoshihara, D.M. Wilson, K.R. Keshari, P. Shin, G. Reed, C. von Morze, R. Bok, P.E.Z. Larson, J. Kurhanewicz, and D.B. Vigneron. In vivo measurement of normal rat intracellular pyruvate and lactate levels after injection of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]alanine. *Magn. Reson. Imag.*, 29:1035-1040, 2011.
- [49] T.B. Rodrigues, E.M. Serrao, B.W.C. Kennedy, D.-E. Hu, M.I. Kettunen, and K.M. Brindle. Magnetic resonance imaging of tumor glycolysis using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labeled glucose. *Nature Medicine*, 20:93{97, 2014.
- [50] Ball DR, Rowlands B, Dodd MS, Le Page L, Ball V, Carr CA, Clarke K, Tyler DJ. Hyperpolarized butyrate: a metabolic probe of short chain fatty acid metabolism in the heart. *Magn Reson Med*. 2014 May;71(5):1663-9. doi: 10.1002/mrm.24849. Epub 2013 Jun 24.
- [51] Mignon L, Dutta P, Martinez GV, Foroutan P, Gillies RJ, Jordan BF, Monitoring chemotherapeutic response by hyperpolarized <sup>13</sup>C-fumarate MRS and diffusion MRI. *Cancer Res*. 2014 Feb 1;74(3):686-94. doi: 10.1158/0008-5472.
- [52] Z. Chen, W. Lu, C. Garcia-Prieto, and P. Huang. The warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 39:267 274, 2007.
- [53] Lin Z. Li, Stephen Kadlecek, He N. Xu, Dania Daye, Benjamin Pullinger, Harrilla Profka, Lewis Chodosh and Rahim Rizzi, Ratiometric analysis in hyperpolarized NMR (I): test of the two-site exchange model and the quantification of reaction rate constants, *NMR Biomed*. 2013 Oct;26(10):1308-20. doi: 10.1002/nbm.2953.
- [54] FA. Gallagher, S E. Bohndiek, M I. Kettunen, D. Y. Lewis, D. Soloviev, Kevin M. Brindle, Hyperpolarized <sup>13</sup>C MRI and PET: In Vivo Tumor Biochemistry, *J Nucl Med*. 2011 Sep;52(9):1333-6. doi: 10.2967/jnumed.110.085258. Epub 2011 Aug 17.
- [55] J. Kurhanewicz D.B. Vigneron, K. Brindle, E.Y. Chekmenev, A. Comment, C.H. Cunningham, R.J. DeBerardinis, G.G. Green M.O. Leach, S.S. Rajan, R.R. Rizzi, B.D. Ross, W.S. Warren, and C.R. Malloy. Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: Prospects for translation to clinical research. *Neoplasia*, 13(2):81 97, 2011.
- [56] M.L. Zierhut, Y-F Yen, A.P. Chen, R. Bok, M.J. Albers, V. Zhang, J. Tropp, I. Park, D.B. Vigneron, J. Kurhanewicz, R.E. Hurd, and S.J. Nelson. Kinetic modeling of hyperpolarized <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-pyruvate metabolism in normal rats and tramp mice. *J. Magn. Reson.*, 202(1):85-92, 2010.
- [57] M.J. Albers, R. Bok, A.P. Chen, C.H. Cunningham, M.L. Zierhut, V. Yi Zhang, S.J. Kohler, J. Tropp, R.E. Hurd, Y.-. Yen, S.J. Nelson, D.B. Vigneron, and J. Kurhanewicz. Hyperpolarized <sup>13</sup>C lactate, pyruvate, and alanine: Noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading. *Cancer. Res.*, 68(20):8607{8615, 2008.
- [58] T. Harrisa, G. Eliyahu, L. Frydman, and H. Degani. Kinetics of hyperpolarized <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells. *PNAS*, 106(43):18131-18136, 2009.
- [59] S. Hu, A.P. Chen, M.L. Zierhut, R. Bok, Y.-F. Yen, M.A. Schroeder, R.E. Hurd, S.J. Nelson, J. Kurhanewicz, and D.B. Vigneron. In vivo carbon-13 dynamic MRS and MRSI of normal and fasted rat liver with hyperpolarized <sup>13</sup>C-pyruvate. *Mol. Imaging Biol.*, 11:399-407, 2009.
- [60] I. Park, P.E.Z. Larson, M.L. Zierhut, S. Hu, R. Bok, T. Ozawa, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron, S.R. VandenBerg, C. D. James, and S.J. Nelson. Hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance metabolic imaging: application to brain tumors. *Neuro-Oncology*, 12(2):1-12, 2010.
- [61] K.M. Brindle. Watching tumours gasp and die with mri: the promise of hyperpolarised <sup>13</sup>C mr spectroscopic imaging. *Br. J. Radiol.*, 85:697 708, 2012.
- [62] K.M. Brindle. NMR methods for measuring enzyme kinetics IN VIVO. *Prog. NMR Spectr.*, 20:257-293, 1988.
- [63] C. Harrison, C. Yang, A. Jindal, R.J. DeBerardinis, M.A. Hooshyar, M. Merritt, A. Dean Sherry, and C.R. Malloy. Comparison of kinetic models for analysis of pyruvate-to-lactate exchange by hyperpolarized <sup>13</sup>C nmr. *NMR Biomed.*, 25:1286-1294, 2012.
- [64] T.H. Witney, M.I. Kettunen, and K.M. Brindle. Kinetic modeling of hyperpolarized <sup>13</sup>C label exchange between pyruvate and lactate in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 286(28):24572-24580, 2011.
- [65] M.I. Kettunen, D. e. Hu, T.H. Witney, R. McLaughlin, F.A. Gallagher, S.E. Bohndiek, S.E. Day, and K.M. Brindle. Magnetization transfer measurements of exchange between hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate and [1-<sup>13</sup>C]lactate in a murine lymphoma. *Magn. Reson. Med.*, 63:872 880, 2010.
- [66] D.K. Hill, M.R. Orton, E. Mariotti, J.K.R. Boulton, R. Panek, M. Jafar, H.G. Parkes, Y. Jamin, M. Falck Miniotti, N.M.S. Al-Sa\_ar, M. Belouche-Babari, S.P. Robinson, M.O. Leach, Y.-L. Chun, and T.R. Eykyn. Model free approach to kinetic analysis of real-time hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy data. *PLOS ONE*, 8(9):e71996, 2013.

- [67] S.J. Nelson, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron, P.E.Z. Larson, A.L. Harzstark, M. Ferrone, M. van Criekinge, J.W. Chang, R. Bok, I. Park, G. Reed, L. Carvajal, E.J. Small, P. Munster, V.K. Weinberg, J.H. Ardenkjaer-Larsen, A.P. Chen, R.E. Hurd, L.-I. Odegardstuen, F.J. Robb, J. Tropp, and J.A. Murray. Metabolic imaging of patients with prostate cancer using hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate. *Sci. Transl. Med.*, 5(128)(198ra108), 2013.
- [68] Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs, Mary C. Sugden, Mark J. Holness, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 284, 855-862, 2003
- [69] M.A. Schroeder, H.J. Atherton, L.C. Heather, J.L. Griffin, K. Clarke, G.K. Radda, and D.J. Tyler. Determining the in vivo regulation of cardiac pyruvate dehydrogenase based on label ux from hyperpolarised [1-<sup>13</sup>C]pyruvate. *NMR Biomed.*, 24(8):980-987, 2011.
- [70] L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori, F. Wiesinger, V. Lionetti, G. Giovannetti, G.D. Aquaro, F.A. Recchia, J.H. Ardenkjaer-Larsen, M.F. Santarelli, and M. Lombardi. Assessment of real-time myocardial uptake and enzymatic conversion of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate in pigs using slice selective magnetic resonance spectroscopy. *Contrast Media Mol. Imaging*, 7:85-94, 2012.
- [71] M.A. Schroeder, H.J. Atherton, D.R. Ball, M.A. Cole, L.C. Heather, J.L. Griffin, K. Clarke, G.K. Radda, and D.J. Tyler. Real-time assessment of krebs cycle metabolism using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy. *FASEB J.*, 23:2529-2538, 2009.
- [72] M.A. Schroeder, H.J. Atherton, M.S. Dodd, P. Lee, L.E. Cochlin, G.K. Radda, K. Clarke, and D.J. Tyler. The cycling of acetyl-coa through acetylcarnitine buffers cardiac substrate supply: A hyperpolarised <sup>13</sup>C magnetic resonance study. *Circ. Cardiovasc. Imaging*, 5(2):201-209, 2012.
- [73] M.A. Schroeder, L.E. Cochlin, L.C. Heather, K. Clarke, G.K. Radda, and D.J. Tyler. In vivo assessment of pyruvate dehydrogenase ux in the heart using hyperpolarized carbon-13 magnetic resonance. *PNAS*, 105(33):12051-12056, 2008.
- [74] M.E. Merritt, C. Harrison, C. Storey, A. Dean Sherry, and C.R. Malloy. Inhibition of carbohydrate oxidation during the first minute of reperfusion after brief ischemia: NMR detection of hyperpolarized <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> and H<sup>13</sup>CO. *Magn. Reson. Med.*, 60(5):1029-1036, 2008.
- [75] H.J. Atherton, M.S. Dodd, L.C. Heather, M.A. Schroeder, J.L. Griffin, G.K. Radda, K. Clarke, and D.J. Tyler. Role of pyruvate dehydrogenase inhibition in the development of hypertrophy in the hyperthyroid rat heart: A combined magnetic resonance imaging and hyperpolarized magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation*, 123:2551-2561, 2011.
- [76] H.J. Atherton, M.S. Dodd, C.A. Carr, D.J. Stuckey, K. Clarke, G.K. Radda, and D.J. Tyler. Investigating the metabolic effects of heart failure progression In Vivo using hyperpolarized magnetic resonance. In *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 18, 2010.
- [77] M.A. Schroeder, A.Z. Lau, A.P. Chen, Y. Gu, J. Nagendran, J. Barry, X. Hu, J.R.B. Dyck, D.J. Tyler, K. Clarke, K.A. Connelly, G.A. Wright, and C.H. Cunningham. Hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance reveals early- and late onset changes to in vivo pyruvate metabolism in the failing heart. *Eu. J. Heart Fail.*, 15:130-140, 2013.
- [78] K. Golman, J.S. Petersson, P. Magnusson, E. Johansson, P. Akeson, C.-M. Chai, G. Hansson, and S. Mansson. Cardiac metabolism measured noninvasively by hyperpolarized <sup>13</sup>C MRI *Magn. Reson. Med.*, 59(5):1005-1013, 2008.
- [79] K. Golman, J.H. Ardenkjaer-Larsen, J.S. Petersson, S. Mansson, and I. Leunbach. Molecular imaging with endogenous substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(18):10435-10439, 2003.
- [80] D.M. Spielman, D. Mayer, Y.-F. Yen, J. Tropp, R.E. Hurd, and A. Pfefferbaum. In vivo measurement of ethanol metabolism in the rat liver using magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate. *Magn. Reson. Med.*, 62:307-313, 2009.
- [81] T. Xu, D. Mayer, M. Gu, Y.-F. Yen, S. Josan, J. Tropp, A. Pfefferbaum, R. Hurd, and D. Spielman. Quantification of in vivo metabolic kinetics of hyperpolarized pyruvate in rat kidneys using dynamic <sup>13</sup>C mrsi. *NMR Biomed.*, 24:997-1005, 2011.
- [82] J.M. Park, S. Josan, T. Grafendorfer, Y.-F. Yen, R.E. Hurd, D.M. Spielman, and D. Mayer. Measuring mitochondrial metabolism in rat brain in vivo using MR spectroscopy of hyperpolarized [2-<sup>13</sup>C]pyruvate. *NMR Biomed.*, 26:1197-1203, 2013.
- [83] M. Mishkovsky, A. Comment, and R. Gruetter. In vivo detection of brain krebs cycle intermediate by hyperpolarized magnetic resonance. *J. Cereb. Blood Flow Met.*, 32:2108-2113, 2012.
- [84] Y.-F. Yen, K. Nagasawa, and T. Nakada. Promising applications of dynamic nuclear polarization for in vivo <sup>13</sup>C mr imaging. *Magn. Reson. Med. Sci.*, 10(4):211-217, 2011.
- [85] H.M. McConnell. Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, 28(3):430-431, 1958.
- [86] H.J. Atherton, M.A. Schroeder, M.S. Dodd, L.C. Heather, E.E. Carter, L.E. Cochlin, S. Nagel, N.R. Sibson, G.K. Radda, K. Clarke, and D.J. Tyler. Validation of the in vivo assessment of pyruvate dehydrogenase activity using hyperpolarised <sup>13</sup>C MRS. *NMR Biomed.*, 24(2):201-208, 2011.

- [87] S.M. Kazan, S. Reynolds, A. Kennerley, E. Wholey, J.E. Blu\_, J. Berwick, V.J. Cunningham, M.N. Paley, and G.M. Tozer. Kinetic modeling of hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  pyruvate metabolism in tumors using a measured arterial input function. *Magn. Reson. Med.*, 70(4):943-953, 2013.
- [88] M. Rausch, K. Sche\_er, M. Rudin, and E.W. Radu. Analysis of input functions from different arterial branches with gamma variate functions and cluster analysis for quantitative blood volume measurements. *Magn. Reson. Imag.*, 18:1235-1243, 2000.
- [89] S. Reynolds, S. Kazan, J. Blu\_, M. Port, E. Wholey, G. Tozer, and M. Paley. Fully mr-compatible syringe pump for the controllable injection of hyperpolarized substrate in animals. *Appl. Magn. Reson.*, 43(1-2):263-273, 2012.
- [90] R.E. Hurd, Y.-F. Yen, J. Tropp, A. Pfefferbaum, D.M. Spielman, and D. Mayer. Cerebral dynamics and metabolism of hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate using time-resolved mr spectroscopic imaging. *J. Cereb. Blood Flow Met.*, 30:1734-1741, 2010.
- [91] Lufang Zhou , Marco E. Cabrera , Isidore C. Okere , Naveen Sharma , William C. Stanley, Regulation of myocardial substrate metabolism during increased energy expenditure: insights from computational studies, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* Published 1 September 2006 Vol. 291 no. H1036-H1046 DOI: 10.1152/ajpheart.01382.
- [92] 2005 W.C. Stanley, F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.*, 85:1093-1129, 2005.
- [93] R.T. Mallet, J. Sun, E.M. Knott, A.B. Sharma, and A.H. Olivencia-Yurvati. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. *Exp. Biol. Med.*, 230:435-443, 2005.
- [94] R.T. Mallet. Pyruvate: metabolic protector of cardiac performance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 223:136-148, 2000.
- [95] A.E. Jeukendrup. Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 967:217-235, 2002
- [96] F.B. Stephens, D. Constantin-Teodosiu, and P.L. Greenha\_. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J. Physiol.*, 581(2):431-444, 2007.
- [97] M. Calvani, E. Reda, and E. Arrigoni-Martelli. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic. Res. Cardiol.*, 95:75-83, 2000.
- [98] J.H. Ardenkjaer-Larsen, A.M. Leach, N. Clarke, J. Urbahn, D. Anderson, and T.W. Skloss. Dynamic nuclear polarization polarizer for sterile use intent. *NMR Biomed.*, 24:927-932, 2011.
- [99] M.F. Santarelli, V. Positano, L. Menichetti, L. Landini, and L. Landini. Cardiovascular molecular imaging: New methodological strategies. *Curr. Pharm. Des.*, 19:2439-2446, 2013.
- [100] L.E. Hudsmith and S. Neubauer. Magnetic resonance spectroscopy in myocardial disease. *JACC: Cardiovasc. Imag.*, 2(2):87-96, 2009.
- [101] I.J. Day, J.C. Mitchell, M.J. Snowden, and A.L. Davis. Applications of dnp nmr for the measurement of heteronuclear  $T_1$  relaxation times. *J. Magn. Reson.*, 187:216-224, 2007.
- [102] L. Vanhamme, A. van den Boogaart, and S. Van Hu\_el. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J. Magn. Reson.*, 129:35-43, 1997.
- [103] M. Janssen and D. Graveron-Demilly. Help and Documentation for jMRUI, July 2006.
- [104] F. Wiesinger, E. Weidl, M.I. Menzel, M.A. Janich, O. Khagai, S.J. Glaser, A. Haase, M. Schwaiger, and R.F. Schulte. Ideal spiral csi for dynamic metabolic mr imaging of hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate. *Magn. Reson. Med.*, 68(1):8-16, 2012.
- [105] S.B. Reeder, J.H. Brittain, T.M. Grist, and Y.-F. Yen. Least-squares chemical shift separation for  $^{13}\text{C}$  metabolic imaging. *J. Magn. Reson. Imag.*, 26:1145-1152, 2007.
- [106] M.A. Janich, M.I. Menzel, F. Wiesinger, E. Weidl, O. Khagai, J.H. Ardenkjaer-Larsen, S.J. Glaser, A. Haase, R.F. Schulte, and M. Schwaiger. Effects of pyruvate dose on in vivo metabolism and quantification of hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  spectra. *NMR Biomed.*, 25(1):142-151, 2011.
- [107] J.M. Lupo, A.P. Chen, M.L. Zierhut, R.A. Bok, C.H. Cunningham, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron, and S.J. Nelson. Analysis of hyperpolarized dynamic  $^{13}\text{C}$  lactate imaging in a transgenic mouse model of prostate cancer. *Magn. Reson. Imag.*, 28:153-162, 2010
- [108] M.J.K. Blomley and P. Dawson. Bolus dynamics: theoretical and experimental aspects. *Br. J. Radiol.*, 70:351-359, 1997.
- [109] M.D. Cerqueira, N.J. Weissman, V. Dilsizian, A.K. Jacobs, S. Kaul, W.K. Laskey, D.J. Pennell, J.A. Rumberger, T. Ryan, M.S. Verani, American Heart Association, *Circulation*, 105(4):539-542, 2002.
- [110] V. Positano, M.F. Santarelli, F. Frijia, G.D. Aquaro, L. Menichetti, V. Lionetti, G. Bianchi, A. Flori, J.H. Ardenkjaer-Larsen, F. Wiesinger, R.F. Schulte, G. Giovannetti, F.A. Recchia, L. Landini, and M. Lombardi. Segmental analysis of cardiac metabolism by hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate: an in-vivo 3D MRI study in pigs. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, 14(Suppl.1):139-140, 2012.
- [111] G.D. Aquaro, F. Frijia, V. Positano, L. Menichetti, M.F. Santarelli, J.H. Ardenkjaer-Larsen, F. Wiesinger, V. Lionetti, S.L. Romano, G. Bianchi, D. Neglia, G. Giovannetti, R.F. Schulte, F.A. Recchia, L. Landini, and M. Lombardi. 3D CMR

mapping of metabolism by hyperpolarized  $^{13}\text{C}$ -pyruvate in ischemia-reperfusion. Letter to the editor of JACC, Cardiovascular Imaging, 2013. Vol. 6, No. 6.

[112] L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori, V. Lionetti, G. Giovannetti, J.H. Ardenkjaer-Larsen, G. Bianchi, S.L. Romano, M. Liserani, G.D. Aquaro, V. Positano, F.A. Recchia, L. Landini, M.F. Santarelli, and M. Lombardi.

Hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$  acetate for cardiac 3D MRI metabolic imaging in middle size animal models. In Proceedings of the 5<sup>th</sup> Annual Meeting WMIC, page 008, Dublin, Ireland, 2012.