



UNIVERSITÀ DI PISA

## Università degli Studi di Pisa

---

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali  
Corso di Laurea Magistrale in Fisica

Tesi di Laurea Magistrale

# Risonanza magnetica spettroscopica con [1-<sup>13</sup>C]acetato iperpolarizzato per lo studio del metabolismo cardiaco

Relatore

**Prof. Michele Emdin**

Candidato

**Matteo Liserani**



# Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi:

Prof. Michele Emdin, che mi ha fatto scoprire l'area della ricerca del CNR di Pisa e mi ha dato la possibilità di portare a termine questo lavoro;

Dott. Luca Menichetti, che mi ha sempre sostenuto e incoraggiato, anche quando ero convinto di non riuscire a produrre dei risultati decenti;

Dott.ssa Alessandra Flori, che ha condiviso con me molte giornate in laboratorio e si è fatta in quattro per aiutarmi;

Dott.ssa Francesca Frijia e tutti i componenti del gruppo del  $^{13}\text{C}$  della Fondazione G. Monasterio e dell'istituto di Fisiologia Clinica perchè hanno creduto in me e mi hanno aiutato nei momenti più difficili.

Un grazie particolare va anche a tutti coloro che ho incontrato nel mio percorso di studi in Facoltà e al CNR: grazie ai compagni di stanza, ai compagni di mensa, e a tutti coloro che in questi anni mi hanno regalato un sorriso, una battuta, un rimprovero quando c'era bisogno.

Infine, un ringraziamento speciale va ai miei genitori, che hanno avuto la pazienza di supportarmi e sopportarmi in questo lungo percorso, insieme a tutta la mia famiglia e ai miei amici, che mi hanno sempre fatto sentire apprezzato e importante.



# Abstract

Nell'ambito della risonanza magnetica per immagini alcune tecniche di incremento del segnale di magnetizzazione, definite di "iperpolarizzazione", hanno recentemente dimostrato un potenziale rilevante per la loro applicazione in un contesto clinico. La tecnica definita Polarizzazione Dinamica Nucleare (DNP) si basa sul trasferimento della polarizzazione tra spin elettronici e spin nucleari in un campione mantenuto a temperatura criogenica, in apposite condizioni di campo magnetico statico, mediante irraggiamento con microonde, sintonizzate ad una frequenza prossima a quella di risonanza dell'elettrone.

Negli ultimi anni l'iperpolarizzazione DNP di composti basati su eteronuclei quali  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ , realizzata mediante i primi sistemi di iperpolarizzazione, ha consentito di studiare il metabolismo cellulare in vivo in un organo intatto: oltre a visualizzare il segnale prodotto dal substrato iniettato, possono essere in questo modo rivelati anche i segnali spettroscopici dei prodotti di conversione. La molecola sinora più impiegata in studi sperimentali in vitro ed in vivo è l'acido piruvico, marcato con  $^{13}\text{C}$  in posizione 1 (e più recentemente in posizione 2), che presenta ottime proprietà vetrificanti a temperatura criogenica (condizione essenziale per un efficace processo di polarizzazione), e rappresenta un intermedio fondamentale nel meccanismo della glicolisi cellulare.

Oltre a questo composto sono stati utilizzati per studi in vivo molti altri substrati metabolici arricchiti in  $^{13}\text{C}$ . Nell'ambito di questo lavoro di Tesi è stato selezionato il  $^{13}\text{C}$ -acetato per il notevole interesse biochimico e metabolico: esso subisce infatti lo stesso processo di ossidazione degli acidi grassi a catena corta, e risulta quindi potenzialmente un tracciante ideale per lo studio dei processi metabolici complementari a quelli del piruvato ed in particolare per lo studio del metabolismo cardiaco. Il presente lavoro di Tesi si propone, dunque, di condurre la caratterizzazione fisico-chimica di alcune formulazioni basate su composti di  $^{13}\text{C}$ -acetato ed il loro impiego per lo sviluppo di tecniche di imaging spettroscopico. In particolare sono state studiate le proprietà di due tipologie di formulazione: tris(idrossimetil)amminometano- $^{13}\text{C}$ -acetato e Na- $^{13}\text{C}$ -acetato. Sono state esaminate le caratteristiche fisiche di queste formulazioni a stato solido in condizioni criogeniche e a stato liquido e sono state valutate le prestazioni di ciascuna preparazione in ter-

mini di livello di polarizzazione raggiunto e di tempo impiegato ad ottenere l'amplificazione del segnale DNP e la loro applicazione in vivo mediante la spettroscopia del  $^{13}\text{C}$ . E' stato quindi messo a punto un metodo per la preparazione di una dose idonea all'impiego nell'animale di grossa taglia (maiale) sfruttando un sistema di iperpolarizzazione commerciale. Sulla base della migliore formulazione ottenuta, e delle procedure sperimentali ottimizzate, è stato condotto uno studio di fattibilità in vivo nel maiale da esperimento, finalizzato alla localizzazione del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato nel tessuto miocardico, e alla corrispondente conversione nel prodotto metabolico  $[1-^{13}\text{C}]$ acetilcarnitina impiegando uno scanner clinico a 3 T. Con questo approccio, per mezzo di un modello cinetico apposito, che tiene conto anche delle equazioni di Bloch per il decadimento della magnetizzazione e della conversione apparente in vivo, sono state stimate le costanti di conversione enzimatiche nel tessuto. I diversi valori ottenuti per la costante sono stati impiegati come un indicatore delle condizioni fisiologiche dell'animale in un modello basale/stress indotto farmacologicamente nel maiale.

# Obiettivi del lavoro di Tesi

Nell' ambito del presente lavoro di Tesi viene messa a punto ed ottimizzata una procedura per la polarizzazione di miscele arricchite in  $^{13}\text{C}$  per l'impiego della Risonanza Magnetica Spettroscopica nell'animale di grossa taglia, usando come tracciante metabolico il  $[^{13}\text{C}]$ -acetato. Gli obiettivi specifici del lavoro di Tesi sono di seguito elencati:

- Caratterizzazione fisico chimica di diverse formulazioni di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato allo stato solido e allo stato liquido (analisi dello spettro DNP e messa a punto della formulazione ottimale);
- Scale-up della dose per lo studio in vivo su modello porcino;
- Messa a punto della procedura di Risonanza Magnetica Spettroscopica per l'acquisizione dei segnali metabolici e l'estrazione delle curve metaboliche di conversione di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato in  $[1-^{13}\text{C}]$ acetyl carnitina in vivo;
- Analisi della cinetica dell'agente di imaging iniettato e stima delle costanti di conversione enzimatiche apparenti.





# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Principi di Risonanza Magnetica . . . . .	1
1.2	Iperpolarizzazione . . . . .	5
1.2.1	Forza bruta . . . . .	5
1.2.2	Pompaggio ottico . . . . .	6
1.2.3	Polarizzazione indotta da paraidrogeno ( <i>PHIP</i> ) . . . . .	9
1.3	Polarizzazione Dinamica Nucleare ( <i>DNP</i> ) . . . . .	12
1.3.1	Solid effect . . . . .	13
1.3.2	Cross effect . . . . .	14
1.3.3	Thermal mixing . . . . .	15
1.3.4	Spin diffusion . . . . .	16
1.3.5	DNP e rapida dissoluzione . . . . .	16
1.4	Applicazioni della Dissolution DNP . . . . .	19
1.4.1	Applicazioni in ambito oncologico . . . . .	21
1.4.2	Applicazioni in ambito neurologico . . . . .	23
1.4.3	Applicazioni in ambito cardiologico . . . . .	23
1.5	[ <sup>13</sup> C]Acetato: la via degli acidi grassi . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>27</b>
2.1	Strumentazione . . . . .	27
2.1.1	Polarizzatore e misure a stato solido . . . . .	27
2.1.2	Polarimetro e misure a stato liquido . . . . .	29
2.2	Formulazioni di [ <sup>13</sup> C]acetato iperpolarizzato . . . . .	30
2.2.1	Tris-[1- <sup>13</sup> C]acetato . . . . .	30
2.2.2	Na-[1- <sup>13</sup> C]acetato . . . . .	31
2.2.3	Mezzo di dissoluzione . . . . .	32
2.3	Misure in vivo . . . . .	32
2.3.1	Post processing . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Risultati ottenuti e discussione</b>	<b>35</b>
3.1	Misure a stato solido . . . . .	35
3.1.1	Calibrazioni . . . . .	37
3.1.2	Polarizzazione di large doses per studi in vivo . . . . .	37

3.1.3	Tris-[1- <sup>13</sup> C] acetato . . . . .	39
3.1.4	Na-[1- <sup>13</sup> C]acetato . . . . .	41
3.1.5	Spettri DNP: alcune considerazioni sulla fisica della DNP	46
3.1.6	Misura di $T_1$ a stato solido . . . . .	48
3.2	Misure a stato liquido . . . . .	49
3.3	Misure in vivo . . . . .	53
3.3.1	Confronto tra condizioni basali e sforzo indotto farmaco- logicamente . . . . .	59
	<b>Conclusioni</b>	<b>61</b>
	<b>A Misura del <math>T_1</math> a stato solido</b>	<b>65</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>71</b>
	<b>Lavori pubblicati</b>	<b>85</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Principi di Risonanza Magnetica: polarizzazione e rapporto segnale-rumore

La Risonanza Magnetica è una delle tecniche diagnostiche attualmente più utilizzate nella pratica clinica. Si tratta di una tecnica che permette di ottenere immagini con un'elevata risoluzione spaziale, e si basa sull'impiego di campi magnetici statici ed a radiofrequenza. Il principio della risonanza magnetica si basa sull'interazione di nuclei atomici con un campo magnetico esterno, e la grandezza fondamentale è lo spin nucleare, ( $I$ ). Vi sono nuclei che hanno spin uguale a zero, come ad esempio il  $^{12}\text{C}$  e  $^{16}\text{O}$ , e nuclei in cui la somma degli spin portati da protoni e neutroni dà un valore complessivo diverso da zero. Ad esempio l' $^1\text{H}$  ha un numero di spin  $I=1/2$  (in unità di  $\hbar$ , costante di Plank), come i nuclei di  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ , mentre i nuclei con  $I>1/2$  sono ad esempio  $^2\text{H}$  e  $^{14}\text{N}$  con  $I=1$ ,  $^7\text{Li}$  e  $^{11}\text{Be}$  con  $I=3/2$ , e così via. Per il fatto di possedere un valore di spin diverso da zero, tali nuclei possiedono un momento di dipolo magnetico dato dalla relazione:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (1.1)$$

dove  $\gamma$  è il fattore giromagnetico, grandezza caratteristica di ogni nucleo. Applicando un campo magnetico statico  $\vec{B}_0$  ad un dipolo magnetico, esso compirà un moto descritto dall'equazione:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \wedge \vec{B}_0 \quad (1.2)$$

Questa relazione individua un moto di precessione del momento di dipolo magnetico attorno alla direzione di  $\vec{B}_0$  con una frequenza, detta di Larmor, pari a

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (1.3)$$

Per campi comunemente utilizzati in clinica (1.5 T e 3 T) la frequenza di Larmor del protone, del  $^{13}\text{C}$  e degli altri nuclei citati in precedenza ricade nel

range delle radiofrequenze. Secondo un modello quantistico, uno spin sottoposto a campo magnetico, per via dell'effetto Zeeman, può assumere  $2I + 1$  livelli di energia, dati dai possibili valori  $I_z$  ( $I_z = I, I_z = I - 1, \dots, I_z = -I$ ). Se ci limitiamo al caso di  $I = 1/2$ , un nucleo sottoposto a campo magnetico ha solo due possibili livelli energetici. Classicamente questa proprietà corrisponde a due sole possibili orientazioni del dipolo magnetico rispetto al campo applicato: una parallela al campo, l'altra antiparallela. Un sistema di spin  $1/2$  sottoposti ad un campo magnetico statico avrà dunque al suo interno una parte della popolazione di spin orientata in maniera antiparallela (corrispondente al livello energetico più alto) e l'altra parte orientata in maniera parallela (corrispondente al livello di energia più basso). Il numero degli spin che si dispongono sui due livelli è dato dal modello statistico di Boltzmann:

$$\frac{N_2}{N_1} = \exp^{-\frac{\hbar\gamma B_0}{2kT}}, \quad (1.4)$$

dove  $T$  è la temperatura del sistema,  $k$  è la costante di Boltzmann, e  $N_1, N_2$  sono i corrispondenti numeri della popolazione dei sottolivelli magnetici. In condizioni di equilibrio termico, la popolazione dei nuclei nei due livelli energetici è diversa e quindi si ottiene una prevalenza di spin orientati in una certa direzione rispetto all'altra. Nel caso dell'idrogeno e del  $^{13}\text{C}$  si ha una prevalenza di spin orientati parallelamente al campo applicato, e di conseguenza è possibile rilevare un vettore magnetizzazione, somma vettoriale dei singoli momenti magnetici. La differenza di energia tra i due livelli è molto piccola, quindi la magnetizzazione sarà anch'essa molto piccola (dell'ordine di 10 ppm a 1.5 T).

La tecnica di risonanza magnetica si basa essenzialmente sulla perturbazione e sull'osservazione del successivo ripristino di questo equilibrio termico. La perturbazione avviene applicando un campo magnetico, generalmente definito  $\vec{B}_1$ , oscillante alla frequenza di risonanza della transizione tra i livelli energetici (pari alla frequenza di Larmor del nucleo di interesse). Visto da un sistema di riferimento rotante alla frequenza di Larmor del nucleo, e supposto di avere orientato il campo  $\vec{B}_0$  in direzione  $+z$ , questo corrisponde a spostare la magnetizzazione  $\vec{M}$  dall'asse  $z$  al piano  $x-y$ . Una volta rimosso il campo  $\vec{B}_1$ , le popolazioni degli spin nucleari tenderanno a ristabilirsi secondo la condizione di equilibrio termico (1.4), ossia classicamente la magnetizzazione  $\vec{M}$  comincerà a precedere intorno all'asse  $z$  fino a tornare parallela a  $z$ . Vi sono due grandezze caratteristiche che descrivono il ripristino dell'equilibrio termico una volta cessata la perturbazione (campo  $\vec{B}_1$ ). La prima è il cosiddetto *tempo di rilassamento spin-reticolo* o *longitudinale*, chiamato anche  $T_1$ , che è la costante di tempo con cui la magnetizzazione, vista dal sistema rotante, torna ad essere allineata all'asse  $z$ ; microscopicamente questo avviene grazie a scambi termici degli spin eccitati con il reticolo in cui sono immersi. La seconda è il cosiddetto *tempo di rilassamento spin-spin* o *trasversale*, chiamato anche  $T_2$ , che rappresenta invece la costante di tempo

con cui si ha l'annullamento della magnetizzazione sul piano x-y. Questo avviene perché a livello microscopico si ha uno scambio di energia tra gli spin eccitati, e di conseguenza si produce uno sfasamento nel loro moto di precessione, che, se si osserva il sistema da un riferimento rotante, porta alla perdita della magnetizzazione sul piano orizzontale. Generalmente questo secondo processo è più veloce del primo, per cui si ha che  $T_2 < T_1$ . Locali effetti di disomogeneità del campo magnetico possono portare ad uno sfasamento più veloce degli spin: di questo effetto si tiene conto definendo una costante di tempo, il  $T_2^*$ :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \quad (1.5)$$

Il  $T_2^*$  tiene conto sia del defasamento dovuto al  $T_2$  sia degli effetti di disomogeneità del campo descritti nella costante  $T_2'$ .

L'osservazione del recupero della magnetizzazione verso il valore previsto dall'equilibrio termico viene dunque effettuato misurando il segnale sul piano trasverso una volta che la perturbazione è cessata, grazie ad una bobina a radiofrequenza posta in direzione perpendicolare sia a  $\vec{B}_0$  che a  $\vec{B}_1$ . Si tratta di un segnale che ha la forma caratteristica di un *FID*, cioè di un segnale oscillante alla frequenza di Larmor del nucleo smorzato secondo una legge esponenziale con costante di tempo  $T_2^*$ .

Definito quindi il principio di funzionamento della risonanza magnetica, resta da chiarire come viene costruita un'immagine. Si può ottenere una calibrazione spaziale a partire dal FID applicando i gradienti, cioè si varia il campo linearmente nello spazio nelle tre direzioni, cosicché i nuclei situati in diverse regioni risuonano a frequenza leggermente diversa e sono quindi identificabili. In questo modo con una trasformata di Fourier del segnale acquisito è possibile valutare il peso di ogni singola frequenza e quindi costruire una mappa spaziale del segnale. Su questa base, vengono costruiti opportuni protocolli definiti *sequenze*, che contengono la successione degli impulsi e dei gradienti da applicare per costruire una particolare immagine. All'interno di una *sequenza* molti parametri tipici possono essere variati. I più importanti sono il *flip angle*, che rappresenta macroscopicamente di quanti gradi spostiamo il vettore magnetizzazione dall'asse z, ed è direttamente proporzionale all'intensità del  $B_1$  e al tempo di applicazione dell'impulso (di solito ms), il *field of view* (FOV), la larghezza di banda e la forma dell'impulso in frequenza, il tempo di ripetizione della sequenza (*TR*), ed eventualmente il *TE*, che in sequenze che prevedono il refocusing degli spin sul piano x-y rappresenta l'inizio della lettura del segnale.

Oltre che per la realizzazione di immagini anatomiche, la risonanza magnetica può essere utilizzata per fare misure di spettroscopia. Il principio di funzionamento della *risonanza magnetica spettroscopica* (*RMS*) si basa sul fatto che ogni nucleo avverte un campo magnetico leggermente diverso a seconda del suo intorno chimico. Questo è dovuto al cosiddetto effetto di

schermo o di shielding: il campo  $\vec{B}_0$  induce a livello microscopico delle correnti elettroniche che si oppongono al campo stesso, attenuando in tal modo il campo realmente sperimentato dai vari nuclei. L'intensità del campo locale effettivamente percepito da un nucleo può essere scritta come

$$B_{eff} = B_0(1 - \sigma) , \quad (1.6)$$

dove il parametro  $\sigma$  è definito *costante di shielding*, ed è caratteristico dei diversi intorni chimici. I nuclei, anche della stessa specie, che hanno un intorno chimico diverso risuonano quindi a frequenze leggermente diverse e possono quindi essere identificati dalle varie componenti in frequenza del segnale. In risonanza magnetica spettroscopica si definisce per comodità la grandezza *chemical shift*, che è una unità adimensionale indipendente dal campo  $\vec{B}_0$  applicato:

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_r}{\nu_r} \times 10^6 . \quad (1.7)$$

Questa grandezza viene espressa in *parti per milione (ppm)*, e rappresenta lo scostamento in frequenza tra il nucleo di interesse e lo stesso nucleo nella molecola di tetrametilsilano (*TMS*) [1], allo stesso campo magnetico. Per convenzione il chemical shift è definito negativo se il nucleo di interesse risuona a frequenza più bassa del riferimento.

Naturale evoluzione delle tecniche spettroscopiche è il cosiddetto *chemical shift imaging*. In questo caso si combinano imaging anatomico tradizionale e spettroscopia: utilizzando particolari sequenze di impulsi è possibile suddividere il campo di vista in una matrice di elementi (*voxel*) e ottenere segnali spettroscopici simultaneamente da ognuno di essi. Questa matrice di spettri può essere sovrapposta all'immagine protonica anatomica. Questa tecnica è molto utile soprattutto per quantificare composti endogeni, ad esempio i metaboliti presenti in una determinato volume di interesse di un organo selezionato [2].

Il grande svantaggio di fondo dei vari ambiti della risonanza magnetica è che questa è una tecnica con *SNR* intrinsecamente basso. Si può dimostare che [3]

$$SNR \propto \gamma c P \quad (1.8)$$

in cui  $c$  è la concentrazione del nucleo di interesse e  $P$  è la cosiddetta *polarizzazione*, cioè la differenza percentuale tra spin orientati parallelamente e antiparallelamente al campo  $\vec{B}_0$ . Per nuclei di spin 1/2 il valore della polarizzazione dipende dalla temperatura e dal campo applicato secondo la legge di Brillouin [3]

$$P = \tanh\left(\frac{\gamma \hbar B_0}{2kT}\right) . \quad (1.9)$$

A temperatura ambiente e a campo pari a 1.5 T il valore di  $P$  per l'idrogeno è dell'ordine di  $10^{-5}$ , cioè la differenza tra il numero di nuclei nelle due orientazioni è di circa 10 ppm (10 nuclei su un milione [4]). Vista la relazione

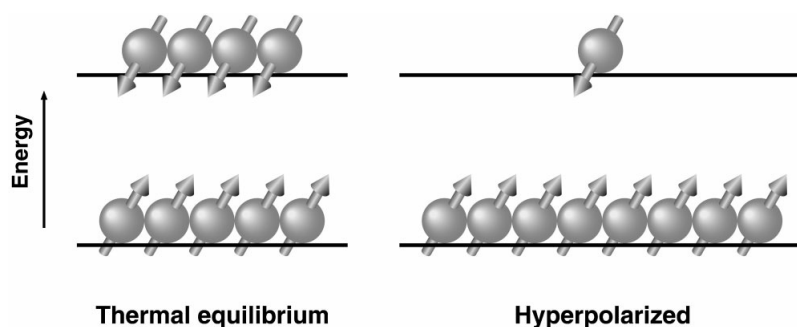


Figura 1.1: Rappresentazione schematica della orientazione dei nuclei all'equilibrio termico e nello stato iperpolarizzato.

(1.8), quello che fa sì che l'idrogeno sia il nucleo cardine della risonanza magnetica è la sua elevata abbondanza all'interno del corpo umano. Il corpo umano è costituito principalmente di acqua, proteine e grassi che contengono un elevato numero di atomi di idrogeno. Altri nuclei interessanti, come ad esempio il  $^{13}\text{C}$  o il  $^{31}\text{P}$ , sono caratterizzati da un segnale inferiore rispetto a  $^1\text{H}$  a causa del minore valore del fattore giromagnetico (rispettivamente pari a circa  $1/4$  e  $1/5$  di quello dell'idrogeno) e della scarsa abbondanza isotopica all'interno del corpo umano.

## 1.2 Iperpolarizzazione

Al fine di migliorare il valore di SNR nelle applicazioni spettroscopiche, nel corso degli anni sono state messe a punto alcune tecniche in grado di elevare il valore di polarizzazione. Questi approcci realizzano una condizione di non-equilibrio in cui il valore della polarizzazione non corrisponde a quello dettato dalla legge di Boltzmann, ma può essere aumentato anche di svariati ordini di grandezza [3]. Queste tecniche, soprattutto negli ultimi quindici anni, hanno dato un notevole impulso a studi di spettroscopia con nuclei diversi dall'idrogeno, superando in questo modo il limite del valore inferiore del fattore giromagnetico. Esempi dei nuclei impiegati sono  $^{129}\text{Xe}$  e  $^3\text{He}$  [5],  $^{13}\text{C}$  [6],  $^{15}\text{N}$  [7],  $^6\text{Li}$  [8].

### 1.2.1 Forza bruta

La tecnica prevede l'esposizione del campione ad un campo magnetico  $B_0$  di elevata intensità e a temperatura di frazioni di grado kelvin: data l'equazione della polarizzazione di Boltzmann (1.4), gli spin nucleari acquisiranno dopo un certo tempo una polarizzazione dettata dal nuovo equilibrio termico. Questa tecnica è stata messa a punto per la polarizzazione di gas nobili:

in [9] è messa a punto una procedura di polarizzazione di  $^3\text{He}$  allo stato solido a temperatura prossima al mK e campo 15 T, seguita da una successiva fusione e vaporizzazione ad una temperatura di circa 7 K, a cui conservare il gas iperpolarizzato prodotto; in [10] si valuta la polarizzazione dello  $^{129}\text{Xe}$  ottenuta mediante la solidificazione del gas ad un campo di 14.7 T e a temperatura dell'ordine dei mK su una matrice di silicio. Il solido viene messo in contatto con  $^3\text{He}$  liquido che accelera il processo di polarizzazione aumentando il rilassamento dei nuclei dello  $^{129}\text{Xe}$  verso l'equilibrio termico con la temperatura di mK. Una volta che lo  $^{129}\text{Xe}$  è polarizzato, viene aggiunto  $^4\text{He}$  al sistema che istantaneamente smorza l'effetto del rilassamento, successivamente viene vaporizzato l'elio con un veloce riscaldamento e lo Xenon ottenuto può essere conservato alla temperatura dell'azoto liquido (77 K), ad un campo di 50 mT. Per via del lungo tempo di polarizzazione necessario (anche di diverse ore) e per la complessità dei dispositivi necessari le tecniche di forza bruta non hanno mai avuto impiego in ambito biomedico.

### 1.2.2 Pompaggio ottico

Questa tecnica permette la polarizzazione di gas nobili ( $^{129}\text{Xe}$ ) e sfrutta le proprietà elettroniche di alcuni elementi allo stato gassoso come i metalli alcalini (tipicamente Cs e Rb). Essi sono caratterizzati dalla disponibilità di un solo elettrone sul livello elettronico più alto. Tramite riscaldamento ad una temperatura di circa 160 °C, il metallo viene vaporizzato. Il vapore così ottenuto viene confinato in una zona in cui è presente un campo magnetico statico dell'ordine delle decine di gauss, e su di esso viene fatta incidere luce polarizzata circolarmente ( $\lambda=784.7\text{nm}$ ), che si propaga parallelamente al campo magnetico. Sfruttando le proprietà delle transizioni tra i livelli iperfini del vapore, è possibile forzare gli atomi in un ben preciso livello energetico  $F$  della struttura iperfine<sup>1</sup> [11]. La polarizzazione ottenuta viene quindi trasferita tramite collisioni atomiche o interazioni Wan Der Waals ad un gas nobile miscelato con i vapori del metallo, in genere  $^{129}\text{Xe}$ . Nella miscela viene di solito aggiunta una certa quantità di azoto per limitare i decadimenti tramite fluorescenza degli atomi del metallo e  $^4\text{He}$  per migliorare l'assorbimento della radiazione laser. La pressione dello  $^{129}\text{Xe}$  è tipicamente dell'ordine delle centinaia di torr. Una volta ottenuto lo  $^{129}\text{Xe}$  polarizzato, un rapido raffreddamento della camera consente di rimuovere tramite solidificazione il metallo alcalino, e successivamente il gas iperpolarizzato può essere conservato allo stato solido alla temperatura dell'azoto liquido (77 K) in ap-

<sup>1</sup>Per struttura iperfine si intende lo schema dei livelli energetici di un atomo prodotto dall'interazione degli spin nucleari con gli spin elettronici e il loro moto orbitale. Il parametro  $F$  è definito  $F = I + J$ , dove  $I$  è la somma dello spin nucleare e del momento angolare portato da ogni nucleone, mentre  $J$  è definito nello stesso modo per gli elettroni. Come per lo spin nucleare o elettronico, a partire dal valore di  $F$  si possono definire sottolivelli energetici caratterizzati dal numero quantico  $m_f$ , che può assumere valori compresi tra  $+F$  e  $-F$ .



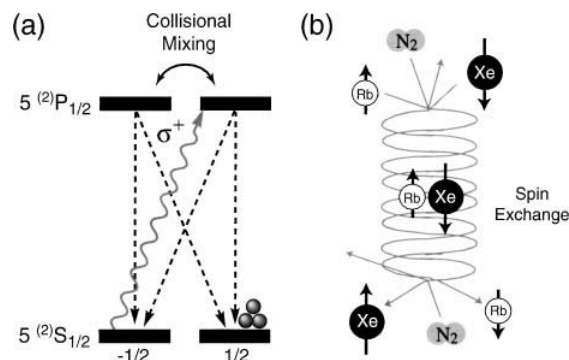


Figura 1.2: Schema della polarizzazione dello  $^{129}\text{Xe}$ . a) Polarizzazione di vapori di rubidio e b) successivo trasferimento della polarizzazione ai nuclei di  $^{129}\text{Xe}$  [5].

positi contenitori, sottoposto ad un campo magnetico di qualche centinaio di millitesla: in questo modo la costante di decadimento della polarizzazione può essere di svariati giorni [5],[12],[13].

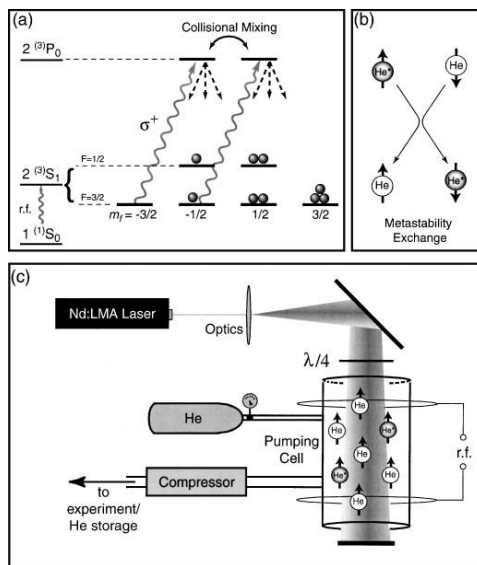


Figura 1.3: Schema della polarizzazione dell' $^3\text{He}$  tramite il metodo *metastability exchange* [5]. a) Livelli energetici coinvolti nella polarizzazione di  $^3\text{He}$  metastabile. b) Collisioni con atomi nello stato fondamentale che permettono la polarizzazione. c) Descrizione schematica dell'apparato sperimentale.

Anche il  $^3\text{He}$  può essere polarizzato mediante il metodo *metastability exchange* [5]. In pratica una piccola frazione di  $^3\text{He}$  (a pressione dell'ordine di qualche mbar) viene confinata in una camera in cui, analogamente al caso precedente, è presente un debole campo magnetico statico. Il gas viene quindi irraggiato con un campo a radiofrequenza che crea una frazione di atomi metastabili nello stato  $2^3S_1$ <sup>2</sup>. Tramite pompaggio ottico con una sorgente laser a  $\lambda = 1083$  nm, gli atomi così ottenuti che si trovano sui livelli della struttura iperfine con  $m_f = -3/2$  e  $m_f = -1/2$  sono forzati nello stato  $2^3P_0$ . Da esso possono decadere liberamente in uno dei quattro stati di  $2^3S_1$  con  $F = 3/2$ , ma gli stati con  $m_f = -3/2$  o  $m_f = -1/2$  vengono comunque depopolati dalla radiazione. Si ottiene quindi che gli atomi metastabili sono fortemente polarizzati, e tramite collisioni questa polarizzazione viene trasferita agli atomi nel ground state  $1^1S_0$ . Questo approccio è stato

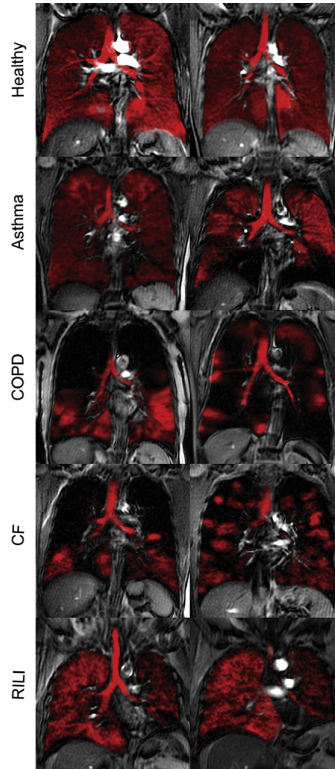


Figura 1.4: Imaging di  $^{129}\text{Xe}$  sovrapposto a immagini protoniche della zona polmonare di soggetti sani (Healthy), pazienti con asma (Asthma), broncopneupatia cronica ostruttiva (COPD), fibrosi cistica (CF), danno polmonare indotto da radiazioni (RILI) [15].

<sup>2</sup>In fisica atomica è consuetudine esprimere lo stato energetico di un atomo con la notazione  $n^{2S+1}L_J$ :  $n$  è il numero quantico principale,  $S$  identifica lo stato di spin elettronico,  $L$  identifica il momento angolare orbitale (può assumere valori compresi tra 0 e  $n - 1$ ) e  $J$  è la somma di  $S$  e  $L$ . Il termine  $2s + 1$  viene a volte omissso.

impiegato per la messa a punto di tecniche di imaging in vivo su animali e sull'uomo (Figura 1.4) [14]-[17]. In questo modo è stato possibile studiare la morfologia e la funzionalità polmonare tramite misure di diffusione alveolare [16]. Recentemente anche il  $^{83}\text{Kr}$  è stato impiegato per lo studio morfologico di tessuti polmonari espantati da ratto [18].

### 1.2.3 Polarizzazione indotta da paraidrogeno (*PHIP*)

Questa metodica si basa sull'uso di paraidrogeno, che è un particolare stato della molecola di idrogeno per cui la somma dei due spin nucleari è uguale a zero (cioè la somma dei due spin  $1/2$  dà luogo allo stato di singoletto). Lo stato di paraidrogeno è prevalente ad una temperatura inferiore a quella dell'azoto liquido. La tecnica prevede l'apposizione dei due protoni della molecola di paraidrogeno su un opportuno substrato organico mediante l'impiego di catalizzatori, generalmente basati su rubidio: in genere, si va a saturare nella molecola di partenza un doppio legame  $C=C$ , nelle vicinanze del quale è presente un nucleo di  $^{13}\text{C}$  o di  $^{15}\text{N}$ . A questo punto l'ordine derivante dallo stato di spin del paraidrogeno può essere trasferito al nucleo da polarizzare sfruttando gli accoppiamenti tra i due protoni e il nucleo marcato. Bowers e Weitekamp hanno dimostrato per primi la fattibilità di questo processo [19],[20]. Il trasferimento dell'ordine derivante dal paraidrogeno può avvenire mediante tecniche di field-cycling diabatico-adiabatico [21]: il substrato da polarizzare, una volta avvenuta l'idrogenazione, viene sottoposto inizialmente ad un campo magnetico dell'ordine delle decine di mT; successivamente si ha uno spegnimento veloce del campo magnetico seguito da una lenta (dell'ordine di alcuni minuti) riaccensione dello stesso. L'apparato deve essere progettato in maniera tale per cui la zona dove si raccoglie il substrato sia il più possibile schermata dal campo magnetico terrestre, in quanto è importante che nella fase di spegnimento l'intensità del campo sia quanto più possibile vicina a zero. Altre tecniche di trasferimento di polarizzazione dal paraidrogeno al substrato prevedono invece l'utilizzo di un campo statico e costante nel tempo (dell'ordine del mT) e una serie di impulsi rf con frequenza vicina a quella del protone [22].

Il principale vantaggio di questa tecnica è la possibilità di ottenere una elevata disponibilità di mezzo di contrasto iperpolarizzato in pochi minuti, a fronte però della scarsità di substrati metabolici polarizzabili con questa tecnica, a causa della mancanza di un doppio legame  $C=C$  da saturare. Ciononostante negli ultimi anni sono stati effettuati numerosi studi in vivo con l'utilizzo di molecole biologiche polarizzate con paraidrogeno. Nei primi studi è stata iniettata la soluzione iperpolarizzata così prodotta nel modello animale come puro mezzo di contrasto, andando ad acquisire in risonanza alla frequenza del nucleo iperpolarizzato: vengono in questo modo visualizzati gli organi in cui l'agente di imaging si localizza [3],[23],[24]. Successivamente, con l'uso del mezzo di contrasto  $^{13}\text{C}$  dietil-succinato in vivo

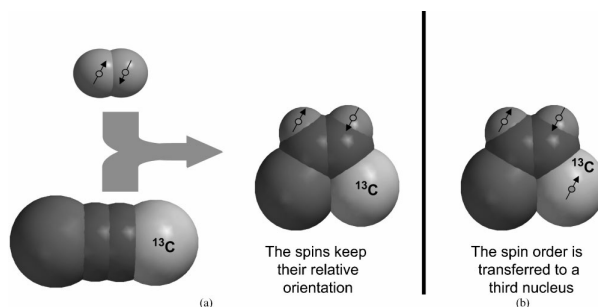


Figura 1.5: Rappresentazione schematica del processo di polarizzazione di una molecola contenente  $^{13}\text{C}$  tramite a) idrogenazione con paraidrogeno e b) successivo trasferimento dell'ordine di spin al nucleo di carbonio [3].

su topo si ha l'evidenza, attraverso la Risonanza Magnetica Spettroscopica, della conversione del substrato iniettato nei metaboliti successivi all'interno del ciclo di Krebs nel tessuto cerebrale [25]. Nello stesso studio è stato valutato il cambiamento del metabolismo indotto inibendo farmacologicamente l'enzima succinato-deidrogenasi, e si è valutata la localizzazione dei metaboliti mediante *chemical shift imaging* sul  $^{13}\text{C}$ . Recentemente è stata messa a punto una procedura per polarizzare composti in cui è presente un gruppo carbossilico come [ $^{13}\text{C}$ ]acido piruvico o [ $^{13}\text{C}$ ]acido acetico [26], e questo presumibilmente porterà ad uno sviluppo ulteriore della tecnica per applicazioni in vivo.

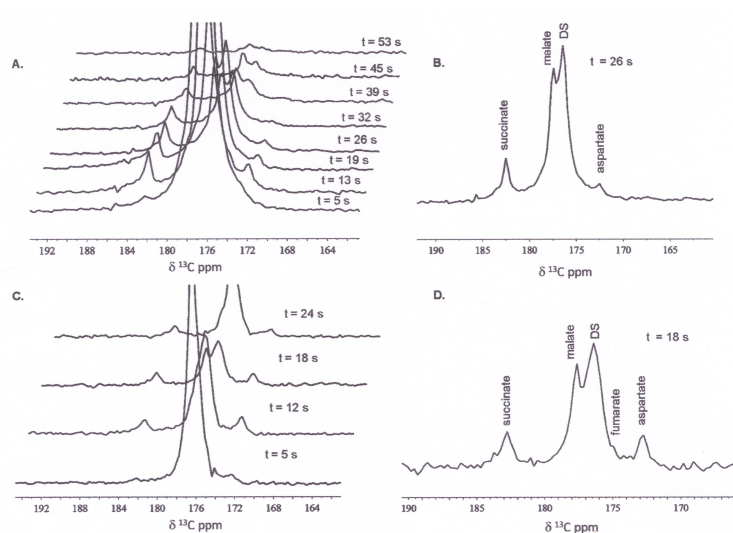


Figura 1.6: A),C) Spettri registrati in due animali diversi dopo l'iniezione di una soluzione di  $[^{13}\text{C}]$ dietil-succinato iperpolarizzato. I tempi indicati sono misurati a partire dal momento dell'iniezione. B),D) Particolare dello spettro acquisito al tempo indicato delle serie A) e C) rispettivamente, in cui si notano i diversi metaboliti [25].

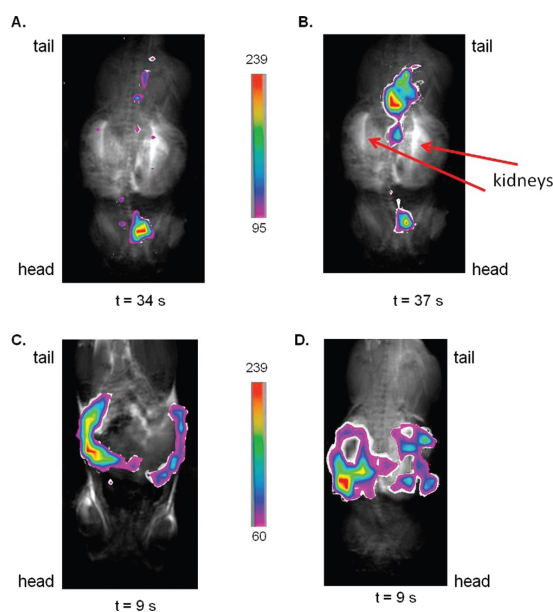


Figura 1.7: Imaging di  $[^{13}\text{C}]$ dietil-succinato iperpolarizzato in vivo su topo. Nelle figure A e B l'agente di imaging è iniettato dalla vena della coda, nelle immagini C e D direttamente intra-peritoneo. Ogni immagine rappresenta una diversa iniezione. I tempi riportati indicano quanti secondi sono trascorsi tra l'iniezione e l'imaging [25].

### 1.3 Polarizzazione Dinamica Nucleare (*DNP*)

La tecnica DNP è stata usata a partire dagli anni 50 del secolo scorso, inizialmente per la produzione di target polarizzati per esperimenti di fisica delle particelle [4],[27]-[29], e solo negli ultimi dieci anni ha trovato una applicazione in ambito biomedico. Questa tecnica permette di ottenere un significativo aumento della polarizzazione nucleare: nelle moderne applicazioni si possono ottenere valori di polarizzazione dell'ordine di  $10^4$  volte il valore dettato dalla statistica di Boltzmann [30]. Overhauser per primo nel 1953 teorizzò il possibile aumento della polarizzazione dei nuclei su metalli andando ad irraggiare il materiale con microonde sintonizzate sulla frequenza dell'elettrone [31], teoria confermata poi su litio metallico da Carver e Slichter [32]. Nel 1955 Abragam estese il concetto a sostanze diamagnetiche [33]. Da allora sono stati compiuti grandi progressi sia sul numero di molecole polarizzabili mediante questa tecnica sia sulla comprensione dei meccanismi microscopici per cui i nuclei diventano polarizzati.

Con questo approccio un materiale opportuno, drogato con impurezze paramagnetiche che forniscono elettroni spaiati (solitamente definite radicali), viene posto in una zona ad alto campo magnetico statico (generalmente  $> 3$  T) e temperatura dell'ordine del grado kelvin.

Uno spin elettronico ( $S = 1/2$ ) posto in un campo magnetico statico si comporta in maniera simile ad uno spin nucleare: anch'esso può assumere due possibili orientazioni, parallela o antiparallela. Anch'esso infatti è assimilabile ad un dipolo magnetico:

$$\vec{\mu}_e = \gamma_e \vec{S} , \quad (1.10)$$

dove  $\gamma_e$  è il fattore giromagnetico dell'elettrone, pari a

$$\gamma_e = -\frac{g_e \mu_B}{\hbar} , \quad (1.11)$$

nella quale  $g_e$  è una quantità adimensionale, pari circa a 2 per l'elettrone libero, e può variare leggermente a seconda dell'intorno chimico,  $\mu_B$  è il magnetone di Bohr. Quantisticamente vi sono due livelli di energia possibile per l'elettrone. La differenza principale con il caso nucleare consiste nel fatto che il momento magnetico dell'elettrone è molto più grande di quello del nucleone (ad esempio  $\mu_e = 660\mu_p$ ) [4]. Da ciò deriva che la polarizzazione degli elettroni è molto alta, pari a quasi l'unità, mentre i nuclei sono polarizzati in minima parte (circa 10 ppm per campi clinici). L'elevato grado di polarizzazione degli elettroni è trasferito ai nuclei attraverso un irraggiamento a microonde ad una frequenza vicina a quella di Larmor dell'elettrone. E' importante che il composto sia in uno stato amorfo (cioè privo di strutture cristalline) perché il trasferimento della polarizzazione sia efficace.

In letteratura sono riportati tre modelli diversi che spiegano il processo di polarizzazione dei nuclei. Ognuno di essi è valido condizioni diverse. In base alla

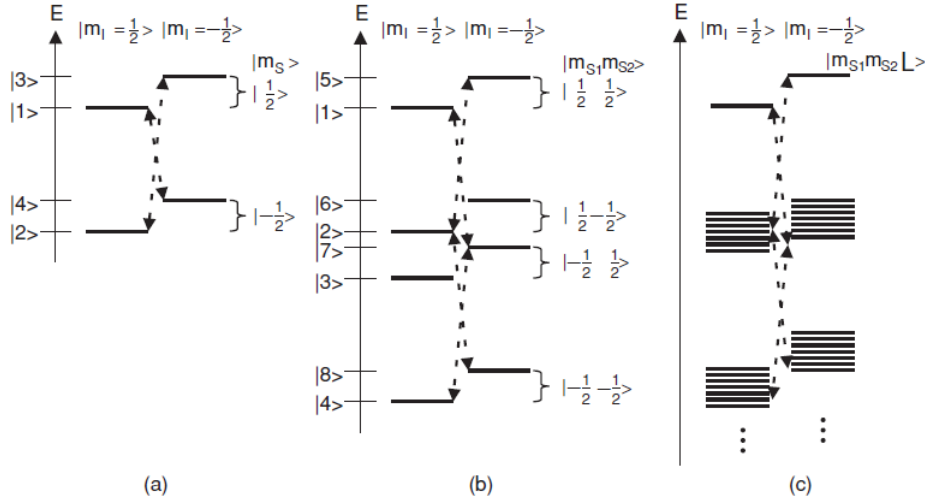


Figura 1.8: Schema dei livelli energetici di a) uno spin elettronico ( $S$ ) e uno spin nucleare ( $I$ ) nel processo di solid effect; b) due spin elettronici e uno spin nucleare nel processo di cross effect; c) un ensemble di spin elettronici e uno spin nucleare nel processo di thermal mixing. Le linee tratteggiate evidenziano le transizioni che vengono eccitate con l'irraggiamento a microonde. Si suppone che il fattore  $\gamma$  del nucleo sia maggiore di 0 [35].

larghezza della linea EPR dell'impurezza paramagnetica usata rispetto alla frequenza di Larmor del nucleo da polarizzare, si può schematizzare il processo come una interazione tra un singolo elettrone e un singolo nucleo (*solid effect*), una interazione tra due elettroni e un nucleo (*cross effect*), oppure una interazione globale tra elettroni e nuclei (*thermal mixing*) [34],[35]. Una rappresentazione schematica degli stati energetici esplorati e delle transizioni coinvolte nei tre processi di trasferimento della polarizzazione è riportata in figura (1.8).

### 1.3.1 Solid effect

Il modello del solid effect considera predominante l'interazione iperfine tra un singolo spin elettronico e un singolo spin nucleare rispetto agli accoppiamenti dipolari elettrone-elettrone. Attraverso questa interazione si ha un mixing tra il livello  $|1\rangle$  e il livello  $|3\rangle$  e tra il livello  $|2\rangle$  e il livello  $|4\rangle$  (figura 1.8a). Questo mixing rende possibile l'eccitazione delle transizioni *double quantum*, alla frequenza  $\nu_s - \nu_i$  (transizione  $|4\rangle \rightarrow |1\rangle$  in figura 8a), oppure *single quantum*, alla frequenza  $\nu_s + \nu_i$  (transizione  $|2\rangle \rightarrow |3\rangle$  in figura 1.8a), altrimenti proibite dalle regole di selezione della meccanica quantistica [27]. I massimi di polarizzazione in funzione della frequenza delle microonde applicate distano dunque tra loro  $2\nu_n$ .

Le interazioni con il reticolo fanno sì che l'elettrone rilassi più velocemente

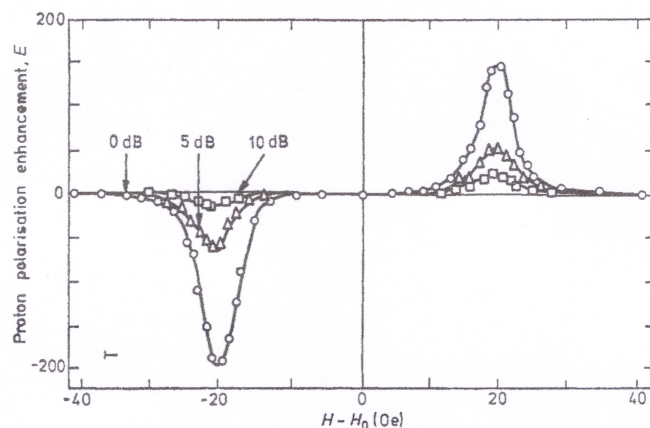


Figura 1.9: Profilo della polarizzazione di LMN:Nd<sup>3+</sup> al variare del campo magnetico (espresso come differenza tra la risonanza elettronica e campo applicato), con irraggiamento a microonde di  $\lambda = 4$  mm, con diversi valore di attenuazione (*db*). Si noti l'equidistanza dei massimi della polarizzazione dallo zero [27].

di quanto possa fare il nucleo (di un ordine di  $10^6$  volte [27]), e quindi in definitiva questo elettrone può essere usato per guidare una nuova transizione con un altro nucleo vicino. In questo modo è possibile forzare, almeno in principio, tutti i nuclei in una direzione fissata. In realtà questo non avviene perché vi sono comunque dei processi di rilassamento non descritti dalla semplice interazione elettrone-nucleo.

I primi studi di DNP a stato solido che hanno confermato la robustezza di questo modello sono stati effettuati su nitrato di lantano e magnesio ( $\text{La}_2\text{Mg}_3(\text{NO}_3)_{12} * 24\text{H}_2\text{O}$ , LMN) drogato con cerio [28] o neodimio[29]. I nuclei polarizzati erano i protoni dell'acqua di idratazione.

### 1.3.2 Cross effect

Pochi anni dopo gli esperimenti citati in precedenza, nuovi studi su polimeri plastici, principalmente polistirene e toluene, mettono in crisi il modello del solid effect [36],[37]: in particolare, gli autori si accorgono che nei materiali studiati i massimi di polarizzazione in funzione della frequenza di irraggiamento non sono spazati di due volte la frequenza di Larmor dell'idrogeno. Il modello proposto per spiegare questo risultato sperimentale è quello del cross effect, che consiste in un processo a tre spin. In figura (1.8b) è rappresentato lo schema dei livelli energetici di un sistema composto da due spin elettronici e uno spin nucleare. In presenza di allargamento della riga EPR dovuto ad anisotropie locali del fattore  $g$  (allargamento disomogeneo [35]), è possibile trovare due elettroni accoppiati tra loro con interazione dipolare.



Essi hanno una frequenza di Larmor leggermente diversa tra loro. Se vale

$$\nu_{s1} - \nu_{s2} = \nu_i , \quad (1.12)$$

dove  $\nu_{s1}$  e  $\nu_{s2}$  sono le frequenze di Larmor dei due elettroni e  $\nu_i$  è la frequenza di Larmor del nucleo, è possibile polarizzare i nuclei andando ad irraggiare con microonde ad una delle due frequenze elettroniche. In questo caso si ha in particolare la degenerazione dei livelli indicati con  $|2\rangle$  e  $|7\rangle$  nella figura (1.8b) [35].

Recentemente in letteratura sono riportati alcuni esperimenti in cui il materiale da polarizzare viene dopato con un cosiddetto *biradicale*, cioè con un radicale che contiene due elettroni spaiati che verificano automaticamente la condizione (1.12) [38],[39].

### 1.3.3 Thermal mixing

Nei casi in cui la concentrazione di impurezze paramagnetiche è più alta, e quindi le interazioni dipolari degli spin elettronici non possono essere trascurate, il modello di polarizzazione proposto in letteratura è il thermal mixing. In questo caso si ha un allargamento omogeneo della linea EPR [35] e quindi una interazione tra un ensemble di spin elettronici e uno spin nucleare. Come schematizzato in figura 1.8c, non è più possibile definire un sistema con dei livelli di energia discreti, ma piuttosto si ha un gruppo di stati quasi-continui.

Il processo DNP è spiegato in questa situazione attraverso una descrizione termodinamica [27],[40]. Si teorizza l'esistenza di un *sistema di interazione spin-spin elettronico*, con una propria temperatura  $T_{ss}$ , che, in assenza di processi di rilassamento, è indipendente dal sistema Zeeman e dal reticolo. Le popolazioni nelle varie bande sono descritte da una distribuzione di Boltzmann con le temperature  $T_{ss}$  e  $T_{Ze}$ , che sono la temperatura del sistema di interazione spin-spin elettronico e la temperatura del sistema Zeeman elettronico, rispettivamente. Solo all'equilibrio termodinamico, cioè senza irradiazione con microonde e dopo processi di rilassamento,  $T_{ss}$  e  $T_{Ze}$  sono identiche alla temperatura del reticolo  $T_L$ . Secondo questo modello di temperatura di Spin, la DNP consiste di due fasi.

- Raffreddamento del sistema spin-spin

Nella prima fase un quanto di energia  $h(\nu_e - \delta)$  viene assorbito dal campo di microonde. L'energia è divisa in due parti: una parte ( $h\nu_e$ ) viene utilizzata per modificare l'energia del sistema Zeeman elettronico e una parte ( $h\delta$ ) viene assorbita dal sistema di interazione spin-spin elettronico. L'applicazione delle microonde corrisponde nel riferimento rotante ad una riduzione del campo effettivo visto dagli elettroni, e quindi ad un raffreddamento del sistema Zeeman elettronico, secondo la legge

$$T_{Ze} = \frac{\delta}{2\pi\nu_e} T_L . \quad (1.13)$$

Contemporaneamente, essendo delta dell'ordine della larghezza EPR, si crea l'accoppiamento con il sistema di interazione spin-spin elettronico, che quindi si raffredda.

- Contatto termico tra il sistema di interazione spin-spin elettronico e il sistema Zeeman nucleare (*thermal mixing*)

Questo processo consiste nel flip flop di due spin elettronici, insieme ad un flip di uno spin nucleare. L'energia del sistema Zeeman elettronico rimane invariata, mentre quella del sistema Zeeman nucleare cambia di  $h\nu_n$ . In questo caso la conservazione dell'energia è garantita dal sistema di interazione spin spin elettronico, dato che questo meccanismo di rilassamento dovrebbe avvenire senza la partecipazione del reticolo. In tale processo vi è uno scambio di energia  $h\nu_n$  tra i due sistemi, e di conseguenza  $T_{ss}$  e  $T_{Z_n}$  diventano uguali. A questo punto, secondo la legge di Brillouin, diminuendo  $T_{Z_n}$  aumenta la polarizzazione dei nuclei. Nuovi studi teorici negli ultimi quattro anni hanno approfondito il ruolo dei tre meccanismi nella DNP, con lo sviluppo di modelli basati su Hamiltoniane di interazione tra spin elettronici e nucleari [35],[41]-[47].

### 1.3.4 Spin diffusion

Per tutti i processi appena esaminati un ruolo importante viene svolto dalla spin diffusion. Secondo il modello di Bloembergen e Abragam, i nuclei più vicini all'impurezza paramagnetica risentono di un campo locale prodotto dall'impurezza stessa, ed hanno quindi una frequenza di risonanza diversa dai nuclei più lontani. Questo comporta la creazione di una diffusion barrier, cioè una zona vicino all'impurezza paramagnetica entro la quale il nucleo è fortemente accoppiato con l'elettrone, e una zona esterna in cui i nuclei sono liberi di interagire tra loro: qui la polarizzazione viene trasportata attraverso mutue interazioni tra vicini, mediate dai nuclei che sono sul bordo della barriera. Si può trovare una relazione approssimata [48] che descrive il variare della polarizzazione nel tempo e nello spazio all'interno del materiale che viene polarizzato

$$-\frac{\partial p}{\partial t} = D\Delta p, \quad (1.14)$$

dove  $D$  è il coefficiente di diffusione (dell'ordine di  $Wa^2$ , con  $a$  distanza media tra gli spin nucleari e  $W$  probabilità di transizione flip-flop). Anche per questo aspetto, ancora non del tutto chiarito, sono stati sviluppati dei modelli numerici che tengono conto delle interazioni tra spin elettronici e nucleari, oltre che della loro densità e localizzazione nel sample [49].

### 1.3.5 DNP e rapida dissoluzione

Una ulteriore evoluzione della tecnica DNP per la polarizzazione di substrati di interesse biologico è stata messa a punto nei primi anni 2000: nel 2003

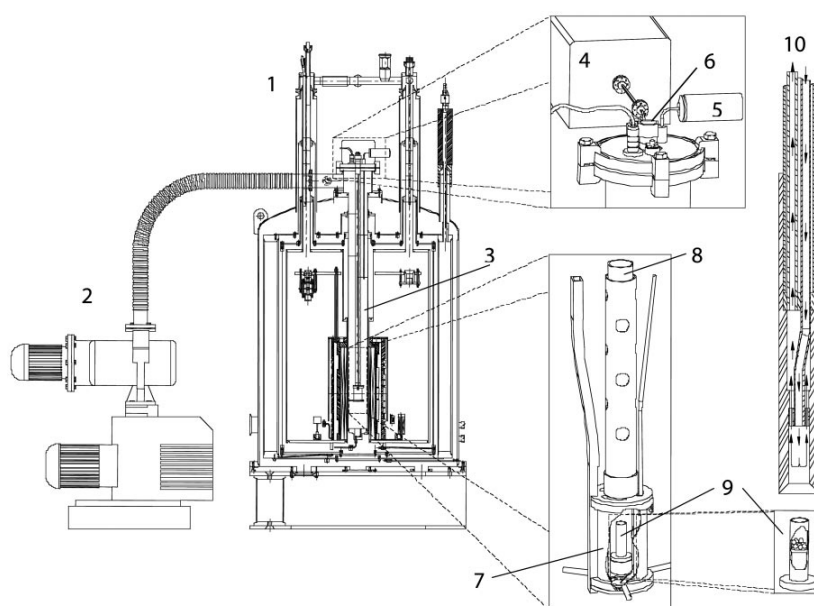


Figura 1.10: Rappresentazione schematica del primo prototipo di polarizzatore per dissolution-DNP [30]. 1: Polarizzatore 2: Sistema di pompaggio 3: Camera di polarizzazione 4: Generatore di microonde 5: Trasduttore (misuratore di pressione) 6: Foro di ingresso del campione 7: Camera di contenimento delle microonde 8: Portacampione 9: Contenitore del campione (nella zona di massima uniformità del campo) 10: Sistema di dissoluzione.

J. H. A. Larsen [30] mette a punto un sistema (HyperSense<sup>®</sup>, Oxford Instruments) in grado di polarizzare allo stato solido e a bassa temperatura un campione contenente composti metabolici arricchiti con  $^{13}\text{C}$  oppure  $^{15}\text{N}$ , e successivamente operare su di esso una dissoluzione con una opportuna soluzione riscaldata e pressurizzata in un tempo molto rapido, dell'ordine di pochi secondi. Si ottiene in questo modo una soluzione a temperatura ambiente. La tecnica viene definita per questo *Dissolution DNP*.

Il polarizzatore consiste in un magnete superconduttore caricato a 3.35 T, con annesso criostato (Magnex, Oxford). Il magnete è dotato di 8 bobine di shimmiing per migliorare l'uniformità del campo (0.1 ppm in un cilindro di diametro 10 cm e altezza 10 cm). Il criostato è stato modificato in modo tale da ricavare un alloggiamento per un tubo di acciaio inossidabile di diametro 70 mm, con parete spessa 0.01 pollici. Il tubo termina con uno scambiatore di calore in rame, collegato ad un dewar di elio liquido da un capillare. Questo sistema costituisce la camera di polarizzazione (figura 1.10). Il flusso di elio è gestito da una valvola a spillo controllata dall'esterno. La camera di polarizzazione è a contatto termico con un dewar di azoto liquido. La distanza tra il centro del magnete e la flangia superiore è di 80 cm.

L'inserto DNP è costituito da un tubo in fibra di vetro, di diametro interno

18 mm, che guida il campione verso il centro del magnete, dove troviamo un cilindro metallico, di diametro 38 mm e altezza 50 mm. Questo serve a confinare le microonde, che giungono attraverso una guida d'onda. Le microonde entrano nel cilindro metallico attraverso un'apertura sul fianco. Dentro il contenitore metallico troviamo una coppia di bobine a sella per la misura del segnale NMR. Le bobine sono collegate ad una linea di trasmissione coassiale che termina con un circuito di tuning e matching. La circuiteria risuona alla frequenza di Larmor del  $^{13}\text{C}$  di 35.89 MHz a 3.35T. Il generatore di microonde ha una potenza massima di uscita 200 mW a 94 GHz, una gamma di sintonia di 500 MHz, e uno step di regolazione di 10 KHz. La potenza in uscita può essere attenuata in maniera continua fino a 60 dB.

Un trasduttore che si affaccia al di sotto dello schermo della radiazione misura la pressione di vapore dell'elio. L'afflusso di elio nella camera di polarizzazione è regolato automaticamente, il livello è controllato misurando la tensione su tre resistenze Allen Bradley da 100  $\Omega$ . Le resistenze sono attraversate sequenzialmente da una corrente definita, e viene misurata la tensione ai loro capi. I profili di tensione sono tipici della fase liquida e della fase gassosa dell'elio. Le tre resistenze sono poste 50 mm, 60 mm e 70 mm sopra il centro del magnete. Un motore passo-passo apre e chiude la valvola a spillo a seconda del livello di elio presente nell'inserito, livello che di solito è mantenuto tra la prima e la seconda resistenza (tipicamente al 55% della capienza massima della camera). La camera è accoppiata ad un sistema pompante in grado di mantenere una pressione di vapore dell'elio di 0.8 mbar, corrispondenti a ad una temperatura di 1.2 K, con le microonde accese. Il sistema può essere isolato dalla camera tramite la chiusura di una valvola a farfalla. La struttura del portacampione è costituita da un tubo di teflon disegnato per mantenere il campione in posizione nel campo magnetico e permetterne il sollevamento subito prima della dissoluzione. Da un'apertura nella camera di polarizzazione un'apposita capsula contenente una certa quantità di soluzione da iperpolarizzare viene caricata nel portacampione, che viene poi abbassato al centro del magnete. La camera viene sigillata con un setto di gomma, la pressione viene abbassata nel nostro caso a 2.8 mbar (valore di pressione dell'elio corrispondente alla temperatura di 1.4 K) e le microonde vengono accese.

Durante la polarizzazione il campione è immerso nell'elio liquido. Poco prima della dissoluzione, le microonde vengono spente, la camera di polarizzazione viene pressurizzata con elio e il campione viene sollevato di 10 cm dal centro del magnete (il campo in questo punto è circa 3 T) affinché rimanga fuori dall'elio liquido. Un piccolo serbatoio (capacità massima 12 ml) viene riempito con una soluzione acquosa. Il volume di soluzione inserito varia in base alle dimensioni del campione polarizzato. L'ambiente viene pressurizzato con elio fino a raggiungere una pressione di 10 bar e scaldato fino ad una temperatura di 200 °C. Il serbatoio è collegato ad un sistema di iniezione costituito da due tubi di Teflon aperti alle estremità contenuti in un tubo di

fibra di vetro. Uno dei due tubi pesca direttamente nel serbatoio. Il sistema viene inserito nella camera ermeticamente. La soluzione soprariscaldata è iniettata direttamente nel campione da uno dei due tubi. Il campione viene sciolto velocemente e la soluzione ottenuta viene recuperata in un piccolo contenitore di vetro all'esterno attraverso il secondo tubo.

Nel corso degli ultimi dieci anni sono stati sviluppati da diversi centri di ricerca altri modelli di polarizzatori per Dissolution-DNP, che si basano sul medesimo principio di funzionamento [50]-[52].

## 1.4 Applicazioni della Dissolution DNP

Molecola	Modello sperimentale	Ambito medico interessato	Fonti
$^{13}\text{C}$ ]HMCP	topo ratto	angiografia perfusione	[54] [60]
$^{13}\text{C}$ ]urea	ratto topo	angiografia, perfusione perfusione	[55] [59], [60]
$^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ]urea	ratto	angiografia	[56]
$^{13}\text{C}$ ]t-butanolo	ratto, topo	perfusione	[58],[60]
$^{5-13}\text{C}$ ]glutamina	ratto	oncologia	[65]
$^{1-13}\text{C}$ ]isocaproato	ratto topo	oncologia neurologia	[66] [79]
$^{1-13}\text{C}$ ]glutammato	topo	oncologia	[67]
$^{2-13}\text{C}$ ]fruttosio	topo	oncologia	[68]
$^{1-13}\text{C}$ ]DHA	topo	oncologia	[69]
$^{13}\text{C}$ ]bicarbonato	topo ratto	oncologia cardiologia	[70] [88]
$^{1,4-13}\text{C}_2$ ]fumarato	topo	oncologia	[73]
$^{[U-2\text{H}, U-13\text{C}]}$ glucosio	topo	oncologia	[74]
$^{5-13}\text{C}$ ]glutamina	cellule ex vivo	oncologia	[75]
$^{1-13}\text{C}$ ]etil-piruvato	ratto	neurologia	[76]
$^{1-13}\text{C}$ ]piruvato	ratto,topo,uomo  topo,ratto maiale	oncologia  neurologia cardiologia	[61]-[64] [71],[72] [77],[78] [81]-[87]
$^{2-13}\text{C}$ ]piruvato	ratto maiale	neurologia cardiologia	[78] [89],[90]
$^{1-13}\text{C}$ ]acetato	topo ratto	neurologia cardiologia	[96],[80] [97]-[100]

Tabella 1.1: Principali lavori pubblicati riguardanti studi in vivo con agenti metabolici arricchiti in  $^{13}\text{C}$ , polarizzati tramite DNP.

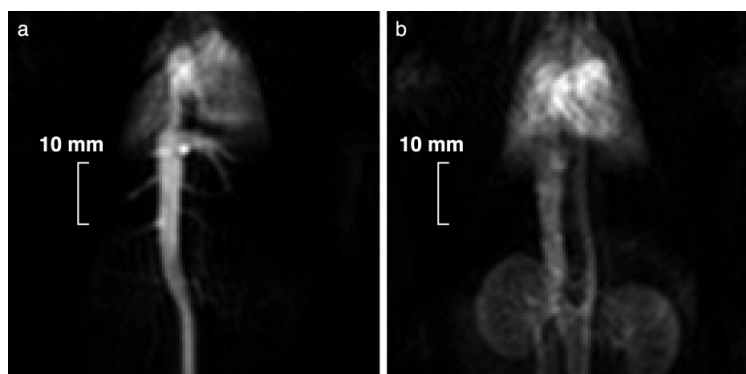


Figura 1.11: Imaging di  $[^{13}\text{C}]$ urea nel ratto, durante l'iniezione (a) e trascorsi 2 secondi (b). Si noti come aumenta il contrasto dell'intero sistema vascolare fino ad evidenziare la zona renale [55].

Dopo l'arrivo sul mercato dell'HyperSense<sup>®</sup> è stato possibile utilizzare dei probe isotopicamente arricchiti con  $^{13}\text{C}$  per studi biodinamici in vivo. Il numero di molecole che sono state polarizzate mediante DNP per questo scopo è estremamente vasto [53]: nella tabella (1.1) sono elencati gli studi più significativi effettuati in vivo.

In parte di questi, effettuati subito dopo la messa a punto del macchinario, si dimostra la possibilità di ottenere delle immagini angiografiche ad elevata risoluzione sfruttando l'iniezione di una soluzione iperpolarizzata su modello di piccolo animale. Mediante l'iniezione di un composto iperpolarizzato a base di  $[^{13}\text{C}]$ idrossimetil-ciclopropano (*HMCP*) nel topo, vengono effettuate una serie di acquisizioni angiografiche, in cui risulta ben evidente il sistema vascolare dell'animale nella zona dell'addome [54], mentre una soluzione di  $[^{13}\text{C}]$ urea iperpolarizzata è stata impiegata per fare imaging angiografico su ratto, ottenendo in pochi secondi delle immagini con elevato SNR del sistema vascolare e della zona renale [55]. Più recentemente è stato ripreso il concetto con uno studio di imaging con  $[^{13}\text{C}-^{15}\text{N}]$ urea iperpolarizzata [56]. L'arricchimento in  $^{15}\text{N}$  ha l'effetto di un aumento del valore del  $T_2$  della  $[^{13}\text{C}]$  urea, e questo permette agli autori di ottenere un migliore SNR nelle immagini acquisite. Inoltre in questo studio si evidenzia la possibilità di distinguere i diversi tessuti dal valore di  $T_2$  dell'urea iperpolarizzata che vi si localizza. Un altro lavoro del 2014 evidenzia per la prima volta la possibilità di fare imaging angiografico su ratto utilizzando l'idrogeno come nucleo iperpolarizzato: lo studio sfrutta l'iniezione in vivo di un bolo di acqua iperpolarizzata per esaltare il segnale proveniente dal sistema vascolare dell'animale [57].

I mezzi di contrasto iperpolarizzati offrono anche l'opportunità di generare mappe di perfusione, cioè immagini in cui l'intensità del segnale vascolare è direttamente proporzionale alla quantità di mezzo di contrasto perfuso nell'organo di interesse. Il  $[^{13}\text{C}]$ t-butanolo deuterato è stato usato come agente

di imaging per valutarne la diffusione a livello cerebrale su ratto [58], mentre  $[^{13}\text{C}]$ urea è stata impiegata per lo studio della perfusione epatica su ratti, valutando le differenze tra tessuto sano e tumore [59]. È stata dimostrata inoltre la possibilità di polarizzare una miscela contenente diverse molecole arricchite in  $^{13}\text{C}$ . Questo ha permesso di valutare contemporaneamente la perfusione cerebrale impiegando tre mezzi di contrasto diversi su modello murino in vivo con l'iniezione di una soluzione di  $[^{13}\text{C}]$ urea,  $[^{13}\text{C}]$ HMCP e  $[^{13}\text{C}]$ t-butanolo [60].

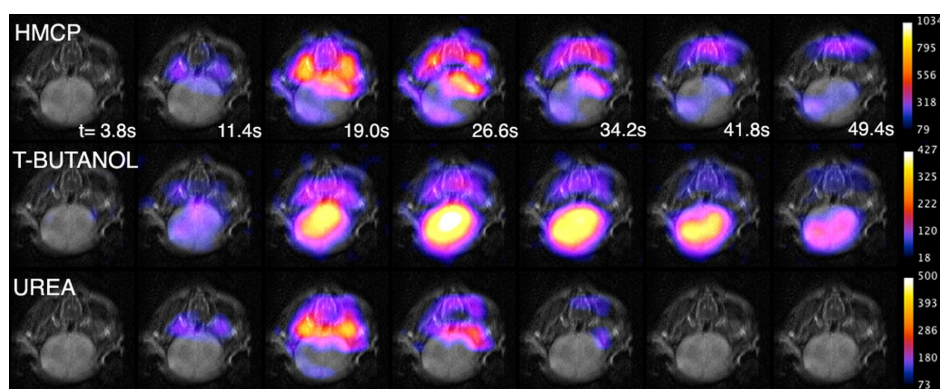


Figura 1.12:  $^{13}\text{C}$  imaging in vivo su tessuto cerebrale murino dopo l'iniezione di una soluzione contenente tre differenti molecole iperpolarizzate. Si noti la localizzazione del mezzo di contrasto t-butanolo all'interno dei tessuti cerebrali [60].

Tuttavia l'aspetto più innovativo è rappresentato dalla possibilità di condurre studi metabolici, cioè di stimare in modo dinamico e in vivo la localizzazione di un tracciante metabolico iperpolarizzato e la conversione nei suoi metaboliti nell'organo di interesse. Negli ultimi anni questa possibilità è stata sfruttata intensamente per studiare vari ambiti della medicina.

#### 1.4.1 Applicazioni in ambito oncologico

Mezzi di contrasto iperpolarizzati sono stati utilizzati più volte in esperimenti atti a identificare in vivo la presenza di lesioni tumorali. In particolare, vari studi su piccolo animale hanno evidenziato come la conversione da  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato in  $[1-^{13}\text{C}]$ lattato e in  $[1-^{13}\text{C}]$ alanina possa essere usata in vivo per evidenziare le sedi interessate dalla malattia [61]-[63]. Recentemente è stato pubblicato il primo (e finora unico) studio in vivo su esseri umani con l'utilizzo di mezzo di contrasto iperpolarizzato [64]. Nel lavoro, effettuato su volontari affetti da tumore alla prostata, tramite l'iniezione di  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato iperpolarizzato si è potuto confermare la presenza di ammassi tumorali prostatici o addirittura identificare piccole zone tumorali non rilevate con indagini radiologiche standard.

Anche altre molecole iperpolarizzate sono state impiegate per l'identificazione di lesioni tumorali: in studi con piccolo animale è stato dimostrato come la conversione di  $[5-^{13}\text{C}]$ glutamina in  $[5-^{13}\text{C}]$ glutammato avvenga solo nel tessuto epatico malato e non nel tessuto sano [65], mentre l'uso del tracciante 2-cheto- $[1-^{13}\text{C}]$ isocaproato dimostra come nei tessuti tumorali si abbia un incremento di sette volte della conversione in  $[^{13}\text{C}]$  leucina rispetto al tessuto sano [66]. Altri substrati metabolici arricchiti in  $^{13}\text{C}$  sono stati usati in studi in vivo su piccolo animale per il medesimo scopo. Tra questi troviamo ad esempio il  $[1-^{13}\text{C}]$ glutammato [67] e il  $[2-^{13}\text{C}]$ fruttosio [68] e il  $[1-^{13}\text{C}]$ deidroascorbato (*DHA*) [69].

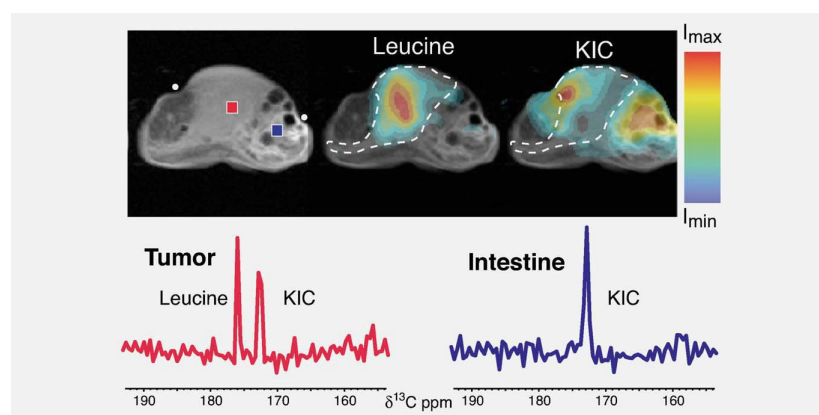


Figura 1.13: Imaging del  $[^{13}\text{C}]$ chetoisocaproato in vivo su topo: la conversione in  $[^{13}\text{C}]$ leucina avviene solo nel tessuto tumorale (delimitato da una linea tratteggiata nell'immagine anatomica)[66].

Un'altra applicazione dei mezzi di contrasto iperpolarizzati in oncologia è il calcolo del pH in vivo: grazie a questo tool particolare si possono individuare eventuali lesioni o aree malate. L'imaging del pH è stato effettuato dopo iniezione di  $[^{13}\text{C}]$ bicarbonato su un modello di linfoma murino [70]. Il pH viene calcolato voxel per voxel sulla base del rapporto tra i segnali del substrato iniettato e della  $^{13}\text{CO}_2$  prodotta. Nel lavoro si dimostra che il valore del pH calcolato nella zona di tessuto interessata dal tumore è minore rispetto ai tessuti sani, e questo permette di discriminare zone malate da zone sane.

Esperimenti in vivo con agenti di contrasto iperpolarizzati possono essere rivolti al monitoraggio della risposta del tumore alle terapie. Una ridotta produzione di  $[1-^{13}\text{C}]$ lattato a partire da  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato può essere usata come marcatore della risposta del tumore ad un farmaco antitumorale in un modello murino [71], oppure la risposta a dicloroacetato su modello di glioma di ratto [72], mentre il  $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ fumarato è stato impiegato come indicatore della necrosi cellulare valutando la conversione nel metabolita  $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ malato [73]: si riporta un aumento di 2.4 volte di questo metabolita per cellule tumorali trattate con etoposide rispetto a cellule non trattate. Per



valutare la risposta a terapia chemioterapica è stato effettuato uno studio con [U-<sup>2</sup>H, U-<sup>13</sup>C]glucosio: dopo l'iniezione in topi con un particolare tipo di linfoma, si è vista la formazione di lattato solo nel tessuto tumorale, e una sua netta diminuzione dopo 24 ore di trattamento con etoposide [74]. Infine, con la [5-<sup>13</sup>C]glutammina è stato possibile monitorare la risposta alle terapie di linee di cellule tumorali prostatiche [75].

#### 1.4.2 Applicazioni in ambito neurologico

In ambito neurologico l'impiego degli agenti di imaging iperpolarizzati ha trovato minore applicazione, anche a causa della lenta diffusione del substrato metabolico iniettato attraverso la barriera emato-encefalica. Il primo studio in cui si impiega un mezzo di contrasto iperpolarizzato è avvenuto nel 2010 su ratto [76]. Gli autori sono riusciti, tramite l'iniezione di [1-<sup>13</sup>C]etilpiruvato iperpolarizzato, a rilevare la conversione del metabolita iniettato in lattato per la prima volta in vivo dalla zona cerebrale. In uno studio successivo di imaging [77], dopo l'iniezione di [1-<sup>13</sup>C]piruvato iperpolarizzato, si rileva come il [1-<sup>13</sup>C]lattato sia localizzato in prevalenza nel tessuto cerebrale, a differenza del piruvato, che rimane in larga parte nei vasi sanguigni. Contemporaneamente un altro studio ha evidenziato la conversione di [1-<sup>13</sup>C]piruvato iperpolarizzato in [1-<sup>13</sup>C]lattato e in [<sup>13</sup>C]bicarbonato ad un livello tale da permettere la stima delle costanti enzimatiche di conversione in vivo su ratto, oltre a rilevare la conversione di [2-<sup>13</sup>C]piruvato in [2-<sup>13</sup>C]lattato [78]. Anche altri substrati metabolici iperpolarizzati come 2-keto[1-<sup>13</sup>C]isocaproato [79] e [1-<sup>13</sup>C]acetato [80] sono stati impiegati per lo studio di aspetti del metabolismo cerebrale in vivo su topo.

#### 1.4.3 Applicazioni in ambito cardiologico

Lo studio del metabolismo cardiaco è stato uno degli ambiti più investigati attraverso agenti di imaging iperpolarizzati. Normalmente il cuore utilizza acidi grassi, carboidrati e chetoni come substrati per la produzione di energia. Nelle malattie come cardiomiopatia, ipertensione o diabete, così come ischemie e infarti, si riscontra un alterato utilizzo di questi substrati. Con il [1-<sup>13</sup>C]piruvato si possono valutare cambiamenti metabolici indotti da ischemia e successiva riperfusione tramite Risonanza Magnetica Spettroscopica [81]-[83]. Nel cuore sano si osservano i metaboliti lattato, alanina, e soprattutto bicarbonato, che, essendo in equilibrio con la CO<sub>2</sub>, rappresenta il flusso attraverso l'enzima *piruvato deidrogenasi* (PDH), come riportato in figura (1.14). Tramite l'imaging spettroscopico [84]-[86] si possono localizzare i metaboliti, con il substrato iniettato che compare principalmente nelle camere, mentre il bicarbonato si manifesta nel miocardio, e il lattato più diffusamente nel muscolo ma anche nel sangue. Una diminuzione sensibile del segnale del bicarbonato subito dopo l'occlusione dimostra la compromissione

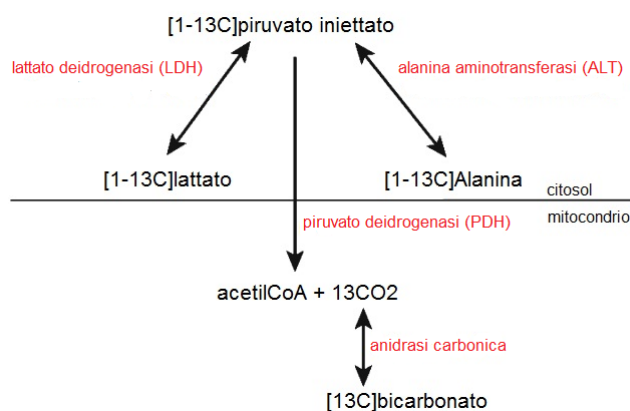


Figura 1.14: Schema dei processi di conversione del  $[1-^{13}\text{C}]$  piruvato nel citosol e nel mitocondrio. In rosso sono evidenziati gli enzimi coinvolti.

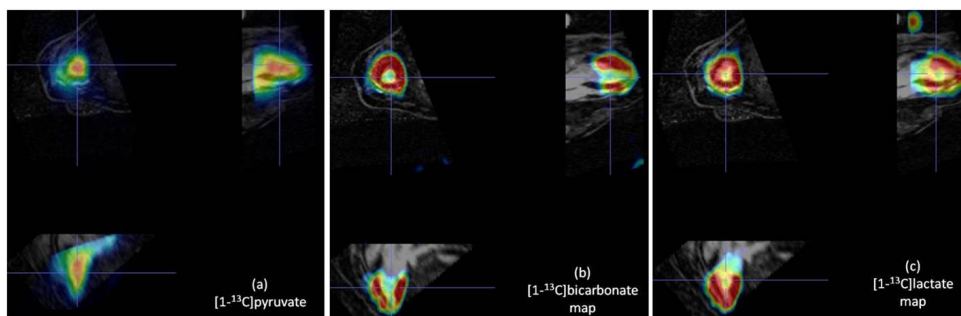


Figura 1.15: Distribuzione spaziale di a)  $[1-^{13}\text{C}]$ piruvato, b)  $[1-^{13}\text{C}]$ bicarbonato e c)  $[1-^{13}\text{C}]$ lattato su cuore porcino in vivo dopo iniezione in vivo di piruvato [86].

della via metabolica della PDH.

Con questi set up sperimentali sono stati effettuati anche studi di misura del pH in vivo [81],[87]; in uno studio su ratto viene usato per questo scopo il  $[^{13}\text{C}]$ bicarbonato iperpolarizzato [88]. L'utilizzo del  $[2-^{13}\text{C}]$ piruvato, prima nel cuore porcino perfuso [89] e poi direttamente in vivo [90], ha permesso di fare un ulteriore passo in avanti nello studio del metabolismo cardiaco, in quanto il carbonio in posizione 2 del piruvato entra direttamente nel ciclo di Krebs nell'acetil-CoA, invece di essere rilasciato come  $\text{CO}_2$ . Questo permette di valutare ad esempio cambiamenti nel flusso della PDH misurando la variazione del segnale del  $[5-^{13}\text{C}]$ glutammato tramite MRS, ad esempio nel modello di cardiomiopatia dilatativa. Mediante l'iniezione di piruvato marcato con  $^{13}\text{C}$  sia in posizione 1 che in posizione 2 si riesce a valutare la conversione del piruvato in alanina, lattato e bicarbonato ed anche glutammato nella medesima sessione sperimentale [91].

## 1.5 $^{13}\text{C}$ Acetato: la via degli acidi grassi

Gli acidi grassi sono il principale nutrimento del miocardio [92], [93] e in generale del muscolo scheletrico [94], almeno in condizioni basali. Il prodotto finale dell'ossidazione degli acidi grassi è, analogamente alla glicolisi, l'acetil coenzima A, prodotto tramite l'enzima acetilCoA sintetasi (ACS) in presenza di ATP. L'acetilCoA è una molecola importante perché è la base per la sintesi del colesterolo e degli acidi grassi. Inoltre, attraverso la condensazione con ossalacetato che produce citrato, questa molecola è il principale substrato del ciclo di Krebs. Attraverso l'enzima carnitina acetil-transferasi (CAT) viene prodotta una molecola di acetil carnitina e liberata una molecola di coenzima A. Questo processo serve alla cellula per mantenere in equilibrio il rapporto acetilCoA:CoA e soprattutto per il trasporto di un gruppo acetile all'interno del mitocondrio, dove poi il processo inverso forma nuovamente acetilCoA, che è utilizzato appunto nel ciclo di Krebs.

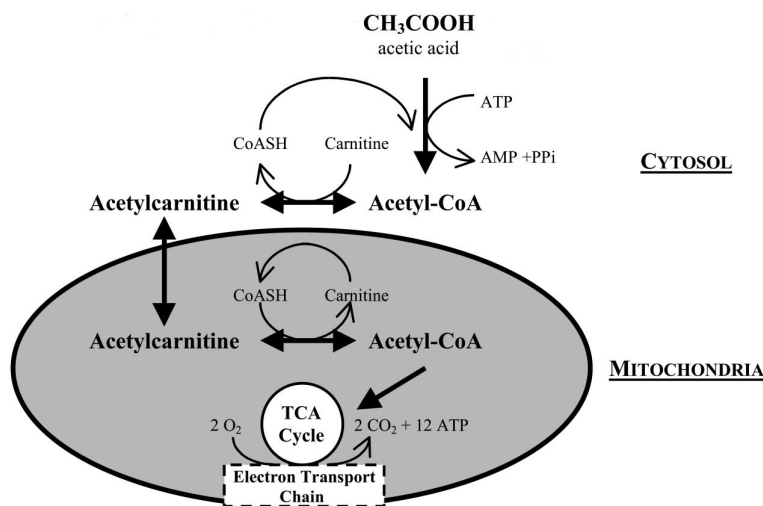


Figura 1.16: Rappresentazione schematica del destino metabolico dell'acetato all'interno della cellula [95]. CoASH: coenzima A libero (ridotto  $\text{H}^+$ ), PPI: pirofosfato.

Alternativamente alla via della glicolisi tramite il piruvato, negli ultimi anni altri studi hanno tentato di caratterizzare la via degli acidi grassi tramite l'iniezione in vivo di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato. Nel 2008 si ha per la prima volta la visualizzazione tramite Risonanza Magnetica Spettroscopica del picco dell'acetato e di un picco secondario dal tessuto cerebrale di ratto [96], e successivamente, mediante uno studio spettroscopico in vivo sul cuore del ratto, il picco secondario individuato in precedenza viene attribuito alla  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil-carnitina [97]. Gli autori riescono a valutare il metabolismo dell'acetato nel modello di occlusione e riperfusione: durante l'occlusione non vi

è la produzione di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil-carnitina, mentre dopo un'ora di riperfusione si nota di nuovo la presenza di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil-carnitina, anche se in misura significativamente minore rispetto al basale. In un lavoro successivo, ancora una volta con spettroscopia in vivo su cuore di ratto, si riesce a visualizzare anche il segnale dovuto al  $[^{13}\text{C}]$ citrato [98], e sullo stesso modello animale gli autori riescono a stimare la costante di conversione da  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato a  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil-carnitina [99]. Infine, in un recente studio per la prima volta viene effettuato l'imaging di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato e di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetil carnitina su settori di cuore e di muscolo scheletrico del ratto [100].

## Capitolo 2

# Materiali e metodi

### 2.1 Strumentazione

#### 2.1.1 Polarizzatore e misure a stato solido

Il polarizzatore utilizzato nell'ambito del presente lavoro di tesi è la versione commerciale dell'HyperSense<sup>®</sup> (*Oxford Instruments*). Al fine di poter studiare uno scale up della dose di campione da polarizzare, sono state apportate alcune modifiche all'apparecchio (la macchina in origine era stata progettata per la polarizzazione di una quantità massima di 200  $\mu\text{L}$  di formulazione). In particolare sono state usate delle capsule di 800  $\mu\text{L}$  di capacità, ma con dimensioni esterne uguali a quelle di fabbrica per mantenere la compatibilità con il sistema, ed è stato cambiato il tubo che porta il liquido sovrariscaldato al campione con uno di diametro minore, in modo tale che sia maggiore la pressione con cui il solvente viene a contatto con il campione allo stato solido. Questa scelta permette di ottenere un processo di dissoluzione più veloce ed efficiente.

Al polarizzatore è accoppiato uno polarimetro NMR, MQC (*Oxford Instruments Molecular Biotoools*) con il quale, attraverso il software di controllo RINMR v.5.7.1 (*Oxford Instruments Molecular Biotoools*) è possibile effettuare misure sul campione allo stato solido. Attraverso degli script ad hoc vengono calibrate con precisione la frequenza NMR per il  $^{13}\text{C}$  e la durata in ms dell'impulso a  $90^\circ$ . La frequenza di irraggiamento delle microonde viene scelta in base ad una procedura di calibrazione che prevede la polarizzazione per 1 minuto del campione ad una certa frequenza seguita dall'applicazione di un impulso a  $90^\circ$  e dalla lettura del segnale acquisito. Questo procedimento viene ripetuto per un certo intervallo di frequenze. Al termine, viene scelta la frequenza che ha prodotto il segnale maggiore.

La polarizzazione avviene irraggiando con le microonde il campione inserito per un tempo tale da raggiungere la massima polarizzazione possibile. Durante il processo di polarizzazione viene letto ogni 200 s il segnale proveniente dai nuclei di  $^{13}\text{C}$  del campione dopo l'applicazione di un impulso a  $5^\circ$ . In

questo modo si ottiene la *curva di build up*, cioè un andamento del segnale di magnetizzazione in funzione del tempo, che viene fittata con una legge monoesponenziale e da cui si ricava la costante di tempo della polarizzazione,  $\tau$ , e il valore massimo del plateau (in unità arbitrarie),  $\Pi$ .

$$M(t) = \Pi(1 - \exp(-\frac{t}{\tau})) \quad (2.1)$$

Il valore di plateau viene valutato per ogni campione dividendo per il numero di spin di  $^{13}\text{C}$  presenti. Il numero di spin di  $^{13}\text{C}$  in ogni campione viene calcolato sulla base della percentuale in peso del substrato arricchito in  $^{13}\text{C}$  sul totale, calcolando da questo valore le millimoli e successivamente il numero di spin corrispondenti tramite il numero di Avogadro. Il valore della potenza delle microonde è stato fissato a 100 mw dopo aver testato diversi valori di potenza su un campione standard di Na-[ $^{13}\text{C}$ ]acetato ed aver valutato la costante di build up e il valore di plateau raggiunto.

Mediante il polarizzatore è stata effettuata anche una misura di  $T_1$  su N=3 campioni di massa 400 mg di una soluzione di acetato alla temperatura di 1.4 K. La misura consiste nel polarizzare il campione per 40 minuti, e successivamente, dopo che aver terminato l'irraggiamento con le microonde, si acquisiscono dei FID tramite una procedura implementata in RINMR. La routine prevede l'utilizzo della sequenza FID con  $TR=300$  s e  $FA=5^\circ$  (con  $FA$  si intende il flip angle). In pratica si segue il decadimento della magnetizzazione nel tempo del campione iperpolarizzato. Dopo una procedura di correzione della baseline e apodizzazione, si effettua una trasformata di Fourier del segnale ottenuto. Si rappresenta poi in funzione del tempo la media del segnale su 100 punti intorno al massimo del picco ottenuto. Da un fit monoesponenziale viene stimato il tempo caratteristico di decadimento  $T$ . Il valore di  $T_1$  si ottiene correggendo il valore di  $T$  per l'ulteriore decadimento indotto dagli impulsi RF.

Applicando una successione di impulsi a radiofrequenza si introduce infatti una ulteriore perturbazione del sistema di spin. Ad ogni impulso applicato corrisponde una riduzione del valore della magnetizzazione lungo l'asse z. Il valore della magnetizzazione subito dopo ogni impulso è

$$M_{post} = M_{pre} \cos(FA) . \quad (2.2)$$

Questa frazione di magnetizzazione persa non è più recuperabile: il sistema tende infatti a rilassare verso l'equilibrio termico. Il parametro  $T$  rappresenta quindi una sottostima del  $T_1$ . Si corregge dunque il valore di  $T$  ottenuto dal fit mediante la relazione [101]-[103]

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T} + \frac{1}{TR} \ln \cos(FA) , \quad (2.3)$$

da cui invertendo

$$T_1 = \frac{T \times TR}{TR + T \times \ln \cos(FA)} . \quad (2.4)$$

### 2.1.2 Polarimetro e misure a stato liquido

Negli esperimenti di dissolution DNP, 1 ml circa di soluzione viene trasferito ad un polarimetro (*Minispec MQ, Bruker BioSpin GmbH, Germany*), per valutare la polarizzazione e il tempo caratteristico di rilassamento  $T_1$ . Il sistema è costituito da una consolle contenente un elettromagnete caricato a 1.05 T e da una unità di controllo contenente l'elettronica che si interfaccia con un PC. Attraverso una guida nella consolle un apposito tubo NMR di diametro 9.5 mm contenente la soluzione iperpolarizzata viene posto al centro del magnete. La temperatura dell'alloggiamento del tubo NMR è mantenuta fissa a 40°C. Attraverso l'interfaccia sul PC è possibile modificare i parametri delle sequenze utilizzate, e in particolare regolare la frequenza NMR (impostabile tra 2 MHz e 65 MHz) per il  $^{13}\text{C}$  e la durata degli impulsi a 90° e 180° per la soluzione da analizzare con apposite procedure di calibrazione. Una volta inserita la soluzione iperpolarizzata nel Minispec, viene fatta partire un'acquisizione con una sequenza pulse and acquire,  $FA=5^\circ$ ,  $TR=5$  s, durata=200 s, receiver gain=40 dB. Tramite questa acquisizione è possibile seguire in tempo reale il rilassamento della magnetizzazione, e tramite un fit monoesponenziale è possibile stimare il  $T_1$ , sempre tenendo conto della correzione per il flip angle definita in precedenza. Dopo che la magnetizzazione si è completamente rilassata, il campione viene sottoposto ad acquisizioni con una sequenza di tipo Carr-Purcell [104], modificata secondo lo schema di Meiboom e Gill [105] ( $TR=180$  s,  $n^\circ$  scans=16,  $n^\circ$  echi=600, echo time=2 ms, receiver gain=94 dB): il segnale ottenuto rappresenta il segnale termico del campione. Prima dell'inizio di ogni sessione sperimentale viene effettuata una misura a vuoto con la sequenza usata per la misura del termico, con i medesimi parametri: in questo modo otteniamo un segnale di background che viene sottratto dal segnale termico. Con questi parametri viene calcolato il cosiddetto *fattore di enhancement*, cioè il rapporto tra segnale iperpolarizzato e segnale termico:

$$EF = \frac{\textit{normalizedhyper}}{\textit{thermal - background}} , \quad (2.5)$$

nella quale *normalizedhyper* è pari a

$$\textit{normalizedhyper} = \textit{measuredhyper} \times \epsilon . \quad (2.6)$$

Il parametro  $\epsilon$  è un fattore di normalizzazione. Esso può essere espresso dalla formula

$$\epsilon = \frac{G_c}{FE_c \times FA_c} . \quad (2.7)$$

Il termine indicato con  $G_c$  è il *gain correction*. Esso tiene conto del fatto che le acquisizioni del segnale termico e del segnale iperpolarizzato sono avvenute con due receiver gain diversi. Questo fattore viene espresso come

$$G_c = 10^{\frac{\textit{gaintherm-gainhyper}}{20}} . \quad (2.8)$$

Il termine  $FE_c$  esprime il *FID/echo correction*, è un parametro del macchinario ed è fissato a 1.05. Il termine  $FA_c$  è la correzione per il flip angle, pari a  $\sin(5^\circ)$  nel nostro caso.

Una volta ottenuto il fattore di enhancement viene calcolata la polarizzazione del campione a stato liquido:

$$P_{liquid} = P_{therm} \times EF, \quad (2.9)$$

dove  $P_{therm}$  è la polarizzazione termica calcolata secondo la relazione (1.9).

## 2.2 Formulazioni di [ $^{13}\text{C}$ ]acetato iperpolarizzato

### 2.2.1 Tris-[ $^{13}\text{C}$ ]acetato

Il sale tris-[ $^{13}\text{C}$ ]acetato viene sintetizzato dissolvendo 1 g di [ $^{13}\text{C}$ ]acido acetico (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*) in una soluzione 0.54 M di tris(idrossimetil)aminometano (TRIZMA base pH 8.5, Sigma-Aldrich), ottenendo una miscela a pH compreso tra 7.4 e 7.8. La soluzione viene lasciata liofilizzare per circa 24 h, dopodiché viene raccolto il sale formatosi.

Viene testata una formulazione basata sulla ricetta riportata in [106]. Il campione viene formulato miscelando 44.03 mg di tris-[ $^{13}\text{C}$ ]acetato, 4.63 mg di una soluzione 139  $\mu\text{mol/g}$  di radicale tris(8-carboxyl-2,2,6,6-benzo(1,2-d:5-d)-bis(1,3)dithiole-4-yl)methyl sodium salt (*OX063, Oxford Instr. Ltd*) e 1  $\mu\text{L}$  di una soluzione 50 mM di  $\text{Gd}^{3+}$  chelato (*Dotarem, Guebert*) in 6  $\mu\text{L}$  di acqua ultrapura (*mQ, Millipore*). Sulla base di questa formulazione, nuovi campioni sono stati preparati con l'aggiunta ulteriore di glicerolo in ragione del 10% in peso del singolo campione. Altri campioni vengono invece preparati impiegando, oltre al glicerolo, una soluzione di OX063 di 181  $\mu\text{mol/g}$ , con un aumento quindi del 30% della quantità di radicale sciolto nel campione: tris-[ $^{13}\text{C}$ ]acetato, radicale OX063 e  $\text{Gd}^{3+}$  chelato sono miscelati in una soluzione 65:35 peso:peso di acqua ultrapura e glicerolo. Le concentrazioni finali nel composto sono: [ $^{13}\text{C}$ -acetato]= 4.7 M, [OX063]= 15.5 mM, [ $\text{Gd}^{3+}$ ]= 0.93 mM. Per quest'ultima formulazione, si confrontano le prestazioni del sistema tra campioni ottenuti da una semplice miscela delle sostanze chimiche elencate ed altri per i quali la soluzione viene resa omogenea tramite una procedura di sonificazione a  $60^\circ\text{C}$  per 10 minuti. Il riepilogo delle caratteristiche chimiche delle formulazioni di tris-[ $^{13}\text{C}$ ]acetato esaminate è mostrato nella tabella (2.1).

Campioni con massa compresa tra 50 mg a 800 mg vengono poi prelevati di volta in volta e subito inseriti nel polarizzatore all'interno di capsule apposite per evitare cristallizzazioni che comprometterebbero irrimediabilmente il processo di polarizzazione. Per ogni formulazione sono state effettuate prove di polarizzazione e successive dissoluzioni su svariati campioni, e sono stati registrati la costante di tempo di build up, il valore di plateau (nor-



Formulazioni	$[^{13}\text{C}$ acetato] (M)	[OX063] (mM)
1	4.8	12.8
2	4.7	11.8
3	4.7	15.5
4 (3 + sonicatore)	4.7	15.5

Tabella 2.1: Formulazioni di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato testate.

Formulazioni	Arricchimento (%)	$[^{13}\text{C}$ acetato] (M)	[OX063] (mM)
1	20	1.5	25
2	50	3.6	25
3	100	7.3	25
4	100	7.3	21
5	100	7.3	16

Tabella 2.2: Formulazioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato testate.

malizzato per il numero di spin di  $^{13}\text{C}$ ), il valore del  $T_1$  e la percentuale di polarizzazione a stato liquido.

### 2.2.2 Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato

Viene testata una formulazione in cui è mantenuto uguale il rapporto spin  $^{13}\text{C}$ -spin elettronici rispetto alla formulazione standard del tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato. Il campione da polarizzare è ottenuto miscelando Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato (*Cambridge Isotope Laboratories Inc.*), radicale OX063 e  $\text{Gd}^{3+}$  chelato in una soluzione 60:40 peso:peso di acqua ultrapura e glicerolo. La soluzione ottenuta viene resa omogenea grazie a una procedura di sonificazione per 20 minuti a  $60^\circ\text{C}$ . Le concentrazioni finali sono:  $[^{13}\text{C}\text{-acetato}] = 7.3$  M,  $[\text{OX063}] = 25$  mM,  $[\text{Gd}^{3+}] = 1.4$  mM. Come è evidente da questi dati, la concentrazione di  $^{13}\text{C}$  di questa nuova formulazione è maggiore rispetto alla preparazione del tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato. Per valutare inoltre il comportamento della preparazione a stato solido e a stato liquido, sono stati fatti studi sia variando la concentrazione di OX063 nella miscela (16 mM, 21 mM, 25 mM) con concentrazione fissa di  $^{13}\text{C}$ , sia variando la concentrazione di  $^{13}\text{C}$  (1.5 M, 3.6 M, 7.3 M), miscelando sale arricchito in  $^{13}\text{C}$  e non arricchito, lasciando fissa la concentrazione di radicale a 25 mM. Il riepilogo delle caratteristiche chimiche delle formulazioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato esaminate è mostrato nella tabella (2.2). Per ogni formulazione sono state effettuate prove di polarizzazione e successive dissoluzioni su svariati campioni, e sono stati registrati la costante di tempo di build up, il valore di plateau (normalizzato per il numero di spin di  $^{13}\text{C}$ ), il valore del  $T_1$  e la percentuale di polarizzazione a stato liquido.

### 2.2.3 Mezzo di dissoluzione

Per tutte le formulazioni di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato proposte, la dissoluzione è avvenuta caricando nell'apposito serbatoio nel polarizzatore una quantità opportuna (in base al peso del sample polarizzato) di mezzo di dissoluzione ottenuto sciogliendo in acqua ultrapura TRIZMA pH 7.6 (Sigma-Aldrich) 40 mM, etilendiamminotetraacetato (EDTA, Sigma-Aldrich) 0.27 mM e NaCl 50 mM. Per gli studi in vivo, dovendo usare 21 mL complessivi di mezzo di dissoluzione, si caricano 10 mL nel serbatoio e 11 ml nel vaso esterno.

La temperatura della soluzione ottenuta è  $37\pm 2$  °C, ed è controllata tenendo il recipiente di raccolta in un bagno di acqua e ghiaccio. In ogni studio viene raccolto il valore di plateau normalizzato, la costante di tempo di polarizzazione, e dopo la dissoluzione il valore del  $T_1$  e della polarizzazione a stato liquido. Essi sono poi paragonati in base alla formulazione.

## 2.3 Misure in vivo

Lo scopo principale del lavoro di tesi è utilizzare la soluzione di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato prodotta per studi di risonanza magnetica spettroscopica in vivo. L'approccio usato è la sperimentazione su animale di media taglia (minipig, massa circa 40 Kg). Sulla base della letteratura esaminata, per la prima volta si ha uno studio in vivo su animale di media taglia con  $[^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato. Il protocollo sperimentale è conforme alle normative italiane vigenti (DL 116/92). Vengono usati suini maschi, di peso circa 40 Kg. Gli animali vengono prima sedati con una miscela di tiletamina cloridrato e zolazepam cloridrato (8 mg/Kg) e medicati con solfato di atropina. Durante l'esperimento l'animale è sedato con una infusione continua di propofol (1 mg/Kg/h) ed è lasciato in respiro spontaneo. La pressione e il battito cardiaco sono monitorati per tutta la durata dell'esperimento.

Lo scanner usato è uno scanner clinico a 3 T in dotazione alla Fondazione Toscana Gabriele Monasterio (*GE Excite HDXt*, *GE HealthCare*). Per prima cosa viene eseguita una sessione di imaging protonico per la visualizzazione degli organi interni dell'animale, tramite una sequenza SSFP (*steady state free precession*) triggerata sul battito cardiaco ( $FOV=35$  cm,  $FA=45^\circ$ ,  $TE=1.71$  ms,  $TR=3.849$  ms). Successivamente, 20 ml di una soluzione di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato (150 mM, equivalenti a 0,08 mmol/Kg) vengono iniettati manualmente all'animale tramite un catetere posizionato nella vena dell'orecchio destro. Mediante una sequenza pulse and acquire (soft pulse, slice thickness= 40 mm assiale,  $FA=10^\circ$ , 2048 pt, bandwidth=2200 Hz,  $TR=2$  s, durata scansione=120 s, frequenza dell'impulso aggiustata su un fantoccio contenente  $^{13}\text{C}$  acetato) si misura il segnale derivante dall'acetato e dell'acetyl carnitina su una fetta di spessore 40 mm localizzata sul cuore dell'animale. Per la trasmissione dell'impulso RF alla frequenza del  $^{13}\text{C}$  e la ricezione del segnale spettroscopico viene impiegata una bobina bir-

dcage (*Rapid Biomedical*) sintonizzata sulla frequenza del  $^{13}\text{C}$  a 3 T (32.13 MHz). Sono stati effettuati N=4 studi preliminari di infusione di una soluzione di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato, in cui si è studiata la fattibilità dell'impiego di  $^{13}\text{C}$  acetato e la forma caratteristica dei segnali ottenuti. Successivamente sono stati eseguiti N=5 studi per effettuare un confronto tra stato basale e stato di stress inotropo indotto farmacologicamente nell'animale. Dopo una prima iniezione di una dose di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato, l'animale viene lasciato a riposo per circa 40 minuti nell'attesa che una nuova dose sia polarizzata. Successivamente  $10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$  dobutamina vengono infusi all'animale per 5 minuti, a cui segue immediatamente l'iniezione della soluzione di  $^{13}\text{C}$ -acetato iperpolarizzato.

### 2.3.1 Post processing

Il segnale raccolto viene processato mediante il programma JMRUI 3.0 [107]. Si ha una rappresentazione di 60 spettri, uno ogni 2 secondi, per ogni iniezione nell'animale. Agli spettri viene applicata una procedura di rifasamento. Successivamente, attraverso l'algoritmo AMARES implementato nel programma vengono identificati i picchi dell'acetato e della acetil carnitina [108]. L'algoritmo dà la possibilità di inserire delle prior knowledge: per questi studi vengono definiti la forma della linea spettrale (Gaussiana), le larghezze di riga dei picchi (da 0 a 20 Hz), e lo shift in frequenza tra  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato e  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina (276 Hz). Per ogni spettro si registrano i massimi dei due picchi. Successivamente questi valori vengono rappresentati in funzione del tempo, ottenendo in questo modo delle curve metaboliche. Per i primi N=4 esperimenti, la time course di ogni curva di acetato ottenuta viene fittata suddividendo la curva in due parti. La seconda parte della curva viene modellizzata secondo un andamento monoesponeziale della forma

$$S_2(t) = h e^{-\frac{t}{T_{1\text{eff}}}}, \quad (2.10)$$

che descrive il rilassamento della magnetizzazione e la conversione del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato in  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina.

La prima parte della curva, una volta corretto il segnale per il  $T_{1\text{eff}}$  trovato in precedenza, viene modellizzata secondo una funzione gamma-variata [83],[109], della forma

$$S_1(t) = s (t - t_0)^a e^{-\left(\frac{t-t_0}{b}\right)}, \quad (2.11)$$

che descrive l'arrivo del bolo nella regione di interesse. Il parametro  $s$  è un fattore di scala, i parametri  $a$  e  $b$  determinano la forma della curva e  $t_0$  rappresenta il tempo di arrivo del bolo nella regione di interesse. Nelle nostre misure abbiamo sempre supposto che  $t_0 = 0$ , cioè che quando la scansione ha inizio il mezzo di contrasto è già presente nella fetta selezionata.

Per i successivi N=5 studi in vivo vengono confrontati i valori dei *rate pressure product* (RPP), parametro definito come il prodotto tra il numero di pulsazioni al minuto e la pressione sistolica, espressa in mmHg, dell'animale, e delle costanti di conversione enzimatiche efficaci tra stato basale e stato di stress inotropo. Le time courses metaboliche di entrambi i metaboliti sono esaminate mediante la funzione *sbioparamestim* del tool [110], secondo il modello di conversione descritto dal seguente sistema di equazioni differenziali, mutuato dalle equazioni di Bloch per il rilassamento della magnetizzazione [101]

$$\begin{cases} \frac{dM_{ace}}{dt} = -\frac{M_{ace}}{T_{1,ace}} - k \times M_{ace} \\ \frac{dM_{carn}}{dt} = -\frac{M_{carn}}{T_{1,carn}} + k \times M_{ace} \end{cases} \quad (2.12)$$

dove  $M_{ace}$  e  $M_{carn}$  indicano i segnali dovuti al  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato e alla  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina, rispettivamente, e analogamente i tempi di rilassamento in vivo  $T_1$ . Il parametro  $k$  indica la costante di conversione enzimatica efficace, valore registrato per ogni iniezione. Le time courses sono esaminate partendo dall'istante di tempo corrispondente al massimo del segnale del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato, e sono ottenute separatamente per i due metaboliti mediante l'algoritmo AMARES implementato in JMRUI: in particolare, la time course della  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina è stata ottenuta eliminando il segnale dell'acetato da ogni spettro con il tool HLSVD in JMRUI (*Hankel Lanczos singular value decomposition* [111]), cancellando negli spettri i segnali nel range  $\pm 6$  ppm rispetto al picco dell'acetato.

Nel modello si trascura il valore della magnetizzazione all'equilibrio termico, perché di svariati ordini di grandezza minore del valore dato dall'iperpolarizzazione, e i possibili processi inversi che potrebbero coinvolgere una conversione della acetil-carnitina appena prodotta di nuovo in acetil CoA, in quanto si suppone che la finestra temporale dell'acquisizione sia troppo breve per assistere alla reazione inversa.

## Capitolo 3

# Risultati ottenuti e discussione

### 3.1 Misure a stato solido

La preparazione di un sample contenente un substrato metabolico arricchito in  $^{13}\text{C}$  deve garantire che la soluzione ottenuta sia il più possibile omogenea. In particolare la formulazione deve risultare essere allo stato vetroso a temperature criogeniche (circa 1 K). Solo in questo modo viene assicurata una distribuzione omogenea all'interno del campione degli spin elettronici ed è garantita la possibilità dell'allineamento degli spin nucleari lungo la direzione del campo magnetico. Generalmente per substrati che non presentano proprietà vetrificanti a temperature criogeniche si ricorre all'aggiunta nella preparazione di particolari solventi, come DMSO (dimetilsolfossido) oppure glicerolo, che hanno le proprietà vetrificanti richieste [112],[113]. Nel presente lavoro di tesi, la scelta del substrato metabolico [ $^{13}\text{C}$ ]acetato comporta la necessità di disporre di questi solventi. Polarizzare una soluzione di acido acetico e radicale tritile, come avviene regolarmente per il [ $^{13}\text{C}$ ]acido piruvico, è impossibile a causa dell'estrema instabilità e volatilità di questo composto. Si ricorre generalmente ad una soluzione di sali di acetato in acqua, che purtroppo però non presenta le proprietà vetrificanti richieste per una efficace polarizzazione. Si è scelto dunque di aggiungere alla matrice da polarizzare il glicerolo per le sue note proprietà vetrificanti e la sua compatibilità biologica per gli studi in vivo [113]. Altro aspetto importante nella formulazione dei campioni iperpolarizzati è l'aggiunta di piccole quantità (dell'ordine complessivamente del mM) di chelati di Gadolinio. Come riportato in letteratura, l'aggiunta di ioni gadolinio sembra esaltare il processo di polarizzazione. Anche se non è ancora del tutto chiaro il motivo per cui questo avviene, sembra che l'impurezza paramagnetica abbia effetto sul  $T_2$  elettronico: una sua riduzione sembra decisiva per permettere un efficiente trasferimento della polarizzazione ai nuclei circostanti [114]-[117].

Per valutare le prestazioni delle diverse formulazioni vengono valutati i parametri  $\Pi$  e  $\tau$ . Il plateau normalizzato è un parametro che descrive la polariz-

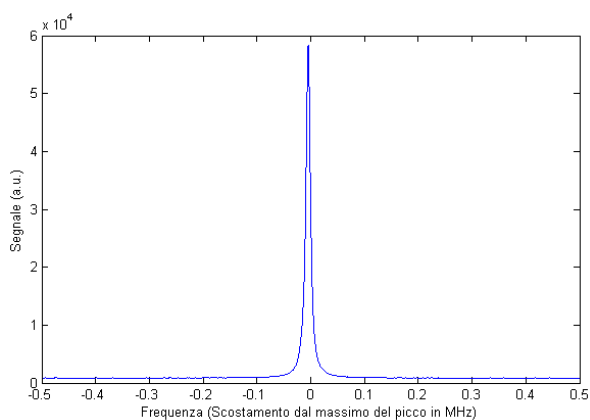


Figura 3.1: Esempio di spettro ottenuto durante la polarizzazione. Il valore del massimo costituisce un punto della curva di build up.

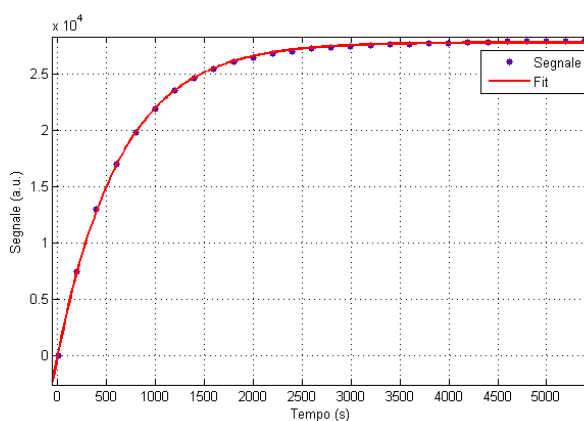


Figura 3.2: Esempio di curva di build up sperimentale ottenuta in laboratorio.

zazione a stato solido. Per calcolare questo valore direttamente andrebbero confrontati gli integrali dei picchi del campione iperpolarizzato e del campione all'equilibrio termico a 1.4 K, ma quest'ultima misura, per avere un SNR accettabile, richiederebbe un tempo di acquisizione di molte ore, e non può essere effettuata per ragioni logistiche nel laboratorio. Il plateau normalizzato, così come è stato definito, è indipendente dal numero di spin presenti nei campioni e permette di confrontare le varie formulazioni e campioni di massa diversa, essendo del tutto uguali i parametri di acquisizione. La costante  $\tau$  invece può essere misurata direttamente dal fit della curva di salita in funzione del tempo, e dà una misura della velocità del processo di polarizzazione.

### 3.1.1 Calibrazioni

L'HyperSense<sup>®</sup> permette di misurare la frequenza NMR del composto contenente  $^{13}\text{C}$  da polarizzare, così come la durata dell'impulso a  $90^\circ$  ( $P90$ ). La procedura che determina la migliore frequenza NMR viene eseguita su un campione di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato preparato secondo la formulazione 3 in tabella (2.2). Il risultato è 35.9731 MHz. Questo valore viene mantenuto costante per tutte le successive misure.

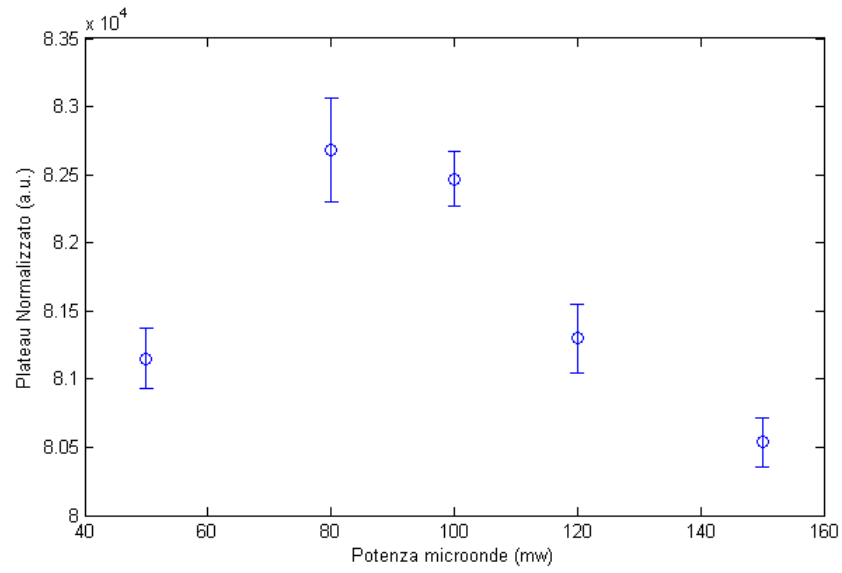
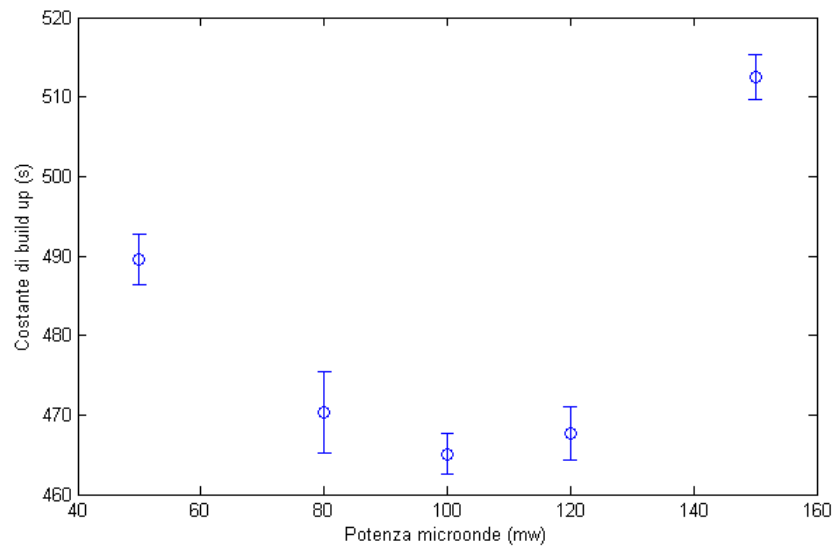
Sullo stesso campione viene effettuata la calibrazione della durata dell'impulso a  $90^\circ$ . Dopo aver irraggiato il campione per un certo tempo con microonde di frequenza presumibilmente prossima al valore che dà la massima polarizzazione dei nuclei di  $^{13}\text{C}$ , il sistema produce un treno di impulsi di lunghezza prefissata, e poi va a contare quanti impulsi sono serviti per annullare la magnetizzazione. Il risultato ottenuto è 276.012  $\mu\text{s}$  per il P90, e anche questo valore viene tenuto fisso per le successive misure.

Il valore della potenza delle microonde che dà la polarizzazione maggiore è stato scelto effettuando varie polarizzazioni sullo stesso campione a potenze diverse. I risultati ottenuti in termini di segnale normalizzato al numero di spin e al tempo di build up sono riportati nelle figure (3.3) e (3.4). Considerando i valori ricavati, si nota come il range di potenza ottimale sia tra gli 80 e i 100 mW. Presumibilmente potenze più basse non riescono a saturare le transizioni elettroniche e quindi a trasferire la polarizzazione dall'elettrone al nucleo, mentre a potenze più alte si ha forse un indesiderato aumento di temperatura del sample e un conseguente peggioramento della performance della polarizzazione.

La potenza delle microonde durante il processo di polarizzazione è stata dunque fissata a 100 mW, valore consigliato dal produttore.

### 3.1.2 Polarizzazione di large doses per studi in vivo

Nell'ottica di effettuare studi in vivo su modello suino è necessario riuscire a polarizzare dosi adeguate di campione. L'HyperSense<sup>®</sup> era stato progettato in origine per polarizzare fino a circa 50 mg di soluzione. Con l'ausilio di nuove capsule di aumentata capacità si è proceduto alla polarizzazione di dosi via via maggiori di soluzione. In figura (3.5) è riportato il confronto tra le prestazioni di N=6 small doses (massa pari 50 mg) e N=8 large doses (massa variabile tra 400 e 800 mg) della formulazione 3 di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato. Si nota dalla figura che i parametri caratteristici  $\tau$  e  $\Pi$  non cambiano in maniera significativa passando da piccola massa a grande massa. Dunque si può affermare che, almeno a stato solido, la macchina riesce a polarizzare in misura confrontabile una quantità di soluzione ben maggiore di quanto inizialmente previsto dalle specifiche tecniche dell'apparecchio. Questo implica anche che per il confronto tra le prestazioni di polarizzazione delle varie for-

Figura 3.3: Valori di  $\Pi$  ottenuti variando la potenza delle microonde.Figura 3.4: Valori di  $\tau$  ottenuti variando la potenza delle microonde.



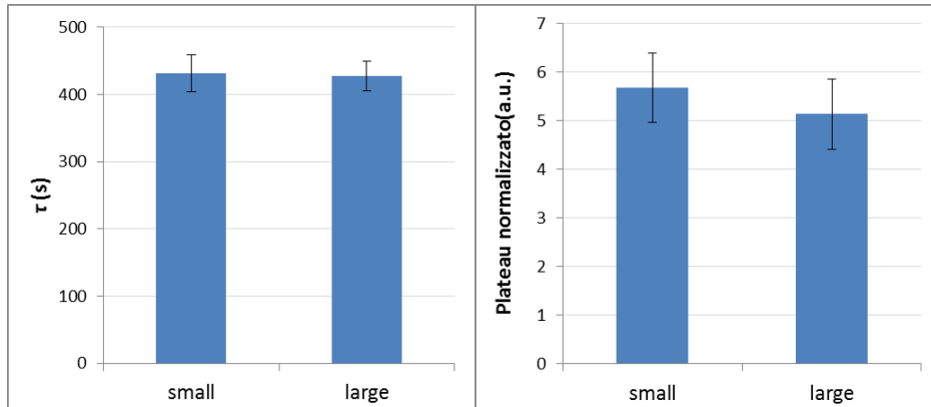


Figura 3.5: Confronto delle prestazioni a stato solido del sistema polarizzante tra small doses ( $N=6$ ) e large doses ( $N=8$ ) per campioni di  $\text{Na}[1-^{13}\text{C}]$ acetato. I campioni usati sono preparati secondo la formulazione 3 in tabella 2.2.

mulazioni si può prescindere dalla massa del campione polarizzato, ossia ogni considerazione può essere fatta semplicemente sui valori di  $\tau$  e  $\Pi$  ricavati.

### 3.1.3 Tris-[1- $^{13}\text{C}$ ] acetato

I valori di  $\tau$  e  $\Pi$  ottenuti dalle prove di polarizzazione per le miscele di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato sono riportati nella tabella (3.1) e nelle figure (3.6) e (3.7). Dal confronto dei valori ottenuti per le formulazioni 1 e 2 in tabella, si nota come l'aggiunta di glicerolo risulta decisiva nel migliorare le prestazioni del sistema. In particolare, la variazione del plateau è significativa ( $p < 0.05$ , t test a due code) rispetto alla ricetta pubblicata in [106]. Questo comportamento indica che l'aggiunta di glicerolo ha aumentato l'uniformità del campione, permettendo dunque una migliore interazione tra spin elettronici e spin nucleari. Come si nota in figura (3.6), la costante di build up aumenta però considerevolmente (+15%) nel caso dell'aggiunta di glicerolo ( $p < 0.05$ ). Questo effetto può forse essere dovuto alla diluizione degli spin nel sample, che si riflette in un rallentamento della dinamica del processo della spin diffusion. Il meccanismo della spin diffusion può essere invocato per i sample

Formulazioni	$\tau$ (s)	$\Pi$ (a.u.)
1	$1652 \pm 297$	$6.6 \pm 1.4$
2	$2257 \pm 317$	$7.7 \pm 0.3$
3	$1468 \pm 331$	$6.3 \pm 1.4$
4	$1340 \pm 56$	$8.6 \pm 0.7$

Tabella 3.1: Valori di  $\tau$  e  $\Pi$  ottenuti per le formulazioni di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato testate.

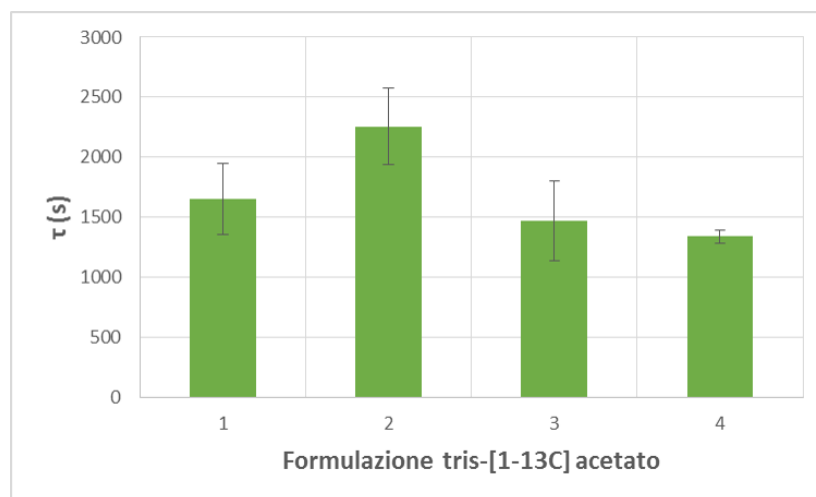


Figura 3.6: Valori di  $\tau$  ottenuti per le formulazioni di tris-[1-<sup>13</sup>C]acetato.

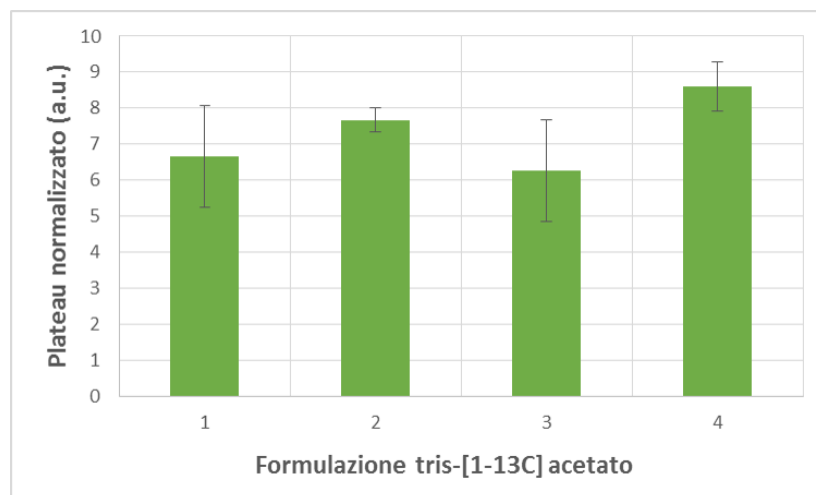


Figura 3.7: Valori di  $\Pi$  ottenuti per le formulazioni di tris-[1-<sup>13</sup>C]acetato.

analizzati in questo lavoro in quanto la distanza tra i nuclei di  $^{13}\text{C}$  è minore della distanza tra le impurezze paramagnetiche [112].

In generale, un aumento della distanza tra gli spin nucleari diminuisce il meccanismo della spin diffusion. Come riportato nell'introduzione, nel 1949 Bloembergen [48] ha sviluppato un modello della spin diffusion che prevede un ruolo importante della distanza spin-spin ( $a$ ) nel coefficiente di diffusione:  $D = Wa^2$ . Questo modello funziona se trascuriamo eventuali moti di vibrazione degli spin: a 1.4 K questa assunzione può dirsi verificata. Considerando gli spin disposti su una matrice cubica, questo comporta una dipendenza dal parametro  $a$  all'incirca della forma  $1/a$  ( $W \propto a^{-3}$ ) [112]. Quindi, un aumento della distanza degli spin aumenta comporta una diminuzione del coefficiente di diffusione, e quindi ad una diminuzione dell'efficienza del processo di spin diffusion.

L'aggiunta contemporanea di OX063 (+30%) e di glicerolo (formulazione 3) ripristina un valore di  $\tau$  compatibile con la formulazione 1, anche se purtroppo a scapito di una diminuzione delle prestazioni di polarizzazione. Confrontando invece il valore di  $\Pi$  per le formulazioni 3 e 4 notiamo che esso aumenta di quasi il 40% sulla medesima composizione del campione, con un  $\tau$  che non cambia in maniera significativa. La procedura di sonicazione della soluzione prima della polarizzazione permette l'eliminazione di eventuali bolle d'aria e fa in modo che si abbia una distribuzione uniforme del radicale e degli spin di  $^{13}\text{C}$  all'interno del campione: i dati ottenuti dimostrano dunque come l'uniformità del campione sia un requisito essenziale per procedere alla polarizzazione, e il trattamento con il sonicatore diviene quindi una procedura standard per la preparazione dei campioni.

La formulazione in questione di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato viene usata come standard per il confronto con le successive preparazioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

### 3.1.4 Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato

Per quanto riguarda le formulazioni di sodio acetato, il primo tentativo che è stato fatto è stato quello di testare una formulazione che avesse lo stesso rapporto tra spin elettronici e spin  $^{13}\text{C}$  rispetto alla formulazione 3 di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato (circa 285). La scelta di testare una formulazione di sodio acetato deriva dal fatto che la preparazione è più semplice, visto che il sodio acetato viene fornito direttamente come sale già formulato, e non c'è quindi bisogno di avviare una lunga sessione al liofilizzatore. Inoltre, la massa molecolare del sodio acetato è significativamente minore di quella del tris-acetato. Questo fatto permette, a parità di massa del sample iperpolarizzato, di ottenere una concentrazione maggiore di spin  $^{13}\text{C}$ , e quindi in linea di principio di aumentare il segnale ricavato negli studi in vivo.

Dalla figura (3.8) si nota come le prestazioni del tris acetato siano migliori di quelle del sodio acetato in termini di plateau normalizzato. Il risultato è in linea con quanto riportato in precedenza in [106]. Interessante notare la

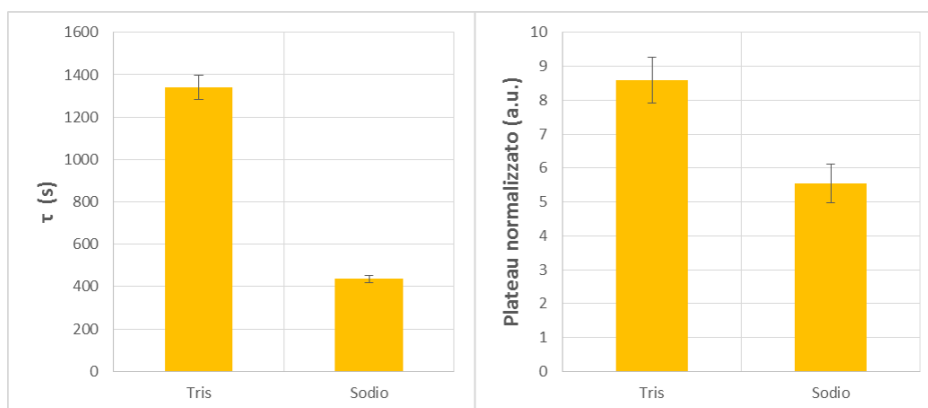


Figura 3.8: Confronto delle performance di polarizzazione tra la preparazione 4 di tris-[1-<sup>13</sup>C]acetato e la formulazione 3 di Na-[1-<sup>13</sup>C]acetato.

Formulazioni	$\tau$ (s)	$\Pi$ (a.u.)
1	1207 ± 17	5.6 ± 0.5
2	841 ± 62	5.0 ± 0.8
3	437 ± 18	5.7 ± 0.6
4	528 ± 86	5.9 ± 0.6
5	992 ± 67	6.8 ± 0.4

Tabella 3.2: Valori di  $\tau$  e  $\Pi$  ottenuti per le formulazioni di Na-[1-<sup>13</sup>C]acetato testate.

netta diminuzione della costante di build up (di circa tre volte): questo può essere imputato al fatto che la concentrazione di OX063 nella formulazione di Na-[1-<sup>13</sup>C]acetato è maggiore rispetto alla formulazione di tris-[1-<sup>13</sup>C]acetato (25 mM contro 16 mM), e questo fatto contribuisce ad accorciare significativamente il tempo di polarizzazione. Questo aspetto gioca molto a vantaggio dell'utilizzo della formulazione di sodio acetato per gli studi in vivo: in questo caso è necessario attendere meno tempo tra una iniezione e l'altra, e quindi diminuisce anche il tempo in cui l'animale deve rimanere sedato.

Data la maggiore facilità con cui si riesce a preparare i sample di Na-[1-<sup>13</sup>C]acetato, sono state testate varie misture di questo sale di acetato. In particolare, sono state effettuate prove su campioni con arricchimento diverso di <sup>13</sup>C (20%, 50%, 100%, formulazioni 1-3) con concentrazione fissa di radicale (25 mM), e concentrazione diversa di OX063 (16 mM, 21 mM, 25 mM, formulazioni 3-5) con arricchimento fissato al 100%. Queste prove hanno lo scopo di valutare le caratteristiche fisiche delle varie formulazioni, e in particolare indagare sui meccanismi di polarizzazione. I valori di  $\tau$  e  $\Pi$  ottenuti per le varie formulazioni sono riassunti nella tabella (3.2).

I risultati delle prove effettuate con diverso arricchimento sono riportati nelle

figure (3.9) e (3.10).

Dalla figura (3.9) si nota come il valore di  $\tau$  scenda al crescere della concentrazione di spin  $^{13}\text{C}$ . Il valore della costante di build up per i campioni a pieno arricchimento risulta 2.7 volte minore del caso dei campioni arricchiti al 20%, e la decrescita è statisticamente significativa ( $p < 0.05$ , t-test a due code). Come nel caso del tris acetato, anche per il sodio acetato sembra che questo comportamento sia dovuto ad una peggiorata efficienza del meccanismo della spin diffusion dovuta all'aumentata distanza tra gli spin  $^{13}\text{C}$ . Nessuna differenza statisticamente significativa si riscontra invece nel valore del plateau normalizzato tra le varie formulazioni, come evidenziato in figura (3.10). Questo fatto indica dunque che la spin diffusion agisce prevalentemente come trasportatore della magnetizzazione all'interno del sample, ma non va a influenzare il valore della polarizzazione finale. Secondo alcuni modelli sviluppati negli ultimi anni, i nuclei più vicini all'impurezza paramagnetica sono racchiusi in una zona di alta disomogeneità del campo [44],[45]. Si crea una zona intorno alla impurezza in cui i nuclei sono fortemente accoppiati con lo spin elettronico (accoppiamento iperfine). I nuclei che stanno sul bordo di questa zona (anche definita *diffusion barrier*) sono accoppiati, grazie all'interazione dipolare, con i nuclei più lontani (bulk). Il trasporto della magnetizzazione all'interno del sample verso i nuclei del bulk sarebbe mediata proprio dai nuclei che stanno sulla diffusion barrier, mentre i nuclei del core non giocherebbero alcun ruolo [114],[117]. Il segnale osservato in risonanza sarebbe poi dovuto solo ai nuclei del bulk. Una diminuita concentrazione di nuclei di  $^{13}\text{C}$ , a parità di impurezze paramagnetiche, può significare una diminuzione di mediatori, e di conseguenza una minore velocità di incremento della polarizzazione. Un comportamento simile è stato riscontrato anche in [112] con una soluzione di [1- $^{13}\text{C}$ ] acido piruvico e OX063 in  $^{13}\text{C}$  DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$ , e in [118] con una mistura di  $^{13}\text{C}$  acetato e radicale TEMPO in  $\text{D}_2\text{O}$ /etanolo.

Nelle figure (3.11) e (3.12) è riportato l'andamento dei valori di  $\tau$  e  $\Pi$  in funzione della diversa concentrazione di radicale presente nei campioni polarizzati (formulazioni 3-5). Si evince per prima cosa che ad una aumentata concentrazione di OX063 corrisponde una diminuzione di  $\tau$ . La diminuzione è statisticamente significativa tra le formulazioni con 16 mM e 21 mM di radicale ( $p < 0.05$ ). L'andamento ottenuto è coerente con quanto visto in letteratura [30],[106],[118]. Anche la polarizzazione però diminuisce all'aumentare della concentrazione di OX063. Questo indica che una eccessiva quantità di radicale non favorisce il processo di polarizzazione, come nel caso precedente con tris[1- $^{13}\text{C}$ ] acetato. Probabilmente in questo caso si ha un rilassamento eccessivo degli spin di  $^{13}\text{C}$  dovuto all'elevato numero di impurezze paramagnetiche. Questo effetto può dipendere anche dal tipo di radicale impiegato: la diversa disposizione degli orbitali elettronici può creare un campo magnetico locale peculiare, con una notevole influenza sul rilassamento dei nuclei di  $^{13}\text{C}$  [119].

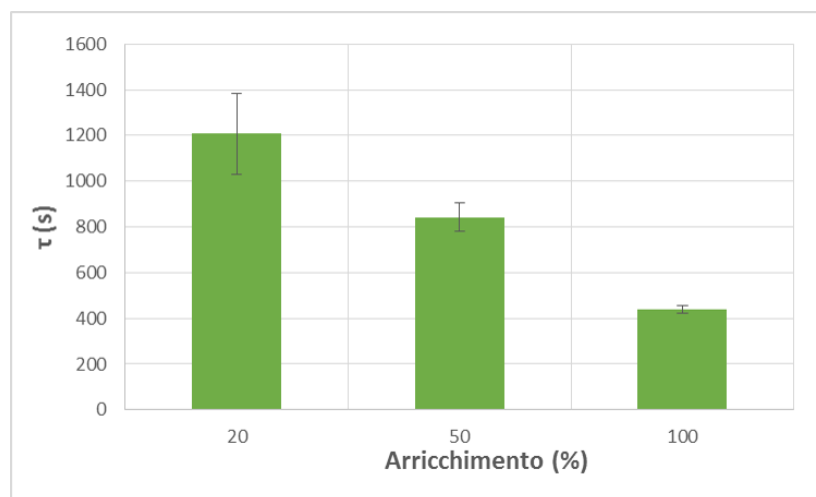


Figura 3.9: Valori di  $\tau$  ottenuti per le formulazioni 1-3 di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

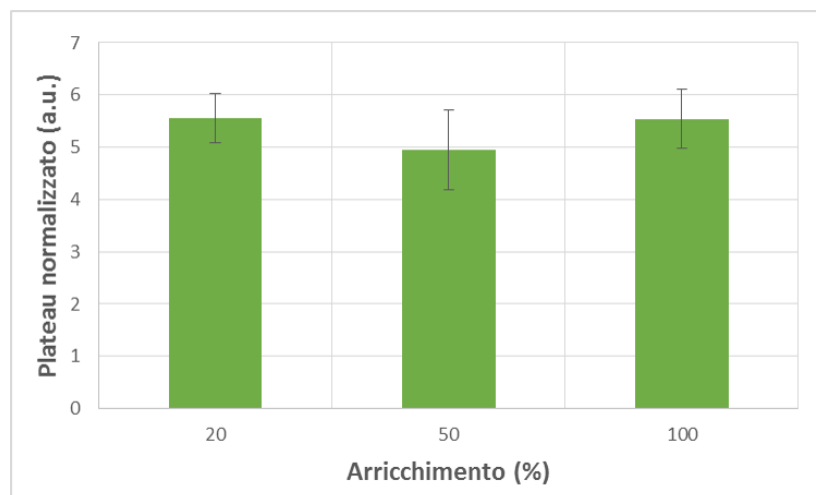


Figura 3.10: Valori di  $\Pi$  ottenuti per le formulazioni 1-3 di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

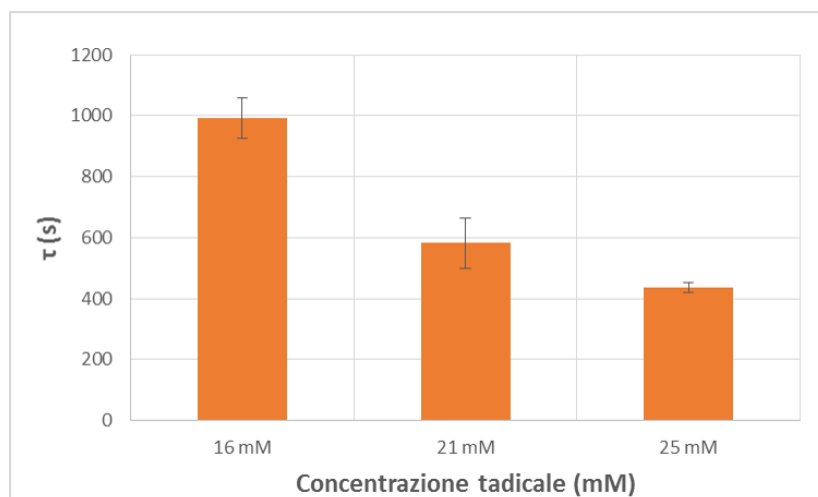


Figura 3.11: Valori di  $\tau$  ottenuti per le formulazioni 3-5 di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

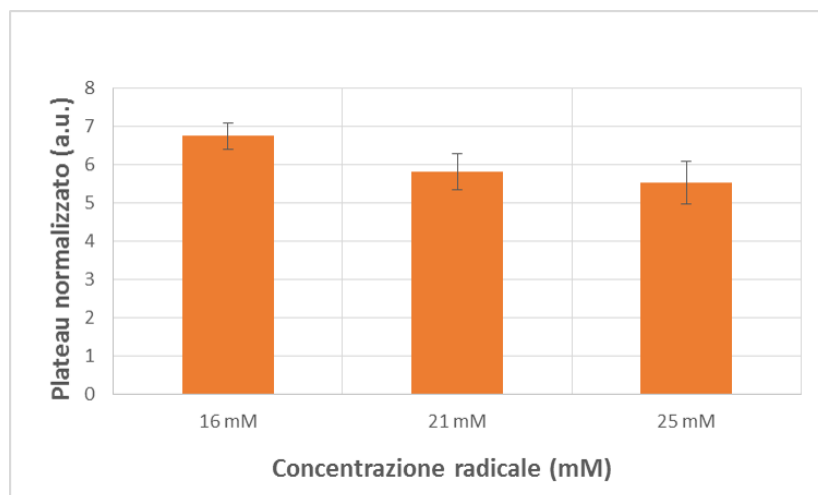


Figura 3.12: Valori di  $\Pi$  ottenuti per le formulazioni 3-5 di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

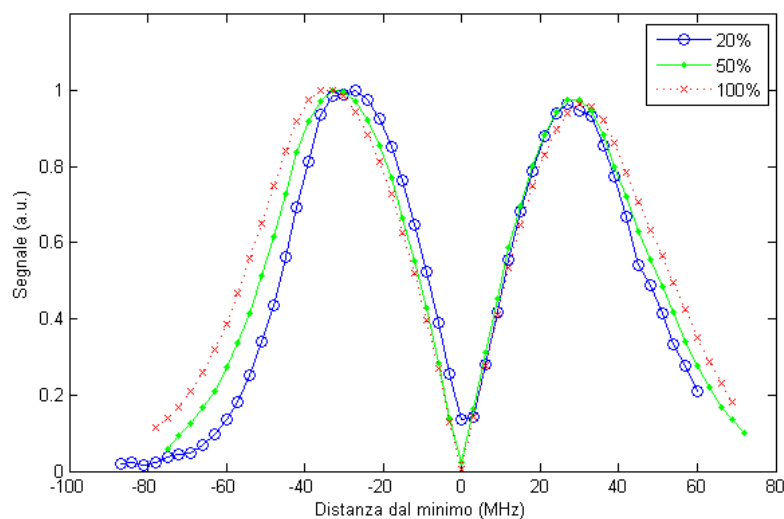


Figura 3.13: Confronto tra i profili di polarizzazione in funzione della frequenza di irraggiamento per i tre diversi arricchimenti in  $^{13}\text{C}$  delle miscele di sodio acetato. Ogni profilo è normalizzato per il proprio massimo del segnale, e la frequenza è espressa come distanza dal minimo di polarizzazione tra i due picchi.

I risultati ottenuti indicano che nella scelta della preparazione da utilizzare per gli studi in vivo è necessario un compromesso tra il valore massimo di polarizzazione ottenibile e la rapidità con cui questa si raggiunge.

### 3.1.5 Spettri DNP: alcune considerazioni sulla fisica della DNP

Altri elementi di discussione sulla fisica della DNP possono essere offerti dagli spettri DNP, cioè dalla rappresentazione del segnale ottenuto in funzione della frequenza di irraggiamento. Gli spettri DNP per i campioni con diverso arricchimento di  $^{13}\text{C}$  sono riportati in figura (3.13). Nella figura si possono individuare due picchi, corrispondenti alla situazione in cui gli spin  $^{13}\text{C}$  sono forzati a disporsi in maniera parallela (primo picco) o antiparallela (secondo picco) al campo applicato. Si nota un allargamento della forma dei picchi al crescere della percentuale di spin  $^{13}\text{C}$  nei campioni. Questo effetto può essere spiegato con un cambiamento nel contributo relativo dei meccanismi di polarizzazione descritti in precedenza. Non è semplice definire a priori il ruolo di ciascun processo nelle misure effettuate, ma i risultati ottenuti possono offrire degli spunti di riflessione. Una minore larghezza del profilo di polarizzazione può indicare un ruolo preminente di un meccanismo rispetto agli altri, mentre una banda più larga una sovrapposizione di più meccanismi [43],[120]. Inoltre, la separazione tra il massimo dei picchi è 54 MHz, 60 MHz, 63 MHz al crescere dell'arricchimento in  $^{13}\text{C}$  contro i circa 72 MHz previsti



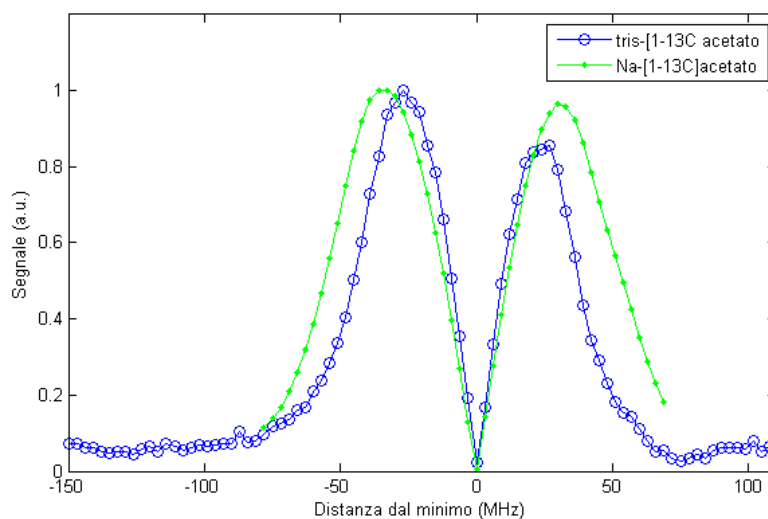


Figura 3.14: Confronto tra i profili di polarizzazione in funzione della frequenza di irraggiamento di una miscela di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato (preparazione 1 in tabella 2.1) e Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato (formulazione 3 in tabella 2.2). Ogni curva è stata normalizzata per il rispettivo massimo, la frequenza è espressa come distanza del minimo di polarizzazione tra i due picchi.

dal modello del solid effect (il doppio della frequenza di Larmor dei nuclei di  $^{13}\text{C}$  a 3.35 T). Da ciò si può dedurre che i processi di interazione a più nuclei come cross effect e thermal mixing hanno un ruolo preminente rispetto al solid effect. L'allargamento dei picchi e la aumentata separazione dei massimi all'aumentare dell'arricchimento possono indicare un overlapping di più meccanismi, forse per il modificato rapporto spin  $^{13}\text{C}$ /elettroni. Si può ipotizzare che vi sia un maggior contributo della componente del solid effect per i campioni con una maggiore concentrazione di spin  $^{13}\text{C}$ , in aggiunta alla presenza maggioritaria di cross effect e/o thermal mixing per i campioni a bassa concentrazione di  $^{13}\text{C}$ . Da notare come questo fatto possa avere un ruolo, insieme al meccanismo della spin diffusion, nella diminuzione del parametro  $\tau$  all'aumentare del numero di spin  $^{13}\text{C}$ . Naturalmente sarebbero necessarie ulteriori misure per valutare in maniera dettagliata queste ipotesi. La tendenza sembra confermata se esaminiamo la figura (3.14), in cui è riportato il confronto tra uno spettro DNP di un campione di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato (formulazione 3) e quello di un campione di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato (formulazione riportata in [106]). Ad una concentrazione minore di spin  $^{13}\text{C}$  (4.8 M per il  $^{13}\text{C}$  tris-acetato contro 7.3 M per il  $^{13}\text{C}$  Na-acetato) sembra corrispondere una minore larghezza complessiva dello spettro; la separazione dei massimi per il tris-acetato è 54 MHz, compatibile con il campione di Na-acetato ad arricchimento minore.

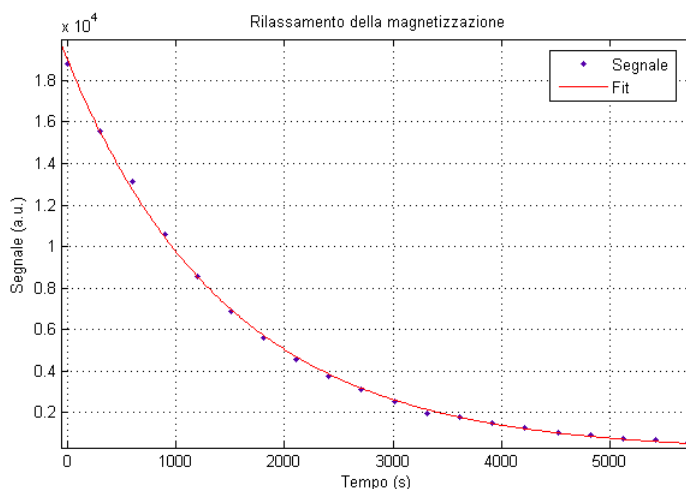


Figura 3.15: Esempio di una curva di rilassamento della magnetizzazione in funzione del tempo ottenuta per la misura del  $T_1$  a stato solido.

### 3.1.6 Misura di $T_1$ a stato solido

Un interessante aspetto che si è potuto valutare con il set up sperimentale proposto è il tempo di rilassamento  $T_1$  della soluzione standard di sodio acetato (formulazione 3) a temperatura criogenica. Come descritto nella parte di materiali e metodi, il  $T_1$  viene misurato dal fit monoesponenziale del decadimento della magnetizzazione nel tempo. In figura (3.15) è riportato un esempio di una curva ottenuta. Dal fit monoesponenziale si ricava un valore di  $T_1$ , su una media di 3 campioni, di  $(1551 \pm 11)$  s. Questo risultato è di un ordine di grandezza minore rispetto al valore di 10300 s ottenuto in un esperimento analogo [119]. Il valore ricavato dal fit può essere probabilmente spiegato tenendo presente che è diverso il tipo di radicale impiegato nei due esperimenti (25 mM OX063 in questo caso contro 33 mM TEMPO). Inoltre, la matrice è diversa tra i due studi: nello studio in [119] la concentrazione di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato è 3 M, contro 7.3 M di queste misure. Infine, la temperatura a cui viene svolto l'esperimento può giocare un ruolo: nelle misure effettuate per questo lavoro di tesi è pari a 1.4 K, mentre nello studio citato è di 1.2 K. Probabilmente si ottiene un valore minore di  $T_1$  in quanto la misura viene effettuata ad una temperatura leggermente maggiore, e di conseguenza si ha un rilassamento più veloce degli spin di  $^{13}\text{C}$  [9]. Da considerare infine la presenza degli ioni  $\text{Gd}^{3+}$  nella preparazione esaminata (non presenti invece nella formulazione impiegata nello studio citato), che contribuisce alla diminuzione del  $T_1$ . Un valore di  $T_1$  più simile a quello misurato in laboratorio viene ricavato in [115] per il [1- $^{13}\text{C}$ ]piruvato (range tra 2200 e 2900 s al variare della concentrazione di ioni  $\text{Gd}^{3+}$  nella miscela fino a 3 mM). In questo caso si tratta di una formulazione completamente diversa, in quanto l'acido

piruvico vetrifica spontaneamente, quindi non c'è bisogno di aggiungere alla preparazione un solvente vetrificante come il glicerolo. La concentrazione di radicale OX063 è in questo caso più bassa (15 mM contro 25 mM), e questo può spiegare il valore maggiore di  $T_1$  riscontrato nello studio.

## 3.2 Misure a stato liquido

Una volta che il campione è polarizzato allo stato solido, è necessario operare una dissoluzione dello stesso per ottenere una soluzione iniettabile. La fase di dissoluzione è un momento critico del processo di produzione del mezzo di contrasto iperpolarizzato: il campione, inizialmente a temperatura criogenica, viene sollevato dalla zona di massima intensità di campo e messo a contatto con un liquido sovrariscaldato. In questo momento il campo a cui è sottoposto il campione è circa 1 T. Una volta effettuata la dissoluzione, la soluzione viene espulsa al di fuori del polarizzatore e raccolta in un contenitore esterno, quindi passa a campo zero. Già in questo momento è presumibile che il campione abbia perso una parte della magnetizzazione creata dal processo di iperpolarizzazione. E' importante dunque eliminare ogni possibile fattore che possa incrementare il rilassamento durante la dissoluzione: è importante che vengano rimosse eventuali impurezze metalliche che possono essere raccolte dal serbatoio del mezzo di dissoluzione e dalla linea di uscita, dunque è per questo che il mezzo di dissoluzione contiene una quota di EDTA, composto chimico dalle proprietà chelanti; inoltre, è importante che il circuito di dissoluzione venga pulito prima di ogni sessione sperimentale con acqua milliQ e successivamente con etanolo. Una volta che la soluzione si trova all'esterno del polarizzatore, la magnetizzazione prodotta dall'iperpolarizzazione rilassa secondo il  $T_1$  del composto: per questo occorre la massima rapidità nella raccolta e nel collocamento nel polarimetro per le misure. C'è da considerare inoltre che a basso campo aumenta drammaticamente il rilassamento del  $^{13}\text{C}$  [121],[122]. Mediamente il tempo che intercorre tra l'arrivo della soluzione iperpolarizzata nel contenitore di raccolta e l'inizio della misura con il polarimetro, in cui si inserisce circa 1 ml di soluzione, o di iniezione in vivo nell'animale è di 12 s. Importante è anche il controllo del pH della soluzione, che deve rimanere intorno al valore di 7.5 per essere compatibile con l'iniezione in vivo, ma anche per evitare una diminuzione indesiderata del valore del  $T_1$ . La temperatura della soluzione iperpolarizzata deve essere quanto più prossima alla temperatura fisiologica di 37 °C per essere compatibile con l'iniezione in vivo.

Per effettuare esperimenti in vivo su animale di media taglia è importante massimizzare il numero di spin  $^{13}\text{C}$  iniettati: per questo occorre polarizzare una quantità opportuna di agente di contrasto. Nello scale up della dose non è possibile far crescere in maniera correlata anche il volume di mezzo di dissoluzione impiegato. Vi è un limite alla capacità del circuito riscaldante, che

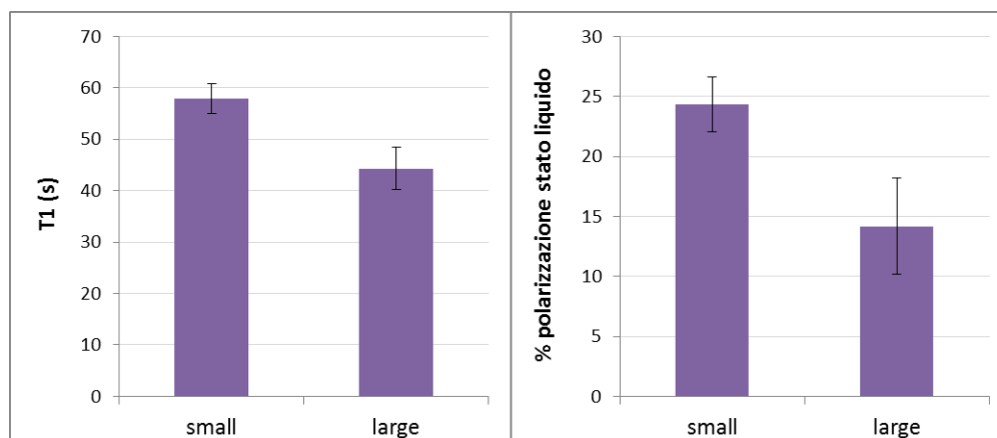


Figura 3.16: Confronto delle prestazioni a stato liquido a 1.05 T tra small doses (N=6) e large doses (N=8) per campioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato, formulazione 3.

non permette di aumentare a piacere questo volume. Negli studi effettuati l'aumento di volume del mezzo di dissoluzione per le large doses necessarie per l'iniezione in vivo è di quattro volte rispetto alle small doses (da 5 ml a 20 ml), mentre la dimensione del sample aumenta di un ordine di grandezza o più. Questo fatto comunque contribuisce ad aumentare la concentrazione di spin  $^{13}\text{C}$  nella soluzione finale, ma come effetto collaterale aumenta anche la concentrazione di radicale. Vedremo tra poco cosa comporta questo fatto. Come già evidenziato nel capitolo dedicato alle misure a stato solido, nell'ottica di effettuare studi in vivo su modello di grosso animale, è importante che l'HyperSense<sup>®</sup> riesca a sciogliere dei campioni di volume maggiore e produrre dunque una adeguata quantità di soluzione iperpolarizzata. Per verificare le prestazioni del sistema di dissoluzione dell' HyperSense<sup>®</sup> si esaminano i valori di  $T_1$  e di percentuale di polarizzazione degli stessi campioni usati per il confronto della polarizzazione a stato solido tra small doses e large doses (formulazione 3 di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato). I risultati ottenuti sono riportati in figura (3.16).

A differenza di quanto accade a stato solido, a stato liquido si nota un netto peggioramento dei parametri caratteristici: il  $T_1$  varia da una media di  $(58 \pm 3)$  s per le small doses (N=6) a una media di  $(44 \pm 4)$  s (N=8) per le large doses, e analogamente la polarizzazione cambia da  $(24 \pm 2)$  % a  $(14.2 \pm 4.0)$  %. Questo comportamento può essere dovuto principalmente a due fattori: un campione grande richiede un tempo maggiore per la dissoluzione completa, quindi una maggiore permanenza del sample iperpolarizzato fuori dalla zona in cui è presente il campo, e questo comporta una perdita netta di segnale iperpolarizzato, senza contare tutti i possibili effetti delle turbolenze che possono intervenire durante il processo di dissoluzione. In secondo luogo bisogna considerare che la concentrazione di radicale nella soluzione finale è

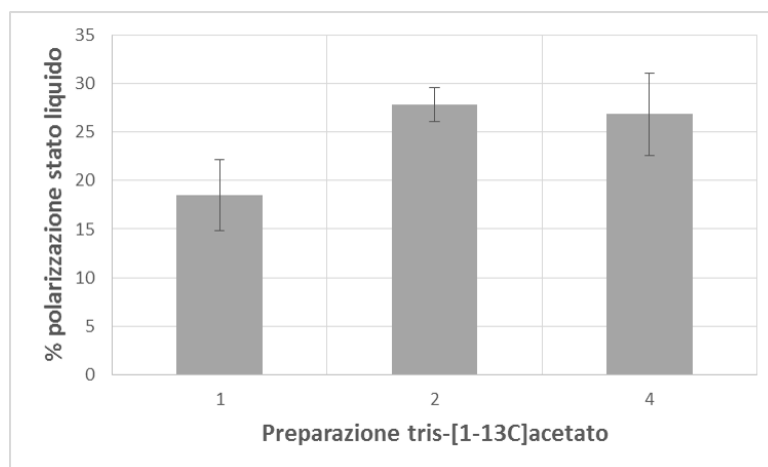


Figura 3.17: Confronto delle percentuali di polarizzazione ottenute a 1.05 T per le formulazioni di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

maggiore nella large rispetto alla small dose, visto che è aumentato il rapporto tra volume del campione e volume di mezzo di dissoluzione usato. Nel caso di queste misure i valori finali di concentrazione di radicale sono  $(0.22 \pm 0.05)$  mM per le small doses e  $(0.56 \pm 0.09)$  mM nelle large doses. Dato che i valori di  $\tau$  e  $\Pi$  sono paragonabili, queste diminuzioni non derivano da differenze tra i campioni allo stato solido.

Confrontiamo i valori di polarizzazione a stato liquido delle formulazioni di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato, confrontando le small doses, riportati in figura (3.17): questo confronto viene effettuato su campioni di massa simile, per evitare errori di valutazioni dovuti alle differenti dimensioni dei campioni polarizzati. Nella figura vengono confrontate le prestazioni delle tre formulazioni studiate, privilegiando per l'ultima formulazione i campioni omogeneizzati con il sonicatore prima dell'inserimento nel polarizzatore (per problemi tecnici non è stato possibile effettuare misure a stato liquido sui sample preparati secondo la formulazione 3). Si nota come effettivamente vi sia una differenza significativa tra la formulazione 1 e la formulazione 2, in cui viene aggiunto il glicerolo. Per queste due formulazioni viene mantenuto dunque ciò che si è visto a stato solido. Per quanto riguarda la formulazione 4 invece non si ripete quanto visto a stato solido, essendo la polarizzazione ottenuta a stato liquido in linea con la formulazione 2. Questo risultato si può spiegare con la differente concentrazione di radicale tra le formulazioni, come riportato nella tabella (2.1): nella formulazione 4 l'aumentata concentrazione di OX063 effettivamente diminuisce il valore di polarizzazione ottenuto.

Il radicale va ad influenzare pesantemente la rilassività dei nuclei di  $^{13}\text{C}$  [109], come si può evincere dalla figura (3.18), in cui viene riportato l'andamento del  $T_1$  in funzione della concentrazione di radicale nei campioni preparati secondo la formulazione 4 in tabella (2.1), raggruppati per classi omogenee

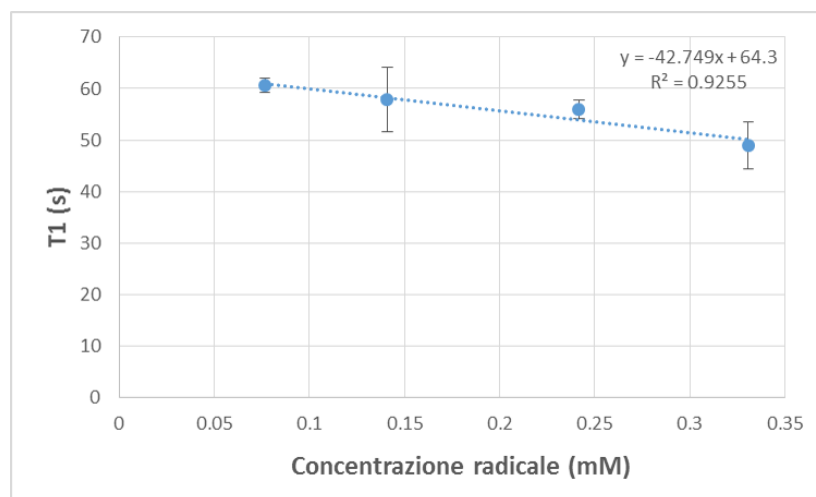


Figura 3.18: Valore di  $T_1$  misurato a 1.05 T in funzione della concentrazione di radicale presente nella soluzione finale per la formulazione 4 di tris-[1- $^{13}\text{C}$ ] acetato.

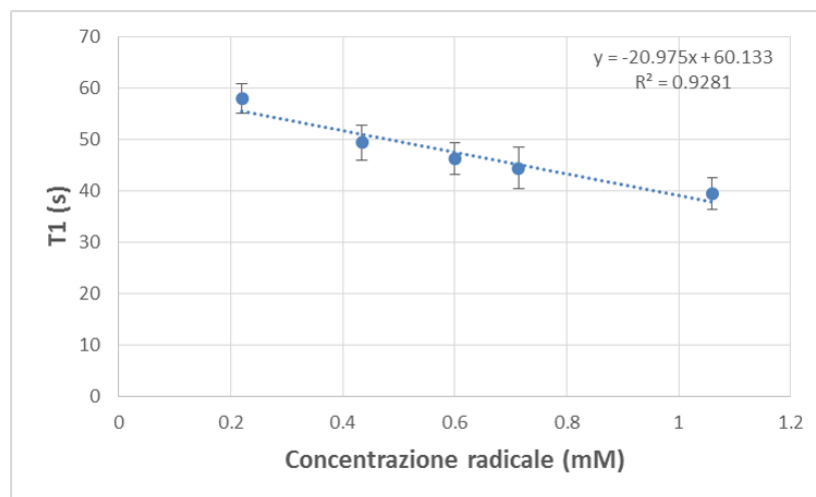


Figura 3.19: Valore di  $T_1$  misurato a 1.05 T in funzione della concentrazione di radicale presente nella soluzione finale per le formulazioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ] acetato.

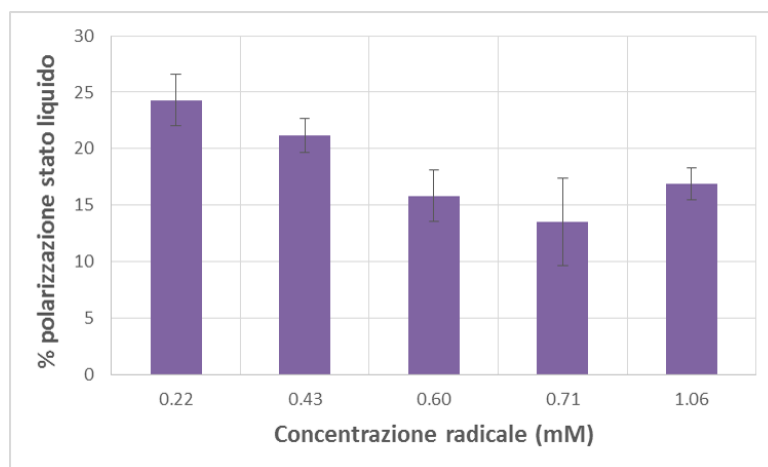


Figura 3.20: Valore di percentuale di polarizzazione misurato a 1.05 T in funzione della concentrazione di radicale presente nella soluzione finale per le formulazioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato.

di concentrazione. In particolare il  $T_1$  della soluzione iperpolarizzata diminuisce in maniera lineare con la concentrazione di radicale in essa presente. Lo stesso andamento del  $T_1$  in funzione della concentrazione di radicale è confermata anche per i campioni di Na-[1- $^{13}\text{C}$ ]acetato, come si può vedere nella figura (3.19). L'aspetto fondamentale dell'andamento evidenziato nelle figure (3.18) e (3.19) è che questo è indipendente dalla formulazione polarizzata: il parametro fondamentale che detta il valore di  $T_1$  della soluzione iperpolarizzata nelle miscele testate è la concentrazione di radicale. Questo fatto si va a riflettere sulla percentuale di polarizzazione ottenuta, come si può vedere dalla figura (3.20). Si vede come la percentuale di polarizzazione diminuisca sensibilmente all'aumentare della concentrazione di radicale, fino a che non si raggiunge un limite per cui non si hanno variazioni significative. Di questi effetti dunque si deve tenere di conto quando si vanno ad effettuare le prove in vivo: il valore di  $T_1$  e di percentuale di polarizzazione sono dunque limitati dal fatto che dobbiamo usare delle large doses per massimizzare il numero di spin  $^{13}\text{C}$  iniettati. Ciononostante si ottengono dei valori di  $T_1$  (al minimo 40 s) e di percentuale di polarizzazione (almeno 15%) che consentono di poter effettuare degli studi in vivo.

### 3.3 Misure in vivo

Una volta definita la possibilità di ottenere un buon grado di polarizzazione per le formulazioni di tris e sodio acetato proposte, siamo in grado di affrontare degli studi in vivo, seguendo gli esempi già proposti in letteratura con [1- $^{13}\text{C}$ ] piruvato [83],[86],[90] e con lo stesso [1- $^{13}\text{C}$ ]acetato [96],[97],[99],

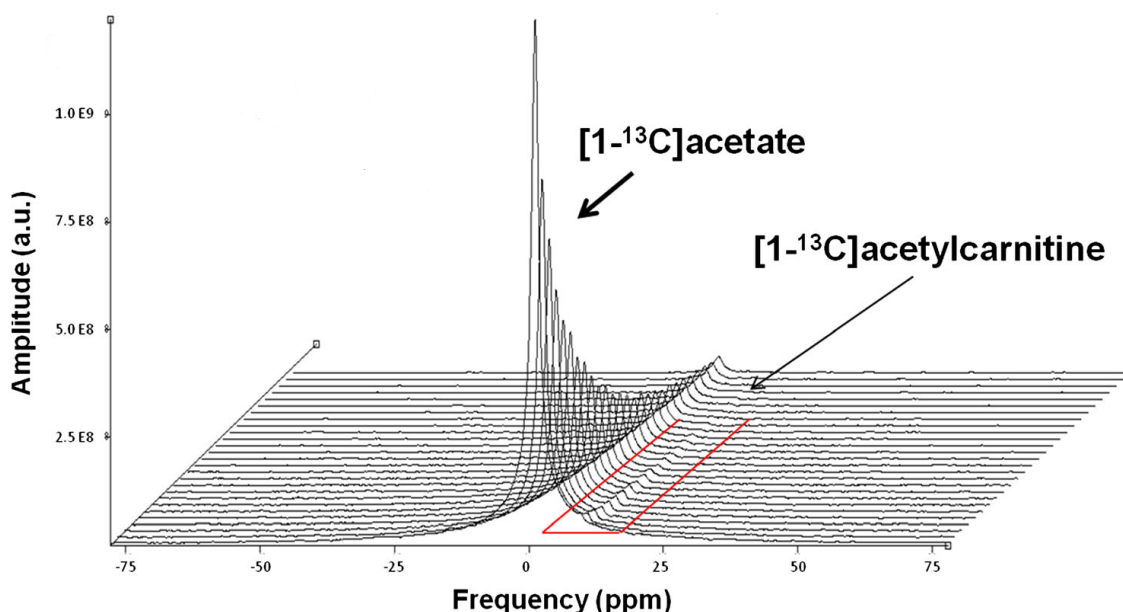


Figura 3.21: Esempio della serie di spettri  $^{13}\text{C}$  in vivo ottenuti durante una sessione sperimentale.

però questa volta con esperimenti su modello animale di media taglia. Lo studio sull'animale di media taglia si rende preferibile in quanto vi è una più accurata somiglianza, rispetto al modello di piccolo animale, dell'anatomia e dei processi metabolici che riguardano l'uomo. Questo studio rientra nell'ottica della cosiddetta medicina traslazionale, il cui scopo è quello di unire le conoscenze scientifiche e cliniche per implementare nuove metodologie diagnostiche e cliniche al servizio del malato. In particolare il modello suino viene spesso utilizzato per studi in vivo come rappresentativo del sistema cardiovascolare umano. Questi studi con  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato sono stati effettuati per la prima volta sull'animale di grossa taglia nei laboratori della Fondazione Regione Toscana Gabriele Monasterio. La miscela scelta per questi studi è la formulazione 3 di  $\text{Na}-[1-^{13}\text{C}]$ acetato (concentrazione di OX063 pari a 25 mM), in modo da massimizzare il numero di spin  $^{13}\text{C}$  iniettati e minimizzare il tempo di attesa per ottenere una dose iperpolarizzata. Negli studi effettuati il valore di concentrazione di spin  $^{13}\text{C}$  nella soluzione finale è pari a circa 150 mM (3 mmol  $^{13}\text{C}$  in 20 mL), valore che comunque rimane nettamente inferiore a studi con  $^{13}\text{C}$  acetato iperpolarizzato riportati sul piccolo animale: la dose efficace iniettata è pari a 0.08 mmol/Kg (peso dell'animale), mentre negli studi con  $^{13}\text{C}$  acetato effettuati su piccolo animale sono riportati valori da 1.5 (0.123 mmol/Kg) fino a 5.5 volte (0.44 mmol/Kg)[97],[99].

In figura (3.21) è riportato un tipico esempio della successione degli spettri in funzione del tempo ottenuti durante uno studio in vivo. In essa distinguiamo un picco dovuto al  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato e a destra di questo, spostato di



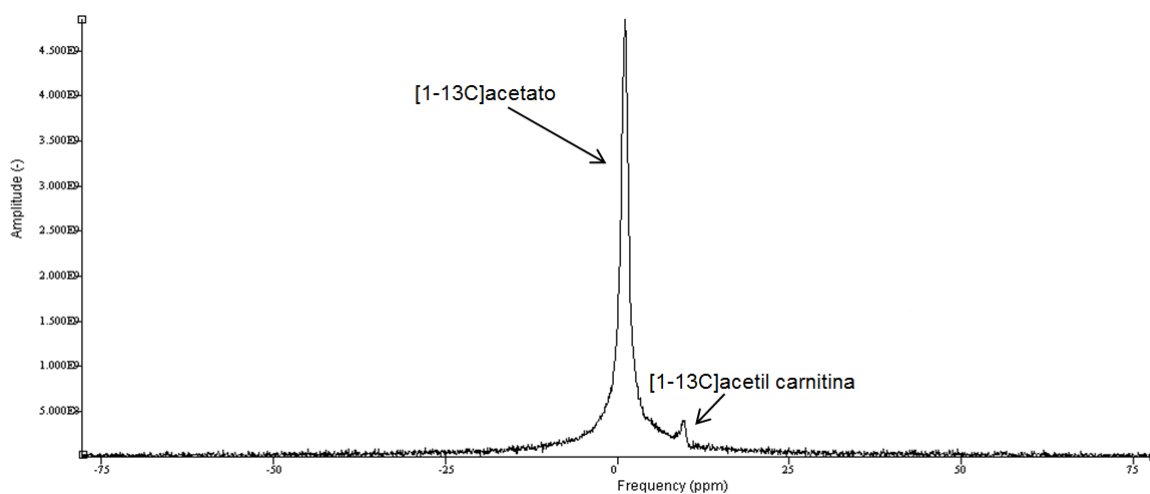


Figura 3.22: Con riferimento allo studio in figura 3.21, somma degli spettri ottenuti da 20 s a 36 s dopo l'inizio dell'iniezione.

circa 8.6 ppm (276 Hz a 3 T), un picco dovuto alla  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina. La presenza di due picchi distinti viene evidenziata nella figura (3.22), in cui è riportata la somma degli spettri di  $^{13}\text{C}$  ottenuti tra  $t=20$  s e  $t=36$  s dopo l'inizio dell'iniezione. L'attribuzione del picco trovato proprio a questo metabolita è giustificata da un confronto con i risultati ottenuti in altri studi presenti in letteratura [96],[97],[99].

La comparsa del picco dovuto alla  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina indica che effettivamente avviene una conversione del  $[1-^{13}\text{C}]$  nelle cellule del tessuto cardiaco, e giustifica l'assunzione fatta in precedenza che durante il passaggio da una molecola all'altra il nucleo di  $^{13}\text{C}$  mantenga la sua polarizzazione, e poi risuoni a una diversa frequenza in relazione al mutato intorno chimico. Va sottolineato come si riesca ad apprezzare una conversione metabolica anche sull'animale di media taglia, sebbene evidenziata da un segnale che, confrontato sul massimo del picco, è minore di circa due ordini di grandezza di quello del mezzo di contrasto iniettato.

Gli spettri vengono acquisiti ogni 2 s per 120 s. In ogni spettro, tramite l'algoritmo AMARES implementato in JMRUI, sono stati individuati i massimi dei picchi e sono stati riportati in un grafico in funzione del tempo (un esempio si può trovare in figura (3.23)). In questo modo si ottengono delle curve metaboliche, che rappresentano l'evoluzione del segnale in funzione del tempo. Si nota come sia quasi immediata la comparsa del picco del  $^{13}\text{C}$  acetato ( $9\pm 1$  s dall'inizio dell'iniezione negli  $N=4$  esperimenti effettuati), con una forma della time course che ricalca nella prima parte l'arrivo del bolo nella regione di interesse, mentre nella seconda parte si evidenzia una diminuzione del segnale dovuta alla conversione e al rilassamento della magnetizzazione.

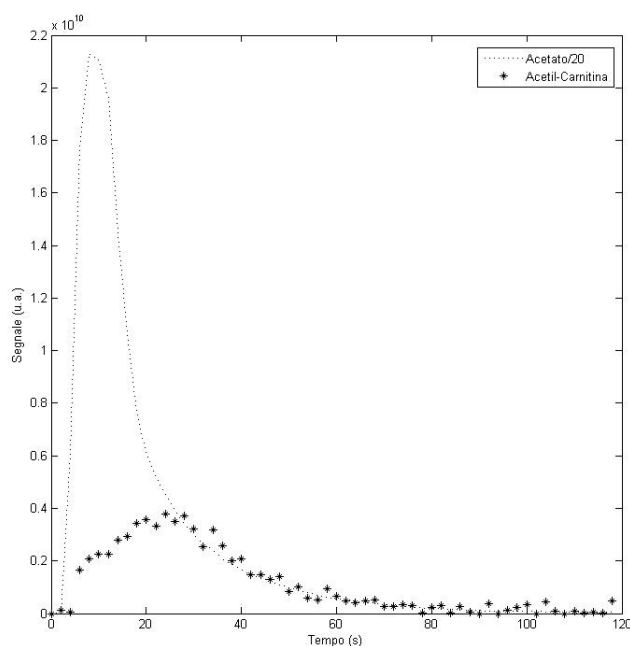


Figura 3.23: Un esempio dell'andamento dei segnali di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato e  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina in vivo in funzione del tempo.

Il segnale della  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina appare successivamente: il massimo si trova a  $24 \pm 3$  s dall'inizio dell'iniezione (media di  $N=4$  studi), come ci aspettiamo trattandosi di un prodotto di conversione.

Una volta ottenute le curve metaboliche, è possibile caratterizzare la cinetica del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato. In particolare si nota un andamento bifasico della curva dell'acetato, e per questo viene eseguito un fit su queste curve suddividendole in due parti. Dalla seconda parte della curva, con un fit monoesponenziale si ricava il  $T_1$  in vivo del  $[1-^{13}\text{C}]$ : in realtà questo è un valore efficace, nel senso che il valore di questo parametro è influenzato anche dalla contemporanea conversione in  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina. Il valore ottenuto per il  $T_1$  efficace da una media sugli  $N=4$  studi è di  $17.6 \pm 1.7$  s, ed è interessante rilevare che è un valore compatibile con quello ottenuto da uno studio su piccolo animale di  $16.2 \pm 1.4$  s [99].

Il valore del  $T_1$  ricavato viene usato per correggere la prima parte della curva e, tramite un fit con la curva  $\gamma$ -variata (2.11), ottenere dei parametri relativi alla velocità di comparsa del bolo nel tessuto cardiaco.

In figura (3.24) si può vedere un esempio del fit ottenuto. Il grafico riporta, oltre ai valori sperimentali, le time courses calcolate usando i parametri ricavati dal fit. Nella tabella (3.3) sono riportati i valori ricavati dei parametri  $a$  e  $b$  della curva. Bisogna evidenziare che i coefficienti di variazione dei

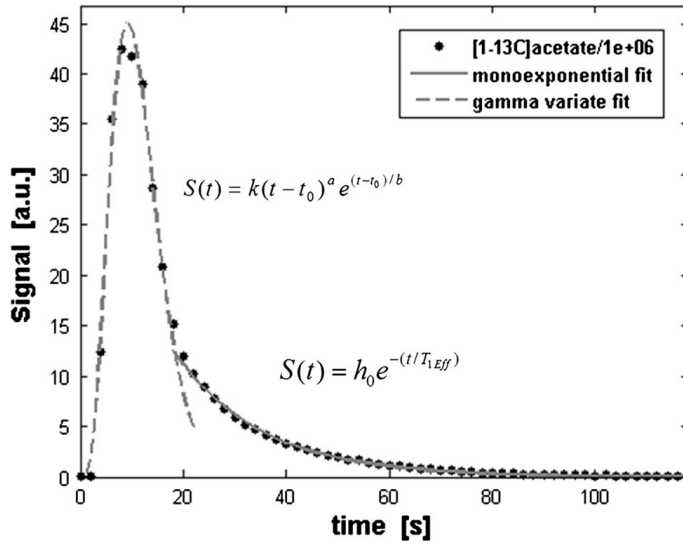


Figura 3.24: Un esempio di time course metabolica di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato con relativo fit come descritto nel testo.

Parametro	Valori ottenuti (media $\pm$ st.dev)
$a(u.a.)$	$4.5 \pm 1.1$
$b(s)$	$-1.6 \pm 0.2$

Tabella 3.3: Valori dei parametri della curva gamma variata ottenuti dal fit su  $N=4$  curve di  $[1-^{13}\text{C}]$  acetato in vivo.

parametri trovati sono 9.7, 25 e 12.5 %: ciò è un valore accettabile per esperimenti in vivo, se consideriamo la variabilità fisiologica che può intercorrere tra un animale e un altro. Da considerare inoltre che la curva dell'acetato mostra una certa somiglianza con la curva metabolica ottenuta in vivo in un esperimento PET effettuato su un intervallo di tempo di 3 minuti a seguito dell'iniezione di  $^{11}\text{C}$  [123]. Sulla base di questo lavoro si può ipotizzare che la prima parte della curva rifletta l'arrivo del bolo nella regione di interesse, mentre la seconda parte rifletta un internalizzazione all'interno delle cellule per la successiva conversione. Da notare che l'uso di acetato iperpolarizzato evidenzia questo comportamento e in più identifica una conversione metabolica.

C'è da sottolineare però che per ottenere un segnale quantificabile dalla zona cardiaca vi è l'obbligo di selezionare una fetta abbastanza spessa (40 mm di spessore) di tessuto. Con una fetta di tale spessore probabilmente si raccoglie il segnale del mezzo di contrasto iperpolarizzato presente non solo nel tessuto del miocardio, ma anche nel flusso sanguigno. Non è possibile allo stato attuale separare i contributi delle due diverse zone. Questo può introdurre un

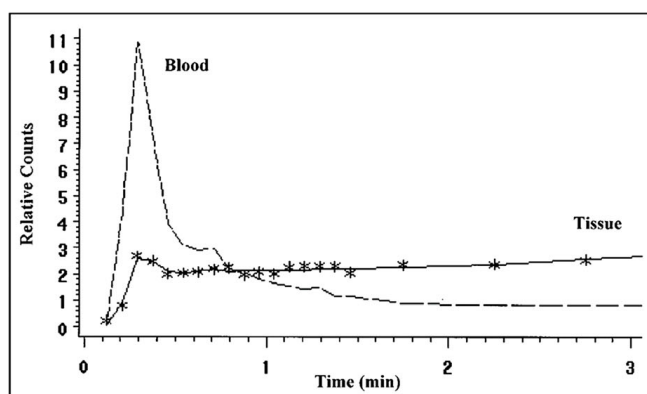


Figura 3.25: Attività del  $^{11}\text{C}$ -acetato nel tessuto flusso sanguigno e nel tessuto miocardico, ricavati da uno studio PET sul cuore umano.

errore importante nelle curve metaboliche soprattutto nella seconda parte, in cui il segnale è minore, e in parte mascherare l'effetto di internalizzazione appena discusso. Questo problema potrebbe essere superato dalla messa a punto di particolari sequenze che permettano di discriminare segnali provenienti da zone diverse all'interno del tessuto cardiaco.

Purtroppo non sembra possibile con il set up sperimentale a disposizione identificare altri metaboliti oltre ai due descritti in precedenza. Per quanto riguarda il metabolita  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil-CoA, dal quale poi ha inizio il ciclo di Krebs cellulare, il fatto che non sia presente nello spettro un picco ad esso associato può dipendere dalla velocità delle reazioni di conversione che lo coinvolgono, che con una risoluzione di 2 s forse non vengono individuate. Il suo ruolo di intermedio nel metabolismo cellulare, come evidenziato nella figura (1.16) probabilmente lo rende non rilevabile durante l'esperimento: verosimilmente la permanenza del  $^{13}\text{C}$  nella molecola di acetil CoA è veramente limitata nel tempo, in quanto si attiva subito una bufferizzazione del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil CoA in  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina [99],[97],[124], oppure si attua subito l'ingresso nel ciclo di Krebs con la formazione di altri substrati metabolici. Alcuni gruppi sono riusciti a visualizzare il  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil CoA [96],[97] durante studi di spettroscopia effettuati su piccolo animale mediante l'applicazione di un impulso a  $90^\circ$  dopo un certo intervallo di tempo dall'iniezione (in genere si applica l'impulso dopo un intervallo di tempo corrispondente al presunto raggiungimento del massimo del segnale dei metaboliti che si vogliono visualizzare). Con questa modalità di acquisizione si perde però l'informazione temporale collegata al metabolismo, visto che la magnetizzazione derivante dall'iperpolarizzazione viene in questo modo irrimediabilmente distrutta.

Per quanto riguarda il  $[5-^{13}\text{C}]$ citrato e altri metaboliti coinvolti nel ciclo di Krebs, probabilmente la loro produzione a partire dal  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iniettato è in questo caso troppo lenta, o magari la comparsa di questi metaboliti

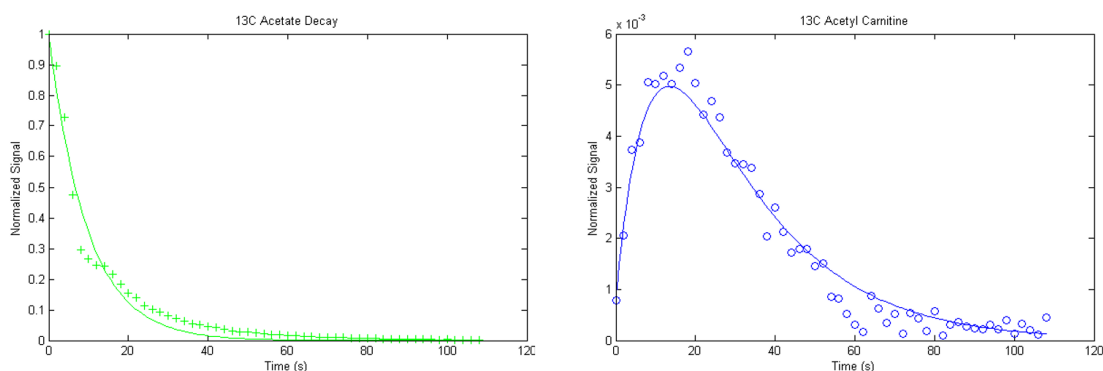


Figura 3.26: Esempi di fit delle time course metaboliche.

avviene in quantità non rilevabili dallo strumento, nonostante il protocollo sperimentale preveda che la cavia rimanga digiuna (*fasted*) per le 24 ore precedenti l'iniezione della soluzione iperpolarizzata, in modo tale da favorire per le cellule del tessuto cardiaco il pathway metabolico degli acidi grassi, a discapito della glicolisi. Non siamo in grado di stabilire se vi sia un eventuale collo di bottiglia nell'uptake del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato da parte delle cellule del miocardio, fatto che potrebbe limitare in maniera sostanziale la comparsa dei metaboliti successivi. Forse la concentrazione del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato nel flusso sanguigno rimane troppo bassa, nonostante in questi esperimenti in vivo sia tra tre e cinque volte più alta rispetto alle normali condizioni fisiologiche [125]. Un altro problema potrebbe essere la risoluzione spettrale insufficiente a distinguere eventuali picchi di frequenza prossima al picco principale: per esempio il  $[5-^{13}\text{C}]$ citrato, che ha una differenza in frequenza di 2.8 ppm rispetto al  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato [106], potrebbe essere localizzato aumentando la separazione dei picchi.

### 3.3.1 Confronto tra condizioni basali e sforzo indotto farmacologicamente

E' stata valutata la variazione dei segnali metabolici del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato incrementando il lavoro cardiaco. Per questo è stata somministrata all'animale dobutamina, un farmaco in grado di aumentare il lavoro inotropo, favorendo la contrattilità del muscolo cardiaco. E' stata esaminata la variazione del rate pressure product (RPP) e dei valori della  $k$  efficace di conversione ottenuti dal fit delle curve metaboliche. Un esempio di curve fittate è riportato nella figura (3.26), in cui la linea continua rappresenta la time course metabolica stimata con la funzione *sbiosimulate* del tool Simbiology di MATLAB, sulla base del sistema di equazioni (2.12), con partenza del fit dal massimo del segnale dell'acetato.

Nelle figure (3.27) e (3.28) è riportato il confronto tra i valori di RPP e  $k$ ,

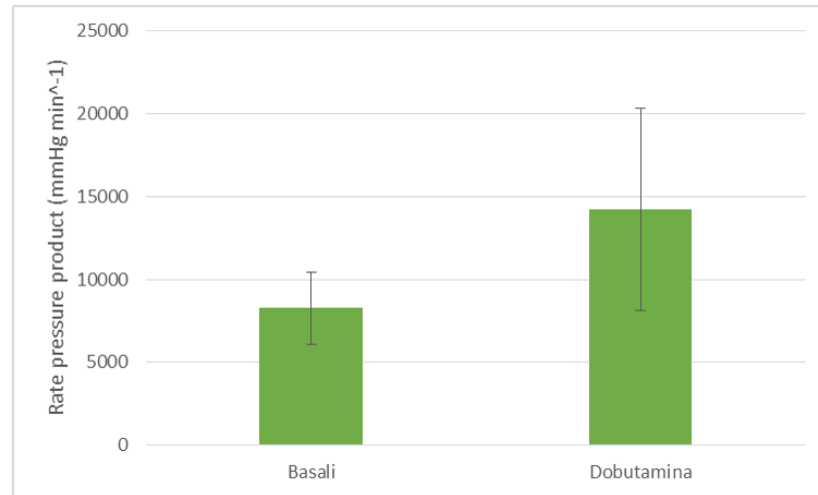


Figura 3.27: Media e deviazione standard dei valori di RPP misurati durante le iniezioni di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato, distinti tra caso basale e dobutamina.

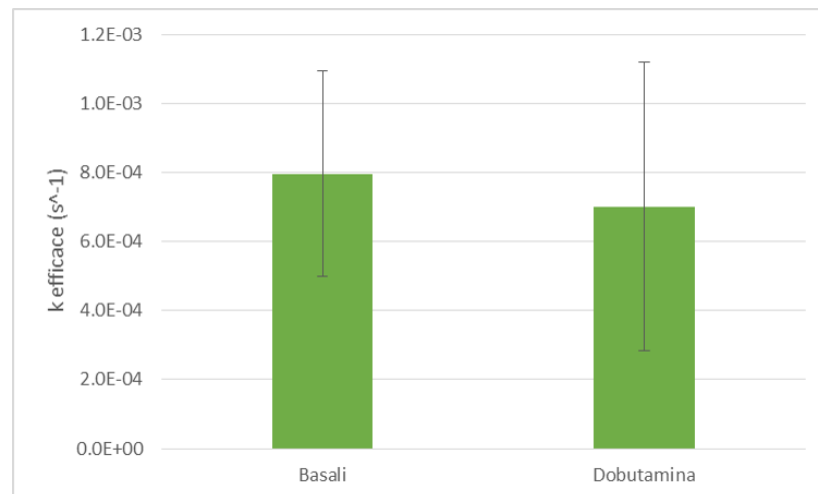


Figura 3.28: Media e deviazione standard dei valori di k efficace stimati dal fit delle curve metaboliche con il tool *Simbiology*, distinti tra caso basale e dobutamina.

ricavati negli studi in vivo, misurati in condizioni basali e dopo lo sforzo indotto farmacologicamente. Si nota che, a fronte di un aumento del RPP, che testimonia un incremento del lavoro inotropo, non si ha una variazione significativa dei valori calcolati della costante di conversione enzimatica, mentre invece sarebbe stato lecito aspettarsi un aumento dei valori di  $k$ , che rappresenta la velocità con cui avviene la conversione dell'acetato nelle cellule del miocardio [126]. Sulla base dei dati ottenuti possiamo affermare che il protocollo usato non descrive in maniera adeguata i cambiamenti delle condizioni fisiologiche dell'animale in condizioni di stress.

Il modello esplicitato nelle equazioni (2.12) non riesce a fittare in maniera appropriata l'andamento bifasico della time course metabolica dell'acetato. Inoltre, il segnale derivante dalla  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina è estremamente basso (circa due ordini di grandezza minore di quello del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato), probabilmente a causa di uno scarso oppure lento processo di internalizzazione e conversione dell'acetato nelle cellule del miocardio, e questo fatto contribuisce a rendere difficoltoso il fit.

Inoltre il modello proposto, basato sulle equazioni di Bloch per la magnetizzazione, prende in considerazione soltanto una pseudo-conversione del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato in  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina e il rilassamento della magnetizzazione. In realtà, come abbiamo visto, i processi metabolici sono molteplici, il valore di  $k$  ricavato dal fit è in realtà una stima di una costante "efficace" che dà una quantificazione di tutte questi passaggi successivi. Probabilmente il parametro  $k$  così ricavato non è idoneo alla valutazione "fine" di minime variazioni metaboliche stress inotropo indotto farmacologicamente. Miglioramenti nelle tecniche di monitoraggio delle condizioni fisiologiche dell'animale, cosiccome nuovi modelli interpretativi delle cinetiche metaboliche, potrebbero contribuire a chiarire la dinamica del processo metabolico e dei cambiamenti dei parametri fisiologici dell'animale in condizione di stress.





# Conclusioni

Nell'ambito del presente lavoro di Tesi è stata messa a punto una procedura per l'iperpolarizzazione di miscele arricchite in  $^{13}\text{C}$ , funzionali all'impiego della Risonanza Magnetica spettroscopica nell'animale di grossa taglia. Durante il lavoro è stata effettuata una caratterizzazione fisico chimica di diverse formulazioni di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato allo stato solido e allo stato liquido, finalizzate alla messa a punto della formulazione ottimale e all'indagine sulla fisica della DNP.

E' stato effettuato uno scale-up della dose polarizzata per effettuare degli studi in vivo su modello porcino, e sono stati valutati gli aspetti negativi comportati da un incremento della dose da polarizzare.

E' stata messa a punto una metodica di Risonanza Magnetica Spettroscopica per l'acquisizione dei segnali metabolici e l'estrazione delle curve metaboliche di conversione di  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato in  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina in vivo.

E' stata successivamente eseguita un'analisi della cinetica dell'agente di imaging iniettato, ed è stata effettuata una stima delle costanti di conversione enzimatiche apparenti.

Dai risultati ottenuti in condizioni di stress inotropo, non è possibile rivelare variazioni "fini" delle condizioni fisiologiche dell'animale dai valori delle costanti ottenute. Il limite principale del  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato è probabilmente il lento processo di internalizzazione e conversione nelle cellule del miocardio, che limita il valore di SNR della  $[1-^{13}\text{C}]$ acetil carnitina.



## Appendice A

# Misura del $T_1$ a stato solido

Per la misura del  $T_1$  a stato solido si fa uso di una routine implementata all'interno del programma RINMR (v.5.7). Il programma consente di costruire semplici routine basate su linguaggio Visual Basic, a cui si aggiungono specifici comandi per interfacciarsi con il polarimetro MQC. Ogni routine prevede inizialmente la dichiarazione delle variabili usate, poi una parte in cui si richiamano le sequenze usate e i relativi parametri e si procede alla scansione, e infine una parte in cui si fa post processing del segnale ottenuto.

La misura consiste nel polarizzare il campione per circa quaranta minuti, poi spegnere le microonde ed eseguire delle scansioni con una sequenza *pulse and acquire* ( $FA=5^\circ$ ,  $TR=300$  s), in modo da seguire il rilassamento della magnetizzazione nel tempo.

Viene creato un apposito file di testo nel computer di controllo che definisce la temperatura a cui avviene la misura e il livello di elio presente nella camera di polarizzazione. Inoltre vengono fissate la durata dell'irraggiamento delle microonde, la frequenza e la potenza. Una volta che il campione è stato polarizzato per il tempo necessario ad ottenere un segnale di magnetizzazione sufficiente, le microonde vengono spente. Nel file di testo è specificata una riga in cui si setta la potenza delle microonde a zero: questo parametro serve da trigger per l'inizio delle acquisizioni da parte della routine. La routine acquisisce un FID ogni TR, per il numero di volte specificato dall'utente, e dopo una procedura di baseline correction e apodizzazione nel dominio del tempo, trasformata di Fourier e rifasamento dello spettro ottenuto, calcola il valore del segnale come media di cento punti successivi intorno al massimo del picco. La routine crea infine un file di testo in cui è riportato l'istante di tempo in cui avviene l'acquisizione e il valore del segnale.

Di seguito è riportato il file di configurazione del polarimetro. Con il carattere ' sono evidenziati i commenti.

```

Settings
Temperature=1.4
LHeLevel=55

MQC
MACHINE=SPECTROMETER
MeasurementDelay=1000

Sweep
'Durata polarizzazione (s), frequenza di irraggiamento (MHz), potenza (mw)
2400 94.150 100
1 93.800 0
1 93.800 0

```

N.B. La frequenza viene cambiata dopo la polarizzazione a 93.800 GHz, quindi molto lontano dalla frequenza di risonanza dell'elettrone, per evitare che, anche se la potenza è settata a zero, vi sia comunque un irraggiamento residuo che possa ristabilire la polarizzazione.

Di seguito è riportato il codice per la misura del  $T_1$  a stato solido con l'HyperSense<sup>®</sup>. Con il carattere ' sono evidenziati i commenti.

```

Option Explicit
'*****
Monitoraggio del rilassamento della magnetizzazione per 13C acetato iperpolarizzato
'*****
Sub Main()

'Dichiarazione variabili
Dim Scans Dim Delay
Dim FSO
Dim Ftxt
Dim sPipeText
Dim Outfilename
Dim n
Dim Datasize
Dim t
Dim i
Dim P90
Dim tempo

'Collegamento al polarizzatore
NMR.Execute("WAIT PIPE 1 HIDE")
NMR.Execute("WAIT PIPE 1 HIDE")

```

```

NMR.Execute("WAIT PIPE 1 HIDE")

NMR.Execute("~PMODE")
'Acquisisce da tastiera il nome del file di riepilogo e dei file RIDAT (SOLO DATI
DEL FID)
'Se viene premuto "CANCEL" il programma si ferma
Outfilename=GetDataName(1)
If Outfilename="" Then
Exit Sub
End If

Scans = InputBox("Enter The number of scans to perform")
'Controlla che sia acquisito un numero, oppure
'trasforma la stringa acquisita in numero intero,
'altrimenti esce
If IsNumeric(Scans) Then
Scans = CInt(Scans)
Else
Exit Sub
End If

'Acquisisce da tastiera il TR
Delay = InputBox("Enter The delay between measurments in seconds")

'Crea il file dei risultati delle scansioni, da usare per il fit
Set FSO=CreateObject("Scripting.FileSystemObject")
Set Ftxt = Fso.CreateTextFile(Outfilename, True)

NMR.Execute("~AMODE")           'Acquisition Mode
NMR.Execute("LOAD FID")        'Carica la sequenza FID
NMR.Execute("P90 " & 15.334)    'Lunghezza impulso per angolo di 5°
NMR.Execute("RD " & 100000)     'Modifica il ritardo alla fine della scansione
NMR.Execute("SF " & 35.97315769) 'Frequenza NMR 13C Acetate
NMR.Execute("NS " & 1)         'Solo un singolo FID per acquisizione
n=1                             'Reset del contatore delle scansioni
NMR.Execute("~PMODE")          'Process Mode
NMR.Execute("XY QUIT")         'Chiude eventuali grafici aperti
NMR.Execute("XY")              'Apre la parte grafica
NMR.Execute("LB " & 2000)      'Larghezza del filtro (Hz) per apodizzazione
Show "Start Polarisation and Press to start"

'Il polarizzatore invia continuamente la stringa corrispondente al comando che
sta eseguendo
'Se la stringa contiene "Power 0", significa che è finita la polarizzazione

```

```

Do
NMR.Execute("WAIT PIPE")
sPipeText = NMR.ReturnValue
If ( Pos("Power 0",sPipeText) > 0 ) Then
Exit Do
End If
If sPipeText = "" Then Exit Sub
Loop

'Acquisisce l'orario di inizio della misura
'Salva nella variabile i l'orario acquisito
NMR.Execute("TIME")
i=NMR.ReturnValue

if Scans>1 then
Do

'Acquisisce l'orario corrente
'Salva nella variabile t l'orario della n-esima scansione
NMR.Execute("TIME")
t=NMR.ReturnValue

'Effettua la scansione
'Crea file .ridat del singolo FID, sovrascrivendo (Y) eventuali file precedenti,
'aggiungendo nel nome file il numero della scansione
NMR.Execute("~AMODE")
NMR.Go
NMR.Execute("WR " & Chr(34) & OutFileName & "." & n & Chr(34)& " Y")

'Post processing
NMR.Execute("~PMODE") 'Process Mode
NMR.Execute("BC")      'Baseline correction
NMR.Execute("EM")      'Apodizzazione
NMR.Execute("FT")      'Trasformata di Fourier del FID
NMR.Execute("ROT")     'Rifasamento
NMR.Execute("QA")      'Scelta della fase di ordine zero

'Restituisce il valore della media di 100 punti intorno al massimo
'Salva questo valore nella variabile Datasize
NMR.Execute("SIZE 100" )
Datasize=NMR.ReturnValue

'Calcola l'istante della scansione come differenza dei due orari, convertendo
'in secondi e tenendo conto del tempo macchina necessario per l'acquisizione.

```

```

tempo=Cdbl((t-i)*24*60*60)+0.00006654

'Mette un punto sul grafico.
'Aggiunge una riga nel file dei risultati con tempo, segnale e i due orari.
NMR.Execute("XY DATA " & tempo & Datasize)
fTxt.WriteLine(tempo & chr(9) & Datasize & chr(9) & t & chr(9) & i

NMR.Execute("WAIT " & delay) 'Aspetta un TR
n=n+1                          'Cambio indice per scansione successiva
Loop Until n=Scans             'Si ferma al numero di scansioni-1
end if

'Ultima scansione, faccio così per avere i file .ridat con il numero della scan-
sione vero (da 1 a n), in caso di problemi è più comodo

NMR.Execute("TIME")
t=NMR.ReturnValue
NMR.Execute("~AMODE")
NMR.Go
NMR.Execute("WR " & Chr(34) & OutFileName & "." & n & Chr(34) & " Y")
NMR.Execute("~PMODE")
NMR.Execute("BC")
NMR.Execute("EM")
NMR.Execute("FT")
NMR.Execute("ROT")
NMR.Execute("QA")
NMR.Execute("SIZE 100" )
Datasize=NMR.ReturnValue
tempo=Cdbl((t-i)*24*60*60)+0.00006654
NMR.Execute("XY DATA " & tempo & Datasize)
fTxt.WriteLine(tempo & chr(9) & Datasize & chr(9) & t & chr(9) & i

fTxt.close
MsgBox "Script eseguito correttamente"
End Sub

'*****

```





# Bibliografia

- [1] M.H. Levitt: *Spin dynamics, basics of nuclear magnetic resonance. 2nd edition.* Chichester, Uk, Wiley. Marzo 2008.
- [2] J.P. Cousins: *Clinical MR spectroscopy: fundamentals, current applications, and future potential.* AJR Am J Roentgenol, 1995;164:1337-47.
- [3] K. Golman, L.E. Olsson, O. Axelsson, S. Månsson, M.Karlsson, J. Petersson: *Molecular imaging using hyperpolarized  $^{13}\text{C}$ .* The British Journal of Radiology 2003;76:S118-S127.
- [4] D.G. Crabb, W. Meier: *Solid polarized targets for nuclear and particle physics experiments.* Annu. Rev. Nucl. Part. Sci. 1997;47:67–109.
- [5] B.M. Goodson: *Nuclear Magnetic Resonance of Laser-Polarized Noble Gases in Molecules, Materials, and Organisms.* Journal of Magnetic Resonance 2002;155:157–216.
- [6] A. Comment, M.E. Merrit: *Hyperpolarized Magnetic Resonance as a Sensitive Detector of Metabolic Function.* Biochemistry 2014;53:7333-7357.
- [7] C. Cudalbu, A. Comment, F. Kurdzesau, R.B. van Heeswijk, K. Uffmann, S. Jannin, V. Denisov, D. Kirik, R. Gruetter: *Feasibility of in vivo  $^{15}\text{N}$  MRS detection of hyperpolarized  $^{15}\text{N}$  labeled choline in rats.* Phys. Chem. Chem. Phys. 2010;12:5818–5823.
- [8] R.B. van Heeswijk, K. Uffmann, A. Comment, F. Kurdzesau, C. Perazzolo, C. Cudalbu, S. Jannin, J.A. Konter, P. Hautle, B. van den Brandt, G. Navon, J.J. van der Klink, R. Gruetter: *Hyperpolarized Lithium-6 as a sensor of nanomolar contrast agents.* Magnetic Resonance in Medicine 2009;61:1489–1493.
- [9] R. Frossati: *Polarization of  $^3\text{He}$ ,  $\text{D}_2$  (and possibly  $^{129}\text{Xe}$ ) using cryogenic techniques.* Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 1998;402:479-483.
- [10] E.V. Krjukov, J.D. O'Neill, J.R. Owers-Bradley: *Brute force polarization of  $^{129}\text{Xe}$ .* Journal of Low Temperature Physics 2005;140:397-408.

- [11] M.A. Bouchiat, T.R. Carver, C.M. Varnum: *Nuclear polarization in  $^3\text{He}$  gas induced by optical pumping and dipolar exchange*. Phys. Rev. Lett. 1960;5:373-375.
- [12] F.W. Hersman, I.C. Ruset, S. Ketel, I. Muradian, D.S. Covrig, J. Distelbrink, W. Porter, D. Watt, J. Ketel, J. Brackett, A. Hope, S. Patz: *Large production system for hyperpolarized  $^{129}\text{Xe}$  for human lung imaging studies*. Acad Radiol. 2008;15:683-692.
- [13] P. Nikolaou, A.M. Coffey, L.L. Walkup, B.M. Gust, N. Whiting, H. Newton, I. Muradyan, M. Dabaghyan, K. Ranta, G.D. Moroz, M.S. Rosen, S. Patz, M.J. Barlow, E.Y. Chekmenev, B.M. Goodson: *XeNA: an automated 'open-source'  $^{129}\text{Xe}$  hyperpolarizer for clinical use*. Magnetic Resonance Imaging 2014;32:541-550.
- [14] S.B. Fain, F.R. Korosec, J.H. Holmes, R. O'Halloran, R.L. Sorkness, T.M. Grist: *Functional lung imaging using hyperpolarized gas MRI*. Journal of Magnetic Resonance Imaging 2007;25:910-923.
- [15] D.M.L. Lilburn, G.E. Pavlovskaya, T.Meersmann: *Perspectives of hyperpolarized noble gas MRI beyond  $^3\text{He}$* . Journal of Magnetic Resonance 2013;229:173-186.
- [16] S. Siddiqui, Y. Xin, K. Emami, J. D'Armiento, T. Shiomi, H. Profka, P. Mongkolwisetwara, R. Rizi: *Hyperpolarized  $^3\text{He}$  diffusion MRI and histology of secreted frizzled related protein-1 (SFRP1) deficient lungs in a Murine model*. Magnetic Resonance Imaging 2014;32:535-540.
- [17] J.D. Quirk, Y.V. Chang, D.A. Yablonskiy: *In vivo lung morphometry with hyperpolarized  $^3\text{He}$  diffusion MRI: reproducibility and the role of diffusion-sensitizing gradient direction*. Magn. Reson. Med. 2015;73:1252-1257.
- [18] J.S. Six, T. Hughes-Riley, D.M.L. Lilburn, A. C. Dorkes, K.F. Stupic, D.E. Shaw, P.G. Morris, I.P. Hall, G.E. Pavlovskaya, T. Meersmann: *Pulmonary MRI contrast using surface quadrupolar relaxation (SQUARE) of hyperpolarized  $^{83}\text{Kr}$* . Magnetic Resonance Imaging 2014;32:48-53.
- [19] C.R. Bowers and D.P. Weitekamp: *Transformation of symmetrization order to nuclear-spin magnetization by chemical reaction and nuclear magnetic resonance*. Phys. Rev. Lett. 1986;57:2645-2648.
- [20] C.R. Bowers and D.P. Weitekamp: *Parahydrogen and synthesis allow dramatically enhanced nuclear alignment*. J. Am. Chem. Soc. 1987;109:5541-5542.

- [21] H. Jóhannesson, O. Axelsson, M. Karlsson: *Transfer of para-hydrogen spin order into polarization by diabatic field cycling*. C. R. Physique 2004;5:315-324.
- [22] J.B. Hövener, E.Y. Chekmenev, K.C. Harris, W.H. Perman, L.W. Robertson, B.D. Ross, P. Bhattacharya: *PASADENA hyperpolarization of  $^{13}\text{C}$  biomolecules: equipment design and installation*. Magn Reson Mater Phy 2009;22:111-121.
- [23] L.E. Olsson, C.M. Chai, O. Axelsson, M. Karlsson, K. Golman, J.S. Petersson: *MR coronary angiography in pigs with intraarterial injections of a hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  substance*. Magnetic Resonance in Medicine 2006;55:731-737.
- [24] P. Bhattacharya, E.Y. Chekmenev, W.F. Reynolds, S.R. Wagner, N. Zacharias, H.R. Chan, R. Bünger, B.D. Ross: *PHIP hyperpolarized MR receptor imaging in vivo: a pilot study of  $^{13}\text{C}$  imaging of atheroma in mice*. NMR Biomed. 2011;24:1023-1028.
- [25] N.M. Zacharias, H.R. Chan, N. Sailasuta, B.D. Ross, P. Bhattacharya: *Real-time molecular imaging of tricarboxylic acid cycle metabolism in vivo by hyperpolarized 1- $^{13}\text{C}$  diethyl succinate*. J. Am. Chem. Soc. 2012;134:934-943.
- [26] F. Reineri, T. Boi, S. Aime: *ParaHydrogen Induced Polarization of  $^{13}\text{C}$  carboxylate resonance in acetate and pyruvate*. Nature Communications 2015;6:5858
- [27] A. Abragam, M. Goldman: *Principles of dynamic nuclear polarisation*. Rep. Prog. Phys 1978;41:395-467.
- [28] A. Abragam, M. Borghini, P. Catillon, J. Coustham, P. Roubeau, J. Thirion: *Diffusion de protons polarisés de 20 MeV par une cible de protons polarisés et mesure préliminaire du paramètre  $C_{nn}$*  Physics Letters 1962;2:310-311.
- [29] O. Chamberlain, C.D. Jeffries, C.H. Schultz, G. Shapiro and L. Van Rossum: *Pion scattering from a polarized target*. Physics Letters 1963;7:293-295.
- [30] J.H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M.H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman: *Increase in signal-to-noise ratio of  $> 10,000$  times in liquid-state NMR*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003;100:10158-10163.
- [31] A.W. Overhauser: *Polarization of nuclei in metals*. Phys. Rev. 1953;92:411-415.

- [32] T.R. Carver C.P. Slichter: *Polarization of nuclear spins in metals*. Phys. Rev. 1953;92:212-213.
- [33] A. Abragam: *Overhauser effect in nonmetals*. Phys. Rev. 1955;98:1729-1735.
- [34] T. Maly, G.T. Debelouchina, V.S. Bajaj, K.N. Hu, C.g. Joo, M.L. Mak–Jurkauskas, J.R. Sirigiri, P.C.A. van der Wel, J. Herzfeld, R.J. Temkin, R.G. Griffin: *Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields*. J. Chem. Phys. 2008;128:052211.
- [35] K.N. Hu, G.T. Debelouchina, A.A. Smith, R.G. Griffin: *Quantum mechanical theory of dynamic nuclear polarization in solid dielectrics*. J. Chem. Phys. 2011;134:125105.
- [36] C.F. Hwang D.A. Hill: *New effect in dynamic polarization*. Phys. Rev. Lett. 1967;18:110-112.
- [37] C.F. Hwang D.A. Hill: *Phenomenological model for the new effect in dynamic polarization*. Phys. Rev. Lett. 1967;19:1011-1014.
- [38] Y. Matsuki, T. Maly, O. Ouari, H. Karoui, F. Le Moigne, E. Rizzato, Se. Lyubenova, J. Herzfeld, T. Prisner, P. Tordo, R.G. Griffin: *Dynamic nuclear polarization with a rigid biradical*. Angew. Chem. 2009;121:5096 –5100.
- [39] K.H. Hu: *Polarizing agents and mechanisms for high-field dynamic nuclear polarization of frozen dielectric solids*. Solid State Nuclear Magnetic Resonance 2011;40:31-41.
- [40] S.T. Goertz: *The dynamic nuclear polarization process*. Nucl. Inst. Meth. Phys. Res. 2004;526:28-42.
- [41] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega: *Theoretical aspects of dynamic nuclear polarization in the solid state – The solid effect*. Journal of Magnetic Resonance 2010;207:176-189.
- [42] A.A. Smith, B. Corzilius, A.B. Barnes, T.Maly, R.G. Griffin: *Solid effect dynamic nuclear polarization and polarization pathways*. J. Chem. Phys. 2012;136:015101.
- [43] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega: *Theoretical aspects of dynamic nuclear polarization in the solid state – The cross effect*. Journal of Magnetic Resonance 2012;214:29-41.
- [44] D. Shimon, Y. Hovav, A. Feintuch, D. Goldfarb, S. Vega: *Dynamic nuclear polarization in the solid state: a transition between the cross effect and the solid effect*. Phys. Chem. Chem. Phys. 2012;14:5729-5743.

- [45] D. Banerjee, D. Shimon, A. Feintuch, S. Vega, D. Goldfarb: *The interplay between the solid effect and the cross effect mechanisms in solid state  $^{13}\text{C}$  DNP at 95 GHz using trityl radicals*. Journal of Magnetic Resonance 2013;230:212-219.
- [46] V.A. Atsarkin, A.V. Kessenikh: *Dynamic nuclear polarization in solids: the birth and development of the many-particle concept*. Appl Magn Reson 2012;43:7-19.
- [47] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega: *Theoretical aspects of dynamic nuclear polarization in the solid state – spin temperature and thermal mixing*. Phys. Chem. Chem. Phys. 2013;15:188-203.
- [48] N. Bloembergen: *On the interaction of nuclear spins in a crystalline lattice*. Physica XV 1949;3-4:386-426.
- [49] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega: *Dynamic nuclear polarization assisted spin diffusion for the solid effect case*. J. Chem. Phys. 2011;134:074509.
- [50] M. Batel, M. Krajewski, K. Weiss, O. With, A. Däpp, A. Hunkeler, M. Gimersky, K.P. Pruessmann, P. Boesiger, B.H. Meier, S. Kozlerke, M. Ernst: *A multi-sample 94 GHz dissolution dynamic-nuclear-polarization system*. Journal of Magnetic Resonance 2012;214:166-174.
- [51] S. Hu, P.E.Z. Larson, M. VanCricking, A.M. Leach, I. Park, C. Leon, J. Zhou, P.J. Shin, G.Reed, P. Keselman, C. von Morze, H. Yoshihara, R.A. Bok, S.J. Nelson, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron: *Rapid sequential injections of hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate in vivo using a sub-kelvin, multi-sample DNP polarizer*. Magnetic Resonance Imaging 2013;31:490-496.
- [52] J.H. Ardenkjær-Larsen, A.M. Leach, N. Clarke, J. Urbahn, D. Anderson, T.W. Skloss: *Dynamic nuclear polarization polarizer for sterile use intent*. NMR in Biomedicine 2011;24:927-932.
- [53] K.R. Keshari, D.M. Wilson: *Chemistry and biochemistry of  $^{13}\text{C}$  hyperpolarized magnetic resonance using dynamic nuclear polarization*. Chem. Soc. Rev. 2014;43:1627-1659.
- [54] J. Svensson, S. Månsson, E. Johansson, J.S. Petersson, L.E. Olsson: *Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  MR angiography using TrueFISP*. Magnetic Resonance in Medicine 2003;50:256-262.
- [55] K. Golman, J.H. Ardenkjær-Larsen, J. S. Petersson, S. Månsson, I. Leunbach: *Molecular imaging with endogenous substances*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003;100:10435-10439.

- [56] 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, D.B. Vigneron: *High resolution  $^{13}\text{C}$  MRI with hyperpolarized urea: in vivo  $T_2$  mapping and  $^{15}\text{N}$  labeling effects*. IEEE Transaction on Medical Imaging 2014;33(2):362-371.
- [57] J.H. Ardenkjær-Larsen, C. Laustsen, S. Bowen, R. Rizi: *Hyperpolarized  $\text{H}_2\text{O}$  MR angiography*. Magnetic Resonance in Medicine 2014;71:50–56.
- [58] A.K. Grant, E. Vinogradov, X. Wang, R.E. Lenkinski, D.C. Alsop: *Perfusion maging with a freely diffusible hyperpolarized contrast agent*. Magnetic Resonance in Medicine 2011;66:746–755.
- [59] C. von Morze, P.E.Z. Larson, S. Hu, K. Keshari, D.M. Wilson, J.H. Ardenkjær-Larsen, A. Goga, R. Bok, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron: *Imaging of blood flow using hyperpolarized [ $^{13}\text{C}$ ]urea in preclinical cancer models*. J. Magn. Reson. Imaging 2011;33:692–697.
- [60] C. von Morze, R. Bok, G. Reed, J.H. Ardenkjær-Larsen, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron: *Simultaneous multiagent hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  perfusion imaging*. Magnetic Resonance in Medicine 2014;72:1599–1609.
- [61] A.P. Chen, M.J. Albers, C.H. Cunningham, S.J. Kohler, Y.F. Yen, R.E. Hurd, J. Tropp, R. Bok, J.M. Pauly, S.J. Nelson, J. Kurhanewicz, D.B. Vigneron: *Hyperpolarized C-13 spectroscopic imaging of the TRAMP mouse at 3T—Initial experience*. Magnetic Resonance in Medicine 2007;58:1099–1106.
- [62] 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.F. Yen, S.J. Nelson, D.B. Vigneron, J. Kurhanewicz: *Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading*. Cancer Res 2008;68:8607-8615.
- [63] M.M. Darpolor, Y.F. Yen, M.S. Chua, L. Xing, R.H. Clarke-Katzenberg, W. Shic, D. Mayer, S. Josan, R.E. Hurd, A. Pfefferbaum, L. Senadheera, S. So, L.V. Hofmann, G.M. Glazer, D.M. Spielman: *In vivo MRSI of hyperpolarized [ $1-^{13}\text{C}$ ]pyruvate metabolism in rat hepatocellular carcinoma*. NMR Biomed. 2011;24:506–513.
- [64] 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. Ardenkjær-Larsen, A.P. Chen, R.E. Hurd, L.I. Odegardstuen, F.J. Robb, J. Tropp, J.A. Murray: *Metabolic imaging of patients with*

- prostate cancer using hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate*. *Sci Transl Med* 2013;5:198ra108.
- [65] C. Cabella, M. Karlsson, C. Canapè, G. Catanzaro, S. Colombo Serra, L. Miragoli, L. Poggi, F. Uggeri, L. Venturi, P.R. Jensen, M.H. Lerche, F. Tedoldi: *In vivo and in vitro liver cancer metabolism observed with hyperpolarized [5-<sup>13</sup>C]glutamine*. *Journal of Magnetic Resonance* 2013;232:45–52.
- [66] M. Karlsson, P.R. Jensen, R. in 't Zandt, A. Gisselsson, G. Hansson, J.Ø. Duus, S. Meier and M.H. Lerche: *Imaging of branched chain amino acid metabolism in tumors with hyperpolarized <sup>13</sup>C ketoisocaproate*. *Int. J. Cancer*. 2010;127:729–736.
- [67] F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, S.E. Day, D.E. Hu, M. Karlsson, A. Gisselsson, M.H. Lerche, K.M. Brindle: *Detection of tumor glutamate metabolism in vivo using <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy and hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]glutamate*. *Magnetic Resonance in Medicine* 2011;66:18–23.
- [68] K.R. Keshari, D.M. Wilson, A.P. Chen, R. Bok, P.E.Z. Larson, S. Hu, M. Van Criekinge, J.M. Macdonald, D.B. Vigneron, J. Kurhanewicz: *Hyperpolarized [2-<sup>13</sup>C]-fructose: a hemiketal DNP substrate for in vivo metabolic imaging*. *J. Am. Chem. Soc.* 2009;131:17591-17596.
- [69] K.R. Keshari, V. Sai, Z.J. Wang, H.F. VanBrocklin, J. Kurhanewicz, D.M. Wilson: *Hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]dehydroascorbate MR spectroscopy in a murine model of prostate cancer: comparison with <sup>18</sup>F-FDG PET*. *The Journal Of Nuclear Medicine* 2013;54:922-928. *Magn. Reson. Med.* 2015;73:2296-305.
- [70] F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, S.E. Day, D.E. Hu, J.H. Ardenkjær-Larsen, R. in't Zandt, P.R. Jensen, M. Karlsson, K. Golman, M.H. Lerche, K.M. Brindle: *Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labelled bicarbonate*. *Nature* 2008;453:940-944.
- [71] S.E. Day, M.I. Kettunen, F.A. Gallagher, D.E. Hu, M. Lerche, J. Wolber, K. Golman, J.H. Ardenkjær-Larsen, K.M. Brindle: *Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance imaging and spectroscopy*. *Nature Medicine* 2007;13:1382-1387.
- [72] J.M. Park, L.D. Recht, S. Josan, M. Merchant, T. Jang, Y.F. Yen, R.E. Hurd, D.M. Spielman, D. Mayer: *Metabolic response of glioma to dichloroacetate measured in vivo by hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopic imaging*. *Neuro Oncol.* 2013;15:433-441.

- [73] F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, D.E. Hu, P.R. Jensen, R. in't Zandt, M. Karlsson, A. Gisselsson, S.K. Nelson, T.H. Witney, S.E. Bohndiek, G. Hansson, T. Peitersen, M.H. Lerche, K.M. Brindle: *Production of hyperpolarized [1,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]malate from [1,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]fumarate is a marker of cell necrosis and treatment response in tumors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009;106:19801-19806.
- [74] T.B. Rodrigues, E.M. Serrao, B.W.C. Kennedy, D.E. Hu, M.I. Kettunen, K.M. Brindle: *Magnetic resonance imaging of tumor glycolysis using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labeled glucose*. Nature Medicine 2014;20:93-97.
- [75] C. Canapè, G. Catanzaro, E. Terreno, M. Karlsson, M.H. Lerche, P.R. Jensen: *Probing treatment response of glutaminolytic prostate cancer cells to natural drugs with hyperpolarized [5-<sup>13</sup>C]glutamine*.
- [76] R.E. Hurd, Y.F. Yen, D. Mayer, A. Chen, D. Wilson, S. Kohler, R. Bok, D. Vigneron, J. Kurhanewicz, J. Tropp, D. Spielman, A. Pfefferbaum: *Metabolic imaging in the anesthetized rat brain using hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C] pyruvate and [1-<sup>13</sup>C] ethyl pyruvate*. Magnetic Resonance in Medicine 2010;63:1137-1143.
- [77] R.E. Hurd, Y.F. Yen, J. Tropp, A. Pfefferbaum, D. Spielman, D. Mayer: *Cerebral dynamics and metabolism of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate using time-resolved MR spectroscopic imaging*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2010;30:1734-1741.
- [78] M. Marjańska, I. Iltis, A.A. Shestov, D.K. Deelchand, C. Nelson, K. Uğurbil, P.G. Henry: *In vivo <sup>13</sup>C spectroscopy in the rat brain using hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate and [2-<sup>13</sup>C]pyruvate*. Journal of Magnetic Resonance 2010;206:210-218.
- [79] S.A. Butt, L.V. Sogaard, P.O. Magnusson, M.H. Lauritzen, C. Laustsen, P. Åkeson, J.H. Ardenkjær-Larsen: *Imaging cerebral 2-ketoisocaproate metabolism with hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopic imaging*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2012;32:1508-1514.
- [80] M. Mishkovsky, A. Comment R. Gruetter: *In vivo detection of brain Krebs cycle intermediate by hyperpolarized magnetic resonance*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2012;32:2108-2113.
- [81] M.E. Merritt, C. Harrison, C. Storey, F.M. Jeffrey, A.D. Sherry, C.R. Malloy: *Hyperpolarized <sup>13</sup>C allows a direct measure of flux through a single enzyme-catalyzed step by NMR*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007;104:19773-19777.



- [82] M.A. Schroeder, L.E. Cochlin, L.C. Heather, K. Clark, G.K. Radda, D.J. Tyler: *In vivo assessment of pyruvate dehydrogenase flux in the heart using hyperpolarized carbon-13 magnetic resonance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008;105:12051-12056.
- [83] L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori, F. Wiesinger, V. Lionetti, G. Giovannetti, G.D. Aquaro, F.A. Recchia, J.H. Ardenkjær-Larsen, M.F. Santarelli, 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 & Molecular Imaging 2012;7:85-94.
- [84] K. Golman, J.S. Petersson, P. Magnusson, E. Johansson, P. Åkesson, C.M. Chai, G. Hansson, S. Månsson: *Cardiac metabolism measured noninvasively by hyperpolarized <sup>13</sup>C MRI*. Magnetic Resonance in Medicine 2008;59:1005-1013.
- [85] M.E. Merritt, C. Harrison, C. Storey, A.D. Sherry, 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<sub>3</sub>*. Magnetic Resonance in Medicine 2008;60:1029-1036.
- [86] A. Flori, F. Frijia, V. Lionetti, J.H. Ardenkjær-Larsen, V. Positano, G. Giovannetti, R.F. Schulte, F. Wiesinger, F.A. Recchia, L. Landini, M.F. Santarelli, M. Lombardi, L. Menichetti: *DNP methods for cardiac metabolic imaging with hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate large dose injection in pigs*. Appl. Magn. Reson. 2012;43:299-310.
- [87] M.A. Schroeder, P. Swietach, H.J. Atherton, F.A. Gallagher, P. Lee, G.K. Radda, K. Clarke, 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*. Cardiovascular Research 2010;86:82-91.
- [88] D.J. Scholz, M.A. Janich, U. Köllisch, R.F. Schulte, J.H. Ardenkjær-Larsen, A. Frank, A. Haase, M. Schwaiger, M.I. Menzel: *Quantified pH Imaging with Hyperpolarized <sup>13</sup>C-Bicarbonate*. Magn. Reson. Med. 2015;73:2274-2282.
- [89] M.A. Schroeder, H.J. Atherton, D.R. Ball, M.A. Cole, L.C. Heather, J.L. Griffin, K. Clarke, G.K. Radda, D.J. Tyler: *Real-time assessment of Krebs cycle metabolism using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy*. The FASEB Journal 2009;23:2529-2538.
- [90] 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, 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.* European Journal of Heart Failure 2013;15, 130–140.

- [91] A.P. Chen, R.E. Hurd, M.A. Schroeder, A.Z. Lau, Y.P. Gu, W.W. Lam, J. Barry, J. Tropp, C.H. Cunningham: *Simultaneous investigation of cardiac pyruvate dehydrogenase flux, Krebs cycle metabolism and pH, using hyperpolarized [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]pyruvate in vivo.* NMR Biomed. 2012;25:305-311.
- [92] M. Calvani, E. Reda, E. Arrigoni-Martelli: *Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions.* Basic. Res. Cardiol. 2000;95:75-83.
- [93] W.C. Stanley, F.A. Recchia, G.D. Lopaschuk: *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart.* Physiol. Rev. 2005;85:1093–1129.
- [94] A.E. Jeukendrup: *Regulation of fat metabolism in skeletal muscle.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002;967:217-235.
- [95] P.A. Roberts, S.J.G. Loxham, S.M. Poucher, D. Constantin-Teodosiu, P.L. Greenhaff: *Acetyl-CoA provision and the acetyl group deficit at the onset of contraction in ischemic canine skeletal muscle.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2005;288:E327-E334.
- [96] K. Uffmann, A. Comment, R.B. van Heeswijk, C. Perazolla, S. Jannin, F. Kurdzesau, J.A. Konter, P. Hautle, B. van der Brandt, J.J. van der Klink, R. Gruetter: *Hyperpolarized <sup>13</sup>C acetate detection in the rat brain in vivo.* Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 2008;16:3198.
- [97] P.R. Jensen, T. Peitersen, M. Karlsson, R. in't Zandt, A. Gissels-son, G. Hansson, S. Meier, M.H. Lerche: *Tissue-specific short chain fatty acid metabolism and slow metabolic recovery after ischemia from hyperpolarized NMR in vivo.* The Journal Of Biological Chemistry 2009;284:36077-36082.
- [98] J.A.M. Bastiaansen, T. Cheng, R. Gruetter, A. Comment: *In vivo real time cardiac metabolism using hyperpolarized acetate.* Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 2012;20:4324.
- [99] J.A.M. Bastiaansen, T. Cheng, M. Mishkovsky, J.M.N. Duarte, A. Comment, 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 2013;1830:4171–4178.

- [100] U. Koellisch, C.V. Gringeri, G. Rancan, E.V. Farell, M.I. Menzel, A. Haase, M. Schwaiger, R.F. Schulte: *Metabolic imaging of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]acetate and [1-<sup>13</sup>C]acetylcarnitine - Investigation of the influence of dobutamine induced stress*. Magnetic Resonance in Medicine. 2014;DOI 10.1002/mrm.25485.
- [101] T. Harris, G. Eliyahu, L. Frydmana, H. Degani: *Kinetics of hyperpolarized <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009;106(43):18131-18136.
- [102] C. Harrison, C. Yang, A. Jindal, R.J. De Berardinis, M.A. Hooshyar, M. Merritt, A. Dean Sherry, C.R. Malloy: *Comparison of kinetic models for analysis of pyruvate-to-lactate exchange by hyperpolarized <sup>13</sup>C*. NMR Biomed. 2012; 25:1286-1294.
- [103] I.J. Day, J.C. Mitchell, M.J. Snowden, A.L. Davis: *Applications of DNP-NMR for measurement of heteronuclear T<sub>1</sub> relaxation times*. J. Magn. Res 2007;187:216-224.
- [104] H.Y. Carr, E.M. Purcell: *Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments*. Phys. Rev. 1954;94:630-638.
- [105] S. Meiboom, D. Gill: *Modified SpinEcho method for measuring nuclear relaxation times*. Rev. Sci. Instrum. 1958;29:688-691.
- [106] P.R. Jensen, S. Meier, J.H. Ardenkjær-Larsen, J.Ø. Duus, M. Karlsson M.H. Lerche: *Detection of low-populated reaction intermediates with hyperpolarized NMR*. Chem. Commun. 2009:5168–5170.
- [107] A. Naressi, C. Couturier, J.M. Devos, M. Janssen, C. Mangeat, R. de Beer, D. Graveron-Demilly: *Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package*. Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine 2001;12:141-152.
- [108] L. Vanhamme, A. van den Boogaart, S. Van Huffel: *Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge*. Journal of Magnetic Resonance 1997;129,35-43.
- [109] A. Flori, M. Liserani, F. Frijia, G. Giovannetti, V. Lionetti, V. Casieri, V. Positano, G. Donato Aquaro, F.A. Recchia, M.F. Santarelli, L. Landini, J.H. Ardenkjær-Larsen, L. Menichetti: *Real-time cardiac metabolism assessed with hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]acetate in a large-animal model*. Contrast Media & Molecular Imaging 2014;DOI: 10.1002/cmmi.1618.
- [110] T.M Yi, H.Kitano, M.I. Simon: *A quantitative characterization of the yeast heterotrimeric G protein cycle*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003;100:10764-10769.

- [111] W. W. F. Pijnappel, A. Van den Boogaart, R. De Beer, D. Van Ormondt: *SVD-based quantification of magnetic resonance signals*. Journal of Magnetic Resonance 1992;97:122-134.
- [112] L. Lumata, Z. Kovacs, C.R. Malloy, A.D. Sherry, M.E. 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. 2011;56:N85-N92.
- [113] C. Talón, Q. W. Zou, M. A. Ramos, R. Villar, S. Vieira: *Low-temperature specific heat and thermal conductivity of glycerol*. Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys. 2001;65:012203.
- [114] J.H. Ardenkjær Larsen, S. Macholl, H. Jóhannesson: *Dynamic Nuclear Polarization with trityls at 1.2 K*. Appl. Magn. Reson 2008;34:509-522.
- [115] J.W. Gordon, S.B. Fain, I.J. Rowland: *Effect of lanthanide ions on Dynamic Nuclear Polarization enhancement and liquid-state  $T_1$  relaxation*. Magnetic Resonance in Medicine 2012;68:1949-1954.
- [116] L. Friesen-Waldner, A. Chen, W. Mander, T.J. Scholl, C.A. McKenzie: *Optimisation of dynamic nuclear polarisation of  $[1-^{13}\text{C}]$  pyruvate by addition of gadolinium-based contrast agents*. Journal of Magnetic Resonance 2012;223:85-89.
- [117] L. Lumata, M.E. Merritt, C.R. Malloy, A.D. Sherry, 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 2012;116:5129-5138.
- [118] A. Comment, B. Van Den Brandt, K. Uffmann, F. Kurdzesau, S. Jannin, J.A. Konter, P. Hautle, W.TH. Wenckebach, R. Gruetter, J.J. Van Der Klink: *Design and performance of a DNP prepolarizer coupled to a rodent MRI scanner*. Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering) 2007;31B:255-269.
- [119] F. Kurdzesau, B. van den Brandt, A. Comment, P. Hautle, S. Jannin, J.J. van der Klink, J.A. Konter: *Dynamic nuclear polarization of small labelled molecules in frozen water-alcohol solutions*. J. Phys. D: Appl. Phys. 2008;41:155506.
- [120] R.A. Wind, M.J. Duijvestijn, C. Van der Lugt, A. Manenschijn, J. Vriend: *Applications of dynamic nuclear polarization in  $^{13}\text{C}$  NMR in solids*. Progress in NMR Spectroscopy, 1985;17:33-67.
- [121] N. Chattergoon, F. Martínez-Santesteban, W.B. Handler, J.H. Ardenkjær-Larsen, T.J. Scholl: *Field dependence of  $T_1$  for hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate NMR in solids*. Contrast Media & Molecular Imaging DOI: 10.1002/cmml.1494.

- [122] P. Miéville, S. Jannin, G. Bodenhausen: *Relaxometry of insensitive nuclei: optimizing dissolution dynamic nuclear polarization*. Journal of Magnetic Resonance 2011;210:137-140.
- [123] R.R. Sciacca, O. Akinboboye, R.L. Chou, S. Epstein, S.R. Bergmann: *Measurement of myocardial blood flow with PET using 1-<sup>11</sup>C-acetate*. J. Nucl. Med. 2001;42:63-70.
- [124] F.B. Stephens, D. Constantin-Teodosiu and P.L. Greenhaff: *New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle*. J. Physiol. 2007;581:431-444.
- [125] P.K. Theil, L.J. Pedersen, M.B. Jensen, C.C. Yde, K.E. Bach Knudsen: *Blood sampling and hemolysis affect concentration of plasma metabolites*. J. Anim. Sci. 2012;90:412-414.
- [126] E. Croteau, S. Gascon, M. Bentourkia, R. Langlois, J.A. Rousseau, R. Lecomte, F. Bénard: *[<sup>11</sup>C]Acetate rest-stress protocol to assess myocardial perfusion and oxygen consumption reserve in a model of congestive heart failure in rats*. Nuclear Medicine and Biology 2012;39:287-294.



# Lavori pubblicati

Nell'ambito del presente lavoro di Tesi, sono stati pubblicati due articoli sul  $[1-^{13}\text{C}]$ acetato iperpolarizzato, elencati di seguito.

A. Flori, M. Liserani, F. Frijia, G. Giovannetti, V. Lionetti, V. Casieri, V. Positano, G. Donato Aquaro, F.A. Recchia, M.F. Santarelli, L. Landini, J.H. Ardenkjær-Larsen, L. Menichetti:

*Real-time cardiac metabolism assessed with hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ acetate in a large-animal model.*

Contrast Media & Molecular Imaging 2014;DOI: 10.1002/cmimi.1618.

A. Flori, M. Liserani, S. Bowen, J.H. Ardenkjær-Larsen, L. Menichetti:

*Dissolution Dynamic Nuclear Polarization of Non-Self-Glassing Agents: Spectroscopy and Relaxation of Hyperpolarized  $[1-^{13}\text{C}]$ Acetate.*

J. Phys. Chem. A 2015;119,1885-1893.

Sono stati inoltre sottomessi i seguenti abstract:

L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori, V. Lionetti, M. Liserani, G. Giovannetti, G. Bianchi, S.L. Romano, V. Positano, J.H. Ardenkjær-Larsen, R.F. Schulte, F.A. Recchia, L. Landini, M.F. Santarelli, M. Lombardi:

*3D cardiac Chemical Shift Imaging of  $[1-^{13}\text{C}]$  hyperpolarized acetate and pyruvate in pigs.*

Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance 2013;15(Suppl 1):P10.

A. Flori, F. Frijia, G. Giovannetti, S. Burchielli, M.F. Santarelli, V. Positano, D. De Marchi, M. Liserani, L. Landini, G. Donato Aquaro, L. Menichetti:

*Dissolution-DNP of C1 and C2 labelled pyruvate cocktail for studying the myocardial uptake selection in pigs.*

European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2015; 18-20 March 2015; Tübingen; Germany. (Abstract #412).

A. Flori, M. Liserani, F. Frijia, G. Giovannetti, V. Lionetti, V. Positano, F.A. Recchia, M.F. Santarelli, J.H. Ardenkjær-Larsen, M. Lombardi, L. Landini, G.D. Aquaro, L. Menichetti:

*Hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]acetate kinetics and real-time cardiac metabolic flux of [13C]acetyl-carnitine in large animal model.*

European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2014; 4-6 June 2014; Antwerp; Belgium. (Abstract #349)

A. Flori, M. Liserani, F. Frijia, V. Lionetti, G. Giovannetti, G. Bianchi, A. Dushpanova, J.H. Ardenkjær-Larsen, G.D. Aquaro, V. Positano, M.F. Santarelli, L. Landini, M. Lombardi, L. Menichetti.

*Hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]acetate kinetics and metabolism in translational animal model: cardiac real-time detection of metabolic flux of [13C]acetyl-carnitine in pigs.*

Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB 2014, 10-16 May 2014, Milan, Italy.

A. Flori, L. Menichetti, M. Liserani, F. Frijia, S. Bowen, G. Giovannetti, M. F. Santarelli, V. Lionetti, J.H. Ardenkjær-Larsen, F. Bernini, L. Landini, M. Lombardi:

*Dynamic Nuclear Polarization of [1-<sup>13</sup>C]acetate for in vivo MR Spectroscopy: characterization of Na [1-<sup>13</sup>C]acetate as probe molecule for dissolution-DNP in middle-size animal models.*

4th International DNP Symposium, 28-31 August 2013, Copenhagen, Denmark.

A. Flori, F. Frijia, V. Lionetti, M. Liserani, G. Giovannetti, G. Bianchi, V. Positano, J.H. Ardenkjær-Larsen, F.A. Recchia, L. Landini, M. F. Santarelli, M. Lombardi, L. Menichetti:

*3D Cardiac Chemical Shift Imaging of <sup>13</sup>C-Hyperpolarized probes in middle size animal models.*

Congresso della Società Italiana di Biomateriali, 3-5 Giugno 2013, Baveno, Italia.

A. Flori, L. Menichetti, M. Liserani, F. Frijia, V. Lionetti, J.H. Ardenkjær-Larsen, G. Bianchi, A. Dushpanova, G. Giovannetti, V. Positano, F.A. Recchia, L. Landini, M. F. Santarelli, M. Lombardi:

*Dissolution DNP with [1-<sup>13</sup>C] acetate for myocardial spectroscopic imaging in pigs.*

European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2013, 26-28 May 2013, Torino, Italy. (Abstract #268)

L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori, V. Lionetti, G. Giovannetti, J.H. Ardenkjær-Larsen, S.L. Romano, M. Liserani, G.D. Aquaro, V. Positano, F. A. Recchia, L. Landini, M.F. Santarelli, M. Lombardi:

*Hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C] acetate for cardiac 3D MRI metabolic Imaging in middle size animal models.*



World Molecular Imaging Conference (WMIC) 2012/ European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2012, 5-8 September 2012, Dublin, Ireland. (P008)

L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori, V. Lionetti, G. Giovannetti, J.H. Ardenkjær-Larsen, S.L. Romano, M. Liserani, V. Positano, F.A. Recchia, L. Landini, M.F. Santarelli, M. Lombardi:

*Chemical Shift Imaging of Hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C] acetate for cardiac studies in pigs.*

12th Chianti/INSTRUCT Workshop on BioNMR (Electron and Nuclear Relaxation for Structural Biology), Montecatini Terme (Pistoia), Italy, June 17th – 22nd, 2012. (P24)