

Συνεισφορά της Χημείας στην Ιατρική Έρευνα: Χρήση της Μεθόδου της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo* στην Εποπτεία Βιολογικών Μεταβολικών Οδών

Θ. Μαυρομούστακος¹, Χ. Δημητρίου² και Α. Παπαδόπουλος¹

1: Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
Βασιλέως Κωνσταντίνου 48, 116 35 Αθήνα, Ελλάδα

2: Ιατρικό Τμήμα Πανεπιστημίου Αθηνών, Μ. Ασίας 75, 115 27 Αθήνα, Ελλάδα

Λέξεις Κλειδιά: *In vivo* Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός, υποθερμική ισχαιμία, γλυκονεογένεση.

Key words: *In vivo* Nuclear Magnetic Resonance, hypothermic ischemia, glyconeogenesis

Δεκτή για δημοσίευση: 20 Ιουλίου 1997

· Π ε ρ ί λ η ψ η . Το παρόν άρθρο αποτελεί ανασκόπηση των εφαρμογών που ευρίσκει ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός *in vivo* στην Ιατρική έρευνα και κυρίως στην Κλινική Παθολογία. Η κατασκευή μαγνητών υψηλού μαγνητικού πεδίου άνοιξε το δρόμο για τη μελέτη μεταβολικών οδών ουσιών μεγάλης βιολογικής σημασίας που ευρίσκονται στον οργανισμό σε μικρές συγκεντρώσεις. Αυτοί οι μεταβολίτες για πρώτη φορά μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τη *de novo* σύνθεσή τους. Επίσης μηχανισμοί που προετάθησαν με κλασική βιοχημεία και σε παθολογικές καταστάσεις που οφείλονται σε δυσχέρειες καλής λειτουργίας κάποιων μεταβολικών οδών μπορούν να μελετηθούν με τη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo*.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 1885 στα εγκαίνια της Royal Society ο τότε πρόεδρος της T.H. Huxley είχε ειπεί τα εξής προφητικά λόγια: *θα ήτο μεγάλη επανάσταση στη Βιολογία, αν η Φυσική ή η Χημεία έδιδε στους φυσιολόγους μέσα για τη μελέτη της δομής των ζώντων ιστών συγκρίσιμα με εκείνα που ο φασματοσκόπος χρησιμοποιεί για τη μελέτη βαρέων ουσιών.* Σήμερα ο συνδυασμός των δύο επιστημών μέσω του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) παρέχει πράγματι τα εφόδια στους φυσιολόγους και ιατρούς για τη μελέτη ζώντων οργανισμών και ιστών σε μοριακό επίπεδο. Έτσι, αφ' ενός μεν η Φυσική εβοήθησε στην ανακάλυψη της μεθόδου και βοηθά στη βελτίωση των δυνατοτήτων της και αφ' ετέρου η Χημεία προάγει τη μέθοδο δίδοντας την υποδομή για εξερεύνηση των χημικών ουσιών και του μεταβολισμού τους στα βιολογικά συστήματα.

· Send reprint requests to: Dr T. Mavromoustakos, National Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Vas. Constantinou 48, 11635 Athens, Greece

Η μέθοδος του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ευρίσκει ποικίλες εφαρμογές στους κλάδους της Ιατρικής, της Φυσικής, της Χημείας, της Βιοχημείας, της Βιοφυσικής και της Μοριακής Βιολογίας. Πρόσφατα ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός χρησιμοποιείται για τη μελέτη της *βιοχημικής ενεργητικής* ανθρώπινων ιστών και οργάνων με μη καταστροφικό τρόπο. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη συμβάλλει στην κατανόηση μερικών ασθενειών των μυών και του μεταβολισμού τους. Επίσης έχει βοηθήσει στη διασαφήνιση των αιτιών των ασθενειών και στον τρόπο αντιμετώπισης με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo*. Μελέτες στη Βιοχημεία του ανθρώπινου εγκεφάλου, της καρδιάς και των νεφρών έχουν ήδη αρχίσει και περαιτέρω μελέτες σε επιλεγμένους ασθενείς θα φέρουν ακόμη περισσότερο πλησίον τη Βιοχημεία με την Κλινική Πράξη.

Η φασματοσκοπία NMR *in vivo* μπορεί να διακρίνει μαγνητικούς πυρήνες σε ενώσεις που παρουσιάζουν υψηλή κινητικότητα και που περιστρέφονται ιστροπικά σε ρυθμό ταχύτερο από τη συχνότητα του μαγνητικού συντονισμού. Αυτό συμβαίνει σε μικρά μόρια που ευρίσκονται σε διάλυμα ή μεγαλύτερα μόρια με ελεύθερη εσωτερική κίνηση. Οι θέσεις των σημάτων συντονισμού δεδομένου μορίου είναι μοναδικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως *δακτυλικά αποτυπώματα* προς ταυτοποίηση. Η ένταση των σημάτων συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του παρατηρούμενου μορίου. Επιπρόσθετα, επειδή το φάσμα κάποιων μορίων εξαρτάται από το pH του περιβάλλοντος, αυτά τα σήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενδοκυτταρικά πεχάμετρα. Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo* είναι ικανή να διερευνήσει ρυθμούς αντίδρασης μεταβολικών οδών (1 ms έως 100 s).

Η βιβλιογραφική αυτή ανασκόπηση στοχεύει να εισαγάγει τον αναγνώστη στη φασματοσκοπία NMR *in vivo* παρέχοντας μια επισκόπηση των δυνατοτήτων και περιορισμών της μεθόδου. Σε αυτή θα αναφερθούν παραδείγματα από τη σύγχρονη βιβλιογραφία, που δείχνουν τη μεγάλη της συνεισφορά στην γνώση παθολογι-

κών καταστάσεων, λόγω βλάβης μεταβολικών οδών, καθώς και στο μηχανισμό λειτουργίας της *de novo* σύνθεσης ουσιών βιολογικής σπουδαιότητας.

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ *IN VIVO*

Αρχή και χαρακτηριστικά της μεθόδου

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) είναι μία μορφή φασματοσκοπίας απορρόφησης όπου υπό κατάλληλες συνθήκες το δείγμα απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συχνότητες χαρακτηριστικές αυτού. Η απορρόφηση είναι συνάρτηση του παρατηρούμενου πυρήνα. Ένα φάσμα NMR είναι ένα διάγραμμα των κορυφών απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συχνότητα.

Τα πειράματα NMR εκμεταλλεύονται σταθερούς πυρήνες που έχουν μαγνητική ροπή και δεν είναι ραδιενεργοί. Αν αυτοί οι πυρήνες εισαχθούν μέσα σε ένα πολύ ισχυρό στατικό μαγνητικό πεδίο και διεγερθούν με παλμό ραδιοσυχνότητας, εκπέμπουν ραδιοκύματα μιας συχνότητας, η οποία είναι ανάλογη με την ένταση του μαγνητικού πεδίου και σχετίζεται με το είδος και το μοριακό περιβάλλον των παρατηρούμενων πυρήνων.

Οι κυριότεροι πυρήνες οι οποίοι είναι οι καταλληλότεροι για μελέτες *in vivo* είναι του υδρογόνου-1 (^1H), του φθορίου-19 (^{19}F), του φώσφορου-31 (^{31}P) και του άνθρακα-13 (^{13}C). Οι συχνότητες συντονισμού των προαναφερθέντων πυρήνων διαφέρουν σημαντικά. Η ποικιλία στη συχνότητα του ίδιου πυρήνα σε διαφορετικά μοριακά περιβάλλοντα εκφράζεται σε ppm. Η ποικιλία αυτή απορρέει από διάφορες προαπίσεις των πυρήνων από το στατικό μαγνητικό πεδίο μέσω των ηλεκτρονίων του μορίου και καλείται χημική μετατόπιση. Αυτή η ιδιότητα είναι σταθερή για τον ίδιο πυρήνα και στο ίδιο μοριακό περιβάλλον και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των μορίων με τη χρήση φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Η χημική μετατόπιση εκφράζεται σε μονάδες δ (ppm) σε σχέση με τη θέση που συνήθως εμφανίζεται η κορυφή απορρόφησης των πρωτο-

νίων του τετραμεθυλοσιλανίου (TMS) στην οποία αυθαίρετα προσδίδεται η τιμή $\delta=0$ ppm. Το δ είναι αδιάστατο μέγεθος, ανεξάρτητο του οργάνου που χρησιμοποιείται και ορίζεται σαν το πηλίκο της συχνότητας σε Hz του συγκεκριμένου πρωτονίου προς τη συχνότητα σε Hz του φασματογράφου NMR πολλαπλασιαζόμενο επί 10^6 . Καθώς το pH στο περιβάλλον μεταβάλλεται, ορισμένα μόρια πρωτονιώνονται ή αποπρωτονιώνονται. Αυτές οι μεταβολές προκαλούν αντίστοιχα αλλαγές στην κατανομή ηλεκτρονίων του μορίου και μεταβάλλουν τη χημική μετατόπιση. Τέτοιες αλλαγές μπορούν να βαθμονομηθούν κατάλληλα και να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση του pH.

Οι χρόνοι αντίδρασης μελετώνται με φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo*. Για χαμηλούς ρυθμούς ($\sim 0,1 \text{ s}^{-1}$) οι μεταβολές στη συγκέντρωση των μεταβολιτών μπορούν να μελετηθούν με φάσματα τα οποία λαμβάνονται κατά διαστήματα. Σε ενδιάμεσους ρυθμούς ($\sim 5 \text{ s}^{-1}$) πειράματα κορεσμού-μεταφοράς (1,2) ή χημικής ανταλλαγής δύο διαστάσεων (3), φανερώνουν ποια ποσότητα *επισημασμένου μορίου* έχει μετατραπεί σε μια νέα χημική ένωση μέσα σε δεδομένο χρονικό διάστημα. Τέλος για ταχείς ρυθμούς ($\sim 1000 \text{ s}^{-1}$) οι κορυφές συντονισμού των μορίων που συμμετέχουν στην αντίδραση διαπλάτυνονται ανάλογα με το ρυθμό αντίδρασης (4).

Η περισσότερα υποσχόμενη εφαρμογή του *in vivo* NMR φαίνεται ότι είναι η ιατρική διάγνωση μέσω της διερεύνησης ενός αντικειμένου με συνδυασμό Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H απεικόνισης για μια περιοχή που παρουσιάζει ενδιαφέρον και κατόπιν διερεύνησης της χημικής σύνθεσης και μεταβολισμού του με *in vivo* φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Το απλούστερο μέσο για να ληφθούν χημικές πληροφορίες από εντοπισμένο ευαίσθητο όγκο είναι το επιφανειακό σπείρωμα (5). Αυτό αποτελείται από συρμάτινο βρόγχο, ο οποίος τοποθετείται στην επιφάνεια του υπό εξέταση αντικειμένου και λειτουργεί ως κεραία ραδιοκυμάτων που διεγείρει τους πυρήνες και αργότερα συλλέγει τα τυπικά ραδιοσήματά τους. Ο βρόγχος συλλέγει σήματα από πυρή-

νες που ευρίσκονται μέσα στο αντικείμενο και σε περιοχή προσεγγιστικά ενός ημισφαιρίου που έχει περίπου ίση διάμετρο με αυτή του σπείρωματος. Για περιοχές που ευρίσκονται βαθιά μέσα σε ένα αντικείμενο, το επιφανειακό σπείρωμα δεν παρουσιάζει καμιά ευαισθησία. Εδώ μπορούν να εφαρμοσθούν συνδυαστικά πειράματα απεικόνισης και φασματοσκοπίας (φασματοσκοπική απεικόνιση) τα οποία ιδεωδώς δίδουν ένα χάρτη όλων των μεταβολιτών σε όλο τον όγκο του αντικειμένου.

Η φασματοσκοπική απεικόνιση βασίζεται στο γεγονός ότι η συχνότητα του ραδιοκύματος που εκπέμπεται από δεδομένο πυρήνα σχετίζεται με την ένταση του στατικού μαγνητικού πεδίου και το μοριακό του περιβάλλον. Η μεν φασματοσκοπία χρησιμοποιεί το σήμα συντονισμού ενός δεδομένου πυρήνα σε ένα ομογενές πεδίο για χημική ταυτοποίηση, ενώ η απεικόνιση εκμεταλλεύεται τη γραμμική βαθμίδα ενός στατικού πεδίου το οποίο υπέρκειται ενός κατά τα άλλα ομογενούς ισχυρού στατικού μαγνητικού πεδίου. Υπό αυτές τις συνθήκες οι πυρήνες με εντελώς όμοιο μοριακό περιβάλλον θα εκπέμπουν συχνότητες ανάλογα με τις θέσεις τους μέσα στη βαθμίδα. Αυτό επιτρέπει να προσδιορισθούν οι θέσεις των πυρήνων από τις συχνότητες συντονισμού τους. Η φασματοσκοπία απεικόνισης συνδυάζει τις δύο τεχνικές σε ένα πολυδιάστατο πείραμα, κατά τη διάρκεια του οποίου οι πυρήνες πρώτα μεταδίδουν τη θέση τους σε μία ή διάφορες βαθμίδες του πεδίου και αργότερα στο μοριακό τους περιβάλλον. Από μια τέτοια σειρά δεδομένων, η κατανομή ενός χημικού μίγματος μέσα σε ένα αντικείμενο ή η χημική σύνθεση οποιουδήποτε όγκου που ενδιαφέρει μπορεί να υπολογισθεί κατά βούληση (6,7). Αυτές οι χρήσιμες πληροφορίες μειώνονται από τη σχετική χαμηλή ευαισθησία και τις αυστηρές απαιτήσεις για την ομοιογένεια του στατικού μαγνητικού πεδίου. Τροποποιήσεις της τεχνικής αυτής βελτίωσαν την ευαισθησία, αλλά επέφεραν μείωση σε πληροφορίες άλλων χαρακτηριστικών (6-12).

Αν η χημική σύνθεση μιας μόνης περιοχής γνωστής από την απεικόνισή της παρουσιάζει ενδιαφέρον, μπορούν να ληφθούν φάσματα με

τη μέθοδο της επιλεκτικής διέγερσης όγκων (VSE, Volume Selective Excitation) με απλούστερο τρόπο και μεγαλύτερη ευαισθησία. Η επιλεκτική διέγερση όγκων συνδυάζει τις τεχνικές Απεικόνισης και Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού σε ένα και μόνο πείραμα. Είναι γνωστό από την απεικόνιση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ότι κατά την παρουσία γραμμικής βαθμίδας πεδίου ένας εκλεκτικός παλμός ραδιοσυχνότητας επιδρά αποκλειστικά σε πυρήνες μέσα σε ένα επίπεδο κάθετο στην κατεύθυνση της βαθμίδας, αφού η συνθήκη συντονισμού πληρούται μόνο σε αυτό το επίπεδο. Με το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης όγκων εκτελείται διαδοχική επιλογή επιπέδων σε τρεις κατευθύνσεις ορθογώνιες μεταξύ τους και τότε με υψηλή επιλεκτικότητα χώρου παρατηρείται το φάσμα των πυρήνων που υπάρχουν στον όγκο, ο οποίος είναι κοινός στα τρία ορθογώνια επίπεδα με βέλτιστη ευαισθησία (13,14). Για πυρήνες με μεγάλο εύρος χημικών μετατοπίσεων, π.χ. ^{13}C , η διαδικασία εντοπισμού μπορεί να αποβεί ανακριβής, αφού οι πυρήνες με διαφορετικές συχνότητες συντονισμού θα διεγερθούν σε διαφορετικούς όγκους. Στην περίπτωση του ^{13}C , το πείραμα διεκπεραιώνεται με επιλογή όγκων στα πρωτόνια που έχουν μικρό εύρος χημικών μετατοπίσεων και κατόπιν μεταφοράς της πρωτονιακής μαγνήτισης στους πυρήνες ^{13}C . Έτσι βελτιώνεται η ευαισθησία λήψης του φάσματος (15,16).

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo* χρειάζεται επαρκής εξοπλισμός. Σε αντίθεση με τους συμβατικούς αναλυτικούς φασματογράφους Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού οι οποίοι χειρίζονται δείγματα μέχρι και 20 mm σε διάμετρο, οι σύγχρονοι *in vivo* NMR φασματογράφοι μπορούν να δεχθούν μικρά ζώα, ανθρώπινα άκρα ή ακόμη και ολόκληρους ανθρώπους. Σε ένα φάσμα οι συχνότητες συντονισμού, οι οποίες διαφέρουν κατά κλάσματα του ppm, μπορούν να διακριθούν μόνο αν η ανομοιογένεια του στατικού μαγνητικού πεδίου επάνω από τον όγκο που ενδιαφέρει δεν υπερβαίνει το 10^{-7} T. Διαφορετικά, ισοδύναμοι πυρήνες σε διαφορετικές θέσεις στο μαγνήτη συ-

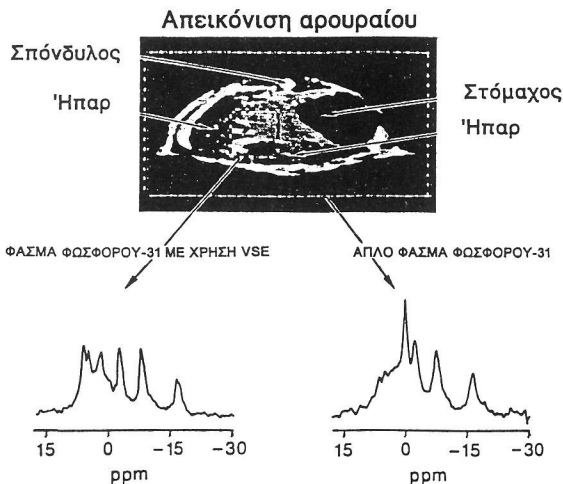
ντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, γεγονός που οδηγεί σε διεύρυνση των φασματογραμμών και συνεπώς σε απώλεια της διακριτικής τους ικανότητας. Επίσης, το μαγνητικό πεδίο πρέπει να είναι το υψηλότερο δυνατό, κατά προτίμηση υψηλότερο από 1,5 T, καθ' όσον για μεγάλα δείγματα τόσο η ευαισθησία όσο και η διακριτική ικανότητα στο πείραμα του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού βελτιώνονται γραμμικά με το μαγνητικό πεδίο. Για τον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό απεικόνισης, φασματοσκοπικής απεικόνισης και της επιλεκτικής διέγερσης όγκων, το σύστημα του μαγνήτη πρέπει να περιλαμβάνει ανθεκτικά σπειρώματα για να παράγονται γραμμικές βαθμίδες του μαγνητικού πεδίου μιας ελάχιστης ισχύος της τάξης του 1 G/cm, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο εντοπισμός (του δείγματος). Η ραδιοσυχνότητα και οι ηλεκτρονικές απαιτήσεις της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo* είναι κατ' αρχή ίδιες με αυτές της σύγχρονης αναλυτικής φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Ωστόσο, χρειάζονται δύο επιπρόσθετα εξαρτήματα: ένας διαμορφωτής ραδιοσυχνοτήτων που διαμορφώνει τις εκπεμπόμενες παλμοσειρές και ένα ενδιάμεσο σύστημα προσαρμογής το οποίο επιτρέπει ηλεκτρονικά κατευθυνόμενες ταχείες μεταβολές των γραμμικών βαθμίδων. Οι *in vivo* φασματογράφοι Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, που διατίθενται σήμερα στο εμπόριο, συνδυάζουν και τις δύο τεχνικές.

Ακολουθούν ορισμένα παραδείγματα από τη βιβλιογραφία στα οποία καταφαίνεται η χρησιμότητα της μεθόδου αυτής (17-19).

Επιλεκτική διέγερση όγκων.- Η επιλεκτική διέγερση όγκων είναι η προτιμώμενη μέθοδος για τη λήψη φάσματος Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού με υψηλή ευαισθησία κάποιας καλώς καθορισμένης περιοχής ενδιαφέροντος βαθιά σε ένα αντικείμενο. Η εκλεκτικότητα χώρου της μεθόδου παρουσιάζεται με φάσμα ^{31}P σε ήπαρ ποντικού *in vivo* στο σχήμα 1, όπου η απεικόνιση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H προς τα άνω, που έχει ληφθεί στον ίδιο φασματογράφο, δείχνει μια διασταυρούμενη τομή

διά μέσου της κοιλιακής χώρας του ποντικού στο ύψος του ήπατος. Υψηλή υδρογονική πυκνότητα με υψηλή κινητικότητα, π.χ. ύδωρ ή λίπος, φαίνεται ανοικτόχρωμη, ενώ χαμηλή υδρογονική πυκνότητα ή υδρογόνο με περιορισμένη κινητικότητα φαίνονται φαιά. Ανατομικές λεπτομέρειες μπορούν ευκρινώς να διακριθούν. Ο νωτιαίος μυελός, η αορτή, το υποδόριο λίπος και ο λιπώδης ιστός είναι λευκοί, ενώ ο στόμαχος, ο οποίος κατά κύριο λόγο είναι πλήρης με αέρια, καθώς και ο νωτιαίος μυελός είναι φαιοί. Στο κάτω μέρος του σχήματος 1 δεικνύονται δύο φάσματα ^{31}P που έχουν ληφθεί από τον ίδιο ποντικό. Το δεξιό φάσμα έχει εξαχθεί από ολόκληρο τον ποντικό (εξωτερικός σκελετός) και παρουσιάζει ίχνη τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στα $-2,4$, $-7,7$ και $-16,2$ ppm, φωσφοκρεατίνη (PCr) στα 0 ppm, ανόργανες φωσφορικές ομάδες (Pi) στα 5,1 ppm, καθώς και φωσφομονοεστέρα (PM) στα 6,4 ppm. Επιλεκτική διέγερση του όγκου στον εσωτερικό σκελετό παρήγαγε το φάσμα στα αριστερά, το οποίο δεικνύει αποκλειστικά και μόνο σήματα του ήπατος του ποντικού. Για μια ακόμη φορά αναγνωρίζονται τα σήματα από ATP και Pi καθώς και η υψηλότερη ποσότητα του φωσφομονοεστέρα. Επιπρόσθετη κορυφή εμφανίζεται στα 2,1 ppm από φωσφοδιεστέρες (PD). Η κορυφή της φωσφοκρεατίνης είναι απουσία, κάτι που αποδεικνύει την καθαρή επιλογή του φάσματος επιλεκτικής διέγερσης όγκων για ηπατικό ιστό, που δεν περιέχει καθόλου φωσφοκρεατίνη.

Χρήση Φασματοσκοπίας φώσφορου-31 για τη μελέτη του μεταβολισμού του εγκεφάλου κονίκλου υπό υποθερμική ισχαιμία: Σε βρέφη και μικρά παιδιά, η εγχείριση ανοικτής καρδιάς πραγματοποιείται συχνά με ολική διακοπή της κυκλοφορίας υπό βαθεία υποθερμία. Ερώτηση ζωτικής σημασίας είναι η επιρροή της διαδικασίας αυτής στον ενεργειακό εγκεφαλικό μεταβολισμό. Προκειμένου να δοθεί απάντηση εξετάστη η θερμοκρασιακή εξάρτηση του ισχαιμικού μεταβολισμού σε εγκεφάλους άθικτων κονίκλων σε 21 °C, 24 °C και 35 °C χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ^{31}P (20).



Σχήμα 1: Απεικόνιση πρωτονίου και φάσματα φώσφορου-31 in vivo που ελήφθησαν με χρήση του ίδιου φασματογράφου

Δώδεκα άρρενες κόνικλοι Νεοζηλανδίας αναισθητοποιήθηκαν και ετραχειοτομήθηκαν. Τέσσερα ζώα την ίδια στιγμή εψύχθησαν έξω από το μαγνήτη σε θερμοκρασίες 21 °C και 24 °C αντιστοίχως. Μια τρίτη ομάδα εμετρήθη στους 35 °C. Μετά την είσοδο στο μαγνήτη, ένα φάσμα ελέγχου επεβεβαίωσε τη φυσιολογική ενεργειακή κατάσταση των εγκεφάλων και για τις τρεις ομάδες. Η διακοπή της κυκλοφορίας προεκλήθη με τη φλεβοτόμηση των ζώων.

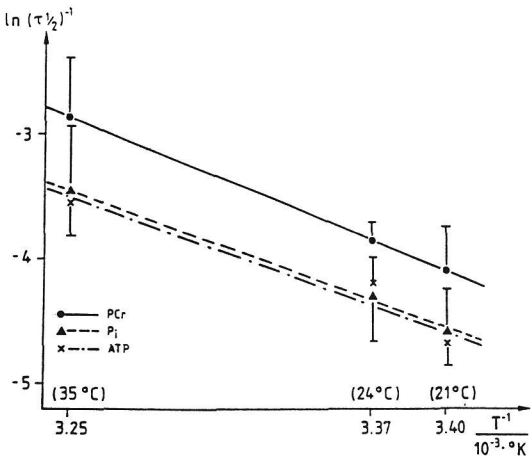
Έπειτα από τη διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος, παρατηρήθη αποσύνθεση της φωσφοκρεατίνης και τριφωσφορικής αδενοσίνης και συνακόλουθη σύνθεση των ανόργανων φωσφορικών ομάδων. Οι τρεις συγκεντρώσεις περιγράφησαν επιτυχώς με εκθετικές συναρτήσεις σε σχέση με το χρόνο. Εξετιμήθηκαν για τις σταθερές χρόνου τους με μη γραμμική εφαρμογή τριών παραμέτρων της οποίας τα αποτελέσματα δίδονται στον πίνακα 1. Εποπτεία του πίνακα αυτού αποκαλύπτει δύο χαρακτηριστικά. Πρώτον, ότι σε όλες τις θερμοκρασίες η φωσφοκρεατίνη αποσυντίθεται με περίπου διπλάσιο ρυθμό από αυτό της τριφωσφορικής αδενοσίνης. Κατά δεύτερο λόγο, οι χρόνοι ημιζωής

της τριφωσφορικής αδενοσίνης και φωσφοκρεατινής εξαρτώνται, σε μεγάλο βαθμό, από τη θερμοκρασία: αυξάνονται σε περίπου τριπλάσια τιμή με τη μείωση της θερμοκρασίας του εγκέφαλου από 35 °C σε 21 °C. Σε απλό χημικό σύστημα η θερμοκρασιακή εξάρτηση των ρυθμών αντίδρασης ακολουθεί το νόμο του Arrhenius για τη χημική κινητική: $\ln(1/T_{1/2})/d(1/T) = -E_a/R$

Πίνακας 1

Ρυθμός πτώσης του ημίσεος χρόνου ($\tau_{1/2}$) των μεταβολιτών φώσφορου στον εγκέφαλο κονίκλου μετά τη διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος

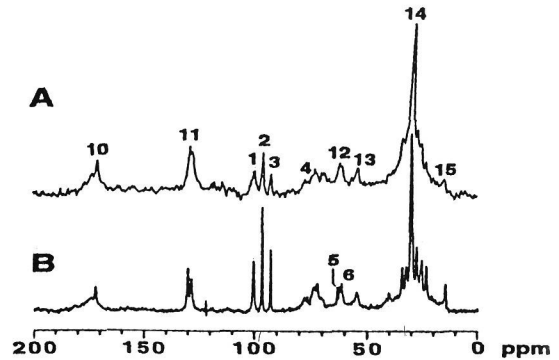
Θερμοκρασία (°C)	$\tau_{1/2}$ (min)			
	PCr	ATP	Pi	N
35	19±8	35±10	36±19	4
24	48±6	69±14	79±26	4
21	63±19	112±19	105±32	4



Σχήμα 2: Ημιλογαριθμικά διαγράμματα του ρυθμού πτώσης του ημίσεος χρόνου ($\tau_{1/2}$) της φωσφοκρεατινής (PCr), τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και φώσφορου (Pi) σε συνάρτηση με την αντίστροφη θερμοκρασία. Τα μοναδικά σημεία που ελήφθησαν σε κάθε θερμοκρασία παριστάνονται ως μέσες θετικές τιμές μιας τυπικής απόκλισης

Οι πειραματικές τιμές του πίνακα 1 αποδίδονται στο σχήμα 2, στο οποίο οι λογάριθμοι των ρυθμών αντίδρασης παρουσιάζονται σε συνάρτηση με την αντίστροφη απόλυτη θερμοκρασία. Το γεγονός ότι τα σημεία των δεδομένων κατά καλή προσέγγιση κείνται σε ευθείες γραμμές, δηλώνει ότι ο ενεργειακός μεταβολισμός στον εγκέφαλο ενός ισχαιμικού κονίκλου υπακούει

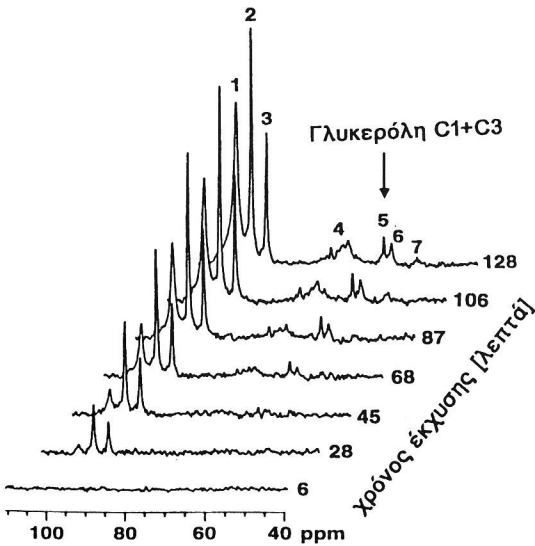
στους κλασσικούς νόμους της χημικής κινητικής. Επιπρόσθετα, τουλάχιστον στο εύρος θερμοκρασιών που έχει μελετηθεί, δεν υπάρχει κρίσιμη θερμοκρασία κάτω από την οποία ο μεταβολισμός να διακόπτεται εξ ολοκλήρου. Από την κλίση των ευθειών μπορεί να υπολογισθεί η ενέργεια ενεργοποίησης κατά Arrhenius (E_a): αυτή ευρέθη ότι είναι 17 ± 3 kcal/mole για τη φωσφοκρεατινή, 15 ± 2 kcal/mol για την τριφωσφορική αδενοσίνη και 15 ± 4 kcal/mol για τον ανόργανο φώσφορο. Αυτές οι *in vivo* ενέργειες ενεργοποίησης προσεγγίζουν αυτές που μετρώται για ενζυμικές αντιδράσεις *in vitro*.



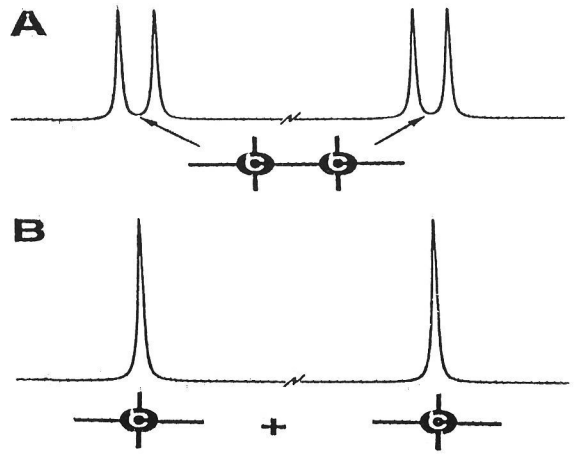
Σχήμα 3: Σύγκριση δύο φασμάτων ^{13}C *in vivo* ήπατος αρουραίου που ελήφθησαν σε μαγνητικό πεδίο έντασης (A) 1,9 Tesla και (B) 7 Tesla, περίπου 1 ώρα μετά ενδοπεριτοναϊκή ένεση (A) ή έγχυση ορού [1- C_2]-γλυκόζης (B) σε ζώα που είχαν λάβει προηγουμένως τροφή. Τα φάσματα περιέχουν κυρίως κορυφές που οφείλονται στη φυσική αφθονία του ^{13}C των λιπιδίων [10: -C(O)-, 11: -C=C-, 12: γλυκερολικό μέρος των γλυκερολικών εστέρων, 13: συντονισμοί από χολίνη, 14: -CH₂, 15: -CH₃]. Οι νέοι συντονισμοί που σχετίζονται με την έγχυση της [1- $^{13}C_2$]-γλυκόζης δείχνονται στα 100,4 ppm (1: γλυκογόνο C1), 96,7 ppm (2: γλυκόζη Cβ), 92,8 ppm (3: γλυκόζη C1α) και 70-76 ppm (4: γλυκογόνο C2-C5). Στο φάσμα B εμφανίζονται επιπρόσθετοι συντονισμοί στα 63,5 ppm (5: γλυκερόλη C1+C3) και 61,2 ppm (6: γλυκογόνο C6)

De-novo σύνθεση γλυκερόλης: Την τελευταία τριετία ανεπτύχθησαν φασματογράφοι υψηλού πεδίου με βελτιωμένη ευαισθησία και φασματική διαχωριστική ικανότητα, κατάλληλοι για μελέτες ζώων. Αυτοί ανοίγουν νέους ορίζοντες για μελέτες με μη καταστρεπτικό τρόπο μεταβολισμού άθικτων οργανισμών. Ιδιαίτερα ο Πυ-

ρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός ^{13}C *in vivo* επωφελήθη από αυτή την τεχνολογική ανάπτυξη. Προς απόδειξη των προλεχθέντων στο σχήμα 3 περιγράφονται δύο αντιπροσωπευτικά φάσματα ^{13}C *in vivo* με όργανα διαφορετικού πεδίου. Το φάσμα Β, που ελήφθη με μεγαλύτερο πεδίο, είναι εμφανές ότι περιέχει επιπρόσθετους συντονισμούς. Στο σχήμα 4 δεικνύονται διάφορα φάσματα που ελήφθησαν από ήπαρ αρουραίου ευρισκόμενου σε νηστεία μετά από έκχυση ορού γλυκόζης. Τα φάσματα, που ελήφθησαν σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την έκχυση της γλυκόζης, καλούνται φάσματα διαφοράς. Αυτό σημαίνει ότι λαμβάνονται από διαφορά με φάσμα ελέγχου που δεν υπέστη έκχυση επισημασμένης $1\text{-}^{13}\text{C}$ -γλυκόζης. Το σημαντικότερο αποτέλεσμα στο πείραμα αυτό είναι ότι παρατηρήθη συντονισμός στα 63,5 ppm του οποίου ηύξανε χρονικά η ένταση. Ο συντονισμός αυτός ταυτοποιήθη ότι οφείλεται στους άνθρακες C1, C3 της γλυκερόλης.



Σχήμα 4: Η χρήση του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^{13}C *in vivo* στον έλεγχο του φάσματος εγχυμένης $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -γλυκόζης σε ήπαρ αρουραίου υπό νηστεία κατά διάφορες χρονικές περιόδους. Τα φάσματα που δείχνονται είναι φάσματα διαφοράς. Οι αριθμοί άνω των κορυφών δείχνουν την ταυτοποίηση τους. 1: γλυκογόνο C1, 2: γλυκόζη C1β, 3: γλυκόζη C1α, 4: γλυκογόνο C2-C5, 5: γλυκερόλη C1+C3, 6: γλυκογόνο C6, 7: γλουταμικό οξύ/γλουταμίνη C2



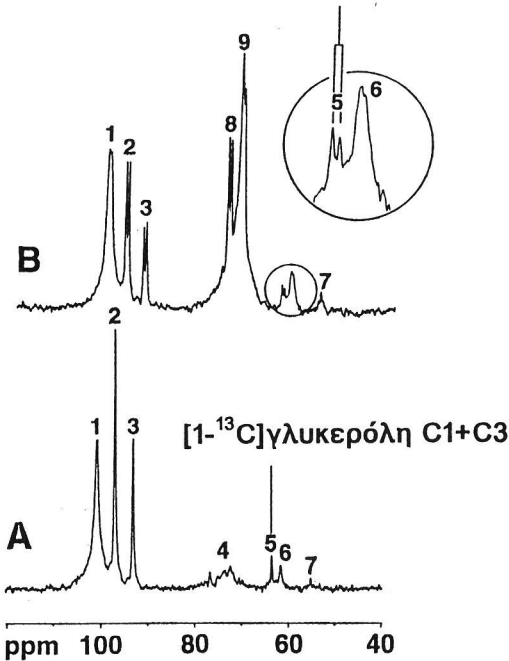
Σχήμα 5: (Α) Φάσμα που παρατηρείται από επισημασμένους γειτνιάζοντες άνθρακες ηνωμένους ομοιοπολικώς. (Β) Φάσμα που παρατηρείται από δύο επισημασμένους άνθρακες που δεν είναι ηνωμένοι μεταξύ τους ομοιοπολικώς

Η γλυκερόλη είναι ένας καλά χαρακτηρισμένος μεταβολίτης που εμπλέκεται στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Επισημασμένη γλυκερόλη, χορηγούμενη εξωγενώς, εχρησιμοποιήθη στο παρελθόν ως μεταβολικό υπόστρωμα για τη μελέτη της γλυκονεογένεσης με χρήση ^{13}C (21,22). Λόγω της μικρής της συγκεντρώσεως (140 μM) η ενδογενής ηπατική γλυκερόλη δεν ήτο δυνατό να ανιχνευθεί. Εφέτος όμως με χρήση υψηλού μαγνητικού πεδίου και Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^{13}C *in vivo* επετεύχθη η ανίχνευση της *de novo* συνθετικής γλυκερόλης (23).

Ας εξετασθεί αναλυτικά πως επετεύχθη αυτή η ανίχνευσή της. Στο σχήμα 5Α εμφανίζεται ζεύγος διπλών συντονισμών με σταθερά σύζευξης $^1J_{\text{CC}}$ που λαμβάνει τιμές μεταξύ 25-70 Hz, ανάλογα με τον υβριδισμό που έχουν τα γειτνιάζοντα επισημασμένα άτομα άνθρακα τα οποία είναι ηνωμένα μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. Αν ο δεσμός αυτός υποστεί θραύση κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού, η spin σύζευξη χάνεται και οι συντονισμοί καταλήγουν σε απλές κορυφές (σχήμα 5B). Πολλαπλή λοιπόν επισήμανση ενός μεταβολίτη παρέχει πληροφορίες για το μεταβολισμό του, γιατί, αν κατά το μεταβολισμό του σχασθεί, η επισήμανση

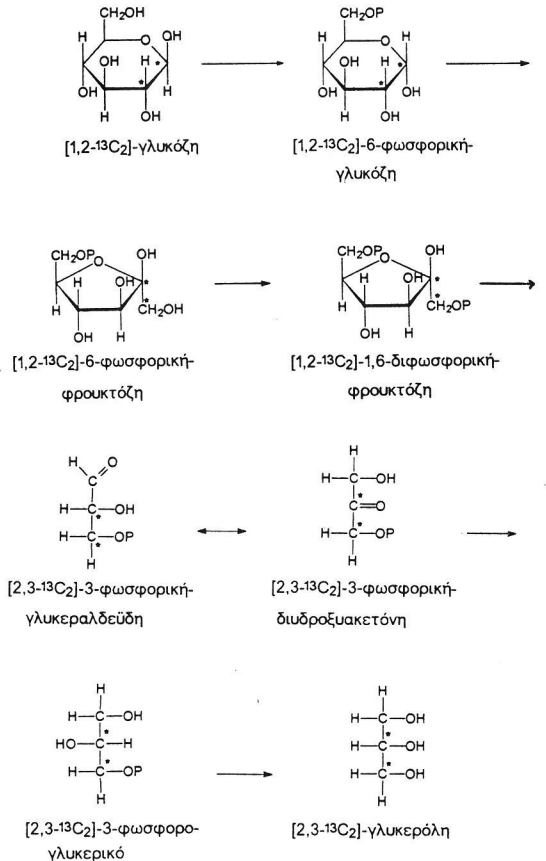
π.χ. δύο γειτονικών επισημασμένων ανθράκων δεν θα δώσει δύο διπλέτες, αλλά δύο απλέτες όπως ήδη προαναφέρθη. Τα πλεονεκτήματα της χορήγησης ουσιών πολλαπλά επισημασμένων δείχνεται στο παρακάτω σχήμα 6 όπου έγινε χορήγηση σε ήπαρ αρουραίων [1-¹³C]-γλυκόζης (A) ή [1,2-¹³C₂]-γλυκόζης (B). Κατά τη χορήγηση του ορού της [1,2-¹³C₂]-γλυκόζης παρατηρήθηκαν επιπρόσθετοι συντονισμοί (π.χ C_{2β}-συντονισμός 8 και συντονισμός 9). Μερικοί συντονισμοί ενεφανίσθησαν ως διπλέτες, λόγω της παρουσίας του επισημασμένου ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ δύο γειτονικών ανθράκων.

[1,2-¹³C₂]γλυκερόλη C1+C3



Σχήμα 6: Σύγκριση δύο φασμάτων διαφοράς ¹³C ήπατος αρουραίων που ελήφθησαν 125 λεπτά από έγχυση [1-¹³C]-γλυκόζης (A) και [1,2-¹³C₂]-γλυκόζης (B). Οι παρατηρούμενοι συντονισμοί αντανακλούν την ενσωμάτωση του επισημασμένου ¹³C στους ηπατικούς μεταβολίτες. Στην περίπτωση της χορήγησης [1,2-¹³C₂]-γλυκόζης παρατηρούνται ζεύγη διπλέτων που δείχνουν ότι οι επισημασμένοι γειτνιάζοντες άνθρακες που ενώνονται με ομοιοπολικό δεσμό παραμένουν άθικτοι. Οι κύκλοι δείχνουν σε μεγέθυνση τη φασματική περιοχή που εντοπίζονται οι συντονισμοί C1+C3 της γλυκερόλης. Οι ταυτοποιήσεις εξηγήθηκαν σε προηγούμενα σχήματα. Οι επιπρόσθετες κορυφές αντιστοιχούν: 8: γλυκόζη C2β, 9: C2 α-γλυκόζης/γλυκογονίου/γλυκερόλης

Ο διπλός συντονισμός που παρατηρήθη για τη γλυκερόλη C₃ (φαίνεται στους δύο κύκλους του σχήματος 6) αξίζει ιδιαίτερης προσοχής. Η spin σύζευξη δεικνύει ότι το επισημασμένο ζεύγος των ανθρακοατόμων της [1,2-¹³C₂]-γλυκόζης συνεχωνεύθη στη γλυκερόλη C₂-C₃ μέσω μεταβολικής οδού που διατηρεί το ζεύγος ανθράκων στην ίδια θέση. Επίσης η έλλειψη απλότητας σε αυτή τη θέση δηλώνει ότι η *de novo* συνθετική γλυκερόλη προέρχεται αποκλειστικά από τη γλυκόζη μέσω της μεταβολικής πορείας που περιέχει τη γλυκολυτική ενδιάμεση [2,3-¹³C] φωσφορική διυδροξυακετόνη. Παρ' όλο που αυτή η μεταβολική οδός έχει επεξηγηθεί με κλασσικές βιοχημικές μεθόδους (σχήμα 7), με τα πειράματα αυτά έχει επαληθευθεί με άμεσο τρόπο.



Σχήμα 7 Μεταβολική οδός της γλυκονογένεσης

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Οι τρεις ανωτέρω περιγραφείσες εφαρμογές της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού *in vivo* τεκμηριώνουν τα ελκυστικά χαρακτηριστικά της νέας αυτής τεχνικής. Τελειώνοντας αυτή την εργασία, κρίνεται αναγκαίο να υπογραμμισθούν εκ νέου περιληπτικά τα ακόλουθα.

(i) Η *in vivo* φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, ως μη καταστρεπτική τεχνική, αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για βιοχημική έρευνα ευπαθών ιστών και οργάνων (π.χ. εγκέφαλος), όπου άλλες μέθοδοι θα ήτο δυνατό να προξενήσουν βλάβη. Για μετρήσεις σε ασθενείς ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός μπορεί να εφαρμοσθεί επανειλημμένα για την παρακολούθηση της εξέλιξης θεραπειών. Υγιείς εθελοντές μπορούν να εξετασθούν χωρίς ηθικούς φραγμούς.

(ii) Εφ' όσον η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού αποφέρει άμεσες χημικές πληροφορίες (π.χ. φάσματα ως δακτυλικά αποτυπώματα), επιτρέπει ενδιάμεσες ποιοτικές και ποσοτικές μετρήσεις *in vivo*, γεγονός που είναι μεγάλης σημασίας για ασταθείς μεταβολίτες. Το πλεονέκτημα έναντι των ραδιενεργών ιχνηθετών είναι ότι ενεργοί πυρήνες στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό δίδουν χημικές πληροφορίες, ενώ ραδιενεργοί πυρήνες όχι. Έτσι, λοιπόν, οι ραδιενεργές έρευνες πρέπει να ακολουθούνται από χημική ανάλυση των μορίων που περιέχουν το ραδιενεργό δείκτη.

(iii) Ένα άλλο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι ο όγκος που ενδιαφέρει, από τον οποίο είναι δυνατό να συλλεγούν χημικές πληροφορίες, μπορεί να σκιαγραφηθεί ευκρινώς και να συσχετισθεί με μια απεικόνιση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, η οποία είχε προηγουμένως ληφθεί στην ίδια συσκευή. Αυτό επιτρέπει να υποβληθεί ταχέως σε σάρωση ένας ασθενής για μια περιοχή που ενδιαφέρει με ένα φάσμα ^1H απεικόνισης και μετά να ταυτοποιηθεί ο επιλεγόμενος όγκος με εντοπισμένη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

Η μόνη επιφύλαξη για το μη καταστρεπτικό Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό είναι η εγγε-

νής χαμηλή ευαισθησία η οποία ακολουθεί άμεσα από τις πιο χαμηλές ενέργειες ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται στο πείραμα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (FM ραδιοκύματα). Με όριο συγκέντρωσης το 1 mM, περίπου, για το *in vivo* πείραμα, οι έρευνες είναι τουλάχιστον για την ώρα περιορισμένες σε συμπυκνωμένους μεταβολίτες όπως Pcr, ATP, Pi, PM, PD, τριγλυκερίδια, γλυκογόνο και λακτάση. Παρ' όλα αυτά με τους νέους μαγνήτες υψηλής διαχωριστικότητας, η ευαισθησία αυτή αυξάνεται και μικρότερες συγκεντρώσεις (mM) επισημασμένων μεταβολιτών μπορούν να ανιχνευθούν. Η απ' ευθείας παρατήρηση φαρμάκων σε φυσιολογικές τιμές φαίνεται να είναι μελλοντικός στόχος.



The use of *in vivo* Nuclear Magnetic Resonance as a Diagnostic Tool in Medicine

T. Mavromoustakos, C. Dimitriou and
A. Papadopoulos

National Hellenic Research Foundation, Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, Vas. Constantinou 48, 11635 Athens, Greece

SUMMARY. This review article gives the principles and the important implications from the use of *in vivo* Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Some examples from the literature point out its significant contribution in the understanding of the role of metabolism under physiological or pathological conditions. In addition, the labelling of various molecules leads to the knowledge of their metabolic route. Thus, the metabolic pathways, that are proposed by classic biochemical methods, can be tested and completed. It appears that *in vivo* NMR spectroscopy soon will serve as a diagnostic tool in Medicine and more specifically in Clinical Practice.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

1. Forsen S., Hoffmann R.A.: Study of moderately rapid chemical exchange reaction by means of nuclear magnetic double resonance. *J. Chem. Phys.* 39: 2892 (1963)
2. Gadian D.G., Radda G.K., Brown T.R., Chance E.M., Dawson M.J., Wilkie D.R.: The activity of creatine kinase in frog skeletal muscle studied by saturation transfer NMR. *Biochem J.* 215: 194 (1981)
3. Balaban R.S., Kantor H.L., Ferretti J.A.: *In vivo* flux between phosphocreatine and adenosinetriphosphate determined by two dimensional phosphorus NMR. *J. Biol. Chem.* 258: 12787 (1983)
4. Whitesides G.M., Eisenhut M., Bunting W.M.: Pseudorotation in Arylbis(4,4'-dimethyl-2,2'-biphenylene)phosphoranes. *J. Am. Chem. Soc.* 96: 5398 (1974)
5. Ackerman J.J.H., Grover T.H., Wong G.C., Gadian D.G., Radda G.K.: Mapping of metabolites in whole animals by ³¹P NMR using surface coils. *Nature* 167: 283 (1980)
6. Brown T.R., Kincaid B.N., Ugurbil K.: NMR chemical shift imaging in three dimensions. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79: 3523 (1982)
7. Maudsley A.A., Hilal S.K., Perman, W.H., Simon H.E.: Spatially resolved high resolution spectroscopy by four-dimensional NMR. *J. Magn. Resonance.* 51: 147 (1983)
8. Lauterbur P.C., Kramer D.M., House W.V. and Chen C.-N.: Zeugmatographic high resolution NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 97: 6866 (1975)
9. Bendel P., Lai C.-M., Lauterbur P.C.: ³¹P Spectroscopy zeugmatography of phosphorus metabolites. *J. Magn. Resonance* 38: 343 (1980)
10. Lauterbur P.C., Levin, D.N., Marr R.B.: Theory and simulation of NMR spectroscopic imaging by projection reconstruction involving an intrinsic frequency dimension. *J. Magn. Resonance* 59: 536 (1984)
11. Bernardo M., Lauterbur P.C., Hedges L.K.: Experimental example of NMR spectroscopy imaging by projection reconstruction involving an intrinsic frequency dimension. *J. Magn. Resonance* 61: 168 (1985)
12. Cox S.J., Styles P.: Towards biochemical imaging. *J. Magn. Resonance* 40: 209 (1980)
13. Aue W.P., Möller S., Cross T.A., Seelig J.: Volume selective excitation. A novel approach to topical NMR. *J. Magn. Resonance* 56: 350 (1984)
14. Möller S., Aue W.P., Seelig J.: Practical aspects of VSE. Compensation sequences. *J. Magn. Resonance* 65: 332 (1985)
15. Aue W.P., Möller S., Seelig J.: Localized ¹³C NMR spectra with enhanced sensitivity obtained by VSE. *J. Magn. Resonance* 61: 329 (1985)
16. Möller S., Aue W.P., Seelig J.: NMR imaging and volume selective spectroscopy with a signal surface coil. *J. Magn. Resonance* 63: 530 (1985)
17. Gadian, D.G.: NMR and its Applications to Living Systems. Clarendon Press, Oxford, 1982
18. Cohen J.S. (ed.): Noninvasive Probes of Tissue Metabolism. John Wiley, New York, 1982
19. Damalian R. (ed.): NMR in Medicine. Springer Verlag, Berlin, 1981
20. Stocker F., Herschkowitz N., Stoller M., Cross T.A., Aue W.P., Seelig, J.: Cerebral metabolic studies by P-31 NMR after hypothermic circulatory arrest. *Ped. Res.* 20: 867 (1986).
21. Jung-Mei L.K., Drucker Y., Jarad J.: Hepatic Glycerol Metabolism in Tumorous Rats: A ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Study. *Cancer Res.* 55: 761 (1995)
22. Cohen S.M., Ogawa S., Shulman R.G.: ¹³C Nuclear Magnetic Resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1603 (1979)
23. Köstermann E., Kónnecke B., Seelig J.: *In vivo* ¹³C-MR Spectroscopy of Rat Liver at 7T. *Bruker Report* 143: 27 (1996)