

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

Dipartimento di Biochimica

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA
SSD BIO/10**

**Informatizzazione della misura *in vivo* del
Mg²⁺ citosolico libero del muscolo scheletrico
e del cervello di uomo con la spettroscopia di
risonanza magnetica del fosforo**

Coordinatore:

Professor: GIORGIO LENZA

Tutore:

Professor: BRUNO BARBIROLI

**Dottorando:
Emil Malucelli**

2007 – BIO/10 XIX

Ringraziamenti

Le ricerche riportate in questo lavoro sono state realizzate presso il “Centro di Ricerca e Diagnostica molecolare *in vivo*” del Dipartimento di Medicina Clinica e Biotecnologia Applicata “D. Campanacci” dell’università degli studi di Bologna, diretto dal Prof Bruno Barbiroli

Desidero ringraziare il tutore Prof Bruno Barbiroli, per aver reso possibile questo lavoro.

Desidero inoltre ringraziare il Prof Stefano Iotti per la costante disponibilità e cortesia dimostratemi, e per tutto l’aiuto fornito durante la stesura.

Indice

1	Introduzione alla spettroscopia di risonanza magnetica	9
1.1	Principi fisici della spettroscopia di risonanza magnetica	10
1.2	Fattori che influenzano l'intensità del segnale	14
1.3	Il segnale di spettroscopia NMR	16
1.4	Chemical shift.....	19
1.5	Accoppiamento di spin	20
1.6	Scelta del nucleo del fosforo (^{31}P).....	24
1.7	Elementi di bioenergetica muscolare.....	26
1.8	Magnesio	30
2	Esame MRS	33
2.1	Ergometro	33
2.2	Acquisizione del segnale NMR	36
2.3	Acquisizione degli spettri del muscolo.....	37
2.4	Elaborazione degli spettri del muscolo.....	39
2.5	Valutazione della $[\text{Mg}^{2+}]$ e del pH intracellulare	42
2.6	Valutazione <i>in vivo</i> della $[\text{Mg}^{2+}]$	46
2.7	Risintesi della fosfocreatina dopo esercizio muscolare.....	49
3	Glicogenosi muscolari	51
3.1	Glicogenosi muscolari	52
3.2	Metodi.....	54
3.3	Risultati.....	55
3.4	Discussione.....	59

4	Sindrome da affaticamento cronico	61
4.1	Sindrome da affaticamento cronico.....	62
4.2	Metodi	63
4.3	Risultati e discussione	64
5	Insufficienza intestinale cronica benigna	67
5.1	Insufficienza intestinale cronica benigna	68
5.2	Metodi	70
5.3	Risultati e discussione	71
	Conclusioni	75
	Bibliografia	77

Introduzione alla spettroscopia di risonanza magnetica

Capitolo 1

La Spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica che misura l'assorbimento di radiazione elettromagnetica in molecole immerse in un campo magnetico statico

Oltre alle applicazioni *in vitro* che vanno dalle indagini strutturali molecolari di composti organici, alla proteomica e alle indagini delle micro strutture di materiali, esiste un campo di applicazione più recente, (MRS) che, utilizzando magneti di grandi dimensioni, permette di analizzare organi e tessuti *in vivo* sia nell'uomo che negli animali. La MRS fornisce quindi informazioni biochimiche e permette di misurare la concentrazione dei metaboliti presenti nei tessuti analizzati.

In particolare la spettroscopia di risonanza magnetica del fosforo (^{31}P MRS), eseguita con magneti di grandi dimensioni, offre la straordinaria possibilità di studiare *in vivo*, nell'uomo, il metabolismo energetico; consentendo in particolare uno studio dinamico delle trasduzioni energetiche cellulari direttamente sui tessuti e sugli organi.

1.1 Principi fisici della spettroscopia di risonanza magnetica

Il fenomeno fisico della risonanza magnetica ha origine da una proprietà dei nuclei degli atomi con peso atomico e/o numero atomico dispari. Questi posseggono un numero quantico di spin diverso da zero; ovvero, in termini di fisica classica, posseggono un momento magnetico nucleare, specifico per ogni nucleo, pertanto si comportano come dipoli magnetici microscopici e se immersi in un campo magnetico uniforme tendono ad allinearsi in modo parallelo o antiparallelo all'asse del campo con un moto di precessione ad una frequenza tipica per ogni nucleo (frequenza di Larmor). Le leggi quanto-meccaniche impongono che quando è applicato un campo magnetico esterno, sono permesse solo alcune di tutte le possibili orientazioni che l'asse di rotazione può assumere. Espresso in termini formali, lo spin nucleare totale è proporzionale a I , un numero intero o frazionario, che rappresenta il vettore somma degli spin di tutti i singoli nucleoni che costituiscono il nucleo. Le possibili orientazioni dell'asse di rotazione e cioè i possibili valori dello spin nucleare risultante (o momento angolare di spin), sono espressi dal numero intero o frazionario m (numero quantico magnetico). Esso può assumere un qualsiasi valore compreso tra $-I$ e $+I$ e per ogni nucleo l'intervallo tra valori contigui di m , è uno. In questi termini il vettore di spin nucleare totale ha un valore espresso da $[I(I+1)]^{1/2}$. L'angolo tra l'asse di rotazione e la direzione del campo magnetico esterno è θ , dove:

$$\cos \theta = \frac{m}{[I(I+1)]^{1/2}}$$

Per i nuclei ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P , $I = 1/2$ e quindi m può assumere solo i valori $+1/2$ o $-1/2$ e pertanto sono possibili solo due orientazioni dell'asse di rotazione (figura 1.1). Questi diversi stati di spin, rappresentati da diversi valori di m , corrispondono a diversi valori di θ , che indicano le diverse direzioni relative alla direzione del campo magnetico che i momenti magnetici nucleari possono assumere. Le energie di interazione con il campo magnetico $\mu B_0 = |\mu| |B_0| \cos \theta$ sono di conseguenza diverse, ed è proprio da tali differenze che prende origine il fenomeno della risonanza magnetica.

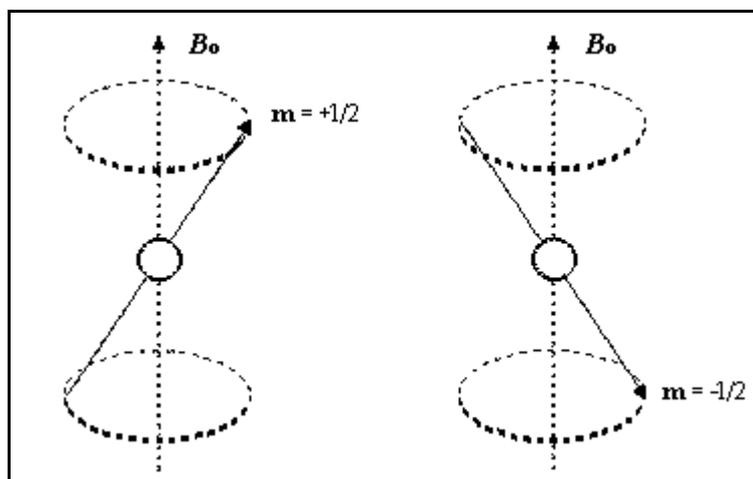


Figura 1.1 - Possibili orientazioni del momento angolare di un nucleo con spin nucleare $I = 1/2$, immerso in un campo magnetico uniforme B_0 diretto lungo l'asse Z .

In conclusione, mentre in assenza del campo magnetico i $2I + 1$ possibili orientamenti (tanti sono infatti i valori che può assumere m) sono completamente equivalenti (livelli energetici degeneri), in presenza di un campo magnetico si ha una differenziazione in $2I + 1$ orientazioni di differente energia. L'energia di ogni orientamento dipende dalle caratteristiche del nucleo e dall'intensità del campo magnetico esterno.

Se consideriamo per semplicità a scopo esemplificativo l'insieme dei livelli energetici di un nucleo con spin $1/2$, si hanno in questo caso solo due

possibili orientamenti rispetto al campo esterno: $m = +1/2$ (parallelo) e $m = -1/2$ (antiparallelo) (figura. 1.2).

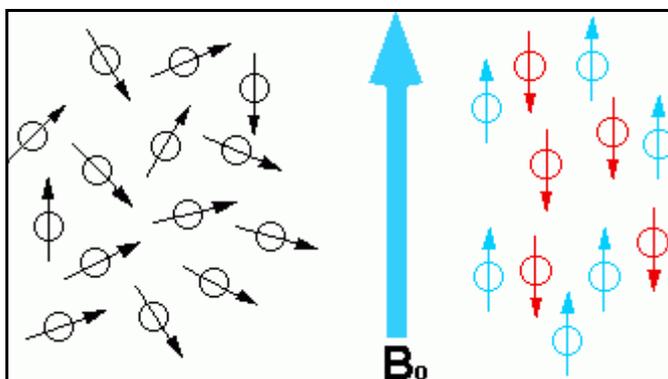


Figura 1.2 - Allineamento parallelo ed antiparallelo degli spin lungo la direzione del campo magnetico

Essendo la differenza di energia $\Delta E = h\nu_0$ per consentire la transizione energetica tra i due livelli (figura 1.3) occorrerà inviare una radiazione elettromagnetica di frequenza ν_0 , che per le transizioni di spin nucleare è dell'ordine delle radiofrequenze. Ognuna delle $2I+1$ orientazioni possibili, occupa un livello energetico equidistante dagli altri.

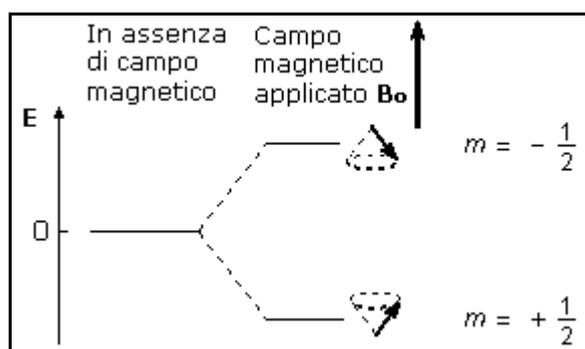


Figura 1.3 - Rappresentazione dei livelli energetici di un nucleo con spin $1/2$ prima e dopo l'inserimento nel campo magnetico esterno B_0 e transazione tra i due livelli tramite l'assorbimento di energia elettromagnetica.

Una radiazione elettromagnetica può causare transizioni energetiche, nel rispetto della regola di selezione:

$$\Delta m = \pm 1$$

che rende possibili solo le transizioni tra due livelli contigui. Poiché tutti i livelli energetici sono ugualmente separati, ne consegue che in ogni caso, dato un campo magnetico di intensità B_0 , esiste una ed una sola frequenza in grado di dar luogo alle transizioni e quindi una sola frequenza di risonanza per ogni nucleo. La frequenza di risonanza è caratterizzata principalmente dal valore del rapporto giromagnetico γ , caratteristica specifica per ogni nucleo:

$$2\pi\nu_0 = \gamma B_0$$

Nella tabella 1.1 sono riportati i valori della frequenza di risonanza per alcuni dei nuclei più comuni, quando sono immersi in un campo magnetico statico uniforme di intensità 1.4 Tesla.

Nucleo	%(Abbond. Naturale.)	I	γ (MHz Tesla ⁻¹)	ν_0 (MHz)
¹ H	99.985	1/2	2.675	60.00
² H	0.015	1	0.410	9.21
¹¹ B	81.2	3/2	0.865	19.27
¹³ C	1.11	1/2	0.672	15.10
¹⁴ N	99.68	1	0.193	4.34
¹⁹ F	100	1/2	2.516	56.50
³¹ P	100	1/2	1.083	24.30

Tabella 1.1 - Frequenze di risonanza in MHz per alcuni nuclei immersi in un campo statico di intensità 1.4 Tesla, intensità alla quale ¹H risuona con frequenza 60 MHz.

E' evidente dall'esame della tabella che alle condizioni in cui entra in risonanza un nucleo, non risuona nessun altro ed è quindi possibile studiare separatamente la risonanza dei vari nuclei.

1.2 Fattori che influenzano l'intensità del segnale

Quando si ha risonanza, cioè quando il campione assorbe i quanti della radiofrequenza, una parte delle molecole passano dal livello energetico inferiore (stato fondamentale) al livello superiore (stato eccitato). Se si indica con N_0 la popolazione dello stato fondamentale e con N_e quella dello stato eccitato, la distribuzione statistica corrispondente all'equilibrio termico è data dalla relazione di Boltzmann:

$$\frac{N_0}{N_e} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

nel caso del nucleo ^1H immerso in un campo di 1.4 Tesla e a 300°K si ha:

$$\frac{N_e}{N_0} = 0.99999904 = \frac{1000000}{1000010}$$

per cui, per ogni milione di nuclei allo stato eccitato ve ne sono 10 in più allo stato fondamentale. Sebbene piccolo, tale eccesso è sufficiente per permettere l'osservazione di assorbimento della radiazione elettromagnetica, poiché la probabilità di una transizione energetica verso l'alto è superiore di quella verso il basso.

L'intensità dell'assorbimento, per un determinato nucleo, dipende dalla differenza di popolazione fra i due livelli e quindi da due fattori: la *concentrazione dei nuclei* e *l'intensità del campo magnetico* applicato B_0 poiché il valore di ΔE , per un singolo nucleo dipende soltanto dall'intensità di B_0 e cresce al crescere di B_0 . Al variare del tipo di nucleo e quindi di γ , varierà conseguentemente anche l'intensità di assorbimento, che a parità di

concentrazione nucleare e intensità del campo magnetico, diventa quindi una caratteristica specifica del nuclide in esame.

Tuttavia questi non sono i soli fattori che regolano l'intensità del segnale; infatti esso dipende anche dai *processi di rilassamento* cioè dai meccanismi con cui un nucleo ritorna allo stato fondamentale senza emissione di energia elettromagnetica. Infatti essendo la differenza di energia tra i due livelli molto piccola, con l'assorbimento si ha la tendenza alla diminuzione dell'eccesso originale nello stato fondamentale (condizione necessaria per osservare un segnale), fino alla totale scomparsa di segnale quando i due stati sono ugualmente popolati (fenomeno della saturazione). Ecco quindi che i processi di rilassamento, che costituiscono una forma di dispersione energetica, contribuiscono a mantenere un eccesso di nuclei nello stato fondamentale e quindi anche un segnale di assorbimento continuo. I processi di rilassamento si distinguono in: *spin-reticolo* o *longitudinale* (T_1) e *spin-spin* o *trasversale* (T_2).

1.3 Il segnale di spettroscopia NMR

Il segnale di spettroscopia negli strumenti più moderni viene generato con il metodo ad impulso. Con questa tecnica tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso di radiofrequenza che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario. Per capire come l'impulso di radiofrequenza interagisce con i nuclei in esame dobbiamo introdurre un vettore chiamato *Magnetizzazione Macroscopica* M_0 (figura 1.4) che è la risultante di tutti i momenti magnetici nucleari. Dato che esiste un leggero eccesso di nuclei che si trovano allineati col campo magnetico B_0 , M_0 sarà piccolo e allineato col campo. Indichiamo questa direzione come asse z.

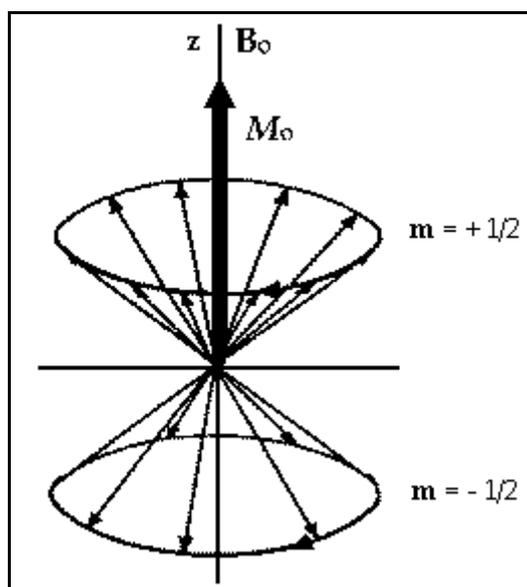


Figura 1.4 - Magnetizzazione macroscopica risultante da tutti i momenti magnetici nucleari orientata nella stessa direzione del campo magnetico B_0

Se ora il campione viene irradiato lungo l'asse x con un impulso di radiofrequenza che contiene anche la frequenza ν di Larmor dei nuclei in esame (ad es ^1H), i nuclei assorbiranno energia e subiranno una transizione di spin. A livello macroscopico si osserva che il vettore Magnetizzazione

Macroscopica M_0 ruota allontanandosi dall'asse z per avvicinarsi al piano xy iniziando un moto di precessione attorno all'asse z . (figura 1.5)

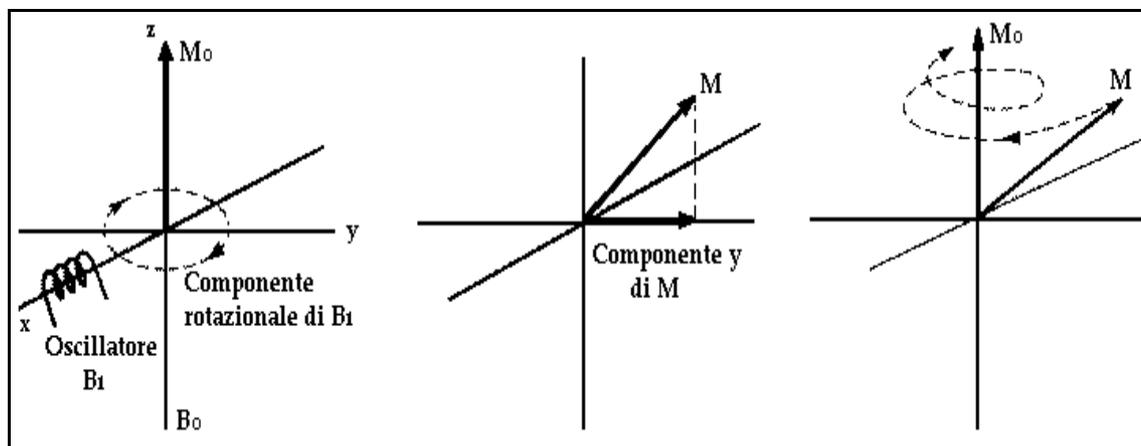


Figura 1.5 - Movimento di precessione della magnetizzazione M_0 attorno all'asse Z dopo aver irradiato il campione con un impulso di radiofrequenza lungo l'asse x

A questo punto l'impulso di radiofrequenza cessa ed entra in funzione un circuito ricevente che ha lo scopo di misurare l'oscillazione della componente y del vettore M .

L'energia assorbita dai nuclei viene lentamente ceduta agli atomi vicini a causa di fenomeni detti di rilassamento e il vettore M , compiendo delle spirali di precessione attorno all'asse z , si riporta al valore iniziale M_0 , posizione per la quale la componente M_y vale zero. La durata $t(p)$ dell'impulso di radiofrequenza deve essere determinata con precisione per produrre un forte segnale di risonanza. Se $t(p)$ è tale da piegare M_0 di 90° , allora si produrrà il vettore M_y massimo. In genere $t(p)$ è di alcuni microsecondi. Il segnale raccolto è un segnale oscillante con frequenza n , la frequenza di Larmor del nucleo in esame, che si smorza nel tempo e che viene detto FID (Free Induction Decay), libero decadimento dell'induzione. In figura 1.6 è illustrato il FID del CH_3I per l'atomo di idrogeno.

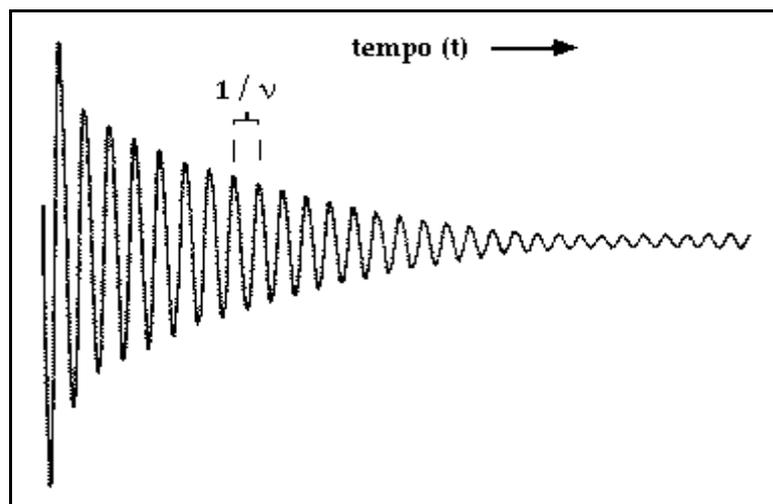


Figura 1.6 Decadimento del segnale oscillante di magnetizzazione del CH_3I per l'atomo di idrogeno

Dato che nella molecola CH_3I gli idrogeni sono equivalenti, avranno tutti la stessa frequenza di risonanza. Nel grafico questa frequenza è facilmente individuabile misurando la lunghezza d'onda (la distanza tra due creste successive) e calcolandone il reciproco, secondo la formula:

$$\nu = \frac{1}{\lambda}$$

dove ν è la frequenza e λ è la lunghezza d'onda.

Si ottiene così il seguente grafico in funzione delle frequenze, (figura 1.7) che mostra la frequenza assorbita dagli atomi di idrogeno nella molecola CH_3I :

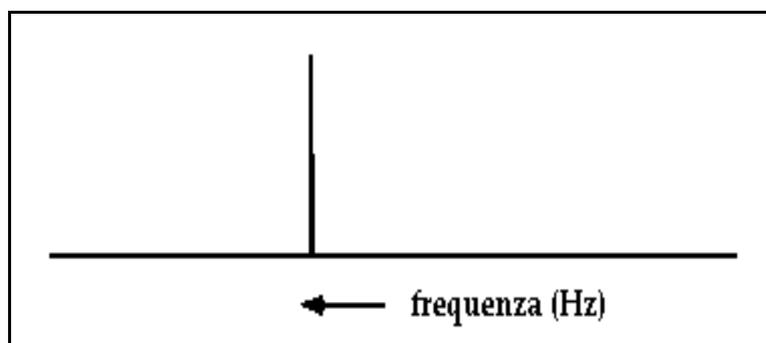


Figura 1.7 Spettro risultante della molecola CH_3I

1.4 Chemical shift

I nuclei delle varie specie risuonano a frequenze molto diverse tra loro, ma ciò non significa necessariamente che i nuclei di una stessa specie risuonino allo stesso valore di frequenza. La frequenza di risonanza di un nucleo dipende anche dall'intorno magnetico e chimico del nucleo stesso; infatti il campo magnetico agente su di esso non è uguale al campo magnetico applicato, ma sarà diverso per una quantità dipendente dallo schermo prodotto dall'intorno. Precisamente:

$$B_{eff} = (1 - \sigma_A) B_0$$

dove B_{eff} è il campo magnetico efficace e σ_A è la costante di schermo del nucleo A, che è strettamente correlata all'intorno chimico del nucleo che risuona. L'effetto dello schermo nucleare è una diminuzione della separazione dei livelli energetici degli spin nucleari, poiché agisce attenuando il campo magnetico applicato. Per un dato valore di B_0 all'aumentare di σ , si ha una diminuzione della frequenza di risonanza ν_0 . Questo significa che una stessa specie nucleare, a seconda della molecola a cui appartiene, avrà una costante di schermo diversa che influenzerà la sua frequenza di risonanza. Quindi un campione con diverse molecole contenenti un dato nuclide, o anche una singola molecola contenente più di un atomo della stessa specie in posizioni chimicamente non equivalenti, darà origine a una frammentazione di segnali nell'intorno della frequenza di risonanza specifica per quel dato nuclide. Questo fenomeno è noto col nome di *chemical shift*, ovvero spostamento chimico. Come unità di scala per misurare questi spostamenti non si usano le frequenze, ma per comodità, la differenza in parti per milione (ppm) rispetto alla frequenza di un segnale scelto come riferimento a cui è assegnato arbitrariamente un valore 0:

$$\delta_{ppm} = \frac{\nu_{rif} - \nu_i}{\nu_0} 10^6$$

1.5 Accoppiamento di Spin

Per una molecola come il dietil etere, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$ ci si può aspettare che ci siano solo due tipi di segnali spettrali: quelli del gruppo metile CH_3 , e quelli del gruppo metilene CH_2 con un segnale spostato verso campi più bassi a causa della vicinanza dell'atomo elettronegativo dell'ossigeno. Lo spettro del dietil etere (figura 1.8), invece, mostra sette picchi, come si può vedere qui sotto.

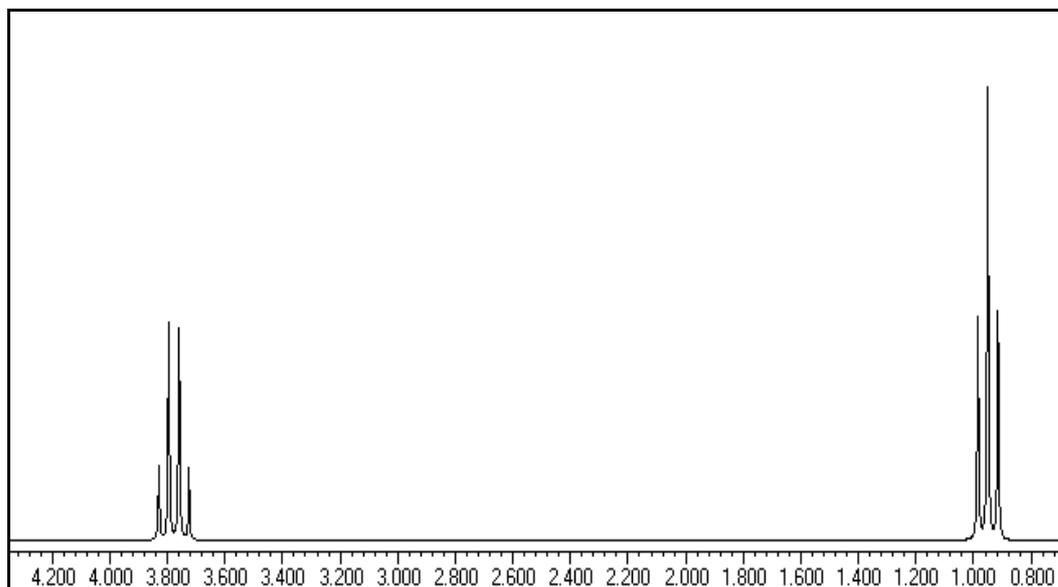
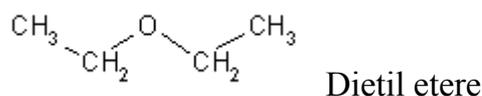


Figura 1.8 - Segnale del dietil etere ottenuto con la Spettroscopia di Risonanza Magnetica del ^1H

Questa molteplicità è dovuta ad un fenomeno noto come accoppiamento di spin e nasce dal fatto che il protone in esame è soggetto a due tipi di campo magnetico, uno uguale in tutte le molecole che chiameremo B_{eff} (B efficace) dato dal campo magnetico applicato, schermato dall'intorno chimico (che abbiamo già descritto parlando dello spostamento chimico), l'altro è dato dai piccoli campi magnetici prodotti dai nuclei dei protoni vicini, ma poiché questi possono combinarsi in molti

modi diversi, questa componente magnetica potrà variare da una molecola all'altra.

Per comprendere meglio il fenomeno consideriamo dapprima il caso più semplice, quello di un solo protone H_a vicino al protone in esame H_b . Il protone H_a può avere due diversi orientamenti di spin, parallelo o antiparallelo al campo magnetico applicato B_{eff} . Così il campo magnetico sentito dal protone adiacente H_b sarà dato dal campo magnetico applicato B_{eff} aumentato o diminuito del campo magnetico β prodotto dal protone H_a . Nella metà delle molecole, il campo magnetico sentito da H_b a causa del protone vicino H_a sarà $B_{eff} + \beta$, mentre sarà $B_{eff} - \beta$ nell'altra metà. Il risultato è che il segnale di un protone viene diviso, per opera di un protone vicino, in 2 picchi uguali (doppietto) (figura 1.9).

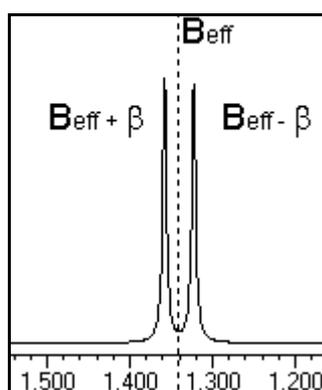


Figura 1.9 - Spettro ottenuto dall'accoppiamento di due atomi di H

Consideriamo il caso di due protoni vicini al protone in esame. E' questo il caso del metile CH_3 del dietil etere ($CH_3-CH_2-O-CH_2-CH_3$). Questi protoni sono influenzati da due protoni vicini, quelli del gruppo CH_2 . Ora dobbiamo considerare le combinazioni dei modi diversi in cui possono orientarsi i due protoni del CH_2 : tutti e due allineati col campo, oppure uno allineato e uno in opposizione, oppure tutti e due in opposizione al campo (figura 1.10).

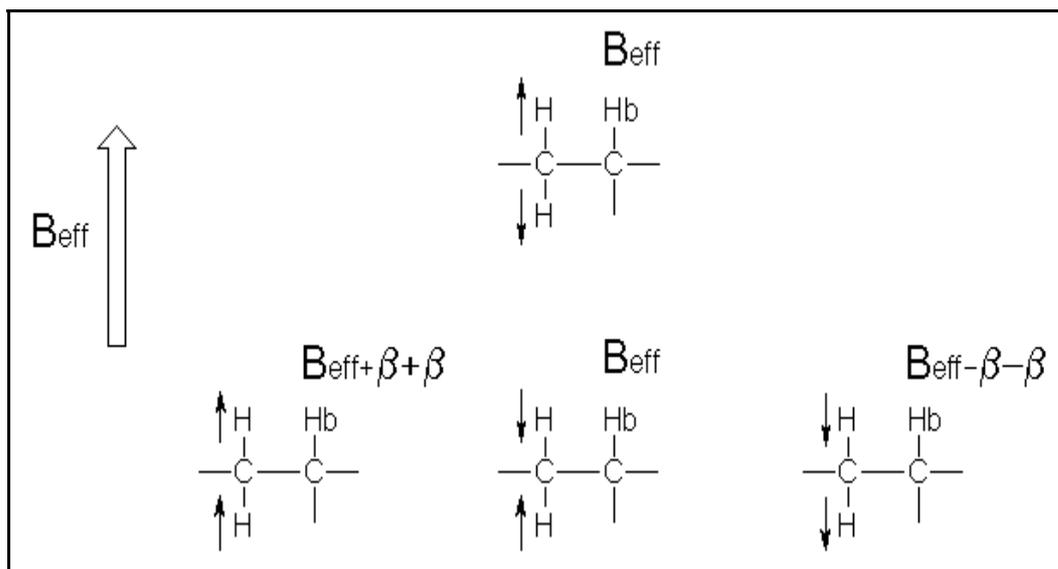


Figura 1.10 - Elenco delle possibili orientazioni degli idrogeni del CH₂

Il campo magnetico sentito da un protone H_b del CH₃ sarà nei tre casi $B_{eff} + \beta + \beta$, B_{eff} e $B_{eff} - \beta - \beta$. Il risultato è che il segnale dei protoni del CH₃ viene suddiviso in tre picchi (tripletto, Figura 1.11) per opera dei due protoni del CH₂ adiacenti.

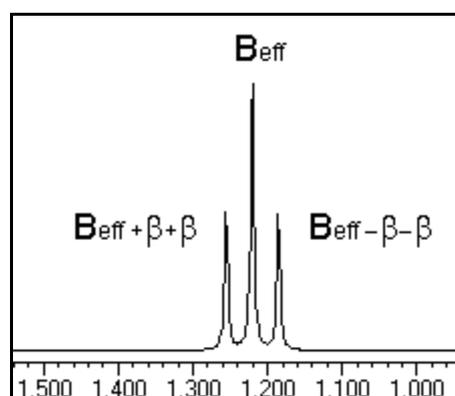


Figura 11 Spettro risultante dall'accoppiamento dei protoni del CH₃ con i 2 protoni del CH₂

Dalle considerazioni precedenti si può anche ricavare l'intensità relativa dei picchi del tripletto. Dato che ognuna delle quattro combinazioni di spin è ugualmente probabile, la situazione centrale con risultante zero si verifica nel 50% dei casi, le altre due nel 25%, quindi un protone adiacente

ad un gruppo CH_2 sarà diviso in tre picchi distinti le cui aree stanno nel rapporto 1 : 2 : 1.

Con ragionamento analogo si può ricavare il numero di picchi in cui viene suddiviso il segnale NMR di un protone ad opera di 3, 4 o più idrogeni vicini. Vale la seguente regola generale: il segnale di un protone viene suddiviso da n protoni adiacenti in $(n + 1)$ picchi.

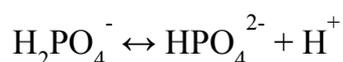
Siamo ora in grado di interpretare lo spettro NMR del dietil etere, mostrato prima. Il segnale del gruppo CH_3 è suddiviso dai due protoni sul CH_2 adiacente in tre picchi (un tripletto) e il segnale del CH_2 è suddiviso dai tre protoni sul CH_3 in $(n + 1) = 4$ picchi (un quartetto). Dato che la molecola ha un piano di simmetria, i due gruppi CH_3 sono chimicamente e magneticamente equivalenti, così come i due gruppi CH_2 , e quindi danno lo stesso segnale.

La separazione tra i picchi di un multipletto viene chiamata costante di accoppiamento J , e viene misurata in Hz ed è importante notare che gruppi di protoni accoppiati tra loro mostrano esattamente la stessa costante di accoppiamento.

1.6 Scelta del nucleo di Fosforo (^{31}P)

La relativa sensibilità di ogni nucleo è proporzionale a γ^3 (rapporto giromagnetico) e alla sua abbondanza isotopica naturale. Il nucleo dell'idrogeno ha la più alta sensibilità e il fosforo ha, rispetto ad esso, il 6.63% di sensibilità relativa. D'altro canto nella spettroscopia di risonanza magnetica *in vivo* la scelta del ^{31}P comporta notevoli vantaggi. Le molecole fosforilate rilevabili con la spettroscopia NMR sono in numero limitato nell'organismo, conseguentemente gli spettri ottenuti contengono un basso numero di segnali che essendo maggiormente risolti, sono di più semplice interpretazione. Lo spettro del ^{31}P è distribuito su un ampio campo di frequenze e ciò facilita ulteriormente la interpretazione dei singoli segnali. Inoltre i principali composti fosforilati misurabili partecipano al metabolismo energetico: ATP, fosfocreatina (PCr), fosforo inorganico (Pi), i fosfomonoesteri (PME) e i fosfodiesteri (PDE) che in alcuni tessuti (ad esempio muscolo scheletrico) sono principalmente rappresentati dagli intermedi glicolitici.

Il segnale del Pi è dato dalle due forme ioniche H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} che essendo in rapido equilibrio tra loro danno luogo ad un unico segnale che rappresenta la media pesata delle due specie. In tale equilibrio è coinvolto anche un protone:



per cui essendo nota la costante di equilibrio di tale dissociazione, è possibile risalire dal chemical shift del Pi al pH del comparto da cui proviene il segnale.

Una caratteristica della MRS è che con le comuni sequenze di acquisizione, utilizzate *in vivo*, si misurano solo i segnali provenienti da

molecole con tempi di rilassamento trasversali sufficientemente lunghi ottenendo informazioni sui metaboliti "liberi" in soluzione o in rapido scambio con essa, e quindi essenzialmente dal comparto citoplasmatico. Gli altri organelli subcellulari, quali ad esempio i mitocondri, rappresentano quindi dei compartimenti invisibili per la risonanza magnetica nucleare *in vivo*, proprio per la alta viscosità della loro matrice che conferisce alle molecole fosforilate in essa contenute dei tempi di rilassamento troppo brevi per dar luogo a segnali misurabili.

Questo fatto che può sembrare una limitazione, è in realtà un vantaggio in quanto sono proprio le concentrazioni dei metaboliti liberi che sono importanti nella valutazione della termodinamica delle reazioni biochimiche, e inoltre consente misurazioni cinetiche di trasporto di metaboliti da un comparto all'altro, altrimenti impossibili.

1.7 Elementi di bioenergetica muscolare

Molte informazioni sul controllo del metabolismo energetico nel muscolo sono ottenibili studiando le transizioni dallo stato di riposo (stato 4 della fosforilazione ossidativa) a diversi livelli di attivazione metabolica (stato 3). In questo senso i muscoli scheletrici offrono l'opportunità di poter modificare la velocità del metabolismo a piacere per mezzo di esercizi muscolari di diversa intensità. Si possono così ottenere informazioni misurando i metaboliti fosforilati nelle diverse condizioni: a riposo, durante diversi livelli di lavoro muscolare e nella successiva fase di recupero.

In figura 1.12 sono riportati due tipici spettri muscolari di uno stesso individuo acquisiti a riposo e dopo l'esercizio, in cui sono indicati i metaboliti misurabili e lo shift del Pi e del β -ATP che indicano rispettivamente la variazione di pH e di magnesio, avvenute in seguito all'esercizio muscolare.

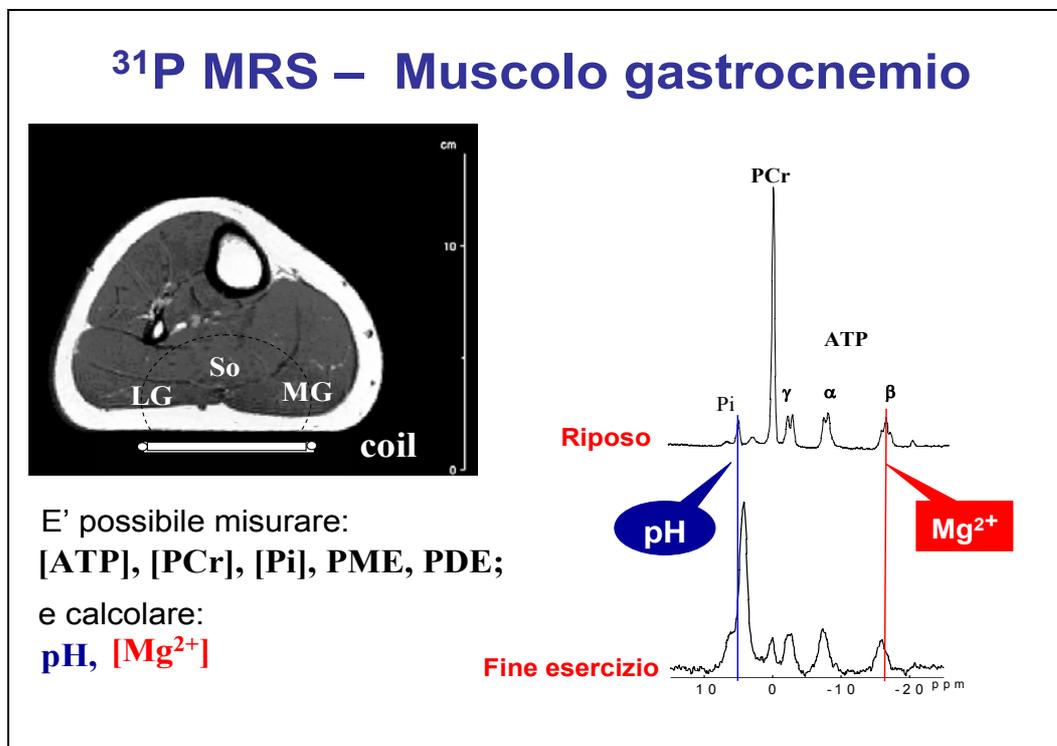


Figura 1.12 – Spettri ^{31}P MRS muscolari acquisiti a riposo e a fine esercizio, con l'indicazione dei metaboliti misurabili e lo shift del Pi e del β -ATP che indicano rispettivamente variazioni di pH e di magnesio libero

La reazione che produce direttamente energia utilizzabile per la contrazione muscolare è catalizzata dalla miosina-ATPasi:



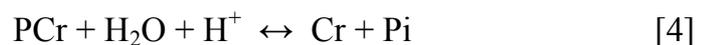
Tuttavia, la quantità di ATP presente nel muscolo è sufficiente per sostenere una attività contrattile solo per un periodo limitato di tempo. Nel muscolo, e in altri tessuti eccitabili, è presente un "serbatoio" energetico in grado di tamponare rapidamente il consumo di ATP per mantenerne la concentrazione costante. Tale sistema è rappresentato dalla fosfocreatina (PCr) il cui gruppo fosforico è trasferito enzimaticamente all'ADP in una reazione catalizzata dalla creatina cinasi (CK):



Peraltro, la maggior parte della produzione energetica cellulare avviene nel mitocondrio per mezzo della fosforilazione ossidativa, le cui reazioni possono essere grandemente semplificate come segue:



Durante i primi istanti di un esercizio muscolare, o quando si incrementa l'intensità dell'esercizio, prima di raggiungere lo stato stazionario in cui la velocità di idrolisi è uguale alla velocità di sintesi di ATP, la somma delle reazioni [1] e [2] è:



quindi l'ATP rimane costante e la concentrazione di PCr diminuisce.

La PCr è anche considerata un "trasportatore di energia" tra i siti di produzione e quelli di utilizzazione di ATP per la localizzazione subcellulare delle diverse forme isoenzimatiche della creatina cinasi (1). Tale enzima infatti oltre a essere presente nel citosol in tre isoforme dimeriche tessuto-specifiche: cerebrale (BB-CK), muscolare (MM-CK), cardiaca (MB-CK), è presente anche in una forma ottamerica mitocondriale (Mi-CK) situata all'interfaccia tra la membrana interna ed esterna, a stretto contatto con le traslocasi dei nucleotidi adenilici. Pertanto le CK citosoliche sarebbero accoppiate funzionalmente alle ATPasi nei siti di utilizzazione dell'ATP, mentre la Mi-CK sarebbe funzionalmente accoppiata alla fosforilazione ossidativa nel sito di produzione dell'ATP.

In condizioni aerobiche la respirazione mitocondriale fornisce la maggior parte dell'energia, ma quando il sistema enzimatico mitocondriale è saturo, ovvero si avvicina alla sua massima velocità, è la glicolisi che deve far fronte a una eventuale ulteriore richiesta energetica. Il metabolismo energetico diventa così anche anaerobico, si produce acido lattico che accumulandosi nel citoplasma porta ad un conseguente abbassamento del pH citosolico.

Nei muscoli a riposo la velocità della respirazione mitocondriale è ridotta considerevolmente e produce una piccola quantità di ATP necessaria per mantenere lo stato stazionario delle cellule ad un basso livello energetico. In queste condizioni [ADP] è pure molto bassa. Quando l'ATP è idrolizzato per fornire l'energia necessaria alla contrazione dalla reazione della miosina-ATPasi [1], [ADP] e [Pi] aumentano equimolarmente ed entrambe vengono trasportati nei mitocondri dove la respirazione è stimolata per sintetizzare ATP.

L'ADP non è direttamente misurabile con la spettroscopia NMR *in vivo*, poiché la concentrazione della sua forma "libera" è dell'ordine μ -molare e il suo segnale di risonanza non è risolto con i magneti utilizzabili per eseguire la spettroscopia sull'uomo.

Tuttavia la [ADP] è calcolabile dalla reazione della creatina cinasi, che *in vivo* è vicino all'equilibrio, sfruttando il forte segnale della PCr che è predominante nello spettro. Quindi, nota la K_{eq} , la [ATP] (2) e la somma [PCr+Cr] (3), misurando la PCr e il pH si ottiene:

$$[ADP] = \frac{[Cr] \cdot [ATP]}{K_{eq} \cdot [PCr] \cdot [H^+]} \quad [5]$$

Per quanto riguarda la concentrazione di Pi è stata riscontrata una notevole discrepanza tra i dati *in vivo* e *in vitro*. Ciò può essere attribuibile alla possibilità che una buona parte del Pi sia in forma legata o in compartimenti invisibili alla risonanza magnetica, oppure alla parziale idrolisi dell'ATP durante il congelamento e l'estrazione per l'analisi biochimica. Infatti le concentrazioni Pi ottenute tramite la risonanza magnetica sono sistematicamente inferiori rispetto a quelle misurate da campioni bioptici.

Un problema della MRS *in vivo*, è la quantificazione assoluta dei metaboliti rivelati. Operativamente si utilizza il segnale dell'ATP la cui concentrazione è nota, e come abbiamo visto in precedenza, rimane costante nelle diverse condizioni metaboliche.

1.8 Magnesio

I muscoli scheletrici contengono approssimativamente il 35% del magnesio totale presente nel corpo umano. Il magnesio è quantitativamente il secondo catione ed è un cofattore essenziale in molti processi cellulari. Il magnesio influenza l'equilibrio di molte reazioni che avvengono nella cellula, interagendo con le molecole fosforilate, e quindi influenza il metabolismo energetico (4), e regola la cinetica del trasporto di ioni attraverso le membrane.

In particolare il magnesio è conosciuto come regolatore dello ione Ca^{2+} nelle cellule del muscolo scheletrico agendo come inibitore del canale di trasporto del Ca^{2+} (5).

Il magnesio inoltre è attivamente trasportato e regolato anche se non si conoscono ancora interamente i meccanismi dell'omeostasi (6). Tutto questo implica che un'accurata conoscenza della concentrazione di magnesio citosolico libero ($[\text{Mg}^{2+}]$) *in vivo* è cruciale per una più profonda comprensione del metabolismo ionico ed energetico delle cellule. Ogni variazione di $[\text{Mg}^{2+}]$ può alterare dei meccanismi critici di regolazione causando delle anomalie nel metabolismo cellulare.

Variazioni di magnesio intracellulare sono state riscontrate in diverse patologie (7), (8), (9), (10), (11), (12) e (13) evidenziando il ruolo chiave di questo ione nei diversi processi metabolici cellulari. Quindi un'accurata valutazione di variazioni della $[\text{Mg}^{2+}]$ intracellulare è utile per una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici di quelle patologie in cui è noto il coinvolgimento di tale ione.

Molti studi riportano dati sulla concentrazione di magnesio totale nel sangue, anche se la frazione di maggior rilevanza funzionale è quella intracellulare libera. Questa incongruità è principalmente dovuta alle limitazioni analitiche nella misura della $[\text{Mg}^{2+}]$. La $[\text{Mg}^{2+}]$ citosolico può essere facilmente valutata *in vivo* utilizzando la spettroscopia di risonanza

magnetica del fosforo (^{31}P MRS). L'accuratezza e l'attendibilità della valutazione *in vivo* della $[\text{Mg}^{2+}]$ intracellulare libero dipende dalla disponibilità di curve di calibrazione basate su misure *in vitro*, realizzate con appropriate soluzioni che ricalchino il più possibile le condizioni del tessuto che deve essere esaminato *in vivo*.

I chemical shift dei fosfati del α -, β -, e γ -ATP sono sensibili alle variazioni di $[\text{Mg}^{2+}]$ ma sono anche influenzati dal pH, dalla temperatura, dalla forza ionica e della concentrazione di molecole fosforilate che complessano il magnesio. Inoltre è anche noto che $[\text{Mg}^{2+}]$ influenza il chemical shift del Pi, interferendo con la valutazione *in vivo* del pH intracellulare (16). Di conseguenza, per una più accurata valutazione della $[\text{Mg}^{2+}]$ intracellulare e del pH citosolico libero, negli organi che subiscono improvvise e sensibili variazioni metaboliche, come il muscolo scheletrico, è fondamentale tenere in considerazione simultaneamente tutte le variabili che influenzano sia il chemical shift dei fosfati dell'ATP e del Pi, che le concentrazioni delle specie che legano sia il H^+ che il Mg^{2+} .

In seguito verranno riportati i risultati di studi effettuati con la ^{31}P -MRS, in soggetti affetti da diverse patologie utilizzando funzioni a multi-variabile per la valutazione contemporanea del pH e della $[\text{Mg}^{2+}]$ nel muscolo scheletrico in diverse condizioni metaboliche tenendo in considerazione la loro mutua interazione (17).

Esame MRS

Capitolo 2

2.1 Ergometro

Per acquisire gli spettri di ^{31}P MRS muscolari in diverse condizioni metaboliche viene utilizzato un ergometro, costruito impiegando materiali non magnetici quali legno, teflon, nylon al fine di minimizzare l'interferenza con l'omogeneità del campo magnetico e con gli impulsi di radiofrequenza. L'ergometro è costruito sulla base di una tavola di legno compensato di 1 cm di spessore, lunga 2 m e larga 40 cm, fissata ad un supporto di legno bombato per poterlo adattare al lettino mobile utilizzato per introdurre nel magnete i soggetti esaminati. Il pedale è fissato al centro di una delle due estremità della base per consentire l'esercizio indifferentemente alla gamba destra o sinistra. Il pedale è stato progettato in modo che il fulcro coincida sempre con l'asse dell'articolazione tibio-tarsica. La posizione finale del soggetto in esame prevede che la gamba formi un angolo di circa 125 gradi con la coscia per minimizzare il

contributo di altri muscoli al movimento di flessione plantare del piede come mostrato in figura 2.1 .

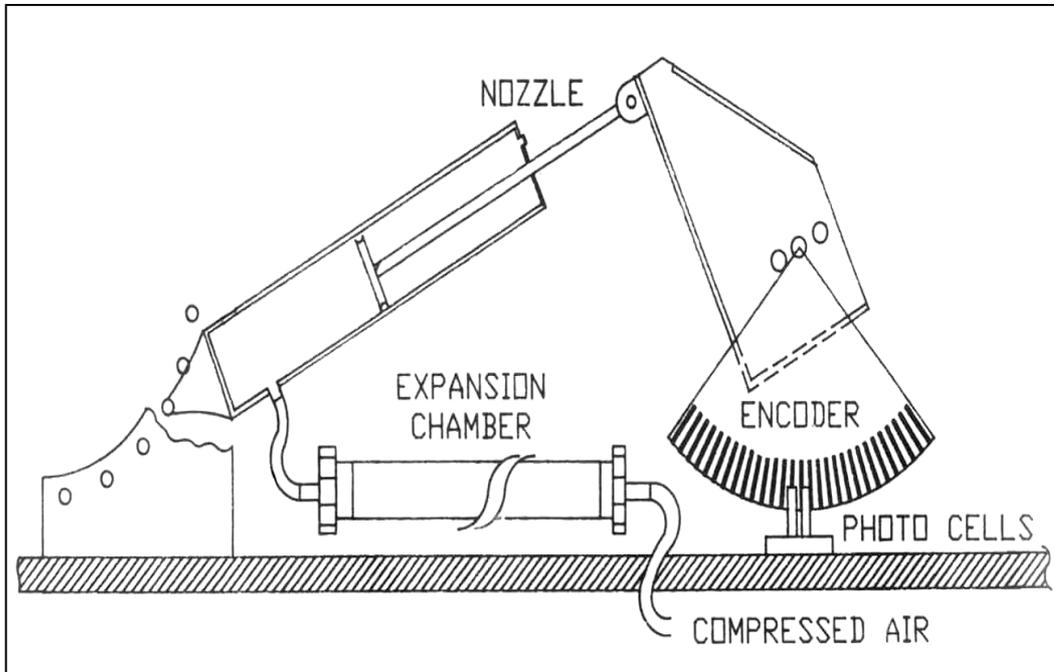


Figura 2.1 – Schema di funzionamento dell'ergometro per effettuare l'esercizio muscolare tramite flessione plantare

La resistenza del pedale è ottenuta per mezzo di un sistema pneumatico connesso a una bombola di aria compressa. I pistoni di teflon, facilmente intercambiabili (con un diametro interno da 2.5 cm fino a 5 cm), sono collegati direttamente al pedale in una posizione che mantiene il corretto angolo dell'articolazione del ginocchio quando si immette l'aria compressa.

Una apparecchiatura, attivata dal generatore di impulsi a radiofrequenza dello spettrometro, scandisce tramite un segnale acustico al soggetto esaminato il momento di inizio di ogni contrazione in modo che l'acquisizioni avvenga sempre nella medesima posizione all'interno del magnete per diminuire le distorsioni (sdoppiamento del picco figura 2.2) causate dal movimento dovuto alle flessioni plantari durante la fase di esercizio. In questo modo le flessioni plantari, effettuate all'interno del

magnete dal soggetto esaminato, vengono sincronizzate all'acquisizione del segnale dello scanner. Il numero dei segnali acustici e l'intervallo di tempo tra essi, per ogni sequenza di impulsi e acquisizioni, può essere programmato a piacere.

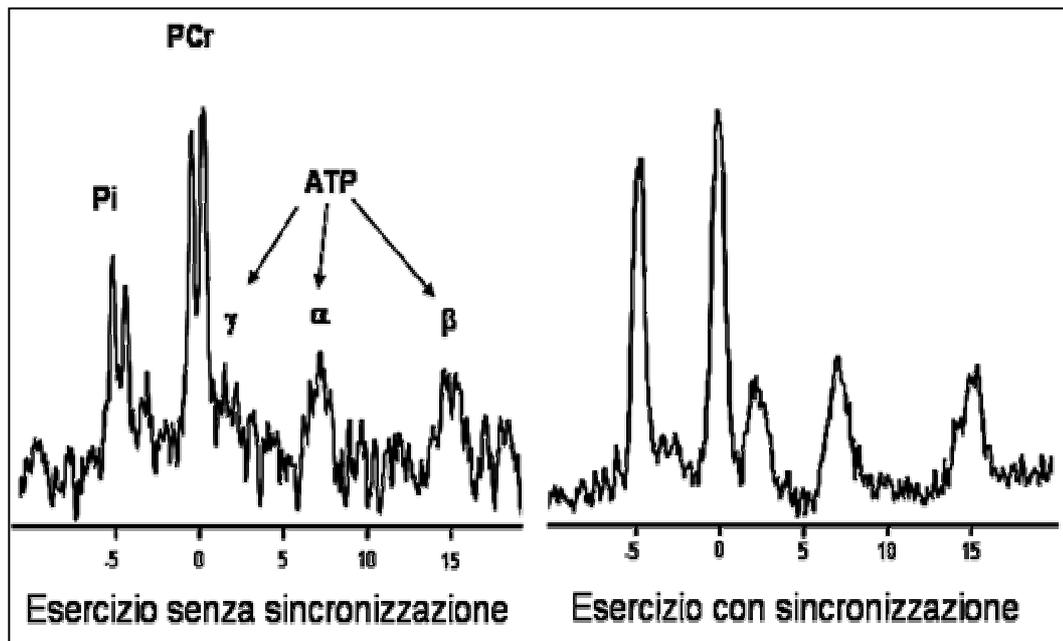


Figura 2.2 – Effetto della sincronizzazione nell'acquisizione degli spettri durante l'esercizio muscolare con l'eliminazione dello sdoppiamento del picco

Due cinghie passanti sulle spalle del soggetto in esame, solidali all'asse dell'ergometro, assicurano al soggetto una posizione ferma prevenendo lo slittamento longitudinale durante lo sforzo muscolare. L'angolo del ginocchio è mantenuto 125° anche durante l'esercizio. La bobina di superficie (che trasmette e riceve gli impulsi radio) è posizionata direttamente sulla pelle e mantenuta nella posizione voluta con un cuscino depressurizzato, che può essere adattato di volta in volta per trattenere la gamba e la bobina nella posizione corretta assunta inizialmente, anche durante l'esperimento.

2.2 Acquisizione del segnale NMR

Lo strumento NMR utilizzato (General Elettrics 1.5 Tesla Signa System con magneti a superconduzione) è a trasformata di Fourier (FT) e consente acquisizioni di segnali con alta sensibilità e tempi ridotti rispetto a quelli in onda continua di più vecchia generazione.

Negli strumenti che lavorano in FT si invia sul campione un intenso impulso per un tempo molto breve (nell'ordine dei μs) di una radiofrequenza a banda larga (nell'ordine dei KHz), centrata intorno alla frequenza media di assorbimento del nuclide in esame, che per il fosforo è di 28.566 KHz. In tal modo non si irradia via via il campione con il passaggio di una serie successiva di singole e ben definite frequenze, che eccitano man mano i vari nuclei, ma si eccitano simultaneamente tutti i nuclei corrispondenti al nuclide esaminato. Dopo ogni impulso i nuclei eccitati rilassano mediante un processo detto *Free Induction Decay* (FID). Queste emissioni sono raccolte e si ottiene così un segnale di tipo esponenziale di decadimento che miscela un vasto numero di segnali con diverse frequenze e che ha un andamento complesso tipico, detto interferogramma. L'operazione è ripetuta e accumulata nel calcolatore tante volte fino ad ottenere un accettabile rapporto segnale rumore (S/N), poi lo stesso computer utilizzando l'algoritmo della serie di Fourier applicato al segnale complesso di interferenza, opera una trasformata di Fourier, che permette di identificare e separare le singole frequenze con le relative intensità e di offrire quindi la normale presentazione dello spettro, che riporta gli assorbimenti alle varie frequenze. Questa tecnica permette un notevole guadagno di tempo nella registrazione dello spettro (poiché registra insieme tutti i segnali) cui corrisponde alla fine un aumento di sensibilità dell'ordine di 10^2 (variabile a secondo dei nuclei) rispetto alla tecnica in onda continua operante alla stessa frequenza fissa.

2.3 Acquisizione degli spettri del muscolo

E' stata utilizzata una bobina di superficie trasmittente (20.5 cm di diametro) e ricevente (7.5 cm di diametro) progettata e costruita nel nostro laboratorio. L'impulso trasmesso è centrato alla frequenza di 25.866 MHz, ha una durata di 400 μ s, una potenza di 0.5 kW e una larghezza di banda di 2,5 kHz. Il ritardo tra la trasmissione e l'acquisizione è di 0.5 ms e la durata dell'acquisizione è di 250 ms. L'intera sequenza impulso-acquisizione è ripetuta ogni 5s (TR = 5). Ogni FID è composto di 2048 punti complessi (2048 reali e 2048 immaginari).

I soggetti sono distesi supini all'interno del magnete e la bobina di superficie è posizionata sulla massima circonferenza della gamba destra in modo da acquisire i segnali provenienti principalmente dal gastrocnemio.

Dopo aver ottimizzato l'omogeneità del campo magnetico utilizzando il segnale del protone dell'acqua, ad una risoluzione della linea spettrale di 0.05-0.10 ppm (misurata come larghezza a metà altezza), si acquisiscono 128 FID a riposo (10 min).

La fase successiva prevede un esercizio aerobico incrementale consistente in flessioni plantari utilizzando l'ergometro descritto. I diversi livelli di lavoro, sono registrati ogni minuto mediando 12 FID di 5 sec.. Ad ogni soggetto è richiesto di effettuare un esercizio per ottenere una deplezione di PCr del 50% circa, verificabile visivamente sullo schermo dell'apparecchiatura con l'inversione delle altezze dei picchi di PCr e Pi.

Nella successiva fase di recupero si registrano mediando 2 FID ogni 10 sec. per un totale di 5 min (Figura 2.3).

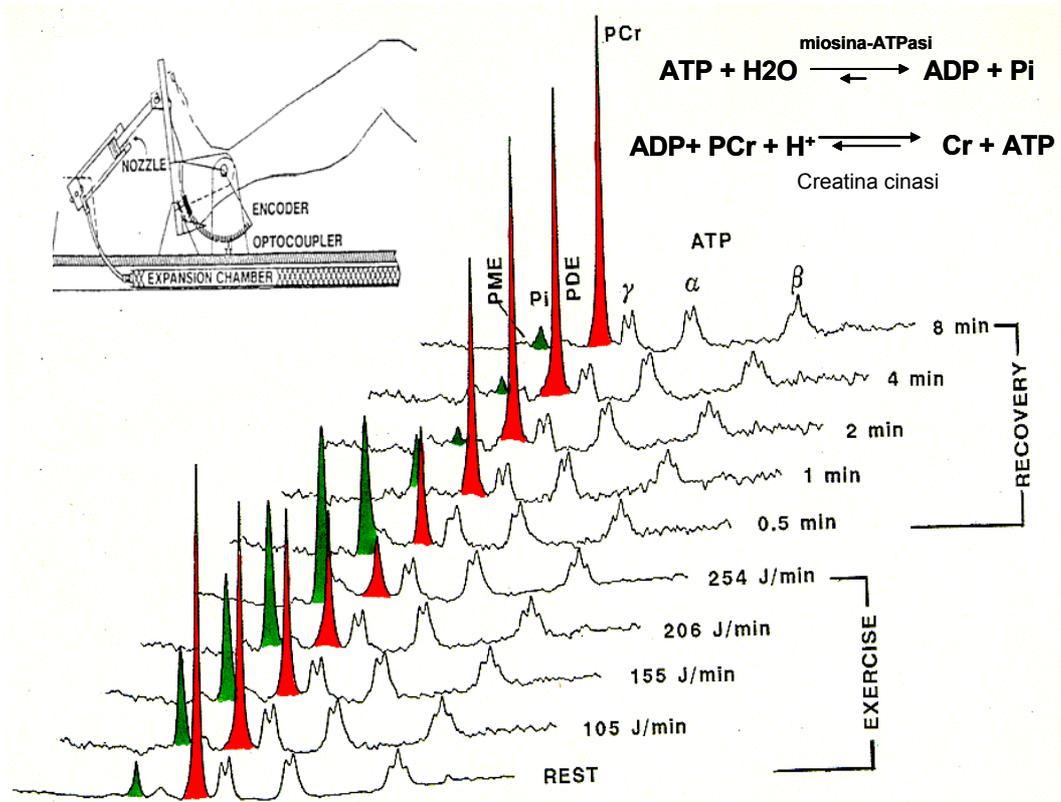


Figura 2.3 - Variazioni di PCr (picco rosso) e Pi (picco verde) durante il riposo (rest), l'esercizio (exercise) e il recupero (recovery)

2.4 Elaborazione degli spettri del muscolo

Al termine di ogni sessione di lavoro i FID acquisiti vengono direttamente trasferiti ad una Work-Station Octane (Silicon Graphics) che contiene il Data-Base di tutti gli esami effettuati. Gli spettri di ogni sessione di esame sono poi trasferiti su un PC Desktop dedicato all'elaborazione dei dati, su cui è caricato il programma di elaborazione. Tutti gli spettri sono stati analizzati utilizzando l'algoritmo AMARES (18), incluso nella piattaforma software jMRUI (Java Magnetic User Interface) (19), sviluppato nell'ambito di un progetto di ricerca Europeo multicentrico. AMARES esegue l'elaborazione del segnale nel dominio del tempo permettendo l'introduzione di vincoli tra le variabili detti *prior knowledge* (figura 2.4) che parametrizzano la funzione che interpola lo spettro. In tal modo è possibile decidere a priori quali picchi analizzare e le caratteristiche dei segnali delle molecole rilevate. Il protocollo di elaborazione è stato standardizzato per renderlo di facile utilizzo ed operatore indipendente.

Si attribuisce convenzionalmente al picco della PCr la frequenza zero, misurandone il centro di gravità (COG) secondo l'equazione (20):

$$P = \frac{\sum_{i=1}^n f_i S_i}{\sum_{i=1}^n S_i}$$

dove per n punti entro un definito intervallo spettrale, f_i è la frequenza dell' i esimo punto e S_i è la sua magnitudine.

Sono stati imposti vincoli come *prior knowledge* nell'elaborazione degli spettri di ^{31}P MRS del muscolo scheletrico, in modo da ottenere risultati congruenti alle regole che governano gli accoppiamenti fra gli spin (figura 2.4). I picchi esaminati sono 9 (Peak Peaking), quelli relativi al

segnale della PCr (singoletto), del Pi (singoletto) e dell'ATP suddiviso nella tre componenti (due doppietti α e γ ed un tripletto β) derivate dall'accoppiamento dei tre atomi di fosforo contenuti nella molecola. Per le leggi degli accoppiamenti di spin un doppietto è formato da due picchi che hanno la stessa larghezza (line width) e la stessa area mentre un tripletto è formato da tre picchi con la stessa larghezza, con quello centrale di area pari al doppio degli altri due (Figura 2.4). In alcuni casi vengono aggiunti uno o due picchi per analizzare, dove sono presenti, PME e/o PDE: entrambi danno come segnale un singoletto. L'aggiunta di questi due picchi, quando presenti, permette ad AMARES di interpolare nel miglior modo possibile lo spettro evitando la sovrastima di altri metaboliti, più in particolare PCr e Pi che si trovano a pochi ppm.

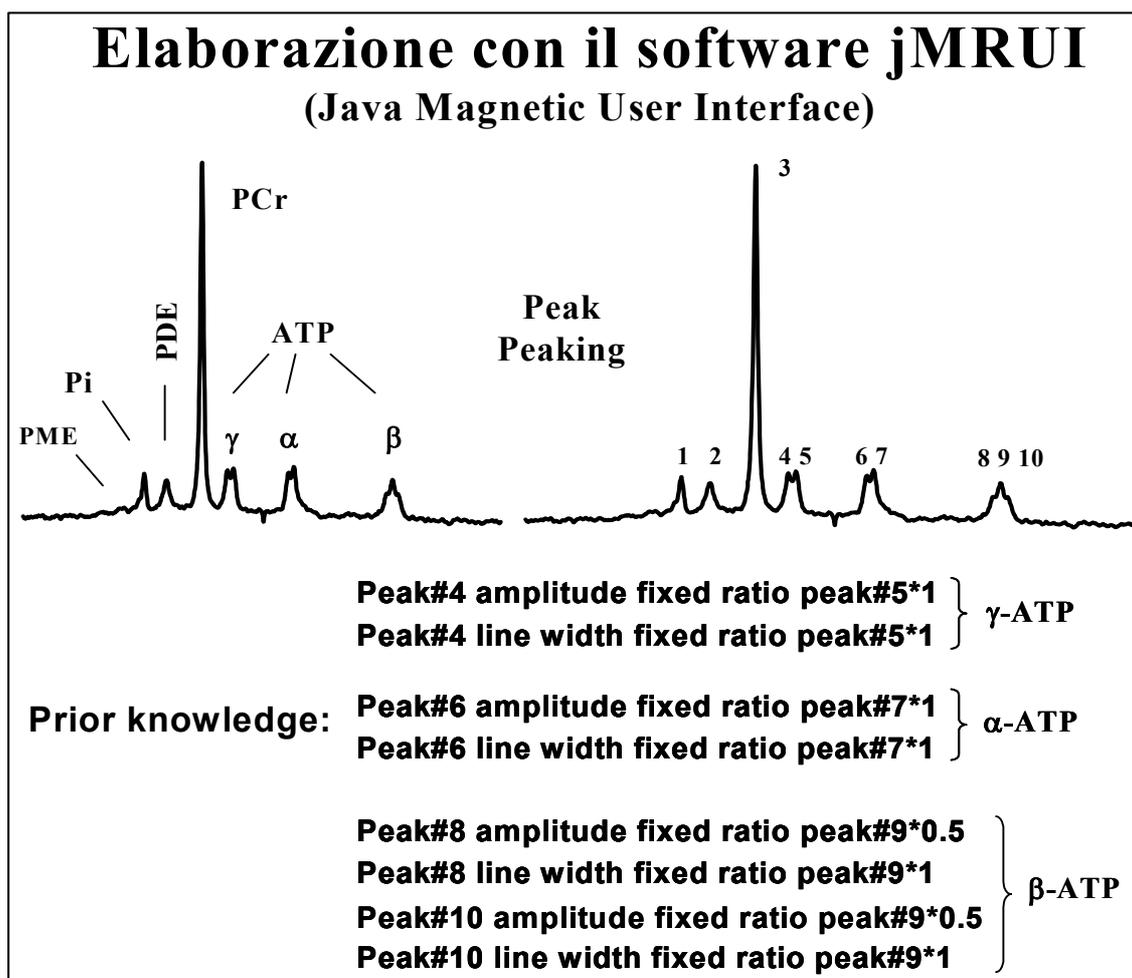


Figura 2.4 – Selezione dei picchi e vincoli imposti per l'elaborazione degli spettri utilizzando AMARES.

Le aree sottese dai picchi relativi ai metaboliti misurati vengono integrate assumendo che i segnali diano luogo a curve Lorentziane. In figura 2.5 e riportato il risultato, ottenuto con AMARES, dell'elaborazione di uno spettro di ^{31}P MRS a riposo.

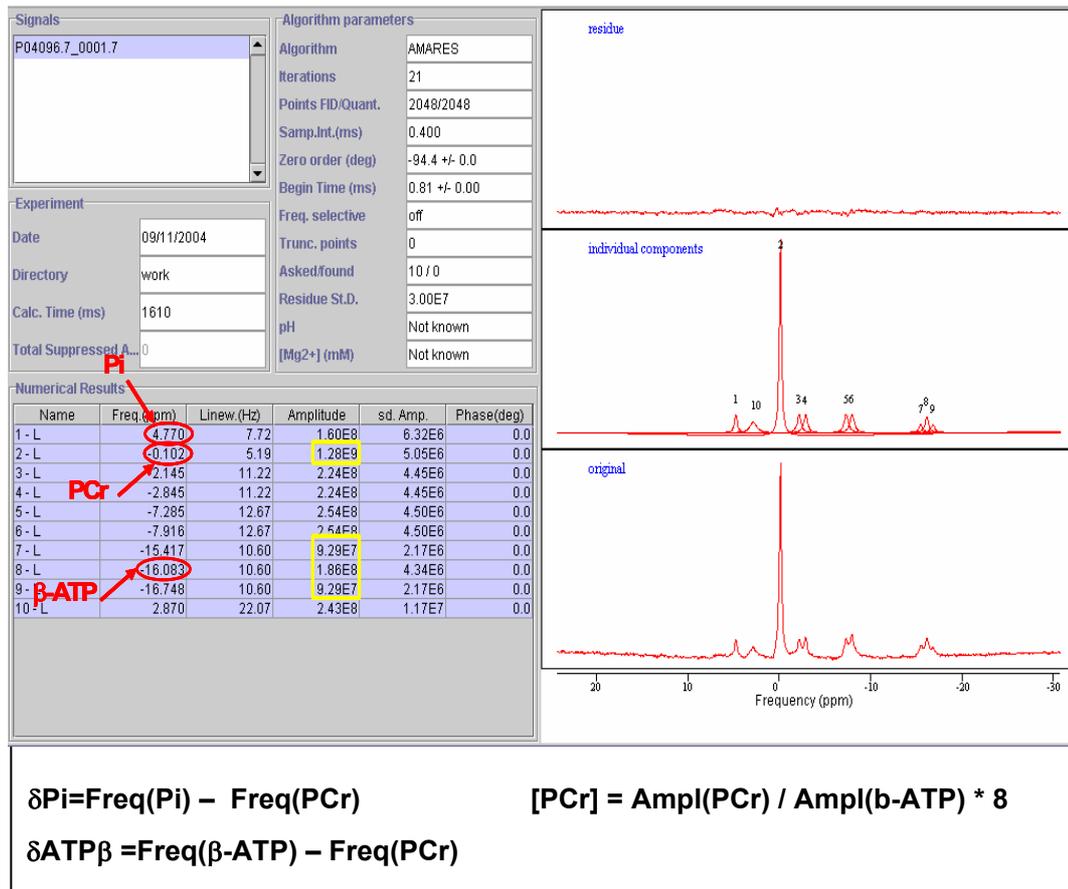


Figura 2.5 – Risultato di un'elaborazione di uno spettro con AMARES

Una volta ottenuti i valori assoluti di ogni segnale, se ne calcola il rapporto con il valore del $\beta\text{-ATP}$ preso come riferimento interno poiché la sua concentrazione è costante.

Lo stesso protocollo di elaborazione è applicato a tutti gli spettri acquisiti alle diverse condizioni metaboliche.

2.5 Valutazione della $[Mg^{2+}]$ e del pH intracellulare

Le variazioni della $[Mg^{2+}]$ e di pH intracellulare si influenzano mutuamente, quindi per un'accurata valutazione occorre che tali quantità siano determinate contemporaneamente.

Questo è particolarmente necessario quando si vogliono effettuare misure in diverse condizioni metaboliche come durante l'esercizio e durante il recupero dove per effetto della produzione di acido lattico si ha una diminuzione sensibile del pH. Inoltre gli ioni H^+ e Mg^{2+} competono, con Na^+ , e K^+ , negli equilibri chimici di complessazione con i principali legandi presenti nell'ambiente citosolico delle cellule, quali ATP^{4-} , PO_4^{3-} , Cl^- and PCr^{2-} (figura 2.6). Pertanto le concentrazioni delle specie libere si influenzano reciprocamente ed è necessario sviluppare un sistema di calcolo che tenga conto di queste interazioni.

Di conseguenza, l'equazione seguente derivata da quella di Henderson-Hasselbach

$$pH = 6.77 + \log \left[\frac{\delta Pi - 3.25}{5.78 - \delta Pi} \right] \quad [1]$$

dove 6.77 è la pK_a di seconda dissociazione dell'acido ortofosforico, δPi il chemical shift del Pi e 3.29, 5.68 i chemical shift degli ioni $H_2PO_4^-$ e HPO_4^{2-} rispettivamente, è approssimativa non tenendo conto dell'influenza del Mg^{2+} .

Occorre dunque introdurre un termine che tenga in considerazione anche la presenza del magnesio. E' stata quindi sviluppata una nuova equazione che sia in funzione anche della $[Mg^{2+}]$ (17):

$$pH = 6.77 - 0.031 \cdot [Mg^{2+}] mM^{-1} + \log \left[\frac{\delta Pi - 3.29}{5.68 - \delta Pi} \right] \quad [2]$$

L'equazione [2] fornisce valori di pH che sono più bassi rispetto all'equazione [1].

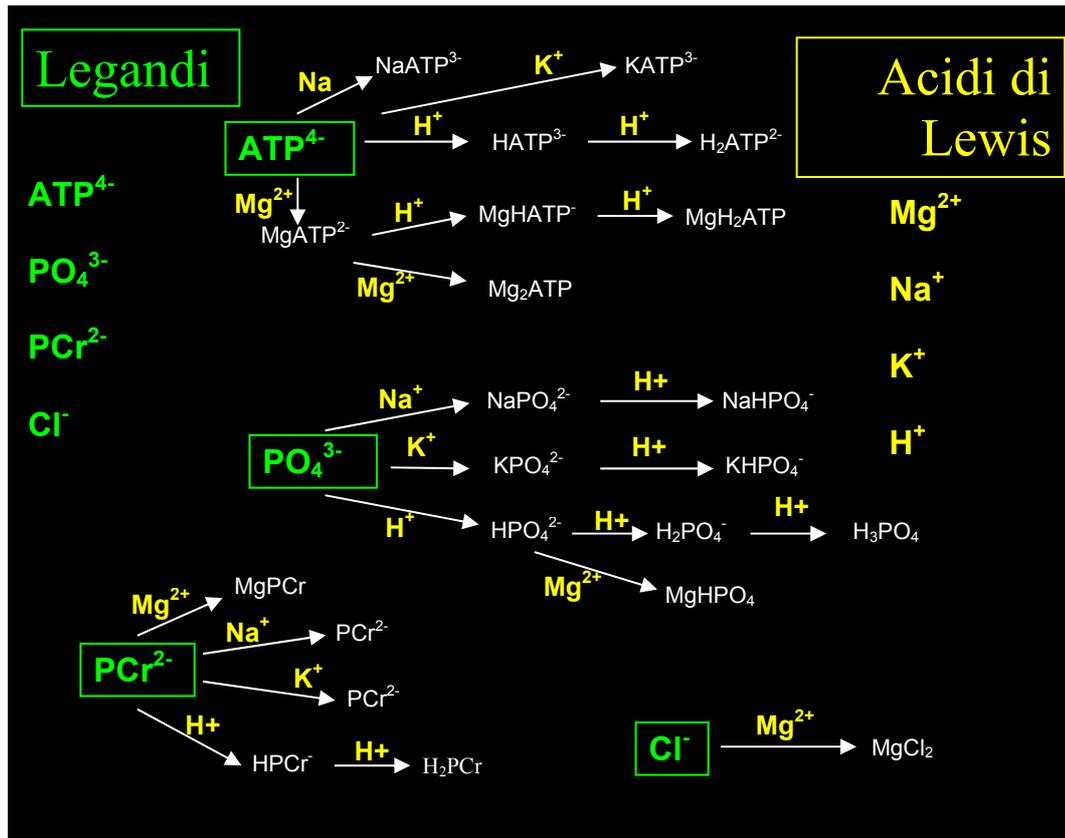


Figura 2.6 – Schema che rappresenta tutte le possibili competizioni tra gli ioni presenti nel citosol

Analogamente a quanto fatto per il pH, è necessario sviluppare un'equazione per la determinazione della $[Mg^{2+}]$ tenendo conto del pH. E' stata costruita la seguente equazione parametrica:

$$pMg = Y_0 + \frac{C_1}{C_2 - e^{(\delta_\beta - \delta_0)/d}} + a_1 (\delta_\beta - \delta_0) + a_2 (\delta_\beta - \delta_0)^2 b(PCr - 27) \quad [3]$$

Dove:

$$d = D_1 + D_2 (pH - 7)^2; \quad a_1 = A_1 + A_2 (pH - 7)$$

e δ_β indica il *chemical shift* del β -ATP e Y_0 , C_1 , C_2 , δ_0 , a_1 , a_2 , D_1 , D_2 , e b sono costanti parametriche, il cui valore:

$$Y_0 = 10.43; \quad C_1 = -25.67; \quad C_2 = 3.728; \quad \delta_0 = -15.695; \quad b = -0.05;$$
$$D_1 = 0.105; \quad D_2 = 0.22; \quad A_1 = -0.2; \quad A_2 = -0.29$$

Quindi le variabili sperimentali ottenibili dagli spettri ^{31}P MRS, necessarie per la valutazione del $[\text{Mg}^{2+}]$ sono le frequenze di risonanza del Pi, del β -ATP e la concentrazione di PCr.

Il sistema di equazioni [2] e [3] non può essere facilmente risolvibile per via analitica, quindi per ovviare a tale difficoltà è stato creato un software (MagicMC, figura 2.7) che utilizza una procedura iterativa in base alla quale il risultato dell'eq. [3] è utilizzato nell'eq. [2], e il risultato ottenuto è nuovamente dato in input all'eq. [3] fino alla convergenza dei risultati. Il processo iterativo si dimostra convergere rapidamente alla soluzione del sistema, fornendo i valori effettivi di pH e $[\text{Mg}^{2+}]$.

La valutazione combinata del pH e della $[\text{Mg}^{2+}]$ è effettuata in diverse condizioni metaboliche ossia riposo, esercizio e recupero post esercizio.

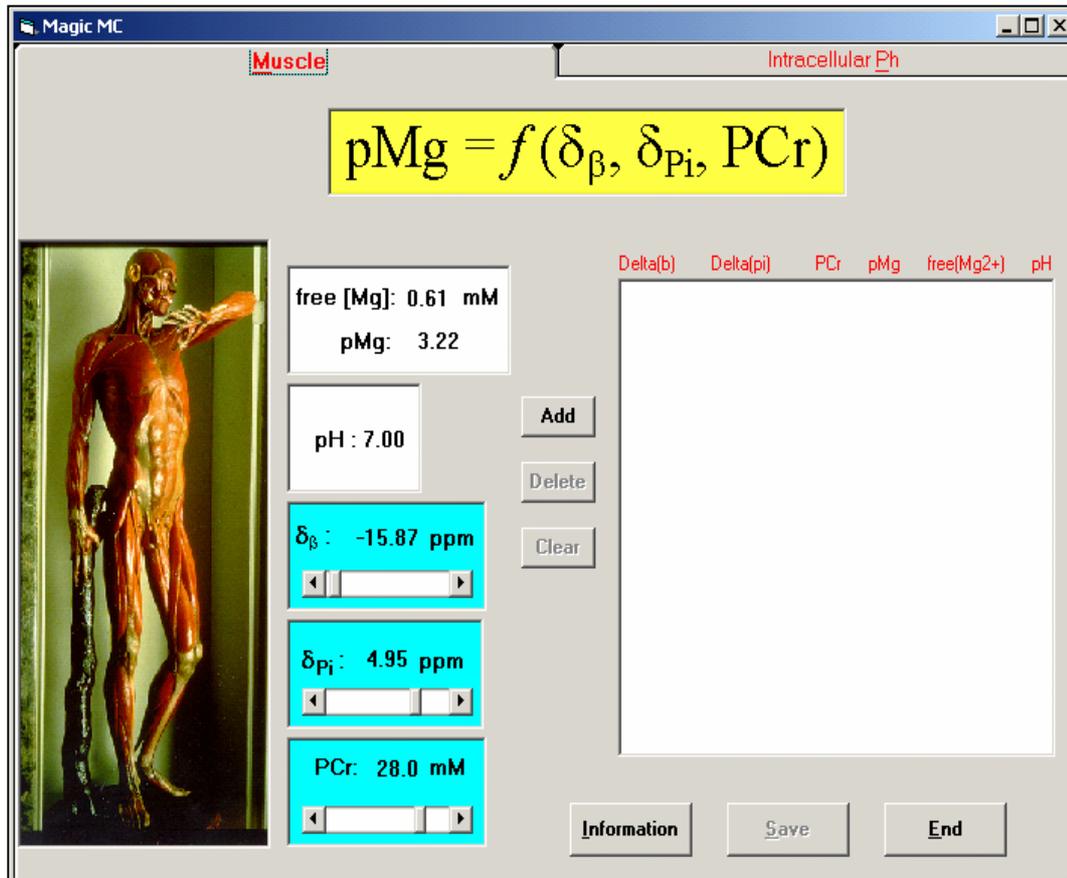


Figura 2.7 – Software MagicMC creato per la valutazione del pH e della $[Mg^{2+}]$ calcolati risolvendo il sistema di equazioni (2) e (3).

2.6 Valutazione in vivo della $[Mg^{2+}]$

Sono stati esaminati 50 soggetti volontari di età compresa tra 14 e 63 anni, 29 donne 21 uomini, le medie e le deviazioni standard sono riportate di seguito in tabella 2.1.

[PCr] (mM)	[Pi] (mM)	pH	$[Mg^{2+}]$ (mM)
28.7 ± 1.9	3.86 ± 0.49	6.98 ± 0.03	0.32 ± 0.03

Tabella 2.1- Tabella riassuntiva dati a riposo valutati su 50 controlli espressi come media e deviazione standard

I valori di pH citosolico intracellulare valutati con l'eq. [2] che tiene conto della $[Mg^{2+}]$, risultano più bassi rispetto a quelli calcolati con l'eq. [1] (21), mentre risultano simili a quelli ottenuti nell'unico altro studio pubblicato che tiene conto dell'influenza della $[Mg^{2+}]$ (22). Questo risultato è la conseguenza della competizione tra H^+ e Mg^{2+} nel legare con Pi e ATP.

Oltre ai valori di riposo è interessante osservare l'andamento del Mg^{2+} e del pH durante tutto l'arco dell'esame e quindi nelle diverse condizioni metaboliche dove si ha una marcata variazione di pH come mostrato in figura 2.7. In tabella 2.2 sono riportati i valori della $[Mg^{2+}]$ valutata in un sottogruppo di 10 controlli con deplezione di PCr paragonabile, di circa il 50 % e con pH a fine esercizio medio di 6.8. I risultati mostrano una variazione significativa ($P < 0.001$) della $[Mg^{2+}]$. La [PCr] e il pH influenzano in direzione opposta la $[Mg^{2+}]$ ma l'influenza del pH prevale su quella della [PCr]. Una bassa [PCr] (che rappresenta un elevato valore di Pi) determina una diminuzione della $[Mg^{2+}]$, mentre un basso pH determina un incremento di $[Mg^{2+}]$. Come risultato durante l'esercizio la variazione di $[Mg^{2+}]$ è influenzata dall'azione predominante della diminuzione di pH.

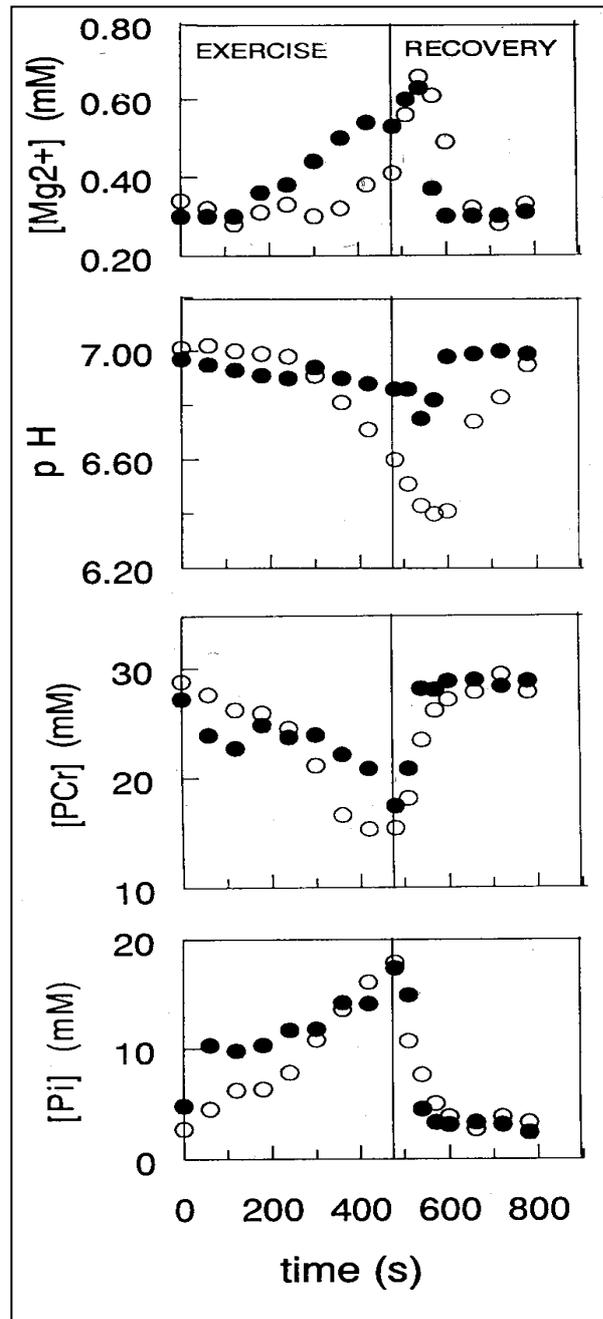


Figura 2.7 – Grafici che rappresentano l'andamento rispettivamente di $[Mg^{2+}]$, pH, [PCr] e [Pi] alle diverse condizioni metaboliche

Durante la prima fase del recupero si nota il risultato combinato dell'incremento della [PCr] e del continuo decremento del valore di pH, in alcuni soggetti dove il livello di acidificazione è molto elevato ($pH < 6.5$), il valore della $[Mg^{2+}]$ raggiunge anche valori di 4 o 5 volte superiori al valore

di riposo. Durante il rimanente periodo di recupero si ha il ritorno del pH verso del valore di riposo e di conseguenza anche della $[Mg^{2+}]$.

Riposo		Fine esercizio		
pH	$[Mg^{2+}]$ (mM)	% PCr	pH	$[Mg^{2+}]$ (mM)
6.96 ± 0.02	0.31 ± 0.04	47.7 ± 13.8	6.8 ± 0.09	0.42 ± 0.06

Tabella 2.2 – Valori di controllo ottenuti in un gruppo di controllo di 10 soggetti sani con una deplezioni PCr circa il 50 % valutata a riposo e fine esercizio fine esercizio. La variazione della $[Mg^{2+}]$ tra il riposo e il fine esercizio è statisticamente significativa con $P < 0.001$

La determinazione accurata della $[Mg^{2+}]$ e del pH sono importanti anche per poter determinare più correttamente la $[ADP]$ e il valore del ΔG di idrolisi dell'ATP (23), (24), (25)), che è stato dimostrato che sono influenzate dalle variazioni di pH e della $[Mg^{2+}]$ intracellulare.

2.7 Risintesi della fosfocreatina dopo esercizio muscolare

La PCr è presente nel muscolo scheletrico e in altri tessuti eccitabili (cervello e reni) e rappresenta un deposito disponibile di energia immediata in grado di tamponare improvvise richieste di energia da parte delle cellule. Tipicamente la PCr, è utilizzata durante la contrazione muscolare ed è risintetizzata durante i periodi di inattività. Quando lo stress metabolico è terminato, la PCr è risintetizzata a partire dall'ATP il quale a sua volta è sintetizzato quasi totalmente nel mitocondrio per mezzo della fosforilazione ossidativa. Il recupero della PCr dopo un esercizio muscolare è un indice della funzionalità della respirazione mitocondriale (26), (27) e (28).

Alla fine dell'esercizio, in assenza di contrazione muscolare, l'equilibrio della creatina cinasi si sposta verso la formazione di PCr con il contemporaneo rilascio di protoni che determinano una ulteriore diminuzione di pH durante la prima fase di recupero fino al raggiungimento di un valore minimo, per poi risalire e tornare al valore di riposo (vedi figura 2.7).

Il recupero della PCr ha un andamento esponenziale asintotico, avente per limite il valore di riposo. L'equazione che descrive il fenomeno è del tipo:

$$Y = c \left[1 - e^{-a(x+b)} \right]$$

In figura 2.8 è mostrato un tipico grafico di interpolazione del recupero. La velocità di recupero della PCr è riportata come costante di tempo della equazione interpolante (TC).

I valori di TC della PCr calcolati dalle curve sperimentali è in correlazione lineare con i valori di pH minimo raggiunti durante il recupero (28). In figura 2.9 è mostrato l'intervallo di normalità del TC in funzione del pH minimo ottenuto dalla retta di regressione del recupero della PCr in

50 controlli sani con un intervallo di confidenza del 95% pari a 2 deviazioni standard. La retta di regressione mostra una pendenza negativa, ciò indica che una maggiore acidificazione corrisponde un recupero della PCr più lento.

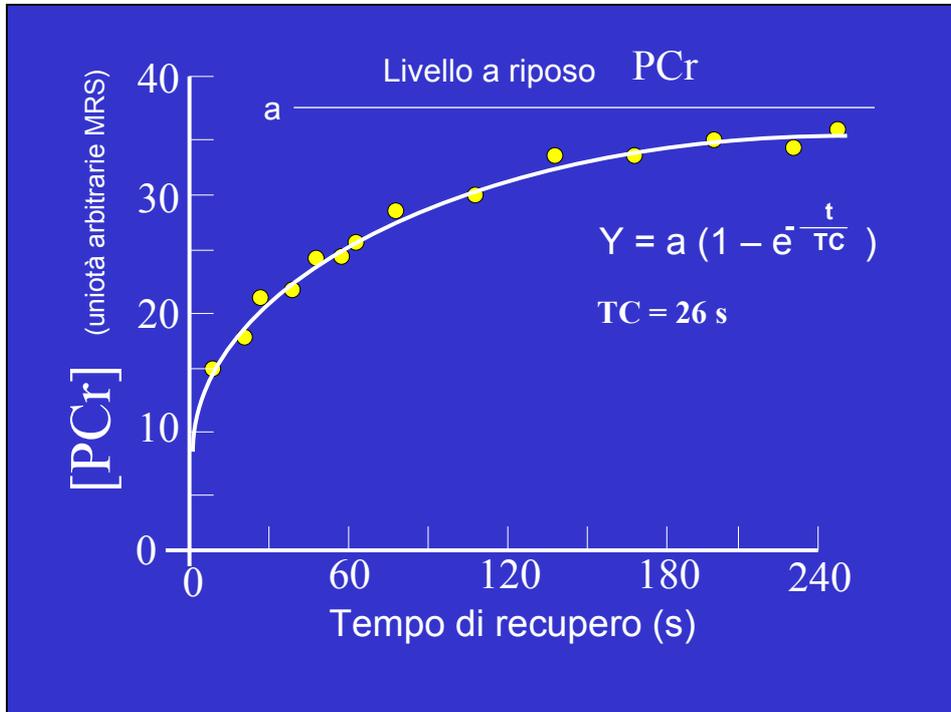


Figura 2.8 – Andamento del recupero della PCr dopo esercizio muscolare. Il TC è la costante di tempo dell'equazione esponenziale interpolante.

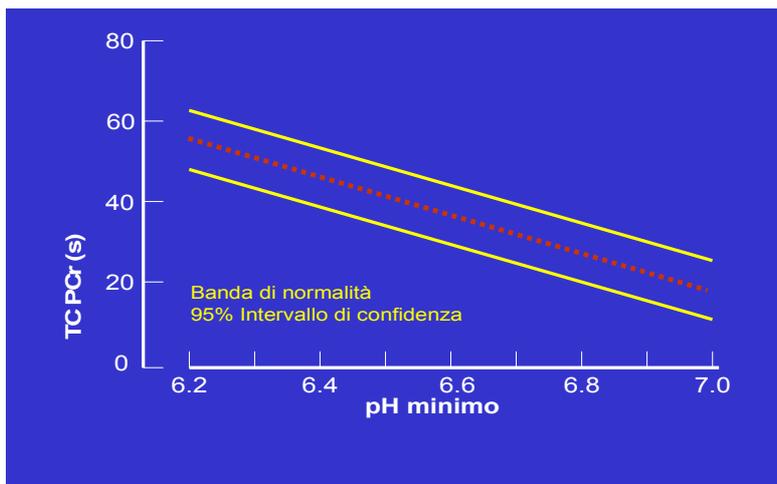


Figura 2.9 – Correlazione lineare tra il TC e il pH minimo (linea rosa). Intervallo di confidenza del 95% pari a 2 deviazioni standard (Linee gialle)

Glicogenosi muscolari

Capitolo 3

Come già mostrato, l'incremento della $[Mg^{2+}]$, che avviene durante l'esercizio e durante i primi istanti di recupero, nel muscolo scheletrico umano, è abbinato ad una diminuzione di pH intracellulare. Per determinare *in vivo* la relazione causale dell'omeostasi del Mg^{2+} con le variazioni di pH nel muscolo scheletrico, sono stati studiati pazienti con miopatie metaboliche dovute a differenti disordini della via glicolitica che comportano l'assenza di acidificazione durante l'esercizio muscolare.

3.1 Glicogenosi muscolari

Abbiamo valutato il pH e la $[Mg^{2+}]$ con la ^{31}P MRS a riposo durante l'esercizio e durante il recupero nel muscolo gastrocnemio di due pazienti affetti da malattia di McArdle e due fratelli affetti dalla malattia di Tarui, caratterizzati rispettivamente da un difetto di glicogeno fosforilasi (McArdle) e dell'enzima fosfofruttochinasi (PFK). Vedi figura 3.1.

I pazienti McArdle presentano una sindrome da intolleranza muscolare allo sforzo, con mialgie, crampi, affaticamento e debolezza muscolare. La diagnosi clinica è basata sulle prove da sforzo che evidenziano un accumulo del lattato e sull'esame bioptico che mostra accumulo di glicogeno muscolare e un deficit di mio-fosforilasi.

I pazienti PFK presentano una sindrome da intolleranza muscolare allo sforzo, più grave rispetto al McArdle. La diagnosi clinica è effettuata tramite biopsia muscolare che evidenzia un accumulo di glicogeno anomalo e di un deficit enzimatico della fosfofruttochinasi (Figura 3.1).

Questi due tipi di glicogenosi, sono caratterizzate dal difetto di due enzimi coinvolti nelle vie metaboliche della glicogenolisi (McArdle) e della glicolisi (PFK) e si manifestano con limitata o assente produzione di acido lattico intracellulare in funzione del grado di deficit (29), 30). Di conseguenza i pazienti affetti dalla malattia di McArdle e dalla malattia di Tarui, mostrano tipicamente l'assenza o la diminuzione dell'acidificazione intracellulare durante l'esercizio muscolare (31), 32). Abbiamo utilizzato queste patologie come modelli sperimentali per studiare l'andamento della $[Mg^{2+}]$ durante l'esercizio e il recupero in assenza di acidificazione intracellulare, per meglio comprendere i meccanismi di omeostasi della $[Mg^{2+}]$.

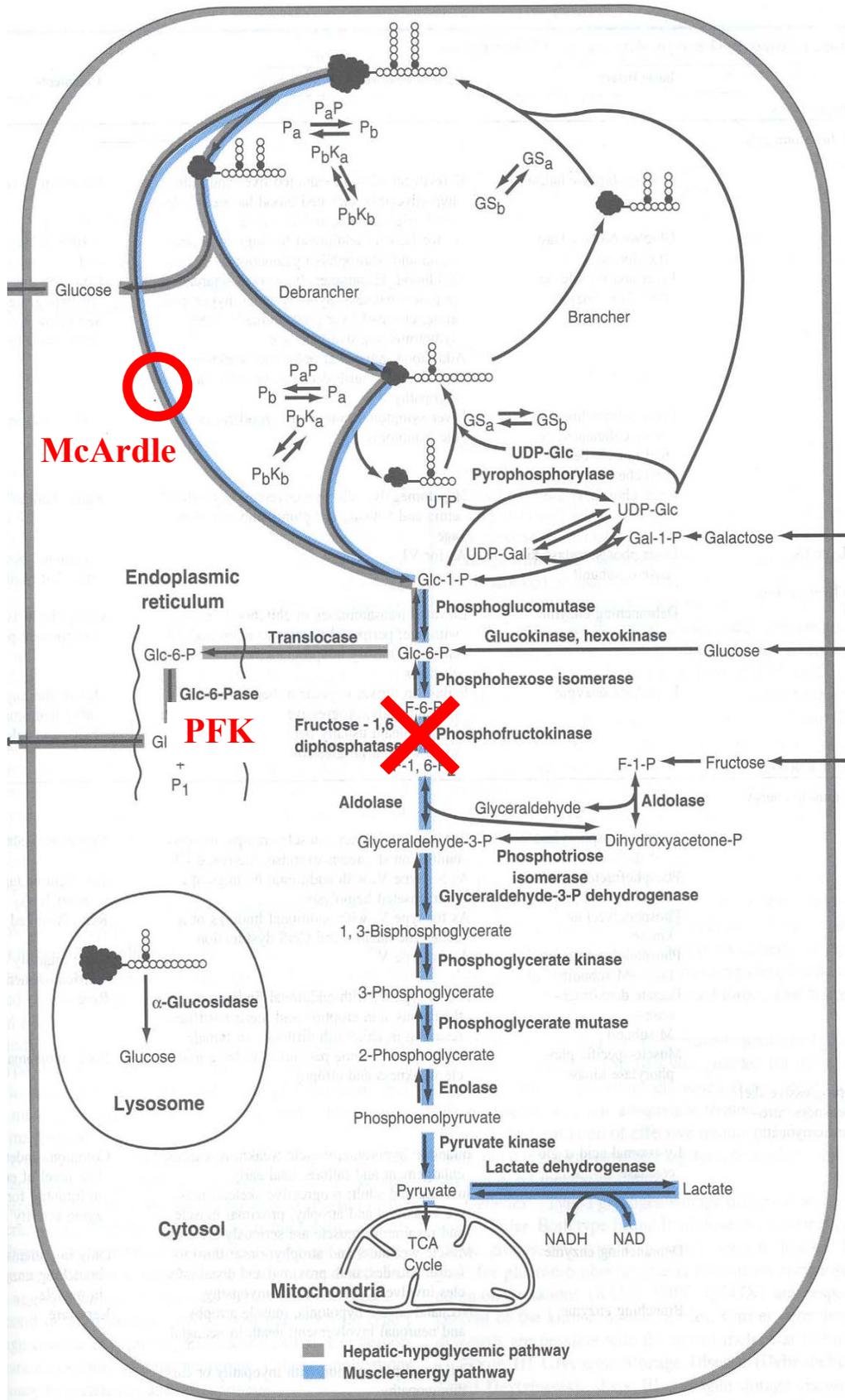


Figura 3.1 Enzimi che caratterizzano la malattia di McArdle e di Tarui.

3.2 Metodi

Abbiamo studiato 4 pazienti: due maschi entrambi di 42 anni, affetti da malattia di McArdle (riportati come McArdle I e McArdle II) e due fratelli di 18 e 10 anni affetti da malattia di Tarui (riportati come PFK I e PFK II). La diagnosi è stata effettuata in precedenza tramite analisi istologica e biopsia muscolare.

Gli spettri sono stati acquisiti con uno spettrometro General Electric a 1.5 T, Signa System con una radio frequenza di 25.866 specifica per la ^{31}P -MRS. Gli spettri sono stati acquisiti con 1024 punti complessi per ogni FID, con una “band width” di 2 kHz.

L’elaborazione del segnale degli spettri è stato effettuato tramite il programma di fitting, nel dominio del tempo, AMARES/JMRUI (18) e (19) come descritto in precedenza nel capitolo 2. La concentrazione di PCr e Pi è stata calcolata assumendo una concentrazione normale di ATP di 8 mM (33).

pH e $[\text{Mg}^{2+}]$ del citosol sono stati calcolati dal chemical shift rispettivamente del Pi e del β -ATP. Per il calcolo sono state utilizzate le equazioni precedentemente descritte nel capitolo 2 ([2] e [3]), che tengono in considerazione la mutua influenza tra pH e la $[\text{Mg}^{2+}]$.

3.3 Risultati

La figura 3.2 mostra spettri ^{31}P MRS acquisiti alla fine dell'esercizio nel muscolo gastrocnemio di pazienti McArdle e PFK confrontati con quello di un soggetto sano di controllo con una deplezione di PCr simile. Entrambi gli spettri dei PFK mostrano un marcato incremento del picco dei PME.

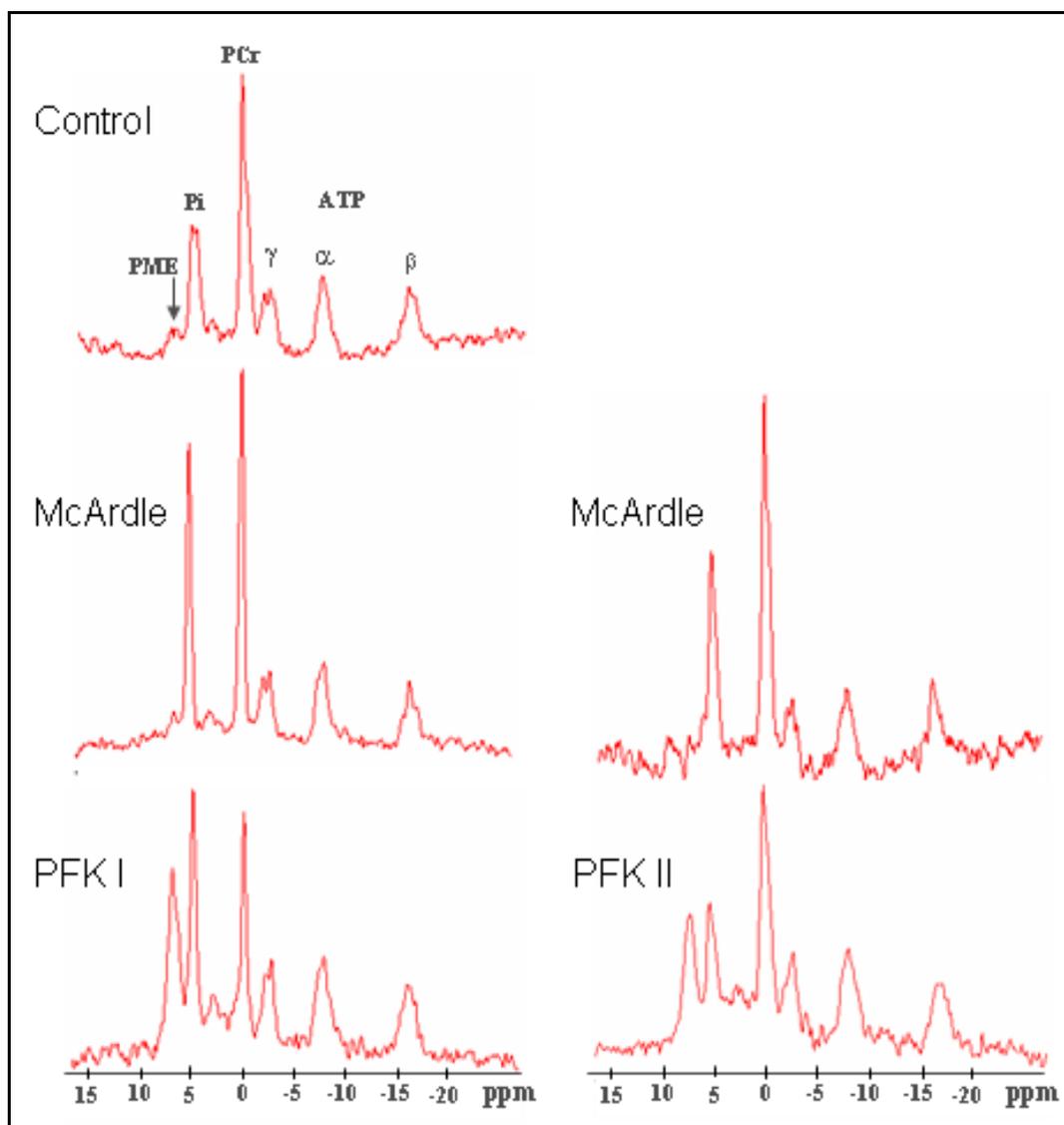


Figura 3.2 - Spettri ottenuti con la ^{31}P MRS del muscolo gastrocnemio a fine esercizio acquisiti su pazienti ed un soggetto di controllo con una deplezione di PCr di circa il 50%. I pazienti PFK mostrano un marcato accumulo di PME.

La tabella 1 riporta i valori di riposo e di fine esercizio della $[Mg^{2+}]$ e del pH confrontato con il valore medio ottenuto in un gruppo di 10 soggetti utilizzati come controlli. I controlli sono stati selezionati in modo da avere una deplezione di PCr, alla fine dell'esercizio, simile a quella dei 4 pazienti.

A riposo i pazienti non mostrano differenza rispetto ai controlli nel valore del pH citosolico intracellulare. Il valore della $[Mg^{2+}]$ del paziente PFK II è di 0.45 mM, maggiore del valore di controllo ($0.32 \text{ mM} \pm 0.4 \text{ mM}$), mentre il paziente PFK I ed entrambi i McArdle hanno valori nella norma. Tutti e due i McArdle e il paziente PFK I hanno raggiunto una simile deplezione di PCr di circa il 50%, mentre il paziente PFK II si è fermato ad un livello minore di deplezione di PCr.

Tabella 3.1- Valori di $[Mg^{2+}]$ e pH a riposo e a fine esercizio

	Riposo		Fine esercizio			
	$[Mg^{2+}]$ (mM)	pH	%PCr	$[Mg^{2+}]$ (mM)	pH	$\Delta[Mg^{2+}]$ (mM)
McArdle I	0.34	6.98	53.1%	0.39	7.06*	+ 0.05
McArdle II	0.36	6.95	53.8%	0.32	7.07*	- 0.04*
PFK I	0.38	6.95	54.1%	0.23*	7.01*	- 0.15*
PFK II	0.45*	6.95	35.3%	0.23*	7.01*	- 0.22*
Controlli Media (n = 10)	0.32	6.96	47.7%	0.42	6.8	+0.11
D.S	0.04	0.02	13.8%	0.06	0.09	0.07
Int. controllo [min:max]	0.27:0.40	6.94:7	22:73	0.35:0.54	6.90:6.67	+0.03:+0.24]

Valori della $[Mg^{2+}]$ e del pH valutati con la ^{31}P MRS nel muscolo del polpaccio in pazienti confrontati con i valori di controllo ottenuti in un gruppo di controllo di 10 soggetti sani con una deplezione di PCr del 50% valutata a fine esercizio

$\Delta[Mg^{2+}]$: differenza della $[Mg^{2+}]$ tra fine esercizio e riposo;

%PCr: percentuale di PCr consumata

* denota valori fuori dal range di normalità: media dei controlli ± 2 DS.

Tutti i pazienti mostrano una completa assenza di acidificazione alla fine dell'esercizio. La $[Mg^{2+}]$ citosolico alla fine dell'esercizio è più bassa in entrambi i pazienti PFK rispetto ai valori di controllo. La variazione della $[Mg^{2+}]$ che si è misurata tra il riposo e la fine dell'esercizio ($\Delta[Mg^{2+}]$) è negativa in entrambi i pazienti PFK e anche nel paziente McArdle II.

La figura 3.3 riporta gli andamenti della $[Mg^{2+}]$ e del pH ottenuti nei pazienti durante l'esercizio (riquadro A e B) e durante il recupero post esercizio (riquadro C e D) confrontati con il tipico andamento ottenuto dal volontario sano con paragonabile deplezione di PCr.

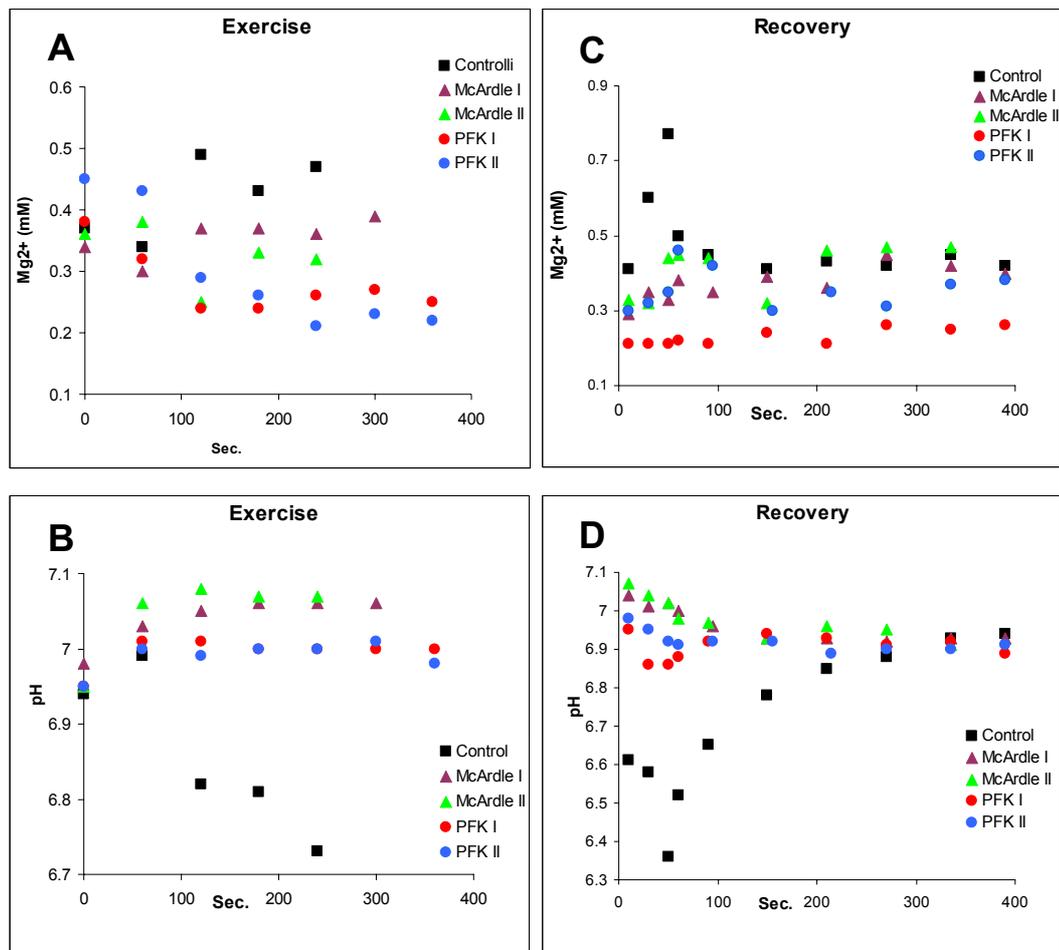


Figura 3.3 - Andamento della $[Mg^{2+}]$ e del pH durante l'esercizio e durante il recupero nei pazienti McArdle e PFK confrontato con l'andamento tipico di un volontario sano con deplezione paragonabile di PCr. (A) andamento della $[Mg^{2+}]$ durante l'esercizio; (C) andamento della $[Mg^{2+}]$ durante il recupero; (B) andamento del pH durante l'esercizio; (D) Andamento del pH durante il recupero.

Durante il recupero i pazienti McArdle I e II non mostrano una variazione significativa della $[Mg^{2+}]$ e di pH come invece avviene nel controllo dove la $[Mg^{2+}]$ continua ad aumentare fino al raggiungimento del pH minimo per poi ritornare al valore di riposo. Entrambi i pazienti PFK mostrano invece una diminuzione della $[Mg^{2+}]$ durante l'esercizio. Durante

il recupero l'andamento della $[Mg^{2+}]$ è diverso nei due pazienti PFK, con il PFK I che mostra un persistente valore basso della $[Mg^{2+}]$.

La figura 3.4 riporta l'andamento dei PME nei due pazienti PFK durante l'esercizio e il recupero. Il Paziente PFK I mostra una più lenta velocità sia di accumulo che di recupero dei PME rispetto al paziente PFK II

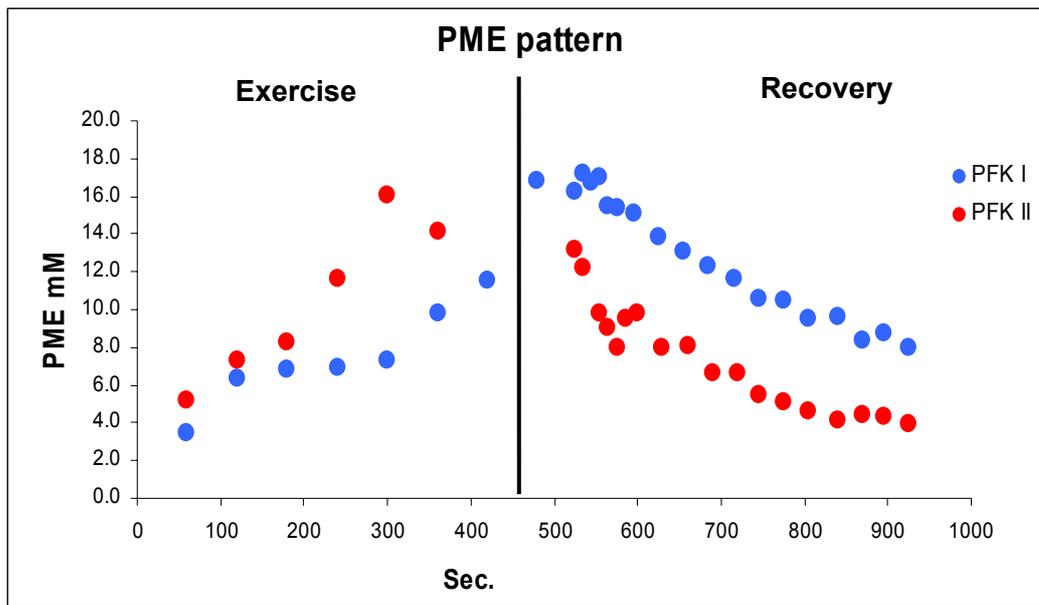


Figura 3.4 - Andamento dei PME nei pazienti PFK durante l'esercizio e il recupero. Il PFK I mostra un lento accumulo di PME durante l'esercizio sia un recupero più lento di PME dopo l'esercizio rispetto al PFK II

3.4 Discussione

I risultati mostrano che esiste una relazione causale tra le variazioni della $[Mg^{2+}]$, nel muscolo scheletrico, e il pH intracellulare e che tali variazioni non sono il risultato di meccanismi collegati alla contrazione muscolare. Inoltre abbiamo trovato che entrambi i pazienti PFK mostrano una riduzione di $[Mg^{2+}]$ durante l'esercizio concomitante con l'incremento dei PME. Inoltre il paziente PFK I mostra che il decremento della $[Mg^{2+}]$ persiste anche per tutta la durata del recupero ed un più lento ritorno dei PME al valore di riposo.

Il picco del PME, nello spettro di ^{31}P MRS, rappresenta una miscela non risolta di monosaccaridi fosforilati metaboliti intermedi della glicogenolisi e glicolisi. Pertanto l'incremento di PME riscontrato nei pazienti con malattia di Tarui rappresenta l'accumulo dei monosaccaridi fosforilati, ulteriore sito di legame per il Mg^{2+} . Quindi abbiamo interpretato che la diminuzione della $[Mg^{2+}]$ e il simultaneo incremento dei PME come dovuto al legame tra $[Mg^{2+}]$ e i fosfomonoesteri che sottraggono una parte della frazione libera di magnesio.

Uno precedente studio (31) riporta che un incremento di PME, nei pazienti affetti da PFK, durante l'esercizio è accompagnato da un diminuito accumulo di Pi. Questo risultato è stato interpretato come conseguenza dell'incorporazione del Pi libero negli intermedi fosforilati della glicogenolisi. Questa ipotesi non si è verificata nei pazienti da noi esaminati perché la somma dell'area dei picchi di PCr e del Pi è costante per tutta la durata dell'intero esercizio, mentre la somma di tutti i segnali fosforilati cresce proporzionalmente all'incremento dei PME.

Sindrome da affaticamento cronico

Capitolo 4

In collaborazione con il prof. Kevin McCully dell'università di *Athens State University (Georgia USA)*, abbiamo analizzato spettri di ^{31}P MRS di pazienti affetti da Sindrome da affaticamento cronico (CFS). Il prof. McCully ha studiato per lungo tempo il metabolismo ossidativo di questi pazienti, per indagare le eventuali cause metaboliche della patologia. Abbiamo condotto uno studio retrospettivo analizzando i dati ^{31}P MRS per valutare su questi pazienti la $[\text{Mg}^{2+}]$ a riposo.

4.1 Sindrome da affaticamento cronico

La Sindrome da affaticamento cronico (CFS) è un disturbo dalle origini ancora oscure, difficile da diagnosticare, essendo la diagnosi fatta per esclusione. La CFS è caratterizzata da una stanchezza prolungata e debilitante, e da multipli sintomi non specifici, quali cefalea, mal di gola ricorrente, dolori muscolari e alle ossa, disturbi del sonno, perdita di memoria, difficoltà di concentrazione e da un malessere generale. La presenza di alterazioni del metabolismo energetico nei pazienti affetti da CFS rappresenta un argomento molto controverso.

In un precedente lavoro è stato valutato il flusso sanguigno e il metabolismo muscolare di pazienti affetti da CFS (35). In questo studio così come in altri (36), 37) e 38)), non è emerso nessun difetto metabolico muscolare nei pazienti CFS perciò per valutare la $[Mg^{2+}]$ in soggetti affetti da CFS, abbiamo valutato gli spettri acquisiti con la ^{31}P MRS nel muscolo scheletrico a riposo.

4.2 Metodi

Essendo uno studio retrospettivo su dati acquisiti in un altro centro, il protocollo di acquisizione applicato non è lo stesso descritto nel capitolo 2. In fase di acquisizione la bobina è stata posta sul muscolo gastrocnemio destro e poi ripetuto su quello sinistro utilizzando un magnete a 2.1 T.

Poiché gli spettri non sono stati acquisiti con il nostro sistema i programmi di elaborazione solitamente utilizzati non erano in grado di elaborare gli spettri. Abbiamo quindi creato un software che permette di modificare il file contenente i dati in modo da renderlo leggibile dai nostri programmi. La fase di elaborazione degli spettri invece si attiene al protocollo precedentemente descritto e la valutazione del magnesio e del pH è stata effettuata utilizzando le equazioni [2] e [3] descritte nel capitolo 2.

4.3 Risultati e discussione

Sono stati analizzati gli spettri relativi a 20 pazienti affetti da CFS. I valori ottenuti dall'elaborazione degli spettri del muscolo gastrocnemio destro e sinistro di ogni paziente sono stati mediati per ottenere un valore unico di $[Mg^{2+}]$. I pazienti CFS hanno un valore maggiore di $[Mg^{2+}]$ rispetto ai valori di controllo. (Tabella 1, $P < 0.01$). Mentre non risulta nessuna differenza nei valori a riposo di $[PCr]$ e pH.

Tabella 4.1 Valori dei metaboliti a riposo dei controlli e dei CFS. Valori medi e DS.

		PCr (mM)	pH	Mg^{2+} (mM)
Controlli	Media	30.88	6.94	0.36
	N = 11	DS	3.19	0.02
CFS	Media	30.72	6.93	0.47
	N = 20	DS	3.18	0.03

Questo è vero per l'intera popolazione, sebbene ci siano delle sovrapposizioni fra le due popolazioni. Questo dato non è associato ad un'alterazione del metabolismo ossidativo come descritto in altri studi. Non è chiara quale implicazione può avere un incremento di $[Mg^{2+}]$ rispetto ai valori di controllo, poiché solitamente in altre patologie le alterazioni riguardano una diminuzione della $[Mg^{2+}]$ (8).

Precedenti studi hanno determinato la relazione che lega la $[Mg^{2+}]$ al pH intracellulare, ma in questi pazienti non c'è differenza di valore di pH rispetto ai valori normativi.

Poiché la $[Mg^{2+}]$ è strettamente correlata alla concentrazione di tutte le specie fosforilate, una possibile causa dell'aumento della $[Mg^{2+}]$ potrebbe essere dovuta ad una diminuzione di $[ATP]$, che tuttavia non è stata riscontrata nei pazienti esaminati.

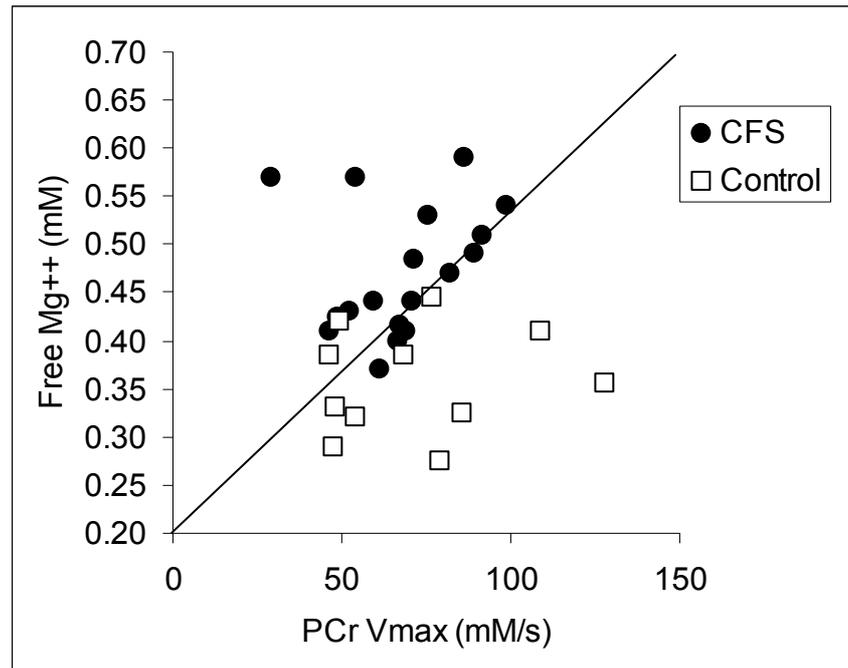


Figura 4.1 - Confronto del magnesio libero e del metabolismo ossidativo misurato con il recupero della PCr nei muscoli dei polpacci di soggetti affetti da CFS e in soggetti di controllo. Mentre il recupero della PCr non è diverso tra i due gruppi, i pazienti CFS hanno un significativo aumento del valore della $[Mg^{2+}]$ magnesio libero.

Come mostrato in un precedente studio effettuato dal Prof. McKully i pazienti CFS non mostrano marcate alterazioni del metabolismo ossidativo nel muscolo scheletrico (35); la figura 4.1 mostra un'analisi discriminante tra $[Mg^{2+}]$ e un indice del metabolismo ossidativo (PCr Vmax) mettendo in evidenza come la $[Mg^{2+}]$ sia la variabile che maggiormente discrimina tra le due popolazioni.

Insufficienza intestinale cronica benigna

Capitolo
5

In collaborazione con il “Centro Regionale di riferimento per l’ Insufficienza Intestinale Cronica Benigna” di Bologna abbiamo intrapreso uno studio al fine di valutare la distribuzione di magnesio in diversi tessuti, quali la frazione libera nel muscolo scheletrico, il totale nel siero e il totale e il libero intra-linfocitario, in pazienti affetti da insufficienza intestinale cronica benigna sottoposti a nutrizione parenterale domiciliare.

Inoltre abbiamo valutato la funzionalità mitocondriale per meglio comprendere se e in che grado lo stato nutrizionale influenza la bioenergetica del muscolo scheletrico.

5.1 Insufficienza intestinale cronica benigna

La ^{31}P MRS ha mostrato di essere un importante strumento per misurare in modo non invasivo la $[\text{Mg}^{2+}]$ nel muscolo scheletrico (17). In questo studio abbiamo misurato la distribuzione di Mg, nei vari tessuti, in pazienti soggetti a Nutrizione Parenterale Domiciliare (NPD) affetti da Insufficienza Intestinale Cronica Benigna (IICB), condizione spesso associata ad una deficit di Mg sierico(41).

La IICB è una condizione patologica caratterizzata dalla riduzione della massa intestinale funzionante sotto il minimo necessario per consentire una digestione ed un assorbimento di nutrienti adeguati al mantenimento del normale stato di nutrizione. Si caratterizza prevalentemente per la presenza di malassorbimento e malnutrizione (es. sindrome da intestino corto). Nelle forme più severe è necessaria la nutrizione parenterale domiciliare (intestino artificiale) o il trapianto di intestino. Le cause che portano alla IICB possono essere: sindrome da intestino corto, alterazioni croniche della motilità intestinale, alterazioni diffuse e non reversibili della mucosa intestinale e fistole intestinali. La NPD ha la funzione di sostituire parzialmente o totalmente le funzioni intestinali perse. Nei pazienti in NPD di lunga durata, possono persistere deficit subclinici di nutrienti e si possono sviluppare complicazioni metaboliche, in parte dovute alla IICB e in parte alla NPD stessa. La persistenza di deficit di magnesio e potassio (42) e 43) e la presenza di alterazioni del metabolismo osseo sono tra le complicazioni più diffuse (44) e 45).

Nei pazienti con IICB, il deficit di Mg può essere causato, oltre che da ridotto apporto alimentare e da malassorbimento, anche da aumento delle perdite attraverso la via renale, dovuto alla presenza di iperaldosteronismo secondario a disidratazione, spesso presente nella IICB (46) e 47).

Nei pazienti IICB è stata valutata la concentrazione di Mg^{2+} intracellulare nel muscolo scheletrico, il magnesio totale nel siero, il

magnesio totale e libero intra-linfocitario, rispettivamente con la ^{31}P MRS, misure colorimetriche, assorbimento atomico e misure fluorimetriche.

Poiché il magnesio gioca anche un ruolo importante nella regolazione della secrezione e delle funzionalità dell'ormone paratiroideo (PTH) (47), abbiamo determinato la relazione tra la distribuzione nei vari distretti di magnesio con la concentrazione di PTH sierico.

Inoltre in questi pazienti è stata valutata la funzionalità mitocondriale, utilizzando i dati rilevati durante l'esame di ^{31}P -MRS, per comprendere se e in che grado lo stato nutrizionale influenza la bioenergetica del muscolo scheletrico.

5.2 Metodi

Abbiamo studiato 22 pazienti affetti da IICB che ricevono NPD. Ogni paziente è stato sottoposto ad un esame di ^{31}P MRS e 6 ore dopo aver terminato la NPD notturna è stato prelevato un campione di sangue.

L'esame di ^{31}P MRS è stato eseguito con un scanner a 1.5T General Electric seguendo il protocollo di acquisizione descritto nel capitolo 2 alle diverse condizioni metaboliche, ossia riposo, esercizio e recupero. Gli spettri sono stati acquisiti esaminando il muscolo gastrocnemio destro di ogni paziente. La valutazione del magnesio è stata effettuata utilizzando le equazioni [2] e [3] descritte nel capitolo 2 e implementate nel software MagicMC.

La spettroscopia a fluorescenza è stata eseguita con un Quanta-Master C60/2000 e la concentrazione di magnesio intra-linfocitario è stata valutata utilizzando Mag-Fura-2. Il magnesio totale sierico, intra-linfocitario e la concentrazione di PTH nel siero sono stati valutati tramite assorbimento atomico e misure fluorimetriche.

5.3 Risultati e discussione

In figura 5.1 sono rappresentate le distribuzioni dei valori a riposo di magnesio nei diversi tessuti indagati. La $[Mg^{2+}]$ è normale sia nel muscolo scheletrico che nei linfociti, mentre il contenuto del magnesio totale nel siero e nei linfociti tende ai valori minimi del range di normalità con alcuni valori che sono al di sotto del limite inferiore.

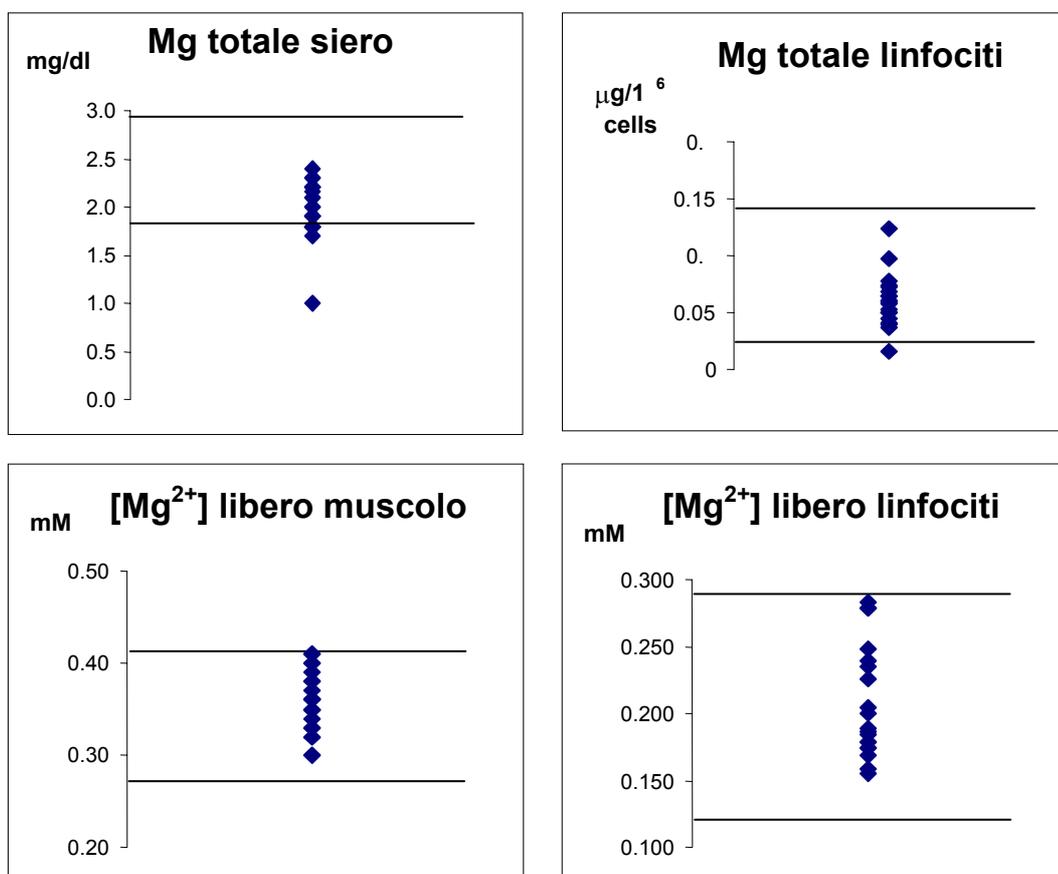


Figura 5.1 – Grafici del valore di $[Mg^{2+}]$ valutato nei vari distretti e rispettive bande di normalità

La $[Mg^{2+}]$ nel muscolo scheletrico mostra inoltre una correlazione positiva, statisticamente significativa, con i valori di PTH sierico ($R = 0.51$, $p < 0.02$) (Figura 5.2). D'altro canto invece si ha un correlazione negativa ($R = 0.66$, $p < 0.001$) tra il magnesio totale sierico e la concentrazione di

PTH (Figura 5.3), mentre il magnesio totale e libero nei linfociti non mostra alcuna correlazione significativa.

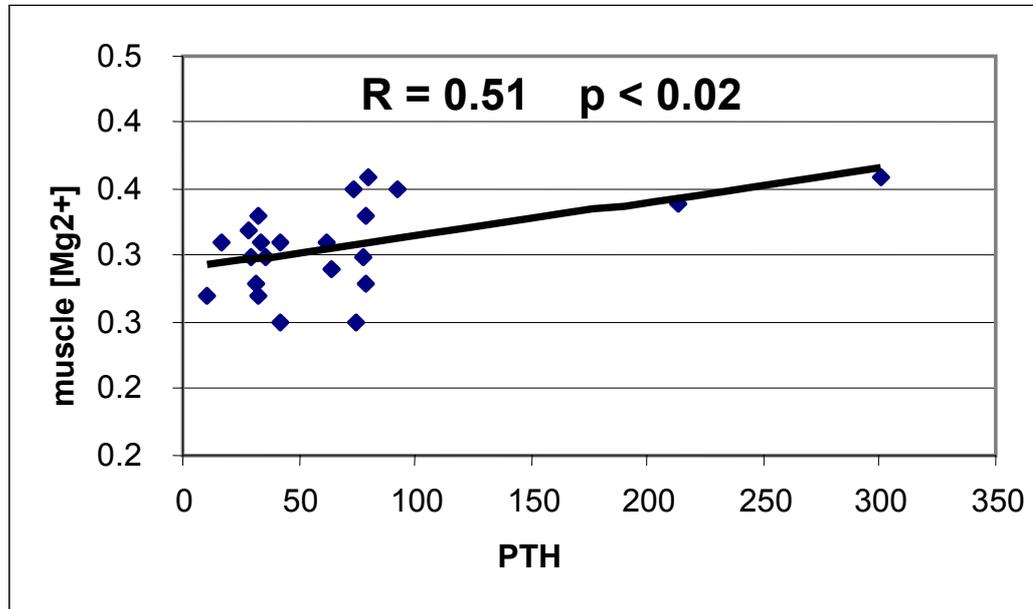


Figura 5.2 – Correlazione positiva tra PTH sierico e [Mg²⁺] valutata nel muscolo scheletrico tramite ³¹P MRS

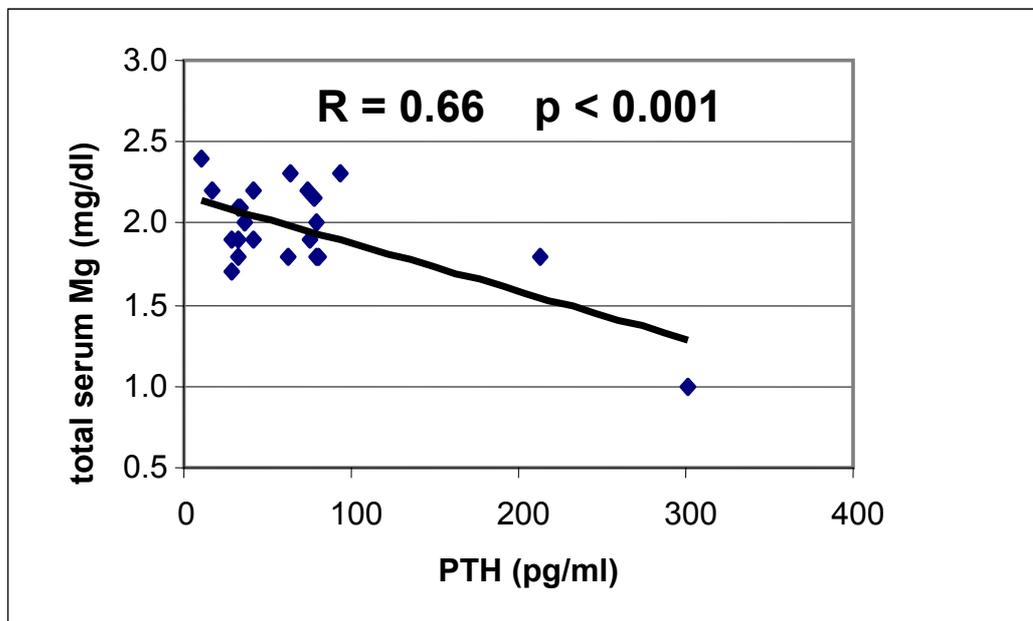


Figura 5.3 - Correlazione negativa tra PTH e Mg totale valutati nel siero

Poiché i linfociti come il muscolo scheletrico posseggono i ricettori per l'ormone PTH, interpretiamo la mancanza di correlazione tra PTH

serico e $[Mg^{2+}]$ nei linfociti come possibile conseguenza della minore precisione analitica della misura evidenziata anche dall'elevata deviazione standard della $[Mg^{2+}]$ intra-linfocitaria.

L'opposta correlazione con il PTH sierico mostrata nel muscolo scheletrico dalla $[Mg^{2+}]$ e dal magnesio totale misurato nel sangue è una nuova e interessante scoperta che rafforza l'ipotesi che il magnesio totale e la frazione libera intracellulare appartengono a pool separati sottoposti a differenti meccanismi di regolazione. Questo risultato mette anche in evidenza che la ^{31}P MRS può essere considerata come una delle tecniche più accurate per la valutazione della $[Mg^{2+}]$ intracellulare.

La funzionalità mitocondriale di questi pazienti riportata come TC interpolante in funzione del pH minimo, mostra un deficit in 13 dei 22 pazienti (figura 5.4). Esaminando il gruppo dei pazienti con più lento valore di recupero di PCr mostrano anche un più alto valore di $[Pi]$ a riposo e una deplezione di PCr più veloce durante l'esercizio. Il gruppo di pazienti con valore più alto di TC non mostra differenze statisticamente significative con la frequenza settimanale di infusioni NPD, con la durata e con il contenuto di energia/giorno, confrontata con gli altri 9 pazienti.

Questi risultati mostrano che i pazienti che ricevono una NPD possono presentare un deficit secondario della funzionalità mitocondriale del muscolo scheletrico, che non correla con la frequenza di infusione di NPD, durata e contenuto energetico. Tuttavia c'è una tendenza che mostra che tra i pazienti con lento recupero di PCr c'è un maggiore contenuto di lipidi nell'infuso di nutrizione parenterale. Quindi, abbiamo ipotizzato che una delle possibili cause del deficit mitocondriale possa essere lo stress perossidativo dovuto ad un incremento della concentrazione di radicali liberi (48). Tuttavia non si può scartare la possibilità di una carenza di alcuni nutrienti essenziali che giocano un ruolo chiave nel metabolismo mitocondriale. Ulteriori studi sono ancora in corso per confermare queste ipotesi

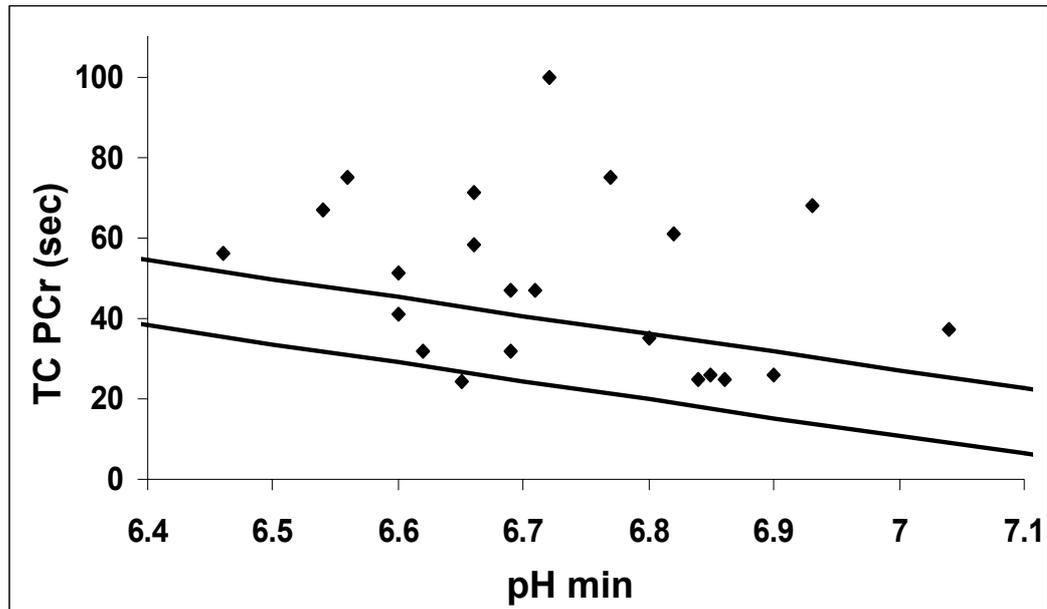


Figura 5.4 – Cinetica del recupero della PCr dei pazienti riportata come TC in funzione del pH min. Le linee rappresentano l'intervallo di confidenza del 99% calcolato su 50 soggetti sani utilizzati come controlli

Conclusioni

In questa tesi è stato implementato un sistema per la valutazione della $[Mg^{2+}]$ *in vivo* con la ^{31}P MRS sull'uomo in diverse condizioni metaboliche nel muscolo gastrocnemio. Nella prima fase è stato messo a punto un protocollo per l'elaborazione degli spettri per rendere indipendente la fase di analisi, e ci ha permesso di valutare oltre alla $[Mg^{2+}]$ tutti i parametri che è possibile misurare con la ^{31}P MRS. Il nostro protocollo è stato inizialmente utilizzato su 50 soggetti sani utilizzati per ottenere valori normativi. Il nostro protocollo di elaborazione dopo essere stato validato sui controlli è stato implementato nella routine clinica diagnostica e lo abbiamo applicato in diverse patologie per la valutazione della $[Mg^{2+}]$. Questo ci ha permesso anche di validare la ^{31}P MRS come strumento d'elezione per la determinazione non invasiva della $[Mg^{2+}]$ nell'uomo. Infine, le applicazioni *in vivo* ci hanno consentito di chiarire alcuni meccanismi dell'omeostasi del Mg^{2+} intracellulare.

Bibliografia

- 1) Wallimann T., M. Wyss, D. Brdiczka, K. Nicolay. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.* 281: 21-40, 1992
- 2) Veech R.L., J.W.R. Lawson, N.W. Cornell, H.A. Krebs. Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem* 254: 6538-6547, 1979.
- 3) Taylor D.J., Styles P., P.M. Matthews, D.A. Arnold, D.G. Gadian, P.J. Bore, G.K. Radda. Energetics in human muscle: exercise-induced ATP depletion. *Magn Reson Med* 3: 44-54, 1986.
- 4) W.R. Lawson and R.L. Veech, Effects of pH and free Mg^{2+} on the K_{eq} of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions. *J Biol Chem* 254 (1979), pp. 6528–6537.
- 5) E.W. Stephenson and R.J. Podolsky, Regulations by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers. *J Gen Physiol* 69 (1977), pp. 1–16
- 6) T. Masuda, G.P. Dobson and R.L. Veech, The Gibbs-Donnan near-equilibrium System of Heart. *J Biol Chem* 265 (1990), pp. 20321–20334.
- 7) N.M. Ramadan, H. Halvorson, A.M.Q. Vande-Linde, S.R. Levine, J.A. Helpern and K.M.A. Welch, Low brain magnesium in migraine. *Headache* 29 (1989), pp. 590–593
- 8) B.T. Altura, A. Gebrewolt, H. Ising and T. Gunter, Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium-deficient diets and microcirculatory changes in situ. *Science* 223 (1984), pp. 1315–1317.

- 9) J.S. Taylor, D.B. Vigneron, J. Murphy-Boesh, S.J. Nelson, H.B. Kessler, L. Coia, W. Curran and T.R. Brown, Free magnesium levels in normal human brain and brain tumors: ^{31}P chemical-shift imaging measurements at 1.5T. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991), pp. 6810–6814.
- 10) M. Yasui, T. Kihlra, K. Adachi and Y. Suzuki, Magnesium and calcium contents in CNS tissues of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur Neurol* 32 (1992), pp. 95–98.
- 11) L.M. Resnick, B.T. Altura, R.K. Gupta, J.H. Laragh, M.H. Alderman and B.M. Altura, Intracellular and extracellular magnesium depletion in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36 (1993), pp. 767–770.
- 12) Z. Stelmiasiak, J. Solski and B. Jakubowska, Magnesium concentration in plasma and erythrocytes in MS. *Acta Neurol Scand* 92 (1995), pp. 109–111.
- 13) R. Lodi, P. Montagna, S. Soriani, S. Iotti, C. Arnaldi, P. Cortelli, G. Pierangeli, A. Patuelli, P. Zaniol and B. Barbiroli, Deficit of brain and skeletal muscle bioenergetics and low magnesium in juvenile migraine: an in vivo ^{31}P magnetic resonance spectroscopy interictal study. *Pediatric Res* 42 (1997), pp. 866–871
- 14) R.K. Gupta, J.L. Benovic and Z.B. Rose, The determination of the free magnesium level in the human red blood cell by ^{31}P NMR. *J Biol Chem* 252 (1978), pp. 6172–6176
- 15) H.R. Halvorson, A.M.Q. Vande Linde, J.A. Helpem and K.M.A. Welch, Assessment of magnesium concentration by ^{31}P NMR in vivo. *NMR Biomed* 5 (1992), pp. 53–58
- 16) O.A.C. Petroff, J.W. Prichard, K.L. Behar, J.R. Alger, J.A. den Hollander and R.G. Shulman, Cerebral intracellular pH by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 35 (1985), pp. 781–788.

- 17) S. Iotti, C. Frassinetti, L. Alderighi, A. Sabatini, A. Vacca and B. Barbiroli, In vivo ^{31}P -MRS assessment of cytosolic $[\text{Mg}^{2+}]$ in the human skeletal muscle in different metabolic conditions. *Mag. Res. Imag.* 18 (2000), pp. 607-614.
- 18) Vanhamme L, Van den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge . *J. Magn Reson* 1997;129:35-43
- 19) Magnetic Resonance User Interface Home Page
[<http://carbon.uab.es/mrui> JMRUI
- 20) Madden A., M.O. Leach, J.C. Sharp, D.J. Collins, D. Easton. A quantitative analysis of the accuracy of in vivo pH measurements with ^{31}P -NMR spectroscopy: assessment of pH measurement methodology. *NMR Biomed* 4: 1-11, 1991
- 21) D.L. Arnold, P.M. Matthews and G.K. Radda, Metabolic recovery after exercise and the assessment of mitochondrial function in human skeletal muscle in vivo by means of ^{31}P -NMR. *Magn Reson Med* 1 (1984), pp. 307–315
- 22) K. Clarke, Y. Kashiwaya, T. King, D. Gates, C.A. Keon, H.R. Cross, G.K. Radda and R.L. Veech, The β/α peak height ratio of ATP. A measure of free $[\text{Mg}^{2+}]$ using ^{31}P NMR. *J Biol Chem* **271** (1996), pp. 21142–21150
- 23) J.W.R. Lawson and R.L. Veech, Effects of pH and free Mg^{2+} on the K_{eq} of the creatine kinase reaction and other phosphate hydrolyses and phosphate transfer reactions. *J Biol Chem* 254 (1979), pp. 6528–6537
- 24) K. Roth and W. Weiner, Determination of cytosolic ADP and AMP concentration and the free energy of ATP hydrolysis in human muscle and brain tissues with ^{31}P NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* **22** (1991), pp. 505–511

- 25) Iotti S, Frassinetti C, Sabatini A, Vacca A, Barbiroli B. Quantitative mathematical expressions for accurate in vivo assessment of cytosolic [ADP] and DeltaG of ATP hydrolysis in the human brain and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1708(2):164-77.
- 26) Chance B, Eleff S, Leigh JS Jr, Sokolow D, Sapega A. Mitochondrial regulation of phosphocreatine/inorganic phosphate ratios in exercising human muscle: a gated ³¹P NMR study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(11):6714-8.
- 27) Bendahan D, Confort-Gouny S, Kozak-Reiss G, Cozzone PJ. Heterogeneity of metabolic response to muscular exercise in humans. New criteria of invariance defined by in vivo phosphorus-31 NMR spectroscopy. *FEBS Lett*. 1990 15;272(1-2):155-8.
- 28) Iotti S, Lodi R, Frassinetti C, Zaniol P, Barbiroli B. In vivo assessment of mitochondrial functionality in human gastrocnemius muscle by ³¹P MRS. The role of pH in the evaluation of phosphocreatine and inorganic phosphate recoveries from exercise. *NMR Biomed*. 1993;6(4):248-53.
- 29) McConchie SM, Coakley J, Edwards RHT, Beynon RJ: Molecular Heterogeneity in McArdle's disease. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1096:26-32.
- 30) Tsujino S, Servidei S, Tonin P, Shanske S, Azan G, DiMauro S: Identification of three novel mutation in non-Ashkenazi Italian patients with muscle phosphofructokinase deficiency. *Am J Hum Genet* 1994, 54:812-819.
- 31) Bertocci LA, Haller RG, Lewis SF, Fleckenstein JL, Nunnally RL: Abnormal high-energy phosphate metabolism in human muscle phosphofructokinase deficiency. *J Appl Physiol* 1991, 70:1201-1207.
- 32) Sahlin K, Areskog NH, Haller RG, Henriksson KG, Jorfeldt L, Lewis SF: Impaired oxidative metabolism increases adenine nucleotide breakdown in McArdle's disease. *J Appl Physiol* 1990, 69:1231-1235.

- 33) Harris RC, Hultman E, Nordesjö LO: Glycogen, glycolytic intermediates, and high-energy phosphates determined in biopsy samples of musculus quadriceps femoris of man at rest. *Methods and variance of values. Scand J Clin Lab Invest* 1974, 33:109-120.
- 34) Iotti S, Tarducci R, Gottardi G, Barbiroli B: Cytosolic Free [Mg²⁺] in the human calf muscle in different metabolic conditions: in vivo ³¹P MRS and computer simulation. In *Proceedings of the Society of Magnetic Resonance in Medicine (seventh scientific meeting and exhibition). Volume 3. Philadelphia, Pennsylvania USA; 1999:1540.22-28, May 1999*
- 35) McCully KK, Smith S, Rajaei S, Leigh Jr JS, Natelson BH: Blood flow and muscle metabolism in chronic fatigue syndrome. *Clin Sci (Lond)* 2003, 104(6):641-647.
- 36) Barnes P, Taylor D, Kemp G, Radda G: Skeletal muscle bioenergetics in the chronic fatigue syndrome. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry* 1993, 56:679-683.
- 37) Gibson H, Carroll N, Clague J, Edwards RHT: Exercise performance and fatigability in patients with chronic fatigue syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1993, 56:993-998.
- 38) Kent-Braun J, Sharma K, Weiner M: Central basis of muscle fatigue in chronic fatigue syndrome. *Neurology* 1993, 43:125-131.
- 39) Malucelli E, Lodi R, Martinuzzi A, Tonon C, Barbiroli B, Iotti S: Free Mg²⁺ concentration in the calf muscle of glycogen phosphorylase and phosphofructokinase deficiency patients assessed in different metabolic conditions by ³¹P MRS. *Dyn Med* 2005, 4:7.
- 40) Fukuda K, Straus S, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A: Chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. *Ann Intern Med* 1994, 121:953-958.
- 41) Pironi L, Labate AM, Pertkiewicz M, Przedlacki J, Tjellesen L, Staun M, De Francesco A, Gallenca P, Guglielmi FW, Van Gossum A,

- Orlandoni P, Contaldo F, Villares JM; Espen-Home Artificial Nutrition Working Group. Prevalence of bone disease in patients on home parenteral nutrition. *Clin Nutr.* 2002; 21(4):289-96.
- 42) Pironi L, Miglioli M, Ruggeri E, Longo N, Suriani U, Maselli S, Gnudi S, Barbara L. Home parenteral nutrition for the management of chronic intestinal failure: a 34 patient-year experience. *It J Gastroenterol*, 1993; 25: 411-418
- 43) Seidner DL, Licata A. Parenteral nutrition-associated metabolic bone disease: pathophysiology, evaluation and treatment. *NCP* 2000; 15: 163-70
- 44) Pironi L Morselli Labate AM, Pertkiewicz M, Przedlaci J, Tjellesen L, Staun M, De Francesco A, Gallenca P, Guglielmi FW, Van Gossum A, Orlandoni P, Contaldo F, Moreno Villares JM. Prevalence of bone disease in patients on home parenteral nutrition. *Clin Nutr.* 2002 Aug;21:289-96.
- 45) Da Pont MC, Massarenti P, Boggio Bertinet D, De Francesco A, Trapani A, Pauletto D, Pagni R, Palmo A. Magnesium status in intestinal failure home parenteral nutrition patients. *Clin Nutr* 2002; 21(supp.1):67.
- 46) Horton R, Biglieri EG. Effect of aldosterone on the metabolism of magnesium. *J Clin Endocrinol Metab* 1962;22:1187-1192.
- 47) Fatemi S, Ryzen E, Flores J, Endres DB, Rude RK. Effect of experimental human magnesium depletion on parathyroid hormone secretion and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(5):1067-72.
- 48) Pironi L, Ruggeri E, Zolezzi C, Savarino L, Incasa E, Belluzzi A, Munarini A, Piazzzi S, Tolomelli M, Pizzoferrato A, Miglioli M. Lipid peroxidation and antioxidant status in adults receiving lipid-based home parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1998 Oct;68(4):888-93.