



IMAGING MOLECOLARE CON LA RISONANZA MAGNETICA

L'impiego di mezzi di contrasto aggiunge importanti informazioni fisio-patologiche alla superba risoluzione anatomica delle immagini MRI. I più comuni sono complessi paramagnetici di Gd(III). La chimica ha contribuito allo sviluppo di altre modalità per creare contrasto. Un recente sviluppo sfrutta l'effetto paramagnetico su segnali di molecole endogene per conoscere la permeabilità delle membrane cellulari.

Negli ultimi decenni le tecniche di imaging hanno fatto enormi progressi diventando indispensabili nella diagnostica medica. Questo processo si è via via orientato a ricercare percorsi di imaging molecolare in grado di visualizzare molecole o eventi molecolari che avvengono a livello cellulare. Si tratta di riportare in un'immagine *in vivo* eventi biochimici che sono alla base dell'insorgenza di una patologia permettendo da un lato diagnosi sempre più precoci e dall'altro di offrire efficaci strumenti per monitorare l'efficacia di un trattamento terapeutico. La chimica ha dato e sta dando un enorme contributo a questi sviluppi in quanto le diverse tecnologie di imaging spesso utilizzano mezzi di contrasto o traccianti progettati per riconoscere specifici epitopi cellulari o tissutali o per agire come substrati per evidenziare, *in vivo*, attività enzimatiche e di trasporto. L'imaging *in vivo* si basa su modalità diverse, ognuna con i suoi pro e i suoi svantaggi. Le modalità che si basano su traccianti radioattivi (PET e SPECT) hanno il vantaggio di utilizzare dosi molto basse di tracciante ma hanno lo svantaggio di non riuscire ad offrire una grande risoluzione anatomica (voxel piuttosto grandi). L'imaging ottico che utilizza molecole fluorescenti è anch'esso molto sensibile (sono sufficienti qualche centinaio di molecole fluorescenti per visualizzare una cellula) ma ha il limite della penetrazione della luce nei tessuti biologici (diffusione, scattering, autofluorescenza). Tecniche quali gli ultrasuoni, l'imaging foto-acustico, il "Metal Particle Imaging" e altre risultano essere di

interesse per specifiche applicazioni ma sono limitate quando si pensa ad un uso più generalizzato. La Risonanza Magnetica Imaging (MRI) ha caratteristiche tali da rappresentare spesso la tecnica di elezione in quanto le onde radio non hanno problemi di penetrazione nei tessuti biologici offrendo la possibilità di visualizzare organi e tessuti profondi con una risoluzione spaziale e temporale molto buona. Circa il 40% degli esami MRI realizzati nelle strutture cliniche fa uso di mezzi di contrasto (MdC) che servono a delineare meglio una lesione tumorale, a mettere in evidenza la circolazione del sangue e a caratterizzare le vie di escrezione. I MdC per MRI in uso nella pratica clinica sono complessi paramagnetici di Gd(III) (GBCA) in grado di causare

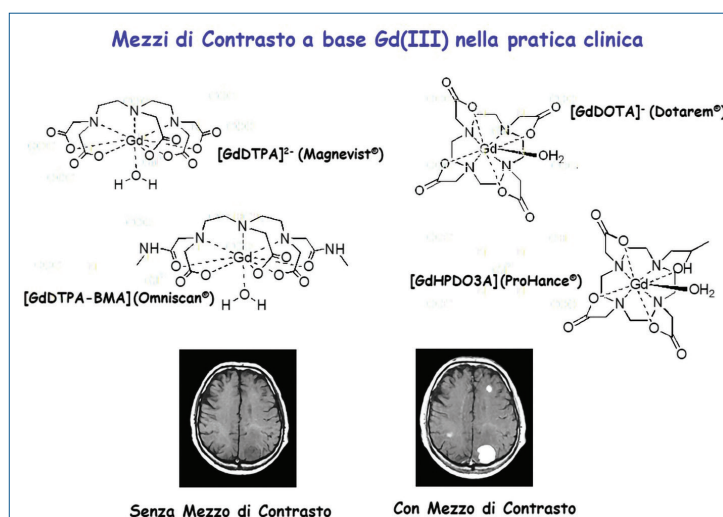


Fig. 1 - a) Strutture di complessi paramagnetici di Gd(III) usati come MdC per MRI e b) loro effetto nelle immagini MRI in presenza di lesioni tumorali



una marcata riduzione del tempo di rilassamento T1 dei protoni dell'acqua nelle regioni dove vengono a distribuirsi [1]. In estrema sintesi un'immagine MRI è la rappresentazione topologica del segnale dell'acqua per il quale i determinanti sono la sua concentrazione e i suoi tempi di rilassamento T1 e T2. Utilizzando opportune procedure di acquisizione l'effetto associato alla presenza di un MdC paramagnetico si rileva come una marcata iper-intensità di segnale nelle immagini pesate in T1 (Fig. 1). La trasformazione di un GBCA a diventare un reporter di imaging molecolare comporta l'introduzione sul legante di opportune funzionalità per il riconoscimento di specifici target molecolari [2].

Per esempio l'introduzione di sostituenti aromatici sulla superficie del DTPA hanno portato ad agenti epatotropici che vengono internalizzati all'interno degli epatociti attraverso trasportatori ad alta capacità come gli OATP (Organic Anion Transport Protein). Analogamente funzioni lipofile hanno portato i GBCA a legarsi reversibilmente all'albumina generando una classe di agenti angiografici caratterizzati da una prolungata permanenza nel comparto vascolare. Il binding ad una macromolecola comporta un marcato allungamento della reorientazione molecolare che si traduce in un aumento della velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua, quindi in un incremento delle sue proprietà come MdC per MRI.

Le specie il cui targeting è l'oggetto dell'imaging molecolare sono presenti a concentrazioni molto inferiori a quella dell'albumina per cui si è reso necessario da un lato sviluppare sistemi ad alta relaxività (questa proprietà, r_1 , indica l'aumento della velocità di rilassamento dei protoni dell'acqua nelle soluzioni in cui il GBCA è presente alla concentrazione di 1 mM) e dall'altro a progettare percorsi che portino all'accumulo di molte unità di GBCA al target di interesse. Già all'inizio dell'era dell'imaging molecolare fu evidente che per visualizzare una cellula in MRI è necessaria una gran quantità di Gd che è stato stimato dalla relazione: $n=10\exp 9/r_1$ [3]. Su questa base la ricerca si è orientata verso la progettazione di vettori in grado di "targettare" con una buona affinità epitopi presenti ad alta concentrazione la cui espressione fosse rappresentativa della patologia di interesse. Target di interesse in ambito oncologico sono per esempio

la fibrina e la fibronectina nella ECM di molti tumori solidi che vengono riconosciuti da specifiche sequenze peptidiche. In questo senso è attualmente in una fase avanzata di clinical trial un GBCA per la fibronectina, che viene pertanto a rappresentare il primo agente di imaging molecolare per MRI nella pratica clinica [4]. La ricerca ha prodotto, negli ultimi decenni, un numero molto elevato di GBCA con un eccellente grado di riconoscimento molecolare ovvero di sistemi responsivi in grado di riportare su specifiche attività enzimatiche o di altri parametri caratterizzanti la regione anatomica in cui vengono a distribuirsi [5]. Nel contesto delle applicazioni di imaging molecolare, un altro problema riguarda il fatto che la variazione del tempo di rilassamento dei protoni dell'acqua non può essere utilizzato come reporter della responsività del GBCA se non si ha una misura indipendente della sua concentrazione, problema di difficile soluzione per le osservazioni *in vivo*. Molti approcci sono stati esplorati per trovare una soluzione a questo problema, spesso ricorrendo a sistemi duali dove, oltre al GBCA, ci sia un altro reporter osservabile con un'altra tecnica di imaging (PET, SPECT o imaging ottico) il cui segnale fornisca l'informazione necessaria per determinare la concentrazione locale del sistema.

Queste problematiche hanno spinto i ricercatori a sviluppare altre classi di agenti di contrasto per MRI sia utilizzando particelle a base di ossidi di ferro (SPIO) con interessanti proprietà superparamagnetiche [6] oppure a considerare specie contenenti eteronuclei come il fluoro, il deuterio, o il carbonio-13. Nel contesto di questi sviluppi una classe di MdC che sta riscontrando un notevole interesse è quella rappresentata dagli agenti CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) [7]. Le immagini MRI-CEST si basano sulla presenza di specie chimiche con gruppi contenenti protoni mobili, in scambio lento/intermedio sui tempi della scala NMR, le cui risonanze vengono irradiate con un secondo campo di radiofrequenze in modo che il trasferimento di questi protoni "saturati" al segnale dell'acqua di "bulk" generi una diminuzione del suo segnale e quindi una ipointensità nella corrispondente immagine MRI (Fig. 2).

Ci sono ovviamente molte specie endogene che possono essere sfruttate per generare immagini

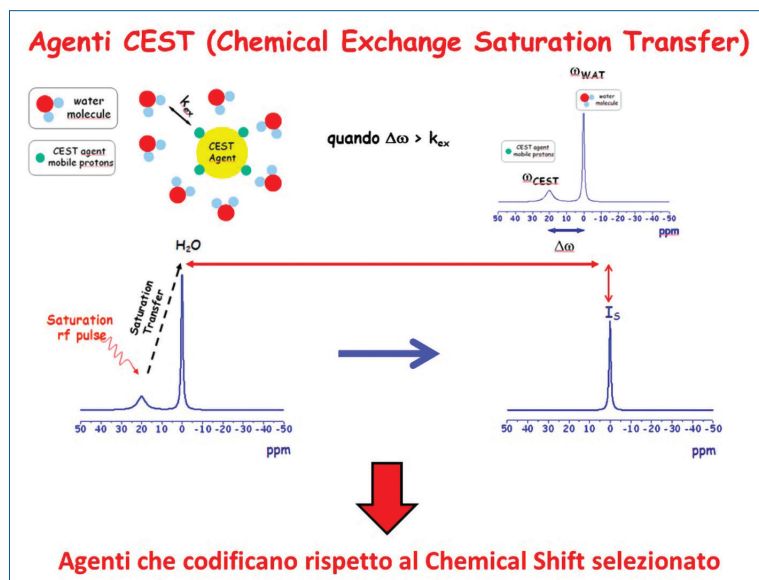


Fig. 2 - Rappresentazione schematica dell'effetto CEST generato dal trasferimento di magnetizzazione saturata al segnale dell'acqua a seguito di scambio chimico

CEST: selezionando l'opportuna rf corrispondente al chemical shift dei protoni mobili si viene ad "interrogare" il sistema specificatamente rispetto alla specie chimica di interesse. È un importante passo in avanti rispetto al contrasto generato nelle immagini T1-pesate dagli MdC paramagnetici per i quali non è possibile identificare singoli contributi, su target diversi nella stessa regione anatomica, in quanto il loro effetto viene a sommarsi diventando indistinguibili sul rilassamento dei protoni dell'acqua. La procedura CEST ha generato molti nuovi MdC che sono raggruppati in classi diverse, quali dia-CEST, para-CEST, Lipo-CEST, etc. Tra i dia-CEST un buon interesse è stato riscontrato dall'impiego di sostanze, già in uso come MdC per raggi X, che contengono protoni mobili nella loro struttura. È il caso della molecola di iopamidolo che contiene, oltre a diversi gruppi alcolici, due funzioni ammidiche che risuonano rispettivamente a 5,4 e 4,9 ppm dal segnale dell'acqua e che mostrano valori leggermente diversi di K_{ex} in funzione del pH [8]. Confrontando la loro risposta CEST è stato possibile mettere a punto un metodo raziometrico che porta alla mappatura del pH nella regione di interesse, informazione particolarmente rilevante nel caso di

lesioni tumorali dove l'aumentata glicolisi delle cellule crea un marcato abbassamento del pH nello spazio extracellulare dove viene a distribuirsi il MdC. Molta attenzione è stata anche dedicata allo sviluppo di agenti para-CEST in quanto il grande shift delle risonanze nei sistemi paramagnetici permette di stare nelle condizioni di scambio lento/intermedio sfruttando quindi alti valori di K_{ex} , che sono il principale determinante del trasferimento di saturazione che sta alla base dell'effetto CEST [9]. Le applicazioni sono innumerevoli. Per esempio si può osservare la distribuzione *in vivo* di cellule labellate con due agenti paraCEST diversi (uno a base di un complesso di Eu(III) e uno analogo a base Yb(III)).

Come accennato sopra, l'applicazione CEST si è sviluppata molto nella direzione della visualizzazione di specifici metaboliti

la cui concentrazione può essere un'informazione importante da un punto di vista diagnostico. Così si sono sviluppati il LactCEST (per il lattato), il GluCEST (per il glutammato) il GlucoCEST (per il glucosio) etc. In particolare la risonanza a 3,5 ppm dall'acqua è stata presa come riferimento per l'APT (Amide Proton Transfer) [10] che riporta su peptidi e proteine (con un buon livello di mobilità), la cui risposta CEST risulta particolarmente utile nella caratterizzazione di patologie oncologiche e

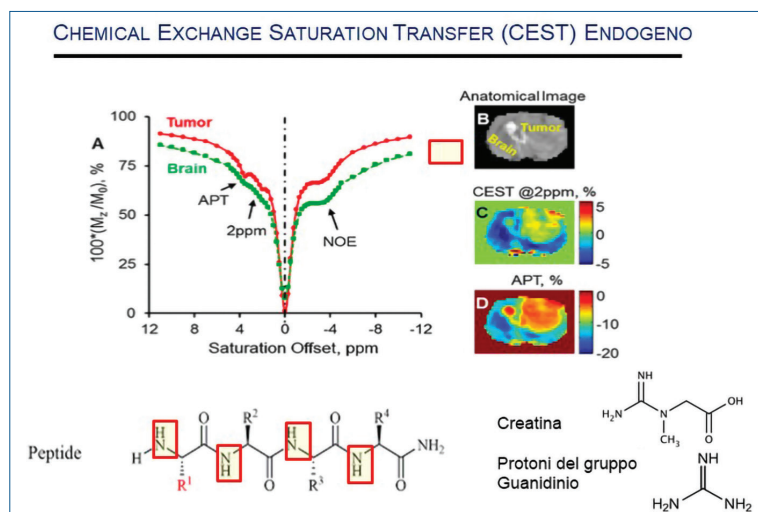


Fig. 3 - Spettro-Z (variazione dell'entità del trasferimento di magnetizzazione saturata da protoni mobili sul segnale dell'acqua) di voxel della regione cerebrale e visualizzazione nell'immagine MR

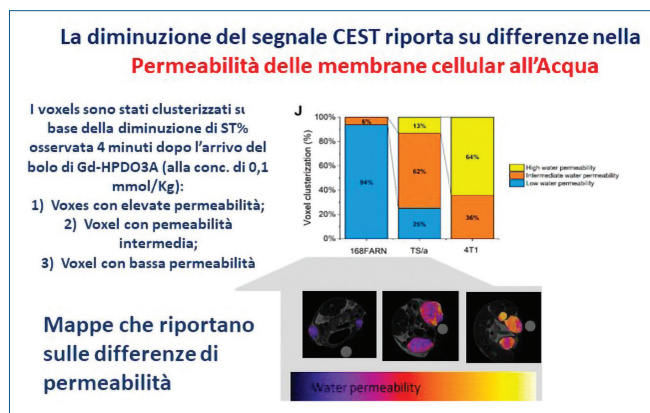


Fig. 4 - Effetto della somministrazione di un GBCA sull'immagine CEST del tumore. Vengono confrontati gli effetti su tre modelli a diversa aggressività

nel monitoraggio del loro trattamento terapeutico. Il segnale della creatina e di diversi gruppi amminici va sotto l'esperimento noto come CEST@2ppm, molto utile per ragioni pratiche perché non comporta complicazioni sperimentali associate alla presenza di NOE nella regione simmetrica del segnale dell'acqua che possono disturbare la misura del ST dalla risonanza di interesse (Fig. 3).

Un recente sviluppo ha riguardato la possibilità di estrarre nuove informazioni diagnostiche attraverso l'integrazione dell'impiego dei GBCA e l'acquisizione delle immagini CEST di molecole endogene [11]. In pratica si va sfruttare l'effetto della riduzione del T1 dell'acqua sul segnale CEST endogeno andando a confrontare l'immagine CEST pre-contrasto con quella post-contrasto. L'acqua proveniente dai vasi e dalla regione extracellulare in cui viene a trovarsi il GBCA entrando nello spazio citoplasmatico in cui si trovano le molecole CEST andrà a ridurre l'entità del "Saturation Transfer" che dipende dal T1 dei protoni dell'acqua oltre che dalla K_{ex} . Quindi questo approccio permette di conoscere l'entità dello scambio di acqua attraverso le membrane cellulari, scambio che avviene sia attraverso trasportatori dedicati come le acquaporine, sia attraverso trasportatori di nutrienti, ioni e metaboliti vari. Questi trasportatori risultano particolarmente attivati nelle cellule tumorali la cui attività metabolica può essere pertanto valutata dall'entità dello scambio dell'acqua tra il comparto extracellulare e quello intracellulare (Fig. 4).

Questo approccio è particolarmente interessante 1) perché offre la possibilità di accedere ad un nuovo

biomarcatore quale la permeabilità all'acqua delle membrane cellulari e 2) perché è immediatamente traslabile sui tomografi operanti nella clinica.

Concludendo si può senz'altro affermare che l'approccio all'imaging molecolare mediante MRI è ancora molto promettente grazie alle infinite soluzioni che l'approccio molecolare alle scienze della vita sta offrendo ai ricercatori. Questi percorsi continueranno a marcare la centralità della metodica MRI nell'affrontare problematiche mediche complesse, sempre più finalizzate alla visione della Medicina Molecolare.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.S. Cohen, S. Aime, *Substantia*, 2026, **10**, 51.
- [2] J. Wahsner, E.M. Gale *et al.*, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 957.
- [3] S. Aime, C. Cabella *et al.*, *J. Magn. Reson. Imaging*, 2002, **16**, 394.
- [4] Z.R. Lu, V. Laney, Y. Li, *Acc. Chem. Res.*, 2022, **55**, 2833.
- [5] D.V. Hingorani, A.S. Bernstein, M.D. Pagel. *Contrast Media Mol Imaging*, 2015, **10**, 245.
- [6] J.W.M. Bulte, D.L. Kraitichman, *NMR in Biomedicine*, 2004, **17**, 484.
- [7] B. Wu, G. Warnock *et al.*, *EJNMMI Phys.*, 2016, **19**, 39.
- [8] D.L. Longo, F. Michelotti *et al.*, *Invest Radiol.*, 2016, **51**, 155.
- [9] A.D. Sherry, D. Delli Castelli *et al.*, *NMR Biomed.*, 2023, **36**, e4698, DOI: <https://doi.org/10.1002/nbm.4698>.
- [10] J. Zhou, M. Zaiss *et al.*, *Magn. Reson. Med.*, 2022, **88**, 546.
- [11] E. Di Gregorio, C. Papi *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2024, **63**, e202313.

Molecular Magnetic Resonance Imaging

The use of Contrast Agents adds important physio-pathological information to the superb anatomical resolution of MR Images. The most common ones are paramagnetic Gd(III) complexes. Chemistry has provided other modalities to generate contrast. A recent development exploits the paramagnetic effect on endogenous signals to inform about the permeability of cell membranes.