

Neue Methoden zur Untersuchung metabolischer Prozesse mittels spektroskopischer und bildgebender ^{17}O -Kernspinresonanz

Robert Borowiak

Medizin Physik, Klinik für Radiologie, Universitätsklinik Freiburg, Deutschland.
robert.borowiak@uniklinik-freiburg.de

Abstract: In this work the feasibility to quantify CMRO_2 at clinical field strength of 3 T was demonstrated. In addition, cellular glycolysis in mouse brain was studied with ^{17}O -glucose and dynamic ^{17}O -MRS for the first time; the results of the glucose exchange and in vivo experiments demonstrate that the C6- ^{17}OH -label in the 6- CH_2OH group is transformed only glycolytically into the metabolic end-product H_2^{17}O , whereas C1- ^{17}OH ends up in water via direct hydrolysis as well as glycolysis.

Zusammenfassung: In dieser Arbeit wurde die prinzipielle Realisierbarkeit der CMRO_2 -Quantifizierung bei einer klinischen Feldstärke von 3 Tesla gezeigt. Darüber hinaus wurde die zelluläre Glykolyse im Maushirn erstmals mit ^{17}O -markierter Glukose und dynamischer ^{17}O -MRS untersucht; die Ergebnisse der Austausch- und *in vivo*-Experimente zeigen, dass die C6- ^{17}OH -Markierung in der CH_2OH -Gruppe ausschließlich glykolytisch in das metabolische Endprodukt H_2^{17}O umgesetzt wird, während C1- ^{17}OH sowohl über die direkte Hydrolyse als auch über die Glykolyse metabolisiert wird.

Motivation

Die Metabolisierung von Glucose stellt die wichtigste Energiequelle der Hirnzellen dar. Der Glukoseabbau kann entweder anaerob (Sauerstoffmangel) im Zuge der Glykolyse im Cytosol oder aerob (unter Einsatz von Sauerstoff) in der Atmungskette in den Mitochondrien stattfinden (Fig. 1). Die zerebralen Raten mit welcher O_2 und Glukose in den Zellen zu energiereichen Phosphatverbindungen (Adenosintriphosphat, ATP) umgesetzt werden, bezeichnet man als CMRO_2 und CMR_{Glc} (*cerebral metabolic rate of oxygen/glucose consumption*). Viele Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson sind durch lokale Veränderungen des CMRO_2 charakterisiert. Zudem weisen Tumore auf Grund des sogenannten Warburg-effekts (1) im Vergleich zu gesundem Gewebe einen deutlich veränderten Energiestoffmetabolismus auf, sodass CMRO_2 und CMR_{Glc} potenziell als Tumormarker in der klinischen Diagnostik verwendet werden kann (2).

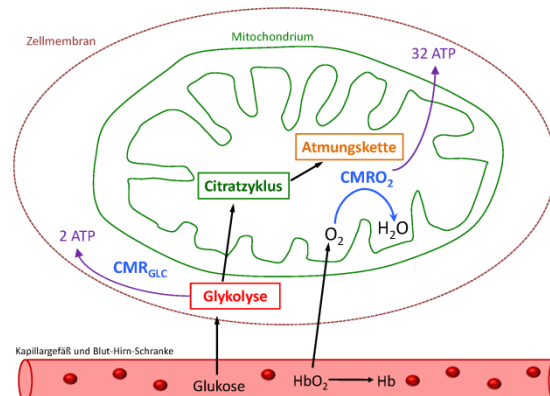


Fig. 1 Zellatmung in einer Gehirnzelle. Aus der Glukose und dem Sauerstoff werden mit der Rate CMR_{Glc} in der Glykolyse sowie durch die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette in den Mitochondrien energiereiche ATP-Moleküle gebildet.

In der medizinischen Diagnostik werden zur ortsaufgelösten Bestimmung des Sauerstoffmetabolismus ^{15}O - und ^{18}F -PET eingesetzt. Da die kurze Halbwertszeit von ^{15}O eine lokale Herstellung mit einem Zyklotron erfordert, ist ein flächendeckender Einsatz der ^{15}O -PET bis heute nicht möglich. Eine nicht radioaktive Alternative bietet die zeitaufgelöste ^{17}O -MRT, bei der ^{17}O -angereicherte Gas appliziert wird und das im Zuge der oxidativen Phosphorylierung metabolisierte H_2^{17}O direkt nachgewiesen wird. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von lediglich 0,037 %, der sehr kurzen *in vivo* T_2^* -Zeiten von ca. 2 ms (3) und dem im Vergleich zu ^1H um etwa den Faktor 7,4 kleineren gyromagnetischen Verhältnis ist die MR-Sensitivität von ^{17}O zu ^1H nur 10^{-5} . Daher stellt die ^{17}O -MRT eine Herausforderung dar, was bisher die Verwendung ultra-hoher Magnetfelder ($B_0 \geq 7 \text{ T}$) erfordert hat (4,5).

Ein Ziel der Arbeit war die CMRO_2 -Quantifizierung mit Hilfe eines vierphasigen ^{17}O -Inhalationsexperimentes (5) bei einer klinischen Feldstärke von 3 Tesla (6). Zudem wurde in dieser Arbeit erstmals die zelluläre Glykolyse im Maushirn mit Hilfe dynamischer ^{17}O -MRS und ^{17}O -markierter Glukose als eine nicht radioaktive Alternative zu ^{18}F -PET evaluiert (7).

Material und Methoden

^{17}O -MRT

Zur HF-Anregung und ^{17}O -Signaldetektion bei $B_0 = 3\text{T}$ wurde eine 1 Tesla ^1H -Kopfspule (MAGNETOM Impact Siemens AG, Erlangen, D) in eine homogene zirkular polarisierte ^{17}O -Kopfspule (ZP-Spule, $f_0 = 16,7\text{ MHz}$ bei 3 Tesla) umgebaut.

Zur CMRO_2 -Bestimmung wurden insgesamt vier dynamische 3D ^{17}O -Datensätze (Exp 1 bis Exp 4) des Kopfes eines gesunden Probanden vor und nach der Gabe von 70 % angereichertem ^{17}O -Gas (2,7/ 2,5/ 3 / 1,5 l, Nukem Isotopes Imaging GmbH, Alzenau, D) bei einer zeitlichen Auflösung von 1 min aufgenommen, wobei das Gas mit Hilfe eines speziellen Atemsystems verabreicht wurde. Die ersten Experimente Exp 1/ Exp 2 wurden mit einer umgebauten linear polarisierten ^{17}O -Prototyp-Kopfspule durchgeführt. Um den k -Raum SNR-effizient abzutasten wurde eine dichteangepasste 3D-Radialsequenz (3D-DAPR, (8)) mit folgenden Parametern implementiert: räumliche Auflösung $\Delta x = 10/ 8\text{ mm}$, $\text{TE} = 0,52\text{ ms}$, $\text{TR} = 8/ 7,58\text{ ms}$, $\text{Tp} = 0,8\text{ ms}$, $\theta = 62^\circ$, $\text{BW} = 150/ 175\text{ Hz/px}$, $\text{T}_{\text{AQ}} = 6,7/ 5,7\text{ ms}$, 1 Mittelung, 7500/ 7922 Projektionen 128 Punkte pro Projektion interpoliert auf eine $128 \times 128 \times 128$ Matrix, Gesamtmeszeit 40/ 45 min.

CMRO_2 -Quantifizierung

Die mit einem Kaiser-Bessel-Gridding-Algorithmus rekonstruierten ^{17}O -Bilder wurden auf einen 3D-MPRAGE- ^1H -Datensatzes koregistriert und segmentiert. Dann wurden mit einem CMRO_2 -Modell (4,9) durch einen Fit an den zeitlichen Verlauf der H_2^{17}O -Konzentrationen die Raten CMRO_2 in der grauen (GHS) und weißen Hirnsubstanz (WHS) quantifiziert.

^{17}O -MRS mit Glukose

Parallel zum Sauerstoffmetabolismus wurde die biochemische Fragestellung untersucht, ob mit ^{17}O -markierte Glukose das in der Glykolyse entstehende metabolische Endprodukt H_2^{17}O nachgewiesen werden kann (Fig. 2).

Hierzu wurden verschieden ^{17}O -markierte Glukoseisotopologe Glc-1, Glc-6 und Glc-1,6 (Nukem Isotopes Imaging GmbH, Alzenau, D) verwendet, die an unterschiedlichen Positionen (C1 oder/und C6-Position) mit ^{17}O markiert waren (Tab. 1)

	1-OH	6-CH ₂ -OH
Glc-1	68	-
Glc-6	-	43
Glc-1,6	68	48

Tab. 1: Markierungsgrad in % der 1-OH und 6-CH₂OH Gruppen der Glukoseisotopologen.

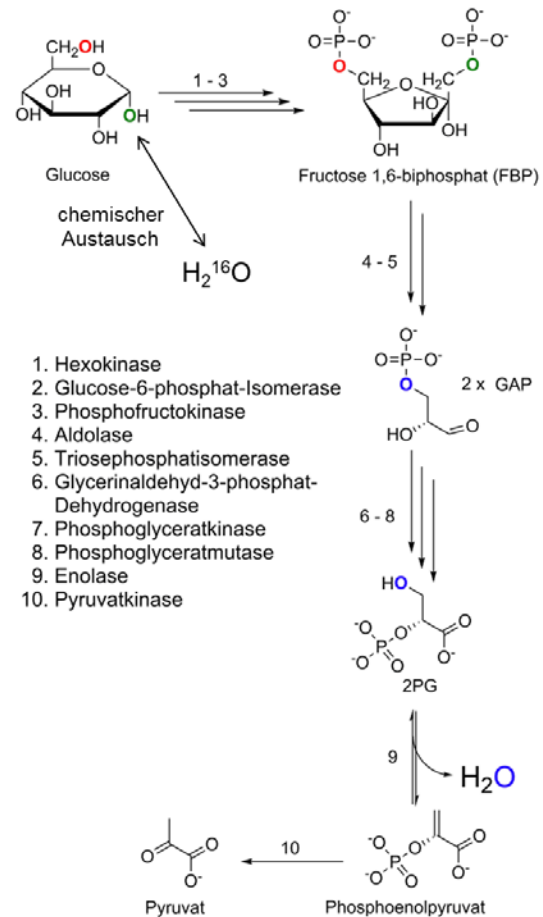


Fig. 2: Abbau von ^{17}O -Glukose im Zuge der Glykolyse -- markiert am C1 (grün) und C6-Kohlenstoffatom (rot). Während der Schritte 1 bis 3 unterliegt die OH-Gruppe am C1 einem chemischen Austausch mit Wasser im Blut. Im 9. Schritt wird das metabolische Endprodukt H_2^{17}O mittels des Enzyms Enolase von 2-Phosphoglycerat (2-PG) abgespalten.

Austauschkinetik

Die OH-Gruppe am anomeren C1-Atom unterliegt einem pH- und temperaturabhängigen chemischen Austausch mit Wasser (10). Das bedeutet, dass über die Zeit eine Zunahme der H_2^{17}O -Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme der Glukoseanreicherung stattfindet, wohingegen die Hydroxylgruppe am C6-Atom (primärer Alkohol) als kinetisch stabil zu erwarten ist.

Zur Untersuchung der Austauschkinetik wurden hochaufgelöste dynamische ^{17}O -NMR-Datensätze zweier 55,5 mM phosphat-gepufferter Glc-6 und Glc-1 Modelllösungen mit einem 500-MHz-Spektrometer (III Avance 500, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) und bei physiologischen Bedingungen ($\text{pH} = 7,4$, $T = 313\text{ K}$) aufgenommen. Die Dynamik des H_2^{17}O -Signals wurde mit dem Auswerteprogramm Dynamics Center 2.4.5 (Bruker Biospin, Rheinstetten, D) bestimmt.

In vivo Experimente

Zur Untersuchung des Glukosemetabolismus im Maushirn wurden mit einer FID-Sequenz zeitaufgelöste nicht-lokalisierte ^{17}O -MR-Spektren nach Injektion eines Glukosebolus (80 mg Glc-1, Glc-6, Glc-1,6 und unmarkierter Glukose aufgelöst in 200 μl 0,9 % NaCl Lösung) zum Zeitpunkt $t = 26,6$ min aufgenommen. Für die Messungen wurde eine SNR-effiziente ^{17}O -Oberflächenspule ($N = 2$ Windungen, Spulendurchmesser = 2 cm, $Q_U/Q_L = 1,1 - 1,2$) konstruiert. Um die Reproduzierbarkeit zu zeigen wurden mit einem optimierten Messablauf zusätzlich sechs Glc-6-Experimente mit einer zeitlichen Auflösung von 10,5 s durchgeführt. Folgende Messparameter wurden verwendet: 90Pulsdauer für $t_p = 62,5 \mu\text{s}$, $TE = 56 \mu\text{s}$, $TR = 5,4$ ms, 313 FID-Punkte aufgenommen mit einem Abtastintervall von $16 \mu\text{s}$, Aufnahmezeit für FID 5 ms. Aufnahmebandbreite = 62,5 kHz, 5791 Mittelungen.

Quantifizierung der Spektren:

Um die zeitliche Dynamik der 1-OH und 6- CH_2OH -Resonanzen im Glc-1,6 Experiment analysieren zu können, wurde zur Unterdrückung des starken H_2^{17}O -Signals ein HLSVD-Algorithmus (11) (JMRUI 5,0 (12)) verwendet. Zur Bestimmung des H_2^{17}O -Signals, das die metabolische Information enthält, konnten die Signale der 1-OH und 6- CH_2OH -Resonanzen herausgefiltert werden, indem die ersten 15 Punkte (Echozeit von 296 μs) des FID entfernt wurden. Die H_2^{17}O -Resonanzen wurden dann im Magnitudenspektrum anhand der Peakhöhe quantifiziert. Damit wird die H_2^{17}O -Quantifizierung im Vergleich zur Bestimmung durch die Zeitdomäne (FID) weniger stark durch restliche Glukoseresonanzen beeinflusst. Anschließend wurden die Signalintensitäten auf die bekannte H_2^{17}O -Konzentration bei natürlicher Häufigkeit normiert (Hirngewicht von 0,4 g und ein Wassergehalt von 80 %).

CMR_{Glc}-Quantifizierung:

Da die Glc-1 und Glc-1,6 einem chemischen Austausch unterliegen (Fig. 4), wurden in einem ersten Schritt CMR_{Glc} der Glc-6 aus dem Fit des zeitlichen Verlauf der H_2^{17}O Konzentrationen an ein angepasstes CMRO₂-Modell (4) bestimmt. Dabei wurde berücksichtigt, dass 1 mol Glukose zu 1 mol H_2^{17}O metabolisiert wird. Zudem wurde eine veränderte Inputfunktion $A_{\text{Glc}}(t)$ verwendet, deren mathematische Modellierung durch zwei Blutzuckermessungen und neuste Ergebnissen (13) bestätigt wird. Zudem konnte mit Hilfe der Blutzuckermessungen der Modellparameter α_{Glc} (^{17}O -Glukosegehalt im Blut über natürlicher Häufigkeit: $^{17}\text{O}/(^{17}\text{O} + ^{16}\text{O})$), wie in (14) beschrieben, abgeschätzt werden. Aus dem Fit des exponentiellen Zerfalls an die Daten der Blutzuckermessungen wurde der Parameter zu $\rho_{\text{Glc}} =$

$0,032 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Zur Untersuchung der Identifizierbarkeit der CMR_{Glc}-Raten wurden eine Profile Likelihood-Analyse durchgeführt (15,16). Die Lösung der ordinären Differentialgleichung (ODE) des CMR_{Glc}-Modells wurde durch Integration mit dem ODE-Solver CVODES (17) erhalten, wobei der für die CMR_{Glc}-Bestimmung wichtige Parameter $\alpha_{\text{Glc}} = 0,32 \pm 0,03$ im Modell als konstant angenommen wurde. Als Ergebnis konnten die CMR_{Glc}-Raten und deren Konfidenzintervalle verlässlich bestimmt werden.

Ergebnisse

^{17}O -MRT

Die ^{17}O -Bilder mit der ZP-Spule zeigen nur eine geringe Variation des Signals von maximal 10 % (Fig. 3a) - anatomische Strukturen wie die Augen und Ventrikel sind eindeutig erkennbar (a\ b, SNR = 36\ 6). Aufgrund der reduzierten räumlichen Auflösung von 8 mm können einzelne Gyri wegen der auftretenden Partialvolumeneffekte nicht separiert werden.

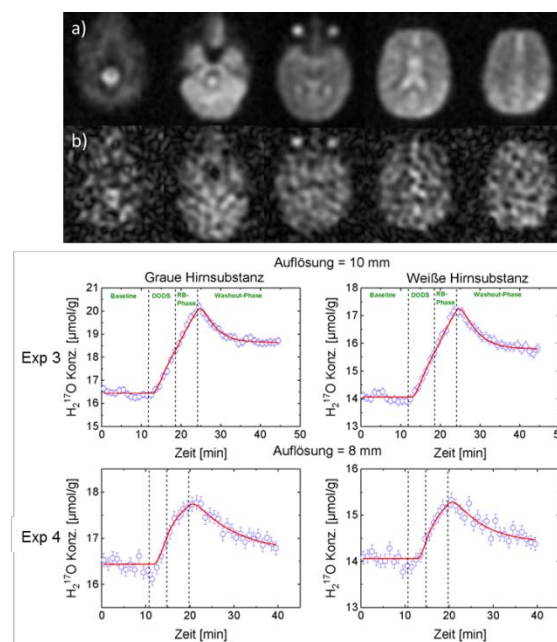


Fig. 3: Ausgewählte transversale ^{17}O -Kopfbilder (Exp 3) aufgenommen in 40 min (a) und 1 min (b) (8 mm). c) Zeitliche Verlauf Dynamik der H_2^{17}O -Konzentrationen (in $\mu\text{mol/g}$) in GM und WM für Exp 3 und Exp 4 mit Fit (rote Linie).

Für die ^{17}O -Inhalationsexperimente Exp 3 und Exp 4 wurden die folgenden CMRO₂-Raten ermittelt (Tab. 2). In GM (Exp 3) wurde ein um 19 % größere Rate als in WM festgestellt, während in Exp 4 kein signifikanter Unterschied zwischen GHS und WHS ermittelt wurde.

	Mittelwert	^{15}O -PET
GHS	$1,17 \pm 0,18$	$1,59 \pm 0,23$
WHS	$0,90 \pm 0,10$	$0,65 \pm 0,10$

Tab. 2: Gemittelte CMRO_2 -Raten für GHS und WHS und ^{15}O -PET-Literaturwert in $\mu\text{mol/g/min}$.

^{17}O -MRS und Glukose

In dem Glc-6-Austauschexperiment wurde keine Zunahme des H_2^{17}O -Signals über die Messzeit von 200 min beobachtet (Fig 4), womit die kinetische Stabilität der OH-Gruppe am C6-Kohlenstoffatom bestätigt wurde. Die H_2^{17}O -Signaldynamik der Glc-1 hingegen zeigte eine lineare Zunahme des Signals von ca. 3,5 %.

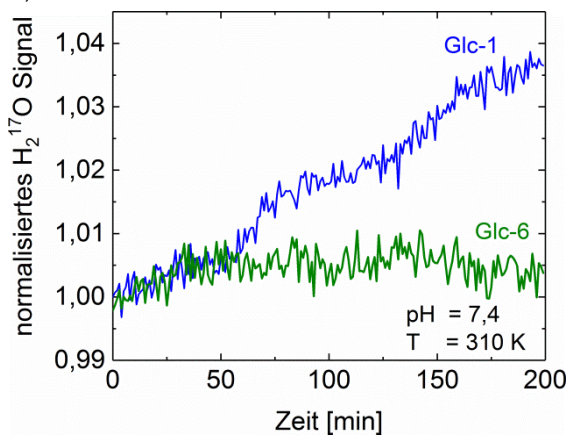


Fig. 4: H_2^{17}O -Signaldynamik der Austauschexperimenten (Glc-1) und Glc-6-Lösungen

Bei physiologischen Bedingungen konnten zudem die α (36 ± 1 ppm) - und β -Form von Glc-1 (47 ± 1 ppm) detektiert werden (nicht gezeigt). Die Ergebnisse wurden anschließend mit präziser Massenspektrometriemessungen von Glc-6 und Glc-1-Lösungen bestätigt (nicht gezeigt).

Zeitaufgelöste *in vivo* ^{17}O -MR-Spektren vom Maushirn mit der prominenten H_2^{17}O -Resonanz ($\text{SNR} = 59$) sind dargestellt (Fig 5a). Durch die H_2^{17}O -Wasserunterdrückung mit dem HLSVD-Algorithmus können die Glukoseresonanzen 1-OH und 6- CH_2OH (Fig. 5b) separat analysiert werden (Tab. 3). Da die α - und β -Form bei 9,4 T nicht aufgelöst werden konnte, ergibt sich der δ -Wert für die 1-OH-Gruppe als ein gewichteter Mittelwert der beiden Formen.

Resonanzen	FWHM [ppm]	δ [ppm]
H_2^{17}O	$5,2 \pm 0,3$	0
6- CH_2OH	16 ± 1	-11 ± 1
1-OH	18 ± 1	40 ± 2

Tab. 3: Ermittelte Linienbreiten und chemischen Verschiebungen der Glukoseresonanzen

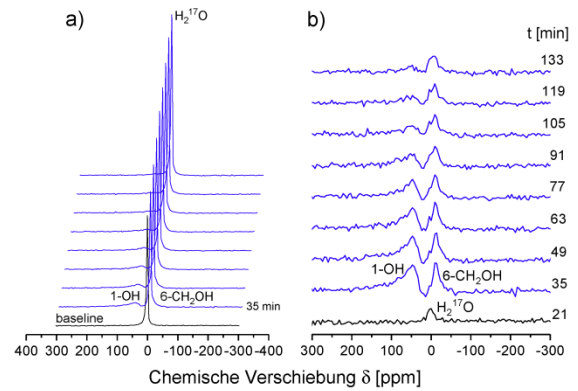


Fig. 5: a) Zeitlich aufgelöste ^{17}O -MR-Spektren vom Maushirn b) Spektren nach Unterdrückung der H_2^{17}O -Resonanz mit dem HLSVD-Algorithmus.

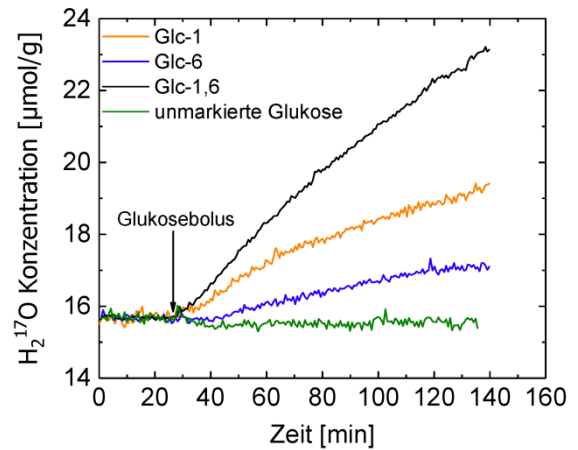


Fig. 6 H_2^{17}O -Konzentrationsverlauf der Glc-1, Glc-6 und Glc-1,6-Experimente im Maushirn.

Der Anstieg der H_2^{17}O -Konzentration zum Ende der Messung betrug 9 % für Glc-6, 24 % für Glc-1 und 47 % für Glc-1,6, wohingegen für die unmarkierte Glukose erwartungsgemäß keine Zunahme beobachtet wurde (Fig 6). Die H_2^{17}O -Konzentration der gemittelten Glc-6-Kurve steigt etwa 5 min (metabolisches delay) (14) nach der Bolusinjektion kontinuierlich bis zum Ende an (Fig 7).

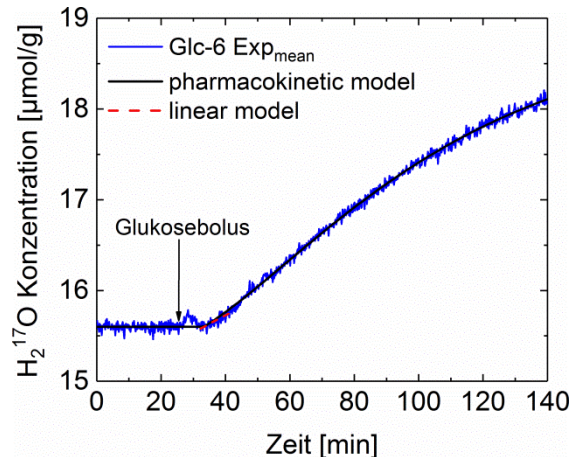


Fig. 7: a) Gemittelter H_2^{17}O -Konzentrationsverlauf (Glc-6 Exp_{mean}) (blau) mit dem CMR_{Glc} -Modellfit und linearen Anpassung Exp_{mean}.

Aus dem Fit mit dem CMR_{Glc} -Model -und der linearen Anpassung wurden CMR_{Glc} -Werte von $0,07 \pm 0,02$ bzw. $0,06 \pm 0,01 \mu\text{mol/g/min}$ erhalten.

Diskussion und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine lokalisierte CMRO_2 -Quantifizierung in großen Regionen von GHS und WHS mit Hilfe dynamischer ^{17}O -MRT bei einer klinischen Feldstärke von 3 Tesla möglich ist. Die aus allen vier Messungen (Exp 1 bis Exp 4) gemittelten CMRO_2 -Werte für GHS und WHS stimmen innerhalb zwei Standardabweichungen (Tab. 2) mit der ^{15}O -PET-Literatur überein (18). Aufgrund von Partialvolumeneffekten unterscheiden sich die CMRO_2 -Werte für GHS und WHS weniger stark als bei ^{15}O -PET. Zukünftige Patientenstudien werden zeigen müssen, ob das Verfahren eine verlässliche Bestimmung der Oxygenierung in Tumoren zulässt (19). Mit diesem Wissen könnte die Behandlung der Tumore mit Hilfe der Strahlentherapie optimiert werden.

In den bisherigen ^{13}C -Studien wurde die Glykolyse indirekt über die Metaboliten Glutamat und Glutamin untersucht (14), wohingegen die hier vorgestellte Methode erstmals die Möglichkeit bietet die ersten Schritte in der Glykolyse im Maushirn mit Hilfe der H_2^{17}O -Resonanz ($\text{SNR} > 50$, zeitliche Auflösung 10,5 s) direkt zu untersuchen. Die ermittelte CMR_{Glc} -Rate von $0,07 \pm 0,02 \mu\text{mol/g/min}$ ist etwa viermal geringer als ein ^{18}F -FDG-PET-Literaturwert von $\text{CMR}_{\text{Glc}} = 0,26 \pm 0,06 \mu\text{mol/g/min}$ (20). Die CMR_{Glc} -Bestimmung ist momentan noch durch Unsicherheiten des verwendeten Modells bzw. der Inputfunktion $A_{\text{Glc}}(t)$ limitiert. Eine präzise Bestimmung dieser könnte durch eine dynamische arterielle Blutabnahme und anschließender Quantifizierung der ^{17}O -Konzentration mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (CG-MS) erreicht werden (21).

Die Daten zeigen allerdings bereits jetzt, dass der Glukosemetabolismus mit ^{17}O -markierter Glukose und zeitaufgelöster ^{17}O -MRS untersucht werden kann. In einem weiteren Schritt könnte eine lokalisierte CMR_{Glc} -Quantifizierung in verschiedenen Gewebearten mit Hilfe von ^{17}O -CSI (*chemical shift imaging*) oder ^{17}O -Bildgebung bei höheren Feldstärken erzielt werden (13). Um komplementäre metabolische Information zu erhalten und zum Vergleich, wird in einem zukünftigen Schritt die hier vorgestellte ^{17}O -MRS-Methode zusammen mit GlucoCEST (22) verwendet werden.

Referenzen

1. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Science* 2009;324:1029–1033.
2. Angleys H, Jespersen SN, Østergaard L. *Front. Comput. Neurosci.* 2016;10.
3. Borowiak R, Groebner J, Haas M, Hennig J, Bock M. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* 2014;27:95–99.
4. Atkinson IC, Thulborn KR. *NeuroImage* 2010;51:723–733.
5. Hoffmann SH, Begovatz P, Nagel AM, Umathum R, Schommer K, Bachert P, Bock M. *Magn. Reson. Med.* 2011;66:1109–1115.
6. Kurzhunov D, Borowiak R, Reiser M, Joachim Krafft A, Caglar Özen A, Bock M. *NeuroImage* 2017;155:612–624.
7. Borowiak R, Reichardt W, Kurzhunov D, Schuch C, Leupold J, Krafft AJ, Reiser M, Lange T, Fischer E, Bock M. *NMR Biomed.* 2017;30:n/a-n/a. doi: 10.1002/nbm.3724.
8. Nagel AM, Laun FB, Weber M-A, Matthies C, Semmler W, Schad LR. *Magn. Reson. Med.* 2009;62:1565–1573.
9. Hoffmann SH. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg; 2011.
10. Mega TL, Van Etten RL. *J. Am. Chem. Soc.* 1988;110:6372–6376.
11. Cabanes E, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Simond G, Cozzone PJ. *J. Magn. Reson.* 2001;150:116–125.
12. Naressi A, Couturier C, Devos JM, Janssen M, Mangeat C, Beer R de, Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med. 2001;12:141–152.
13. Schepkin VD, Neubauer A, Schuch C, Glaeser T, Kievel M, Ranner SL, Brey WW, Hesper S, Schad L. In: *Proceedings of the 25th Annual Meeting ISMRM 2017*. Honolulu, USA; 2017.
14. Fitzpatrick SM, Hetherington HP, Behar KL, Shulman RG. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1990;10:170–179.
15. Raue A, Steiert B, Schelker M, et al. *Bioinformatics* 2015;31:3558–3560.
16. Kurzhunov D, Borowiak R, Hass H, Wagner P, Krafft AJ, Timmer J, Bock M. *Magn. Reson. Med.* 2016.
17. Hindmarsh AC, Brown PN, Grant KE, Lee SL, Serban R, Shumaker DE, Woodward CS. *ACM Trans Math Softw* 2005;31:363–396.
18. Leenders KL, Perani D, Lammertsma AA, Heather JD, Buckingham P, Healy MJ, Gibbs JM, Wise RJ, Hatazawa J, Herold S. *Brain J. Neurol.* 1990;113 (Pt 1):27–47.
19. Hoffmann SH, Radbruch A, Bock M, Semmler W, Nagel AM. *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* 2014;27:579–587.
20. Toyama H, Ichise M, Liow J-S, et al. *J. Nucl. Med.* 2004;45:1398–1405.
21. Zijl PCMV, Davis D, Eleff SM, Moonen CTW, Parker RJ, Strong JM. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 1997;273:E1216–E1227.
22. Walker-Samuel S, Ramasawmy R, Torrealdea F, et al. *Nat. Med.* 2013;19:1067–1072.