

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. В.
ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ПАВЛОВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА
РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДОВ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ
ТОМОГРАФИИ НА ЯДРАХ ФТОРА-19

Специальности: 03.01.02 – Биофизика, 03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Работа выполнена в кафедре медицинской физики физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

Панченко Владислав Яковлевич

доктор физико-математических наук, профессор,
академик РАН

Пирогов Юрий Андреевич

доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты

Рууге Энно Куставич

Доктор физико-математических наук, профессор
Физический факультет ФГБОУ «Московский
государственный университет имени
М.В.Ломоносова, кафедра биофизики, профессор
Семенова Наталия Александровна

Доктор биологических наук, профессор
ФГБУ науки Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
лаборатория кинетики и механизмов
ферментативных и каталитических процессов,
главный научный сотрудник

Терещенко Сергей Андреевич

Доктор физико-математических наук, профессор
Национальный исследовательский университет
«МИЭТ», Институт биомедицинских систем,
профессор

Защита состоится 16 ноября 2020 г. в 16 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, ЦФА. E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). Со сведениями о регистрации участия в защите в удаленном интерактивном режиме и с диссертацией в электронном виде также можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»:

<https://istina.msu.ru/dissertations/324005047/>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,
кандидат технических наук

Сидорова А.Э.

Общая характеристика работы

Актуальность. Магнитно-резонансная томография (МРТ) является одним из наиболее эффективных методов диагностики ввиду высокой информативности и безопасности исследования. Обычно в клинических исследованиях регистрируется сигнал только от ядер водорода (^1H , протонов) из-за их высокого содержания в живых тканях, что позволяет эффективно визуализировать анатомические структуры. Однако, как у любого метода, у него есть свои ограничения (трудности в визуализации легких, желудочно-кишечного тракта и др.), преодолеть которые в рамках протонной МРТ практически невозможно.

На сегодняшний день все большую известность стали приобретать методы, основанные на регистрации ЯМР сигнала не от протонов, а от других ядер (натрия-23, фосфора-31, углерода-13 и др.). Эти методы позволяют получать дополнительную информацию о функциях как отдельных органов, так и всего организма в целом. Настоящая диссертационная работа относится к развитию методов МРТ на ядрах фтора-19. Данное ядро высокочувствительно к ЯМР, но при этом в организме фтор содержится только в костях и эмали зубов, твердое агрегатное состояние которых не позволяет визуализировать его методом МРТ. Зато использование различных фторсодержащих соединений в качестве контрастных агентов дает возможность получать ^{19}F МРТ изображения без фонового сигнала и только от тех органов или тканей, которые накапливают введенные агенты.

Одним из наиболее актуальных приложений в медицинской диагностике является визуализация легких. Существующие методы (спирометрия, рентгенография, флюорография, компьютерная томография (КТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и др.) либо используют вредное для человека излучение, либо способны выявлять лишь глобальные патологические повреждения. Многие годы “ахиллесовой пятой” МРТ было плохое качество визуализации легочной ткани из-за низкого содержания в ней протонов. Существующие гиперполяризационные подходы повышения качества визуализации легких не являются общедоступными, поскольку они чрезвычайно дорогостоящие и требуют разработки сложных вспомогательных устройств и больших трудозатрат при подготовке визуализирующих препаратов. В то же время значительно более экономный метод ^{19}F МРТ может успешно применяться при визуализации легких с использованием фторсодержащих газов в качестве контрастных агентов.

Еще одним перспективным применением метода ^{19}F МРТ является мониторинг

способных к фагоцитозу клеток в организме человека. Так, например, при внутривенном введении жидких эмульсий перфторуглеродов (ПФУ) они поглощаются макрофагами и моноцитами, которые при наличии в организме локальных воспалительных процессов мигрируют в зону воспаления, позволяя визуализировать ее методами ^{19}F МРТ. Применяя подобные методики, можно диагностировать различные патологии (опухоли, повреждения и др.) и следить за ходом их лечения. Также с помощью ПФУ эмульсий можно пометить, например, стволовые клетки и отслеживать их кинетику в организме при клеточной терапии.

Таким образом, метод ^{19}F МРТ способен значительно расширить границы применимости МРТ.

Степень разработанности темы. Разработка методов ^{19}F МРТ в настоящее время является особенно актуальной, о чем можно судить по большому количеству исследований, посвященных визуализации этим методом легких и воспалительных процессов в доклинической практике. Вместе с тем существует ряд проблем, почему эти методы до сих пор не применяются в клиниках. Основная проблема методов ^{19}F МРТ заключается в их невысокой чувствительности, при этом используемые фторсодержащие контрастные агенты не идеальны для МРТ. Например, при визуализации легких обычно используют газы гексафторида серы (SF_6) и перфторпропана (C_3F_8), которые имеют сверхкороткие времена релаксации (1-18 мс), а последний имеет еще и сложный спектр, что дополнительно снижает сигнал на ^{19}F МРТ изображениях. Для отслеживания фагоцитирующих клеток в организме методом ^{19}F МРТ в качестве контрастных агентов обычно используются высокочувствительные для МРТ ПФУ эмульсии, однако все они имеют чересчур длительные времена полувыведения из организма (до нескольких лет) и/или формируют нестабильные эмульсии, что исключает возможность их применения в клинике.

Цель диссертационного исследования. Разработка новых методов ^{19}F МРТ, направленных на расширение диагностических возможностей клинической МРТ. Для достижения указанной цели решаются следующие задачи:

1. Оптимизация процессов ^{19}F МРТ сканирования в полях 0.5 и 7 Тл для визуализации использованных фторсодержащих соединений.
2. Разработка методов ^{19}F МРТ визуализация легких при использовании газа октафторциклобутана (ОФЦБ) в поле 7 Тл. Сравнение свойств нового контрастного агента ОФЦБ и прежде применяемого в ^{19}F МРТ при визуализации легких гексафторида

серы. Получение ^{19}F МРТ изображений легких человека на слабопольном (0.5 Тл) клиническом томографе.

3. Разработка методов ^{19}F МРТ визуализации жидких ПФУ в поле 7 Тл. Изучение кинетики ПФУ эмульсий в организме крыс. Визуализация опухолевых процессов у мышей с использованием Перфторана в качестве контрастного агента.

4. Исследование желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и легких человека методом ^{19}F МРТ.

Объект и предмет исследования. Объектом представленных исследований являются методы ^{19}F МРТ. Предмет исследования – визуализация различных органов и тканей (легких, тимуса, ЖКТ, опухолей) при использовании фторсодержащих газов и жидкостей в качестве контрастного агента.

Научная новизна. В диссертационной работе впервые получены следующие научные данные:

1. Показаны возможность и эффективность использования газа ОФЦБ для ^{19}F МРТ функциональной диагностики легких.
2. Получены 3D изображения дыхательной системы крыс, больных фиброзом легких (включая, трахею и бронхи), методом ^{19}F МРТ в поле 7 Тл при использовании газа ОФЦБ.
3. Построены оксигенационные карты легких здоровых крыс и крыс с легочной гипертензией на основе карт T_1 , полученных методом спинового эхо.
4. Продемонстрирована способность газа ОФЦБ растворяться в тканях легких (проникать в мембрану альвеол) и разработан метод оценки параметров газообмена/проницаемости мембраны.
5. Проведена визуализация легких человека с использованием газа ОФЦБ в качестве контрастного агента методом ^{19}F МРТ в слабом поле 0.5 Тл.
6. Обнаружено, что ПФУ эмульсии способны накапливаться в тимусе. При этом количество ПФУ, попавшего в тимус, зависит от способа введения препарата в организм.
7. Установлена возможность использования препарата Перфторан для визуализации воспалительных процессов.
8. Проведены исследования ЖКТ человека методом ^{19}F МРТ в слабом поле (0.5 Тл) при использовании в качестве контрастного агента капсул, заполненных ПФУ и предназначенных для перорального введения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в изучении поведения в организме фторсодержащих контрастных

агентов, которые ранее не применялись в ^{19}F МРТ, а также того, какую принципиально новую функциональную информацию они могут предоставить в рамках этого метода. В процессе исследований были выявлены такие фундаментальные аспекты, как способность некоторых ПФУ (ОФЦБ) проникать в мембрану альвеол в количестве, достаточном для их регистрации с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Подробно исследована также фармакокинетика жидких ПФУ эмульсий в организме лабораторных животных и показана возможность визуализации тимуса.

Практическая значимость работы заключается в исследовании диагностических свойств фторсодержащих веществ, весьма перспективных для клинических применений. Каждая из поставленных в диссертации задач (визуализация легких, ЖКТ, локальных воспалительных процессов в организме, тимуса) представляет важное направление медицинской диагностики. В отличие от применяемой в современной клинической практике рентгеновской КТ разработанные новые способы МРТ являются в полной мере безопасными и имеют потому особое практическое значение.

Методология диссертационного исследования. В работе использовались методы ^1H и ^{19}F МР томографии и спектроскопии. Обработка полученных ЯМР спектров проводилась с помощью программы TopSpin, а изображений – программами ParaVision и ImageJ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Применение газа ОФЦБ в качестве контрастного агента для ^{19}F МРТ позволяет получать данные о перфузировании и вентилируемости тканей легких, необходимые при диагностике таких патологий, как COVID пневмония, фиброз легких и легочная гипертензия.
2. Реализация метода ^{19}F МРТ по визуализации легких человека на слабопольных клинических сканерах при использовании газа ОФЦБ оказывается возможной и эффективной.
3. Применение ПФУ эмульсий как контрастных агентов для ^{19}F МРТ позволяет визуализировать тимус и локальные воспалительные процессы, определяющие функциональное состояние иммунной системы.
4. ^{19}F МРТ наблюдение за продвижением по ЖКТ перорально введенных капсул, заполненных жидкими ПФУ, обеспечивает получение информации о проходимости и моторике кишечника.

Степень достоверности. Достоверность результатов настоящего исследования подтверждается адекватными способами обработки полученных изображений/спектров, физически корректной постановкой проведенных экспериментов и воспроизводимостью полученных в процессе их выполнения результатов.

Личный вклад автора. Все представленные в диссертационной работе результаты получены автором лично либо при его непосредственном участии. Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные работы. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 9 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI.

Апробация работы. Результаты исследований доложены на 6-ти российских и международных конференциях (представлены в 6-ти опубликованных тезисах докладов).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, трех приложений и списка цитированной литературы. Общий объем работы составляет 113 страниц, включая 35 рисунков и 2 таблицы. Библиография содержит 182 наименования на 10 страницах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обсуждается актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цели и задачи исследования, показаны практическая значимость и научная новизна работы, дается общая постановка задач, кратко описано содержание работы по главам.

Первая глава является обзорной. В ней приведены основы метода МРТ, которые необходимы и полезны для понимания ряда вопросов, поднятых в диссертационной работе и касающихся таких понятий, как чувствительность МРТ измерений, взвешенность изображений, отношение сигнала к шуму (*SNR*) и др. Сделанный обзор не дает исчерпывающей информации по всем методикам МРТ. Вместе с тем приведенного описания вполне достаточно для понимания технических сторон диссертационной работы.

Вторая глава диссертационной работы посвящена разработке методов ^{19}F МРТ визуализации легких при использовании газа ОФЦБ в качестве агента контрастирования

МРТ изображений. В §2.1 описывается актуальность разработки метода МРТ для визуализации легких и то, какими способами это осуществляется. В §2.2 приводится описание материалов и методов ко второй главе. Работа проводилась на 7-Тл МРТ сканнере Bruker BioSpec 70/30 USR. Для получения изображений использовали объемный резонатор с внутренним диаметром 7.2 см, а также дополнительную беспроводную плоскую катушку диаметром 4 см для усиления фторного сигнала (в *in vivo* исследованиях) [A1]. Более подробно о основных характеристика этой катушки и о том, какое возбуждающее РЧ поле она формирует описано в Приложении 1 [1-3]. В качестве контрастирующих газов в ^{19}F МРТ использовали ОФЦБ (C_4F_8) и гексафторид серы (SF_6). В работе проводились *in vitro* измерения на фантомах, *ex vivo* – на вырезанных легких интактных крыс, а также *in vivo* – на здоровых крысах и крысах с легочной гипертензией (ЛГ)/фиброзом легких. Подробнее о том, как создавалась модель ЛГ, а также результаты проведенного гемодинамического анализа и *ex vivo* измерений после МРТ исследований представлены в Приложении 2.

Учитывая особенности визуализации фторированных газов (короткие времена релаксации, ограничение на полное время сканирования), оптимизировались быстрые ИП, основанные на методе градиентного эхо: ИП FLASH – Fast Low Angle SHot (быстрая визуализация с малым углом отклонения), ИП FISP – Fast Imaging with Steady state Precession (быстрая визуализация с устойчивым состоянием прецессии) и ИП UTE - Ultra-short TE (ИП со сверхкоротким TE), а также ИП, основанная на спиновом эхо, FSE – fast spin-echo (быстрое спин-эхо). Времена релаксации T_1 и T_2 на фантомах определялись спектроскопическими методами с помощью ИП IR - inversion-recovery (инверсия-восстановление) и CPMG - метода Карр-Перселла-Мейбума-Гилла, соответственно. Для построения карт T_1 легких использовали ИП RARE-VTR - Rapid Acquisition with Refocused Echoes and Variable Time of Repetitions (быстрый сбор сигнала с рефокусированными эхо и переменными временами повторения). Для получения и обработки МРТ изображений использовали пакеты ParaVision и ImageJ. SNR на МРТ изображениях определяли по формуле [4]: $\text{SNR} = (S - N) / \text{sd}(N)$, где S и N – средняя интенсивность сигнала на МРТ-изображении от фантома/легких и шума, соответственно, $\text{sd}(N)$ – среднее отклонение от сигнала шума. Для получения и обработки ЯМР спектров использовали пакеты TopSpin и Dynamic Center.

Предварительно осуществлялись выбор сканирующих ИП и оптимизация их параметров – §2.3 [A2]. Работа выполнялась сначала посредством *in vitro* исследований

на фантомах, а затем в *ex vivo* экспериментах на вырезанных легких интактной крысы.

В диссертационной работе было продемонстрировано, что ОФЦБ является эффективным контрастным агентом для ^{19}F МРТ легких. Его сравнение с наиболее часто используемым в этом направлении газом гексафторидом серы (§2.4) показало, что чувствительность ОФЦБ в 4.5 раза превосходит SF_6 (рис. 1).

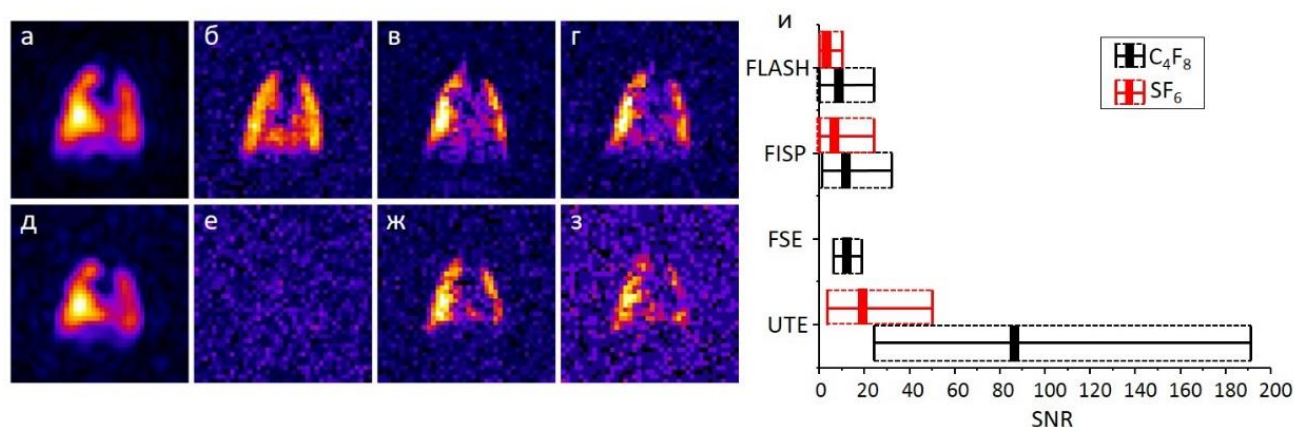


Рис. 1. ^{19}F МРТ изображения легких крысы, полученные с помощью ИП UTE (а, д), FSE (б, е), FISP (в, ж) и FLASH (г, з) при использовании газа ОФЦБ (**верхний ряд**) и гексафторида серы (**нижний ряд**); и – диаграмма, отображающая минимальное, среднее и максимальное значение SNR на соответствующих изображениях

Ключевым фактором в пользу выбора ОФЦБ в качестве контрастного агента являются его более длительные времена релаксации (~60 мс) по сравнению с другими газами (например, у SF_6 времена релаксации ~1.8 мс). Стоит отметить, что ИП на основе спинного эхо невозможно применять для газов с короткими временами релаксации. В то же время МРТ изображения, полученные с помощью спинного эхо, гораздо меньше подвержены искажениям, связанным с неоднородностью поля.

В §2.5 проводился анализ возможности применения метода ^{19}F МРТ для диагностики фиброза легких у крыс. Целью данного исследования было разработать эффективную методику для анализа вентилируемости легких. В работе показана перспективность использования трехмерных (3D) ИП для этих целей. По сравнению с двумерными (2D) ИП сигнал на изображениях, полученных с помощью 3D ИП, оказывается выше за счет того, что в случае 3D сканирования не происходит дефазировки спинов, вызванной диффузией газа в легких, поскольку при этом срез-селектирующий градиент отсутствует [5]. Тогда же становится возможным визуализировать нижние дыхательные пути (трахею и бронхи), диффузия газа в которых является довольно быстрой [A3]. ^{19}F МРТ изображения легких здоровой крысы, полученные с помощью ИП 3D UTE с разрешением $1.56 \times 1.56 \times 1.56 \text{ мм}^3$ за 5 мин, показаны на рис. 2а. Их объемные

реконструкции, построенные по принципу MIP (maximal intensity projection - проекция максимальной интенсивности), представлена на рис. 2б-г.

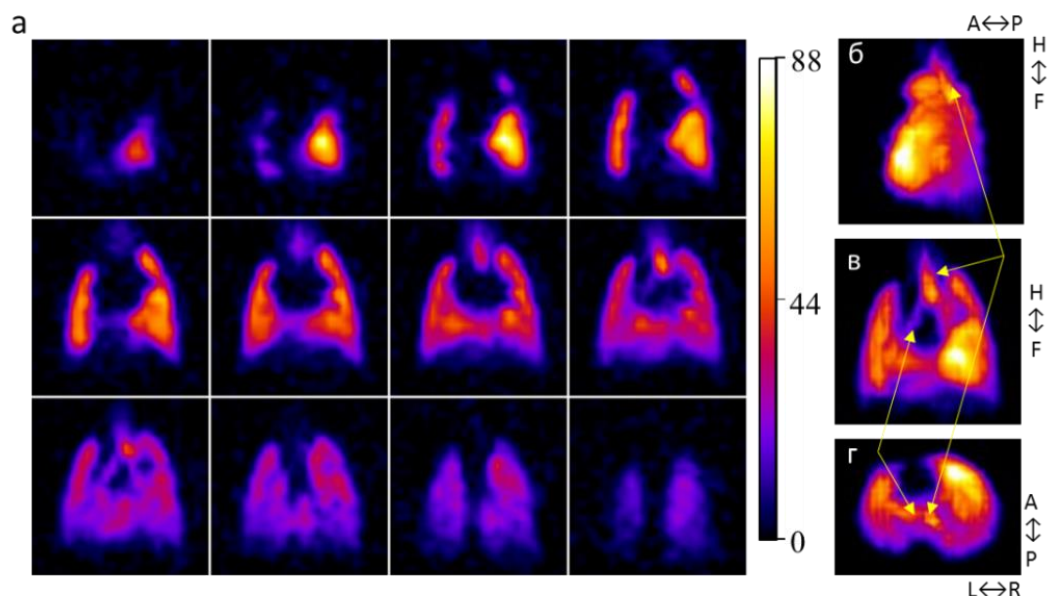


Рис. 2. ^{19}F МРТ изображения легких здоровой крысы (а) и их MIP реконструкции в трех ортогональных проекциях (б-г). Стрелочками указаны трахея и бронхи; A-P – anterior-posterior (перед-назад), L-R – left-right (право-лево), H-F – head-foot (голова-ноги); Цветовая шкала соответствует значению SNR

Эффективность методики была продемонстрирована при диагностике фиброза легких у крыс – рис. 3. На ^1H МРТ изображениях фиброз проявляется в виде светлых пятен на темном фоне легочных тканей. При этом на ^{19}F изображениях отчетливо видны выпадения сигнала в этих же областях, что свидетельствует о нарушении вентилируемости легких.

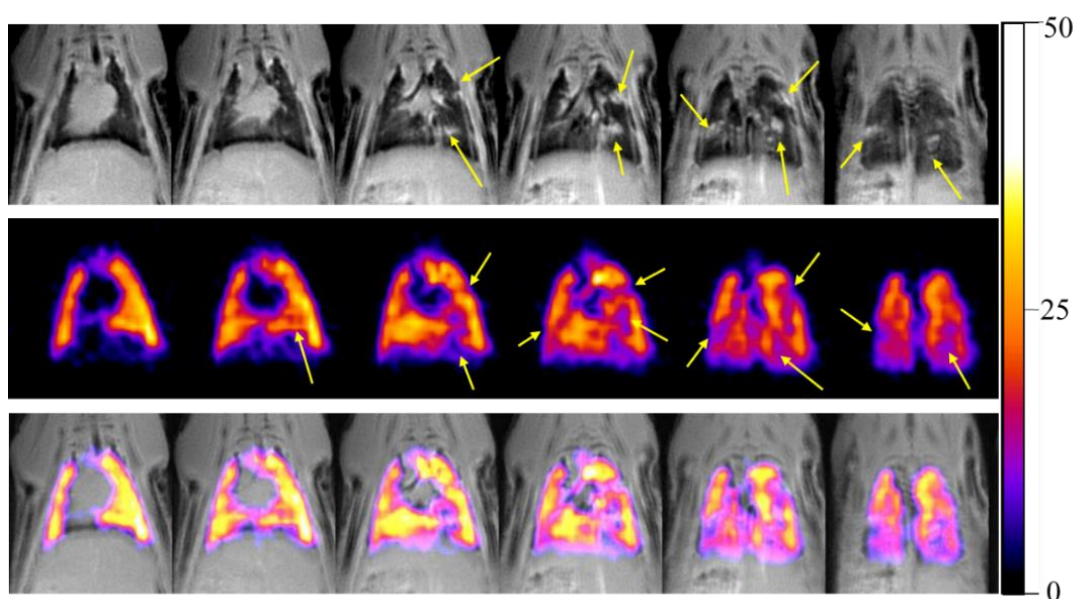


Рис. 3. ^1H (верхний ряд), ^{19}F (средний ряд) и $^1\text{H}+^{19}\text{F}$ (нижний ряд) МРТ изображения легких крысы с фиброзом; Стрелками отмечены области фиброза. Цветовая шкала соответствует значениям SNR

Перспективность газа ОФЦБ связана не только с его высокой чувствительностью для ^{19}F МРТ, но также и его длительными временами релаксации (~ 60 мс). Это делает ОФЦБ эффективным маркером для измерения уровня оксигенации тканей (ввиду линейной зависимости T_1 и T_2 от концентрации кислорода, $[O_2]$). У используемых ранее фторсодержащих газов времена релаксации короткие (1-18 мс), что делает их нечувствительными к слабым перепадам в содержании кислорода. Построение карт $[O_2]$ легких является важной задачей, поскольку они предоставляют информацию о перфузировании различных отделов легких и газообмене в них. В §2.6 описан метод получения релаксационных карт легких и проведена оценка их информативности на здоровых крысах и крысах с ЛГ. При этом для исследования были взяты согласно ^1H МРТ (рис. 4а) крысы без фиброзных поражений, но с нарушением вентилируемости легких, обнаруженным с помощью ^{19}F МРТ (рис. 4б) – MIP реконструкция этих изображений показана на рис. 6б.

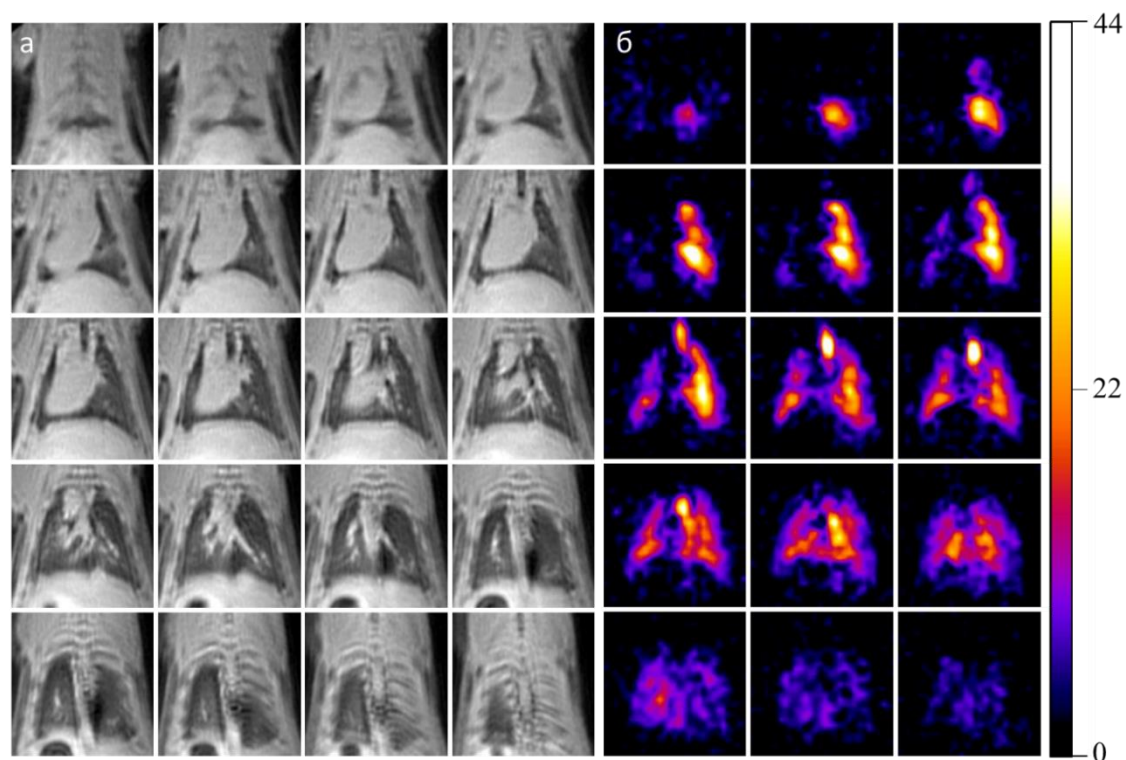


Рис. 4. ^1H (а) и ^{19}F (б) МРТ изображения легких крысы с ЛГ. Цветовая шкала соответствует значению SNR

Для сопоставления релаксационных карт с концентрацией кислорода в легких проводилась калибровка – измерялись зависимости T_1 и T_2 ОФЦБ от содержания $[O_2]$ в газовой смеси. Работу проводили сначала на фантоме, а затем на вырезанных легких крысы – рис. 5.

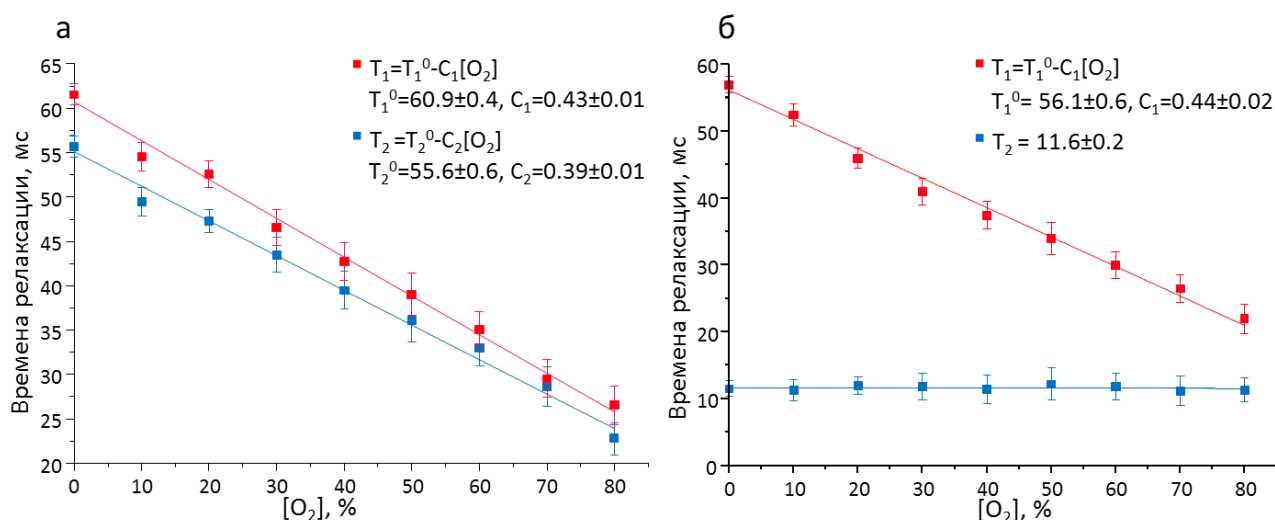


Рис. 5. Калибровочные кривые зависимости T_1 и T_2 времени релаксации в фантоме (а) и вырезанных легких интактной крысы (б)

Поскольку величина T_2 газа сильно снижается в легких крысы ввиду их губчатой структуры, то для оценки оксигенации подходят только T_1 карты. На рис. 6 д,е приведены карты T_1 легких здоровой крысы и крысы с ЛГ, соответственно.

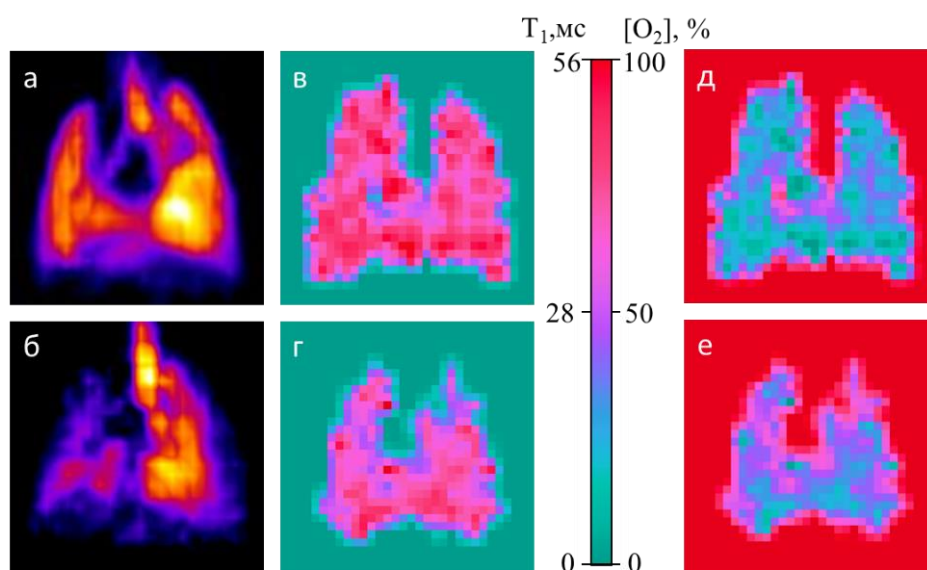


Рис. 6. ^{19}F MIP образ (а,б), T_1 (в,г) и $[O_2]$ (д,е) карты легких здоровой крысы (верхний ряд) и крысы с ЛГ (нижний ряд)

У крыс с ЛГ наблюдается снижение не только вентилируемого объема легких, но и времени T_1 , что соответствует повышению $[O_2]$ в патологических легких. В случае, представленном на рис. 6, концентрация кислорода в патологических легких в среднем была на 14% выше. Это говорит о нарушении газообмена и плохом перфузировании легочных тканей. При этом ^1H МРТ не выявила каких-либо патологических изменений в легких.

В §2.7 изучались возможности ОФЦБ растворяться в тканях легких, на основе чего

был разработан метод оценки газообмена. Большинство фторированных газов сильно липофобны и проникают в мембрану лишь в малой степени, а потому невозможно напрямую исследовать газообмен в легких. Газ ОФЦБ является наиболее липофильным среди них. При этом фтор имеет большое электронное облако, что делает его эффективным сенсором (по химическому сдвигу) к молекулярному окружению. На рис. 7 показан характерный ^{19}F ЯМР спектр, полученный от организма крысы спустя 1.5 часа после дыхания фторсодержащей дыхательной смесью (70%ОФЦБ, 30%О₂) под аппаратом ИВЛ. На спектре хорошо визуализируются два пика на расстоянии ~ 7 м.д. (их интегральное соотношение $\sim 1:5.5$). Левый пик соответствует растворенной в тканях фазе ОФЦБ, а правый – газовой фазе. Величина T_1 растворенной фазы ОФЦБ – 2.3 ± 0.1 с, а T_2 – 34 ± 2 мс.

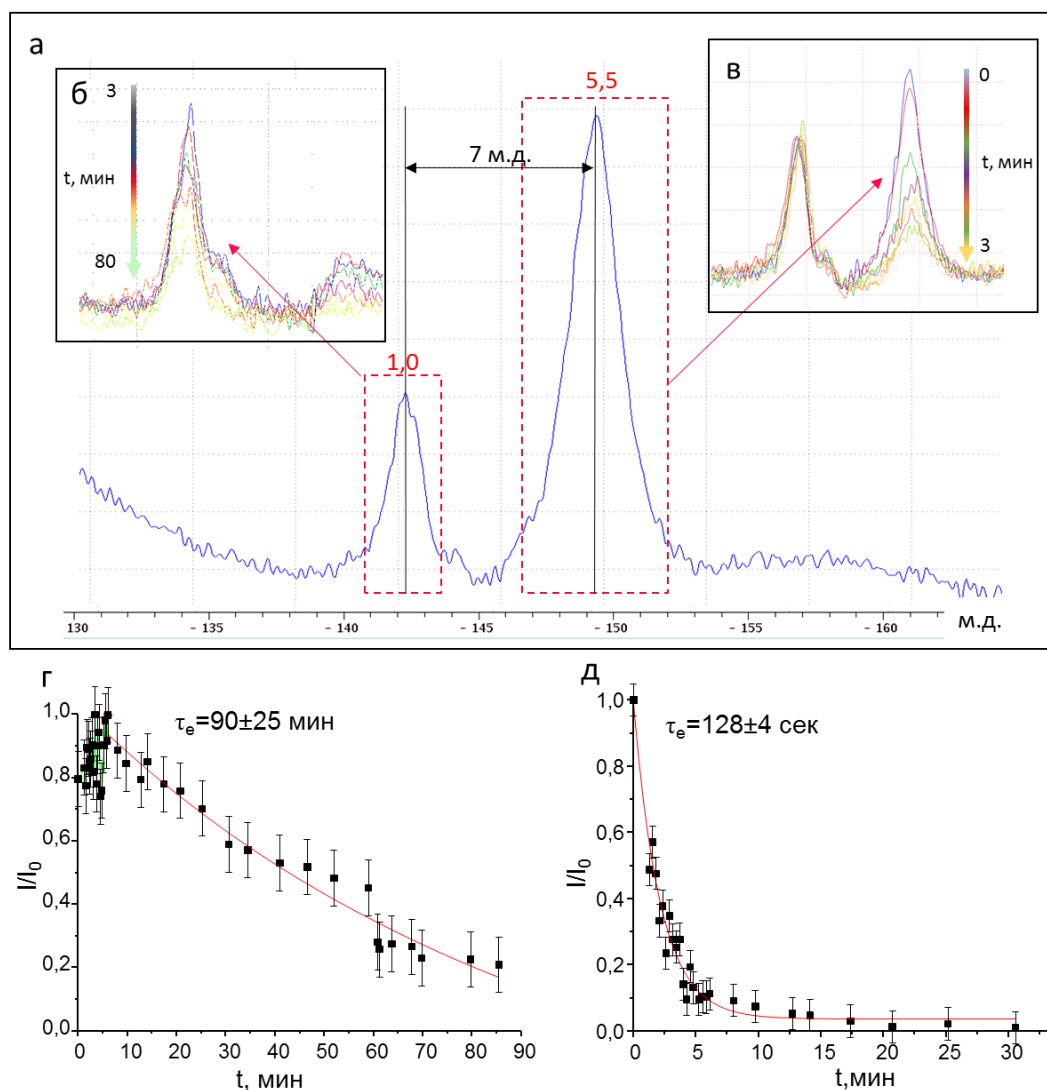


Рис. 7. а: ^{19}F ЯМР спектр здоровой крысы, дышащей дыхательной смесью 70%ОФЦБ+30%О₂; **б,в:** ^{19}F ЯМР спектры, полученные спустя различные промежутки времени после перевода крысы на дыхание воздухом; **г,д:** графики выведения ОФЦБ из фаз растворенной в тканях организма и газовой, соответственно

В исследовании изучалась кинетика выведения ОФЦБ из организма. Для этого крысу переводили с дыхания фторсодержащей газовой смесью на воздушное дыхание и получали ^{19}F ЯМР спектры в различные промежутки времени – рис. 7 б,в. На основе этих спектров были построены графики выведения растворенной и газовой фазы ОФЦБ из организма крысы - рис. 7 г,д. По этим графикам определяли характерное время выведения – время, за которое сигнал соответствующей фазы спадает в e раз. Для газовой фазы ОФЦБ это время составило ~ 2 мин, а для растворенной ~ 90 мин.

Подробный селективный анализ ОФЦБ, находящегося в легких в газовой и растворенной фазах, перспективен для оценки проницаемости мембраны альвеол и процесса газообмена. Эффективным было бы отдельно визуализировать эти фазы и определять интегральное соотношение сигналов и характерные времена выведения препарата не в среднем от всего объема легких, а от их различных отделов (путем построения карт, как в §2.6). Однако даже простая визуализация растворенной фазы ОФЦБ затруднительна ввиду слишком длительного T_1 и короткого T_2 .

Во второй главе был рассмотрен новый контрастный агент – ОФЦБ, обладающий рядом положительных характеристик, отличающих его от других фторированных газов. Его применение для ^{19}F МРТ позволило разработать несколько новых методов, которые могут быть эффективны и полезны для функциональной оценки состояния легких – их вентилируемости, перфузии, а также газообмену. В §2.8 приводятся основные выводы ко второй главе.

В **третьей главе** описано исследование легких человека методом ^{19}F МРТ в слабом поле (0.5 Тл) [А4]. Во введении к главе (§3.1) описана актуальность таких исследований. Ранее подобные работы проводились только в полях 3 и 1.5 Тл. В §3.2 приводится описание материалов и методов, используемых в исследованиях третьей главы. Эксперименты проводились на клиническом 0.5-Тл МРТ сканнере Bruker Tomikon S50. Для получения МРТ изображений использовалась модифицированная фирменная катушка, предназначенная для исследований крупных фрагментов тела и способная перестраиваться с частоты ^1H (21.08 МГц) на ^{19}F (19.83 МГц). В качестве контраста использовался только газ ОФЦБ. В работе проводили *in vitro* измерения по оптимизации сканирования, а также *in vivo* исследование здорового добровольца (мужского пола, 71 год, 105 кг).

Результаты по отработке наиболее эффективной ИП и оптимизации ее параметров

представлены в §3.3. Для получения ^{19}F МРТ изображений использовали ИП GRE и FSE. Было показано, что ИП FSE обеспечивает более сильный сигнал (примерно на 20% выше) и меньшие искажения (из-за неоднородности магнитного поля), чем ИП GRE – рис. 8.

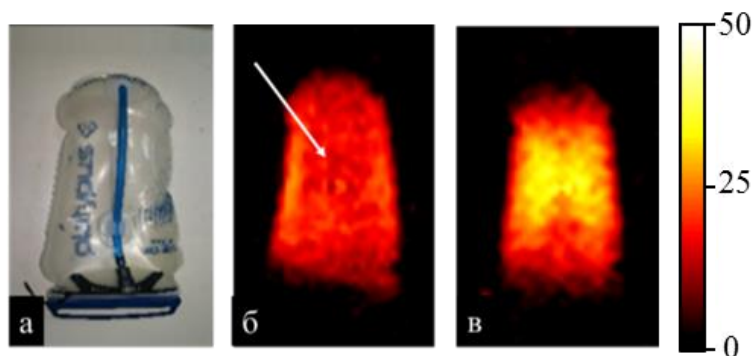


Рис. 8. а: фото фантома – пластикового баллона Platipus объемом 2л, заполненного газом ОФЦБ; б,в: ^{19}F МРТ изображения этого фантома, полученные с помощью ИП GRE и FSE 2D, соответственно. Стрелка указывает на выпадение сигнала на изображении. Цветовая шкала соответствует значению *SNR*

В §3.4 представлены результаты исследования легких человека методом ^{19}F МРТ в поле 0.5 Тл при использовании газа ОФЦБ в качестве контраста. ^{19}F МРТ сканирование легких проводилось с использованием ИП FSE для зоны $40 \times 40 \times 24 \text{ см}^3$ с разрешением $1 \times 1 \times 3 \text{ см}^3$ при 3D-сканировании. 2D сканирование выполнялось без выбора среза. Предполагалось, что время сканирования не будет превышать 20 секунд для 2D сканирования и 40 секунд для 3D сканирования.

Чтобы убедиться, что РЧ облучение безопасно для субъекта, предварительно была проведена оценка *SAR* (specific absorption rate или удельная скорость поглощения) – подробный расчет см. в Приложении 3. Этот показатель используется в МРТ для оценки безопасности исследования. В 3D сканировании рассчитанное значение *SAR* составило $\approx 0.57 \text{ Вт/кг}$, а для 2D – 0.35 Вт/кг , что значительно ниже допустимых значений согласно любым международным стандартам.

На рис. 9 (средний ряд) приведены результаты 3D сканирования ^{19}F МРТ легких человека. Для их отнесения к анатомическим структурам в самом начале эксперимента проводилось посрезовое 2D ^1H МРТ сканирование - рис. 9 (верхний ряд).

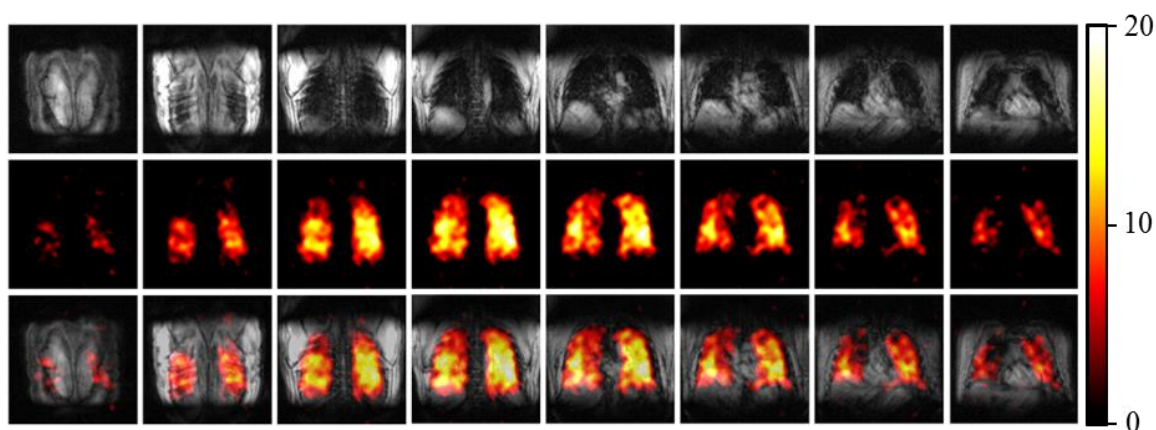


Рис. 9. МРТ изображения легких человека; **верхний ряд:** ^1H МРТ (2D GRE); **средний ряд:** ^{19}F МРТ (3D FSE); **нижний ряд:** наложение ^1H и ^{19}F образов, полученных при одинаковой пространственной локализации; Цветовая шкала соответствует значению SNR

Результаты, полученные на 0.5 Тл томографе, дают основания полагать, что в перспективе исследования легких с помощью ^{19}F МРТ могут проводиться и на слабопольных магнитах. Выводы к третьей главе представлены в §3.5

Важное направление применения методов ^{19}F МРТ относится к визуализации жидких фторсодержащих соединений в организме и является чрезвычайно перспективным для медицинской диагностики локальных воспалительных процессов, мониторинга лечения, клеточной терапии. **Четвертая глава** посвящена использованию жидких ПФУ эмульсий в качестве контрастных агентов для ^{19}F МРТ в исследованиях малых лабораторных животных. При этом в работе особое внимание уделялось препарату Перфторан, поскольку это единственная ПФУ эмульсия, разрешенная к клиническому применению в России и ряде других стран [6]. В §4.1 представлена обзорная часть по применению ПФУ эмульсий для ^{19}F МРТ. В §4.2 описаны материалы и методы, применявшиеся в этой главе. Исследования проводились на 7-Тл МРТ сканере (его подробное описание дано в §2.2). В этом случае дополнительная беспроводная поверхностная катушка использовалась только в экспериментах по визуализации опухолей у мышей. В качестве контрастного агента в ^{19}F МРТ использовались Перфторан и эмульсия ПФТБА – их ^{19}F ЯМР спектры показаны на рис. 10.

В работе проводились *in vitro* эксперименты по оптимизации процессов сканирования, а также *in vivo* исследования на здоровых крысах и мышах со спонтанными опухолями.

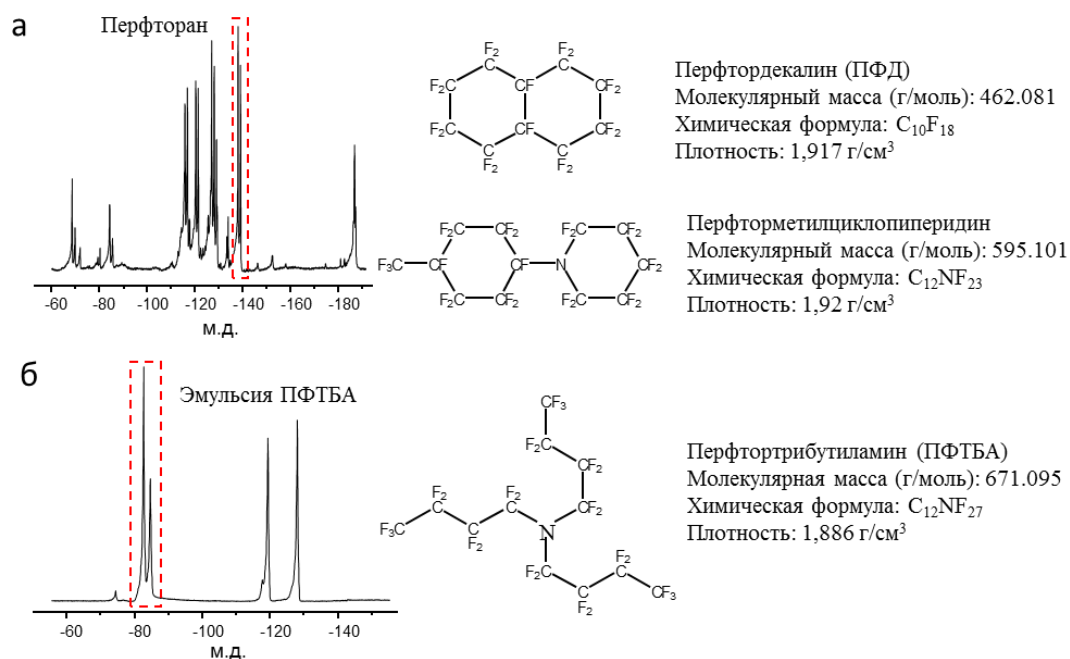


Рис. 10. ЯМР спектры, химические структуры и некоторые параметры Перфторана (**а**) и эмульсии ПФТБА (**б**) [A5]

В §4.3 описаны действия по выбору и оптимизация ИП [A6,A7]. Времена релаксации жидкостей гораздо больше, чем у газов - у Перфторана $T_1 = 923 \pm 20$ мс, $T_2 = 226 \pm 12$ мс, а у эмульсии ПФТБА $T_1 = 554 \pm 18$ мс, $T_2 = 248 \pm 11$ мс, потому нет смысла использовать сверхбыстрые ИП. В работе оптимизировали ИП FLASH и FSE. Основная проблема заключается в сложных спектрах большинства ПФУ, которые содержат много линий, распределенных в широком диапазоне химических сдвигов – сотни м.д. ($\Delta \sim 10^3 - 10^4$ Гц). В связи с этим невозможно возбуждать весь спектр целиком, поскольку на изображениях проявляются артефакты химического сдвига. Приходится тогда использовать частотно-селективные методы с возбуждением лишь нескольких спектральных линий, что нивелирует артефакты, но значительно снижает чувствительность. В таком случае основной задачей оптимизации становится поиск наиболее оптимальных линий спектра возбуждающего излучения с целью получить максимально возможный сигнал на МРТ изображениях. На рис. 10 пунктирной линией отмечены пики, которые оказались наиболее эффективными для возбуждения. Стоит отметить, что в режиме частотно-селективной методики посрезовое 2D сканирование невозможно, так как картина отнесения МРТ сигналов к зонам локализации резонирующих спинов оказывается искаженной (Рис. 11). При 3D сканировании такой проблемы нет, поскольку срез-селектирующие градиенты не используются.

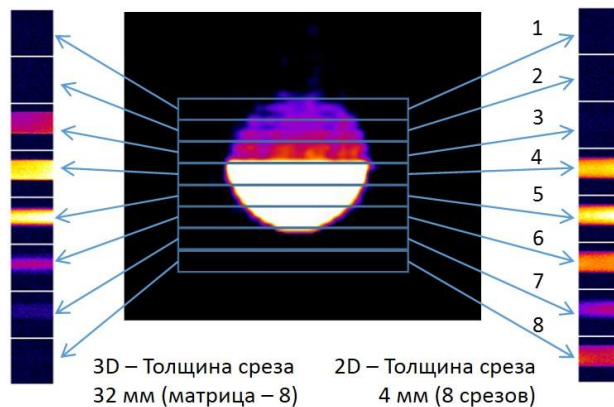


Рис. 11. ^{19}F МРТ изображения ампулы с Перфтораном в поле 7 Тл для 3D (слева) и 2D сканирования (справа) в коронарной проекции; в центре: МРТ изображение ампулы в аксиальной проекции

Чтобы оценить количество ПФУ эмульсии, накопленной в различных органах или тканях, проводилась калибровка ^{19}F сигнала, описанная в §4.4 – [A5]. Отметим, что при протонных МРТ измерениях подобные количественные оценки невозможны из-за наличия фонового сигнала от анатомических структур. В настоящем исследовании использовались 2-мл фантомы, заполненные эмульсией ПФТБА или Перфтораном в различной концентрации. Поскольку состав эмульсий известен, то процентное содержание эмульсии было пересчитано в количество возбуждаемых ядер фтора в единице объема. На рис. 12 показаны калибровочные графики для Перфторана и эмульсии ПФТБА. При этом количество возбуждаемых ядер фтора в 1 мл Перфторана и эмульсии ПФТБА отличаются – на 1 мл эмульсии ПФТБА приходится $50,8 \times 10^{20}$ возбуждаемых ядер фтора, а на 1 мл Перфторана $6,7 \times 10^{20}$. Этот метод позволяет также дать оценку чувствительности, определяя минимальное количество возбуждаемых ядер фтора, которое должно находиться в визуализируемом вокселе – для 7-Тл МРТ системы это $\sim 10^{18}$.

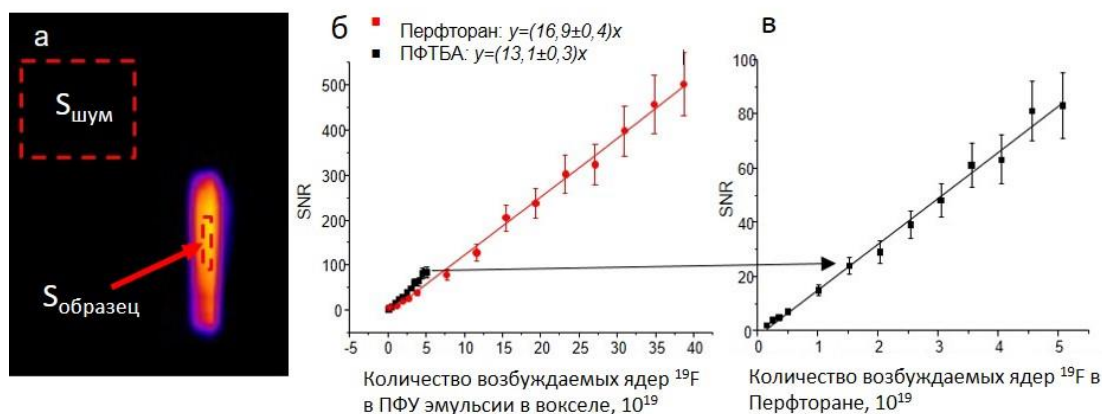


Рис. 12. а: графики зависимости SNR на ^{19}F МРТ изображениях от количества возбуждаемых ядер фтора в единице объема; б: увеличенный график для Перфторана [A5]

Чтобы оценить количество ПФУ эмульсии, накопленной в различных органах или тканях, относительно изначально введенной дозы, рассчитываются среднее значение SNR области фторного сигнала и объем этой области. Используя соответствующие калибровочные графики, можно определить количество введенной эмульсии.

Известно, что крупно-элементные (>10 нм) эмульсии поглощаются клетками ретикулоэндотелиальной системы и разносятся по всему организму. Это делает возможным визуализацию воспалительных процессов в организме с помощью ^{19}F МРТ. При этом обычно упоминаются только печень и селезенка в качестве визуализируемых на ^{19}F МРТ изображениях участков накопления ПФУ эмульсий. Исследованием, описанным в § 4.5, удалось показать, что ПФУ эмульсии накапливаются также в тимусе и ближайших к нему лимфатических узлах [A5,A6,A8]. Количество ПФУ эмульсии, попадающей в тимус напрямую, зависит от способа введения – в случае внутрибрюшинной инъекции тимус накапливает больше эмульсии ($\approx 1.5\text{-}2\%$ от введенной дозы), чем в случае внутривенной инъекции ($<1\%$ от дозы) – рис.13.

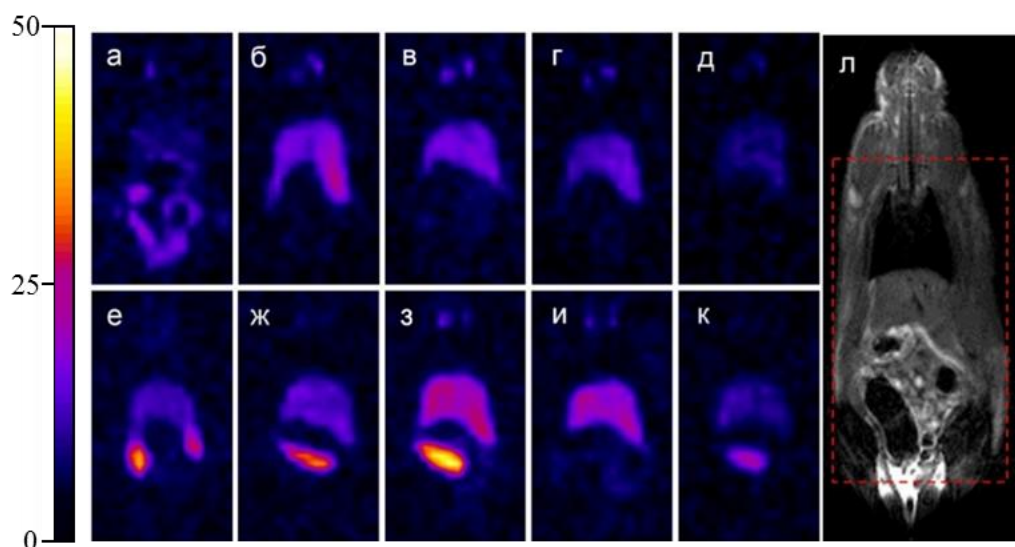


Рис. 13. а-д, е-к: ^{19}F МРТ изображений крыс (центральные срезы), которые были получены спустя 3 часа (а,е), на следующий (б,ж), 2-ой (в,з), 6-ой (г,и) и 35-ый (д,к) дни после внутрибрюшинного и внутривенного введений, соответственно; л: пример ^1H МРТ изображений крысы; Пунктирным прямоугольником обозначена область сканирования ^{19}F МРТ изображений; Цветовая шкала соответствует значению SNR на ^{19}F МРТ изображениях [A5]

Существуют данные [7,8], что макрофаги способны проникать в тимус после нагрузки антигеном на периферии, и что в тимусе присутствуют перитонеальные макрофаги. Эти данные объясняют, почему сигнал от тимуса на снимках выше в случае внутрибрюшинного введения эмульсии ПФУ по сравнению с внутривенным. Это связано с различиями в захвате наночастиц эмульсий макрофагами в зависимости от места

введения. В брюшной полости эмульсия поглощается перитонеальными макрофагами больше, чем в случае внутривенного введения.

Таким образом, было показано, что тимус можно визуализировать методом ^{19}F МРТ при использовании жидких ПФУ в качестве контрастных агентов. Такая методика представляет собой не просто способ визуализации определенных органов, это, прежде всего, оценка состояния иммунной системы, поскольку распределение эмульсии в организме напрямую зависит от активности и количества макрофагальных клеток.

В §4.6 проводилось исследование возможности использования Перфторана для визуализации воспалительных процессов. Несмотря на его низкую ^{19}F МРТ чувствительность была показана возможность визуализации опухолевых процессов в организме мышей. На рис. 14 представлены МРТ изображения, полученные на следующий день после внутривенного введения 0.25 мл Перфторана. Область опухоли подсвечивается на фторе не полностью, а только по периферии. Это связано со строением самой опухоли, которая имеет довольно большую область некроза, поэтому не полностью снабжается кровью.

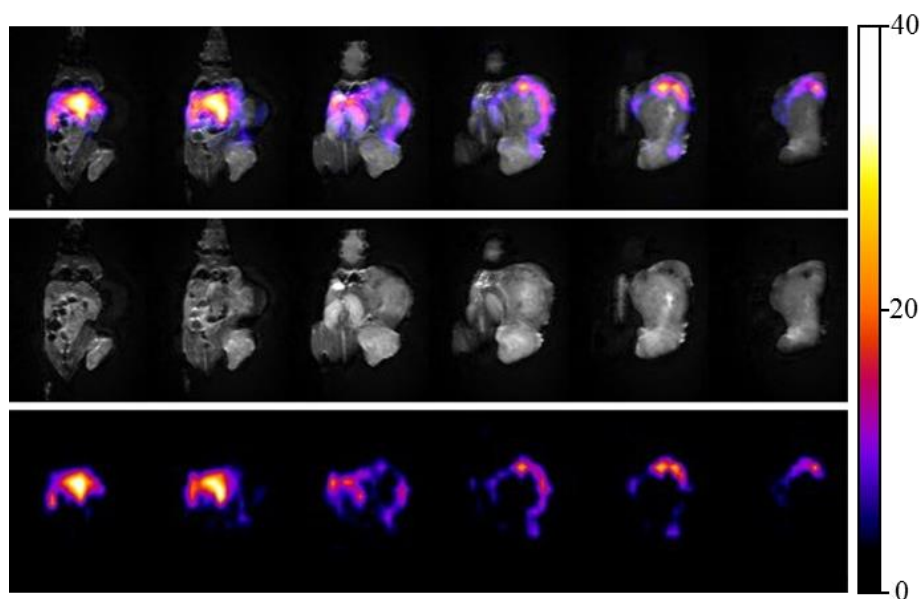


Рис. 14. ^{19}F (нижний ряд), ^1H (средний ряд) и $^{19}\text{F} + ^1\text{H}$ (верхний ряд) МРТ изображения мыши, полученные на следующий день после внутривенного введения Перфторана в дозе 0.25 мл

Таким образом, в четвертой главе, представлен разработанный в диссертации частотно-селективный метод визуализации Перфторана и показана перспективность его использования для визуализации воспалительных процессов, тимуса, а также оценки состояний иммунной системы. Выводы к четвертой главе приводятся в §4.7.

Пятая глава посвящена использованию фторуглеродных соединений в качестве

контраста для ^{19}F МРТ в клинических исследованиях ЖКТ человека на 0.5Тл МР томографе [А6,А8,А9]. В §5.1 содержится обзорная часть к главе. Представлены существующие методы диагностики ЖКТ и наработки в области МРТ. В §5.2 изложены материалы и методы, используемые в этой главе. Исследования проводились на 0.5-Тл МРТ системе (подробнее см. §3.2). Использовались чистые ПФУ – ПФД (основная составляющая Перфторана) и ПФТБА. Их спектры в поле 0.5 Тл представлены на рис. 15. В работе проводились *in vitro* эксперименты по оптимизации сканирования, а также *in vivo* исследования ЖКТ двух добровольцев (мужского пола весом 105 и 60 кг).

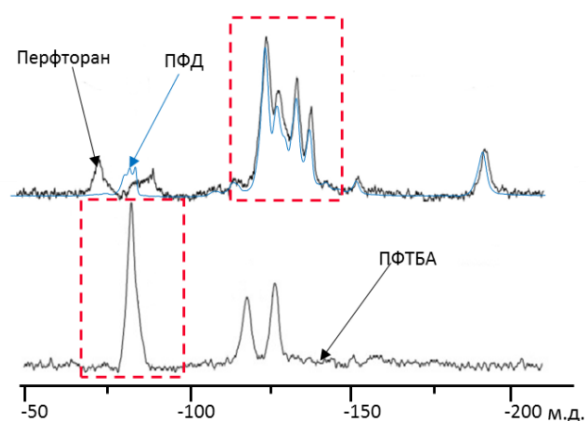


Рис. 15. ^{19}F ЯМР спектры Перфторана, ПФД и ПФТБА

В §5.3 описана процедура оптимизации параметров ИП. Плюсом перехода к слабопольным исследованиям является сужение полосы частот. Это позволяет возбуждать в полосе частот 0.5-Тл томографа большее число спектральных линий МРТ сигнала, чем в случае 7-Тл сканнера. На рис. 15 красной пунктирной линией показаны полосы возбуждения (ширина этой зоны ~ 0.7 кГц). В случае ПФД это соответствует возбуждению 16 ядер фтора (8 CF_2 групп) от транс-ПФД ($\sim 50\%$ от всего ПФД). В случае же ПФТБА в возбуждении участвуют 15 ядер фтора (3 CF_3 и 3 CF_2 группы). Учитывая их плотность и молекулярную массу (см. §4.2) количество возбуждаемых ядер фтора на единицу объема у ПФТБА оказывается всего в ~ 1.35 раз больше, чем у ПФД (в поле 7 Тл эта разница составляет ~ 5.4 раза, поскольку возбуждается только 4 ядра фтора от транс-ПФД). Сканирование проводилось в коронарной проекции по методике 3D GRE для зоны размерами $30 \times 30 \times 35 \text{ см}^3$ с разрешением $0.23 \times 0.23 \times 2.2 \text{ см}^3$, время сканирования капсулы с ПФД составило 20 мин. Благодаря более сильному сигналу ЯМР от капсулы с ПФТБА время сканирования удалось сократить до 5 минут. С помощью аналогичной ИП получались ^1H МР-изображения при времени сканирования 2 мин.

В §5.4 описаны результаты исследования ЖКТ в поле 0.5 Тл. Сначала было

проведено МРТ исследование с капсулой, содержащей ПФД, которую принял доброволец №1. Первое МРТ изображение было получено спустя 20 мин после перорального приема капсулы. Капсула к этому моменту уже находилась у входа в двенадцатиперстную кишку. В течение часа после приема капсула растворилась, и дальнейшее ее отслеживание в организме добровольца проводили методами локальной ЯМР спектроскопии. При этом сигнал регистрировался в основном от верхней части ЖКТ. Хотя ПФУ сильно липофобны и гидрофобны, нельзя исключить вероятность того, что небольшое количество всасывается через стенки кишечника, попадает в кровь и локализуется в печени/селезенке. Спустя 7 дней спектр ПФД практически не регистрировался в теле добровольца, что соответствовало времени выведения ПФД.

После этого проводились исследования с добровольцем №2, который принял нерастворимую капсулу с ПФТБА. Первое МРТ исследование было проведено через 4 минуты после приема капсулы – рис. 16б. В данный момент капсула располагалась у входа в двенадцатиперстную кишку. На рис. 16 приведены полученные изображения капсулы. Через 7 часов после приема капсулы, ее сигнал регистрировался области тонкой кишки.

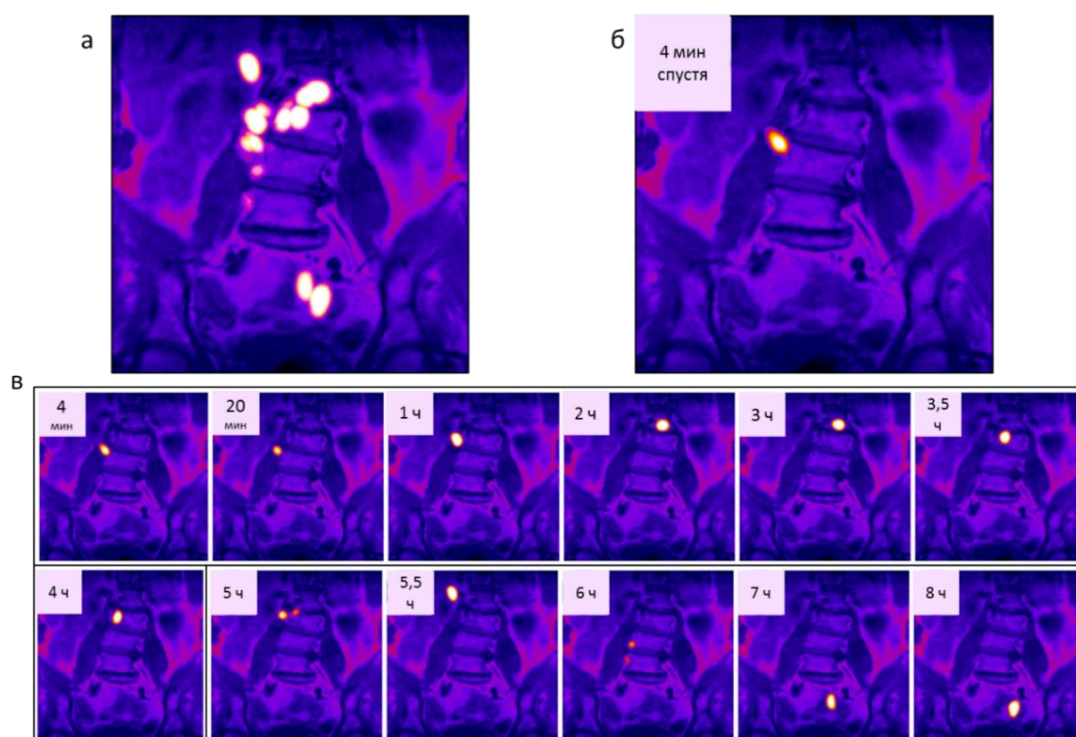


Рис. 16. Совместные $^{19}\text{F}+^1\text{H}$ МРТ изображения добровольца №2 после приема капсулы с ПФТБА; **а:** изображение, полученное путем наложения отдельных ^{19}F МРТ изображений, полученных в разное время после приема капсулы (**б,в**)

Подобное исследование ЖКТ является полезным и эффективным при анализе проходимости и моторики кишечника [9]. Стоит отметить, что перспективным для

исследования ЖКТ может быть также использование не капсул, заполненных ПФУ, а смоченной перфторуглеродами пищи, как это делается в случае применения бариевой каши при исследовании кишечного тракта с помощью КТ. В итоге можно утверждать, что полученные здесь результаты успешно демонстрируют перспективность применения ^{19}F МРТ для исследований ЖКТ в слабых магнитных полях. Выводы по пятой главе приводятся в §5.5.

В **Заключении** описана перспективность разработанных в работе методов для медицинской диагностики.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Показана эффективность использования газа ОФЦБ для ^{19}F МРТ легких в поле 7 Тл. Проведено сравнение его эффективности как контрастного препарата с использовавшимся ранее газом гексафторида серы и показано, что он обеспечивает усиление сигнала в 4.5 раза. Это позволило получить 3D изображения дыхательной системы (включая трахею и бронхи), предоставляющие информацию о вентилируемости различных отделов легких. Методика прошла успешные испытания при диагностике фиброза легких и ЛГ у крыс.
2. Разработаны методы оценки оксигенации и газообмена в легких при использовании газа ОФЦБ в качестве контраста для ^{19}F МРТ. Методика оксиметрии основана на первоначальном построении карт T_1 и апробирована на здоровых крысах и крысах с ЛГ. Метод оценки газообмена основан на способности газа ОФЦБ проникать в мембрану альвеол, причем химический сдвиг растворенной в мембране фазы ОФЦБ, как показано в диссертационной работе, отличается на ~ 4 м.д. от химического сдвига его газовой фазы. Селективный спектральный анализ этих фазовых компонент показал, что характерные времена выведения газовой и растворенной фазы ОФЦБ из организма составляют примерно 2 и 90 мин, соответственно.
3. Продемонстрирована возможность визуализации легких человека на слабопольном (0.5 Тл) клиническом МРТ оборудовании при использовании газа ОФЦБ в качестве контраста, что особенно актуально при работе с магнитами открытого типа и переносными системами. Показано, что за счет длительного времени продольной релаксации ОФЦБ можно применять менее чувствительные к неоднородностям постоянного поля ИП на основе спинного эхо.

4. Разработан метод ^{19}F МРТ визуализации тимуса. Показано, что жидкие ПФУ эмульсии накапливаются в тимусе в объеме, достаточном для визуализации. При этом количество ПФУ, попавшего в тимус, зависит от способа введения препарата и максимально при внутривенной инъекции. Также показано, что препарат Перфторан может успешно применяться в качестве контрастного агента в ^{19}F МРТ при доклинических исследованиях малых лабораторных животных в высоких магнитных полях (7 Тл) при визуализации опухолевых процессов.
5. Продемонстрирована возможность исследования проходимости и моторики ЖКТ с помощью ^{19}F МРТ на слабопольной (0.5 Тл) клинической системе при наблюдении за перемещением по ЖКТ капсул, заполненных ПФУ и предназначенных для перорального приема.

Список используемой литературы

1. Protopopov A., Gulyaev M.V., Pavlova O.S., Mokhova E.A., Pirogov Yu.A. Computation of the resonance frequencies of the transmission line resonators used in mri. *Magn Reson Imaging*. 61:167–174, 2019. doi:10.1016/j.mri.2019.05.002
2. Gulyaev M.V., Pavlova O.S., Volkov D.V., et al. The use of strong inductively coupled wireless surface coil and transmit/receive volume coil for $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ mri. *Appl Magn Reson*. 2019;50(1-3):403–413. doi: 10.1007/s00723-018-1086-y
3. Гуляев МВ, Павлова ОС, Волков ДВ, Анисимов НВ, Пирогов ЮА. Разработка и применение имплантных катушек для получения МРТ-изображений с высоким пространственным разрешением. Биомедицинская радиоэлектроника. 2018;4:41-51.
4. Dietrich O., Raya J.G., Reeder S.B., Reiser M.F., Schoenberg S.O. Measurement of signal-to-noise ratios in MR images: Influence of multichannel coils, parallel imaging, and reconstruction filters. *J Magn Reson Imaging*. 2007;26:375–385. doi: 10.1002/jmri.20969
5. Wild J.M., Woodhouse N., Paley M.N., et al. Comparison between 2D and 3D gradient-echo sequences for MRI of human lung ventilation with hyperpolarized ^3He . *Magn Reson Med*. 2004;52(3):673-8. doi: 10.1002/mrm.20164
6. Ferenz K.B., Steinbicke A.U. Artificial oxygen carriers- past, present and the future-a review of the most innovative and clinically relevant concepts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2019;jpet.118.254664; doi: https://doi.org/10.1124/jpet.118.254664
7. Esashi E., Sekiguchi T., Ito H., Koyasu S., Miyajima A. Cutting Edge: A Possible Role for CD4+ Thymic Macrophages as Professional Scavengers of Apoptotic Thymocytes. *J Immunol*. 2003;171:2773-2777. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.2773
8. Guyden J.C., Pezzano M. Thymic Nurse Cells: A Microenvironment for Thymocyte Development and Selection. *Int Rev Cytol*. 2003;223:1-37. doi:10.1016/s0074-7696(05)23001-2
9. Hahn T., Kozerke S., Schwizer W, et al. Visualization and Quantification of Intestinal Transit and Motor Function by Real-time Tracking of ^{19}F Labeled Capsules in Humans. *Magn Reson Med*. 2011;66:812–820. doi:10.1002/mrm.22822

Публикации автора по теме диссертации

В журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

- A1. Semenova VN, **Pavlova OS**, Pirogov YuA. Magnetic resonance imaging of lungs using fluorinated gas. *J Phys Conf Ser.* 2020;1439:012043. doi:10.1088/1742-6596/1439/1/012043 (Scopus 0.7)
- A2. **Павлова ОС**, Волков ДВ, Гуляев МВ, Костромина МС, Гервиц ЛЛ, Анисимов НВ, Пирогов ЮА. Магнитно-резонансная визуализация легких на ядрах фтора-19 с применением газа перфторциклобутана. *Медицинская физика.* 2017;75(4):59–64. (RSCI 0.290)
- A3. **Павлова ОС**, Семенова ВН, Гуляев МВ, Гервиц ЛЛ, Пирогов ЮА. Визуализация дыхательной системы лабораторных животных методом МРТ на ядрах фтора. *Журнал радиоэлектроники.* 2018;11:1-11. doi:10.30898/1684-1719.2018.11.16 (RSCI 0.423)
- A4. **Pavlova OS**, Anisimov NV, Gervits LL, Gulyaev MV, Semenova VN, Pirogov YuA, Panchenko VYa. 19F MRI of human lungs at 0.5 Tesla using octafluorocyclobutane. *Magn Reson Med.* 2020;84:2117-2123. doi:10.1002/mrm.28270 (WoS 3.858, Scopus 6.8)
- A5. **Pavlova OS**, Gulyaev MV, Anisimov NV, Silachev DN, Gervits LL, Pirogov YuA. New Aspects of Biodistribution of Perfluorocarbon Emulsions in Rats: Thymus Imaging. *Appl Magn Reson* (2020). doi:10.1007/s00723-020-01242-w (WoS 0.780, Scopus 1.6)
- A6. Anisimov NV, Gulyaev MV, **Pavlova OS**, Fomina DV, Glukhova VV, Batova SS, Pirogov YuA. Calculation of optimal parameters for 19F MRI. *J Phys Conf Ser.* 2017;886:012001. doi:10.1088/1742-6596/886/1/012001 (Scopus 0.7)
- A7. Anisimov NV, Gulyaev MV, Volkov DV, Batova SS, **Pavlova OS**, Fomina DV, Pirogov YuA. Optimization of mri parameters for the gradient echo method in fluorocarbon research. *Physics of Wave Phenomena.* 2017;25(2):140–146. doi:/10.3103/S1541308X1702011X (WoS 0.641, Scopus 1.4)
- A8. Anisimov NV, Gulyaev MV, **Pavlova OS**, Volkov DV, Gervits LL, Pirogov YuA. Multinuclear magnetic resonance imaging in biomedical experiments. *J Phys Conf Ser.* 2017;886:012006. doi:10.1088/1742-6596/886/1/012006 (Scopus 0.7)
- A9. Anisimov NV, **Pavlova OS**, Agafonnikova AG, Kosenkov AV, Fomina DV. Multinuclear Applications on 0.5T Magnetic Resonance Scanner. *Appl Magn Reson.* 2019;50:17-27. doi:10.1007/s00723-018-1081-3] (WoS 0.780, Scopus 1.6)