

На правах рукописи



ГОРОДЕЦКИЙ Артем Александрович

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ТОМОГРАФИИ ЭПР И ОМРТ ДЛЯ
ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОКСИГЕНАЦИИ И АЦИДОЗА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

01.04.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика
экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

**Научный
руководитель**

Багрянская Елена Григорьевна

доктор физико-математических наук, профессор

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук

**Официальные
оппоненты**

Мотякин Михаил Викторович

доктор физико-математических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук

Марьясов Александр Георгиевич

кандидат физико-математических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского
Сибирского отделения Российской академии наук

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт «Международный томографический центр» Сибирского
отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «16» октября 2019 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 003.014.02 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук по адресу: 630090, г. Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещен на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ученому секретарю диссертационного совета Д 003.014.02; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан «...» 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Развитие техники электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в низких магнитных полях открыло возможность его применения для изучения живых биологических объектов. Метод ЭПР способен регистрировать парамагнитные частицы – молекулы с неспаренными электронными спинами. Для изучения биологических объектов с помощью ЭПР возникает необходимость использования экзогенных парамагнитных зондов, спектральные характеристики которых способны меняться в зависимости от микроокружения. Таким образом, регистрируя спектр ЭПР спинового зонда, можно получать информацию об объекте исследования. Спектроскопический подход может быть расширен до пространственно разрешенных измерений с помощью использования градиентов внешнего магнитного поля. Также получение томографических изображений возможно с помощью метода двойного резонанса – Оверхаузер-усиленной магнитно-резонансной томографии (ОМРТ). В ОМРТ перенос спиновой поляризации электронных спинов парамагнитного зонда на ядерные спины протонов воды приводит к значительному усилению сигнала, который зависит как от мощности и частоты накачки ЭПР, так и от концентрации спинового зонда и параметров микроокружения. Оба метода томографии ЭПР и ОМРТ открывают уникальную возможность для неинвазивного исследования параметров микроокружения биологических объектов с помощью специально разработанных экзогенных парамагнитных зондов. Неинвазивное исследование микроокружения живых органов и тканей представляет значительный интерес для широкого спектра биомедицинских задач. Ведь, как известно, патологические процессы сопровождаются значительными нарушениями процессов метаболизма, приводя к существенным изменениям в биологической ткани.

Важными примерами таких патологий являются миокардиальная ишемия и раковая опухоль. В каждом из этих случаев концентрация кислорода и pH являются одними из наиболее важных показателей прогрессии развития патологии. Рост злокачественной опухоли происходит в условиях гипоксии из-за нарушения развития системы кровеносных сосудов. Низкая концентрация кислорода и чрезвычайно активный анаэробный гликолиз в быстро растущей опухоли являются причиной ее ацидоза. Кроме

того, глубокая гипоксия стимулирует развитие опухоли в более патологические формы и повышает риск метастазирования. При миокардиальной ишемии в результате закупорки коронарной артерии ишемическая область миокарда также испытывает дефицит кислорода. В условиях гипоксии энергетические функции кардиомиоцитов во многом зависят от анаэробного гликолиза, в результате чего происходит закисление миокардиальной ткани. Это, в свою очередь, ведет к нарушению ионного транспорта, деполяризации клеточной мембраны и нарушению сократительной функции сердца. В конечном счете, такие процессы приводят к некрозу миокардиальной ткани (инфаркт миокарда). Возобновление потока крови (реперфузия) необходимо для прекращения действия патогенных факторов ишемии. Однако реперфузия ишемической области может приводить к образованию активных форм кислорода, что ведет к дополнительному повреждению миокардиальной ткани. Неинвазивное исследование оксигенации и pH микроокружения тканей способно предоставить новую информацию о природе патологии, ее механизмах и динамике, и стать основой для разработки новых терапевтических методов лечения заболевания. Оба вида патологий представляют собой объекты исследования в данной диссертационной работе.

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени в научных работах, направленных на применение томографии ЭПР для визуализации парциального давления кислорода (pO_2) *in vivo*, основным объектом исследования являлись опухоли животных. Оксигенация миокардиальной ткани изучалась только с помощью спектроскопического подхода без получения пространственной информации о характере распределения концентрации кислорода. Таким образом, применение метода томографии ЭПР для визуализации оксигенации миокардиальной ткани при региональной ишемии и реперфузии восполнило пробел в этой области. Что касается важности развития метода ЭПР для измерения pH живых биологических тканей, то до 2016 года применение метода осуществлялось только в рамках спектроскопического подхода. Исследования, представленные в данной диссертации и посвященные визуализации ацидоза миокардиальной ткани при региональной ишемии, являются

первым применением метода томографии ЭПР для визуализации рН живого биологического объекта.

Метод ОМРТ неоднократно применялся для визуализации pO_2 и рН опухолей животных с использованием экзогенных зондов, чувствительных только к одному из параметров. В этой диссертационной работе был применен метод ОМРТ для одновременной визуализации оксигенации и ацидоза здоровых и опухолевых тканей мышей с использованием одного контрастного агента, обладающего чувствительностью к обоим параметрам pO_2 и рН. Следует отметить, что ранее эта идея была осуществлена только с помощью метода спектроскопии ЭПР, не позволяющей получение карт распределения параметров pO_2 и рН [1].

Таким образом, результаты, полученные в этой работе, обеспечивают хороший задел для дальнейшего развития методов томографии ЭПР и ОМРТ для визуализации концентрации кислорода и рН в живых биологических объектах.

Цели и задачи. Цель работы – развитие методов томографии ЭПР и ОМРТ для визуализации концентрации кислорода и рН в живых биологических тканях.

Для исследований миокардиальной ткани была выбрана модель изолированного и перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии, а в качестве спиновых зондов использовались pO_2 и рН-чувствительные нитроксильные радикалы. Идея одновременной визуализации pO_2 и рН была реализована с помощью монофосфорилированного триарилметильного радикала, спектр ЭПР которого, помимо чувствительности к pO_2 и рН, обладает чувствительностью к концентрации неорганического фосфата (Pi). Этот радикал уже зарекомендовал себя как перспективный спиновый зонд для измерения параметров микроокружения злокачественных образований с помощью спектроскопии ЭПР L-диапазона [1]. Было показано, что параметр Pi является новым важным показателем прогрессии развития патологии. В данной диссертационной работе спектроскопический подход был расширен до пространственно разрешенных измерений с помощью метода ОМРТ и был применен для изучения здоровой и опухолевой ткани молочной железы мышей. Для изучения оксигенации опухолей в качестве контрастного агента для ОМРТ также был использован триарилметильный радикал, спектр которого чувствителен только к значениям pO_2 .

Для достижения цели в совокупности было необходимо решение следующих *задач*:

1. Разработать алгоритм реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР, не искажающий спектральную информацию. С использованием разработанного алгоритма продемонстрировать возможность визуализации pO_2 и pH в экспериментах с фантомными образцами.

2. С использованием pO_2 -чувствительного нитроксильного радикала визуализировать оксигенацию миокарда при перфузии, региональной ишемии и реперфузии. С использованием pH-чувствительного нитроксильного радикала визуализировать pH миокарда при региональной ишемии.

3. Исследовать влияние концентрации кислорода на фактор утечки в экспериментах ОМРТ. Продемонстрировать значимость вызванного кислородом эффекта утечки спиновой поляризации с помощью томографии фантомных образцов и мышинных опухолей *in vivo*.

4. Получить выражения, позволяющие описать зависимость значений сигнала ОМРТ от мощности накачки ЭПР, концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и P_i для экспериментов с применением монофосфорилированного триарилметильного радикала. На основе полученных выражений разработать программные алгоритмы и продемонстрировать возможность одновременной визуализации концентрации контрастного агента и параметров pH, pO_2 и P_i в экспериментах с фантомными образцами.

5. Визуализировать распределение концентрации контрастного агента и параметров pH, pO_2 и P_i в молочной железе и опухолевой ткани мыши *in vivo*.

Научная новизна работы.

1. Впервые были получены карты оксигенации и pH изолированного перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии.

2. Впервые были одновременно получены карты оксигенации, pH и распределения концентрации неорганического фосфата в здоровой и опухолевой ткани молочной железы мыши.

Научная и практическая значимость работы. Проведенные исследования являются интересными и важными с точки зрения потенциального применения в биологии и медицине. Неинвазивное

изучение миокардиальной оксигенации и рН при ишемии и реперфузии может обеспечить понимание механизмов ишемического и реперфузионного повреждения, а также помочь в разработке новых терапевтических препаратов. Разработанный метод для одновременной визуализации рН, pO_2 и Pi является важным в исследовании онкогенеза и может внести вклад не только в понимание механизмов образования злокачественных образований, но и для изучения других патологий. Кроме того, на данный момент не существует других методов, способных одновременно визуализировать рН, pO_2 и Pi , что делает разработанный метод томографии в своем роде уникальным.

Личный вклад соискателя. Автор участвовал в постановке задач, разработке плана исследований, обсуждении результатов и подготовке текста публикаций по теме диссертации. Весь объем экспериментальных данных был получен и обработан непосредственно автором. Теоретическое описание, использованное для одновременной визуализации параметров рН, pO_2 и Pi , было разработано автором. Алгоритм реконструкции спектрально-пространственных томограмм был разработан совместно с к.х.н. Д.А. Комаровым.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждались на следующих школах и конференциях: 52-ая Международная научная студенческая конференция “МНСК-2014” (Новосибирск, 2014); III School for young scientists “Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics” (Novosibirsk, 2014); VII International conference on nitroxide radicals “SPIN-2014” (Зеленоградск, Россия, 2014); Молодежная конференция НИОХ СО РАН (Новосибирск, 2014); 53-ая Международная научная студенческая конференция “МНСК-2015” (Новосибирск, 2015); Joint Conference of 9th Asia-Pacific EPR/ESR Society Symposium 1st International EPR (ESR) Society Symposium 53rd SEST Annual Meeting “APES-IES-SEST 2014” (Нага, Япония, 2014); 7th EFEP summer school Advanced Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy (Берлин, Германия, 2015); The 49th Annual International Meeting of the ESR Spectroscopy Group of the Royal Society of Chemistry (Колчестер, Великобритания, 2016); International Conference on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging of Biological Systems (EPR-2017) (Моргантаун, США, 2017); III Inter-

national conference “Spin physics, spin chemistry and spin technology” (SPCT-2018) (Новосибирск, 2018); The third joint conference of the Asia-Pacific EPR/ESR Society and The International EPR (ESR) Society (IES) Symposium (Брисбен, Австралия, 2018).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и 10 тезисов российских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, результатов и выводов и списка литературы. Полный объем диссертационной работы составляет 119 страниц с 51 рисунком и 5 таблицами. Список литературы содержит 136 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложена актуальность темы диссертации, степень разработанности темы исследования, сформулированы основные цели и задачи работы, описаны новизна, практическая значимость, указаны методология и методы диссертационного исследования, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, апробация работы и дано описание структуры диссертации.

Первая глава представляет литературный обзор, описывающий состояние научных публикаций, посвященных применению ОМРТ, спектроскопии и томографии ЭПР для исследований живых биологических объектов *in vivo*. Также представлен обзор методов реконструкции томографического изображения, изложены общие математические принципы решения обратной задачи томографии, приведены теоретические основы описания сигнала ОМРТ, используемые для визуализации pO_2 и pH.

Во второй главе приведены методики приготовления образцов, описаны экспериментальные установки, и указаны условия проведения экспериментов, также описаны методы обработки данных и извлечения калибровочных параметров, в том числе и разработанный алгоритм реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР. Эксперименты на крысиных сердцах проводились с использованием спектрометра/томографа Eleksys E540 (Bruker) в НИОХ СО РАН. Эксперименты ОМРТ

проводились с использованием ОМРТ томографа Keller JXI-KC02 (Japan Redox Ltd.) в Университете Западной Виргинии (США).

Третья глава посвящена визуализации оксигенации и рН ишемического сердца крысы. В первом параграфе данной главы изложены результаты изучения свойств pO_2 -чувствительного нитроксильного радикала – изотопно-замещенного дикарбоксипроксила $^2H, ^{15}N$ -ДКП (Рисунок 1). Спиновый обмен между радикалами и парамагнитными молекулами кислорода приводит к уменьшению времени электронной спин-спиновой релаксации (T_2) и соответствующему уширению спектральных линий ЭПР. На рисунке 1с изображена зависимость лоренцевой составляющей ширины линии низкопольной компоненты спектра ЭПР от концентрации кислорода в растворе.



Рисунок 1. Структура (а) и спектр ЭПР (б) радикала $^2H, ^{15}N$ -ДКП. (с) Зависимость лоренцевой составляющей ширины линии спектра ЭПР от парциального давления кислорода.

В следующем параграфе обсуждаются свойства рН-чувствительного нитроксильного радикала RSG (Рисунок 2). В водных растворах радикал RSG находится в протонированной и депротонированной формах, имеющих разные константы сверхтонкого взаимодействия (СТВ), благодаря чему расстояние между крайними линиями в спектре ЭПР зависит от рН раствора. Данный факт является основой метода ЭПР для измерения рН растворов и биологических тканей.

В третьем параграфе обсуждаются достоинства и недостатки разработанного алгоритма реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР. В качестве основы алгоритма реконструкции был выбран метод алгебраического восстановления, так как он не требует использования дополнительных функционалов и процессов интерполяции для регуляризации и обработки данных. Главным достоинством разработанного алгоритма является то, что он не искажает спектральную информацию. Его отличительной

чертой является процесс аппроксимации спектральной информации в конце каждого итерационного цикла с помощью рационального приближения функции Войта [2], благодаря чему возможно введение априорной спектральной информации в реконструируемый объект. Разработанный алгоритм использовался для реконструкции томограмм как фантомных образцов, так и изолированного сердца крысы.

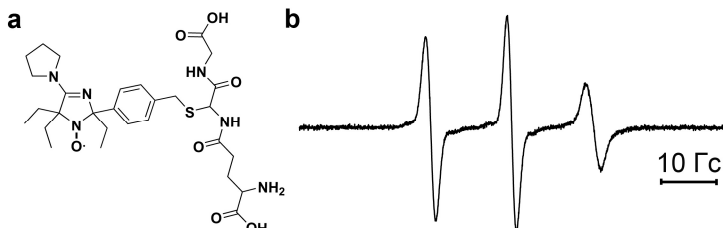


Рисунок 2. Структура (а) и спектр ЭПР (b) радикала RSG.

Четвертый параграф посвящен томографии фантомных образцов. Первый образец состоял из пробирки, наполненной насыщенным воздухом раствором радикала $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП, и вставленной внутрь неё ампулы с анаэробным раствором радикала такой же концентрации (Рисунок 3а). В качестве второго фантомного образца использовались три ампулы, наполненные раствором радикала RSG при различных значениях pH (5,6, 6,6 и 7,6, Рисунок 3б). Как видно из рисунка 3а, трубки с не содержащим кислород и насыщенным воздухом растворами хорошо различимы. Ширина линии ЭПР в центральной трубке составляет 170 ± 15 мГс, в то время как во внешней трубке равна 250 ± 25 мГс. Для второго фантомного образца наблюдаемые значения тоже хорошо отражают реальные значения pH растворов. Действительно, полученные в эксперименте значения pH в ампулах составляют $5,57 \pm 0,17$, $6,57 \pm 0,05$ и $7,66 \pm 0,14$. Таким образом, была продемонстрирована возможность пространственно разрешенных измерений концентрации кислорода и pH.

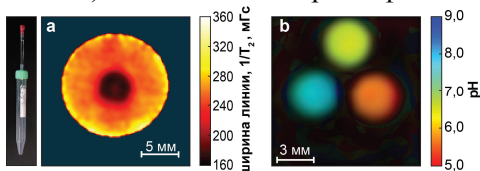


Рисунок 3. (а) Карта распределения лоренцевой ширины линии в фантомном образце. (b) Карта распределения pH в фантомном образце.

В последнем параграфе третьей главы изложены результаты применения разработанных методов для визуализации оксигенации и pH изолированного перфузируемого сердца крысы. На рисунке 4 приведены двумерные карты интенсивности сигнала ЭПР спинового зонда в сердце крысы и карты оксигенации во время перфузии, ишемии и реперфузии. На полученных изображениях видно, что наблюдаемая концентрация кислорода в здоровой ткани при нормальной перфузии составляла 0,24-0,37 мМ. Было установлено, что после наложения лигатуры (нить для перевязки) на нисходящую ветвь левой коронарной артерии концентрация кислорода в ишемической области снизилась до 0,03-0,08 мМ. В свою очередь, при реперфузии, когда лигатура была снята, оксигенация миокардиальной ткани восстановилась не полностью и составляла примерно 0,12 мМ. На рисунках 4г и 4h приведены полученные карты интенсивности сигнала ЭПР и pH в сердце крысы при региональной ишемии. Как видно из рисунков, pH здоровой ткани составлял около 7,4, что соответствует pH буферного раствора, использованного для перфузии сердца. В то же время в ишемической области наблюдалось закисление ткани (миокардиальной ацидоз) до значений pH 6,7-6,9.

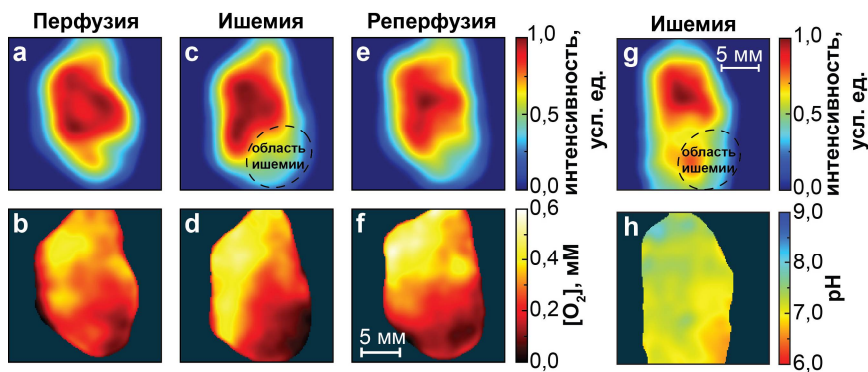


Рисунок 4. Томограммы ЭПР перфузируемого изолированного сердца крысы. (a, b), (c, d) и (e, f) Двумерные распределения интенсивности сигнала спинового зонда и карты оксигенации миокардиальной ткани во время перфузии (слева), региональной ишемии (в центре) и реперфузии (справа). (g, h) Распределение спинового зонда в миокардиальной ткани и карта значений pH во время региональной ишемии.

Четвертая глава диссертации посвящена визуализации концентрации контрастного агента, pO_2 , pH и P_i в здоровой и опухолевой ткани мышей. Материал данной главы разделен на три части.

В первой части приведены полученные теоретические и полужемпирические выражения для описания зависимости сигнала ОМРТ от концентрации контрастного агента (C), pO_2 , pH и P_i . В последующих частях четвертой главы эти выражения были использованы для численного решения обратных задач с помощью разработанных программных алгоритмов.

Во второй части приведены результаты исследования влияния кислорода и других парамагнитных агентов на усиление сигнала, вызванное эффектом Оверхаузера. В качестве основного контрастного агента использовался пердейтерированный Финский триарилметильный радикал (dTAM, Рисунок 5). Экспериментально было показано, что максимальное усиление сигнала уменьшается в присутствии дополнительной парамагнитной примеси (Рисунок 6). В качестве примесей в экспериментах использовались кислород, нитроксильный радикал и комплекс гадолиния. Было установлено, что для количественного описания этого эффекта необходимо ввести дополнительный

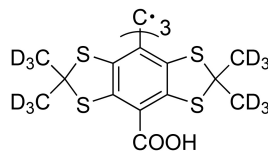


Рисунок 5. Структура триарилметильного радикала dTAM.

процесс релаксации и соответствующую константу скорости утечки спиновой поляризации в фактор утечки. Необходимо отметить, что ранее этот эффект не учитывался [3]. В связи с этим было решено исследовать значимость эффекта с помощью томографических экспериментов на фантомных образцах и опухолевой ткани мышей *in vivo*.

На рисунке 7 представлены карты распределения концентрации контрастного агента и кислорода в фантомном образце, состоящем из четырех пробирок. Карты были рассчитаны двумя способами – принятым в литературе методом и с учетом влияния кислорода на фактор утечки. Анализ средних значений для каждой пробирки показал, что пренебрежение влиянием кислорода на фактор утечки приводит к существенному занижению как вычисленных значений pO_2 , так и концентрации агента.

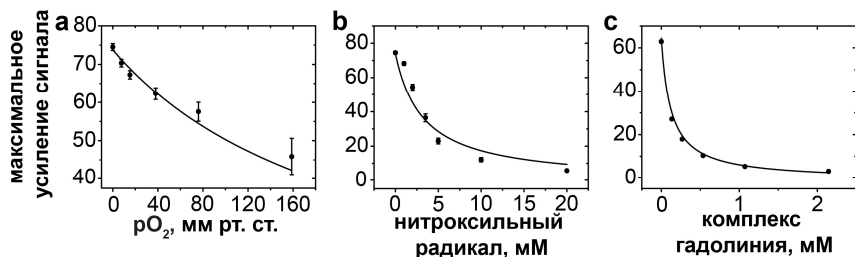


Рисунок 6. Зависимость максимального усиления сигнала МРТ от концентрации парамагнитной примеси: (а) кислорода, (б) нитроксильного радикала (3-карбамоил-проксил), (с) комплекса гадолиния (Gd-DTPA).

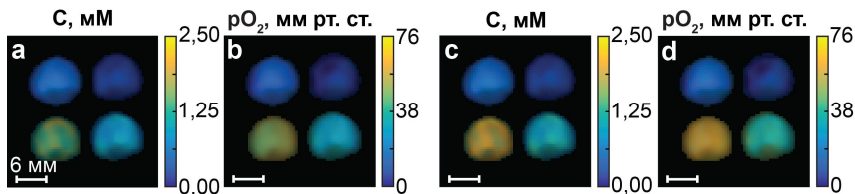


Рисунок 7. Карты распределения контрастного агента (C) и pO_2 в фантомном образце. Карты (а, б) и (с, д) соответствуют вычислениям без и с учетом эффекта влияния кислорода на фактор утечки.

После успешных томографических экспериментов с фантомными образцами были проведены эксперименты на животных. На рисунке 8 изображены двумерные распределения pO_2 и контрастного агента в опухоли мыши. Карты pO_2 показывают наличие двух областей, соответствующих гипоксичному и нормоксичному (нормальному содержанию кислорода) микроокружению опухоли. Для двух способов расчета в области гипоксии средние парциальные давления кислорода и стандартные отклонения равны 17 ± 7 и 23 ± 9 мм рт. ст. Средние значения pO_2 для нормоксичной области в 2-3 раза выше и составляют 43 ± 5 мм рт. ст. и 60 ± 8 мм рт. ст., в то время как средние значения pO_2 для целой опухоли составляют 24 мм рт. ст. и 34 мм рт. ст. для вычислений без и с учетом индуцированной кислородом утечки спиновой поляризации. Аналогичная картина наблюдалась для другой опухоли, представленной на рисунке 9, где изображены двумерные проекции трехмерных карт контрастного агента и давления кислорода в опухоли, а также гистограммы распределения pO_2 . Анализируя полученные данные, было показано, что пренебрежение влиянием кислорода на фактор утечки при больших значениях pO_2 в диапазоне 30-80 мм рт. ст.

может привести к существенным вычислительным ошибкам равным 10-20 мм рт. ст.

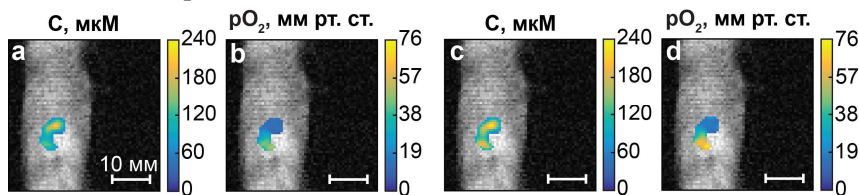


Рисунок 8. Двумерные карты распределения контрастного агента (C) и pO_2 в опухоли мыши. Карты (a, b) и (c, d) соответствуют вычислениям без и с учетом эффекта влияния кислорода на фактор утечки. Карты совмещены с изображением МРТ.

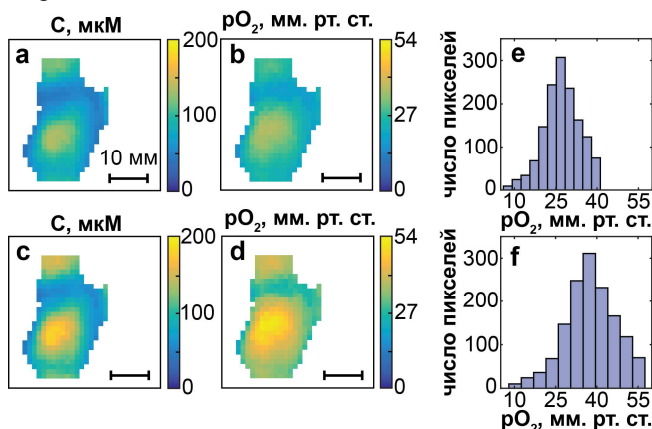


Рисунок 9. (a, b) и (c, d) Двумерные проекции трехмерных карт распределения контрастного агента (C) и pO_2 в опухоли мыши. (e, f) Гистограммы распределения pO_2 в опухоли. Рисунки (a, b, e) и (c, d, f) соответствуют вычислениям без и с учетом эффекта влияния кислорода на фактор утечки.

В третьей части четвертой главы диссертации изложены результаты исследования, направленного на разработку метода для одновременной визуализации параметров C, pO_2 , pH и P_i в здоровой и опухолевой ткани мышей. Для данных задач в качестве контрастного агента использовался пердеитерированный монофосфорилированный триарилметильный радикал (dpTAM, Рисунок 10). Радикал dpTAM при промежуточных значениях pH ($6 < \text{pH} < 8$) в водных растворах находится в протонированной и депротонированной формах. Так как данные формы имеют разные константы СТВ, в спектрах ЭПР и динамической поляризации ядер (ДПЯ)

наблюдаются четыре спектральные линии (Рисунок 11a). На рисунке 11b представлена высокочастотная компонента спектра ДПЯ радикала dpTAM, где левая компонента соответствует депротонированной, а правая протонированной форме. Как показано на рисунке 11c, спектральные линии перекрываются, что приводит к эффекту смешивания, то есть, возбуждая конкретную форму на ее резонансной частоте, частично в процесс переноса спиновой поляризации вовлекается вторая форма радикала. Описанный процесс был учтен в уравнениях для эффекта Оверхаузера путем введения факторов перекрывания спектральных линий:

$$\begin{aligned} E_R^{456,6} &= |1 - E_R^{inf} \cdot f \cdot S_R| + E_{RH}^{456,6}, \\ E_{RH}^{457} &= |1 - E_{RH}^{inf} \cdot f \cdot S_{RH}| + E_R^{457}, \end{aligned} \quad (1)$$

где индексы R и RH соответствуют депротонированной и протонированной форме радикала, $E_R^{456,6}$ и $E_{RH}^{456,6}$ – факторы усиления сигнала, E_R^{inf} и E_{RH}^{inf} – факторы усиления сигнала при бесконечной мощности и концентрации контрастного агента, f – фактор утечки, S_R и S_{RH} – факторы насыщения, $E_{RH}^{456,6}$ и E_R^{457} – факторы перекрывания. Было показано, что полученные выражения корректно описывают экспериментальные данные для депротонированной и протонированной формы радикала.

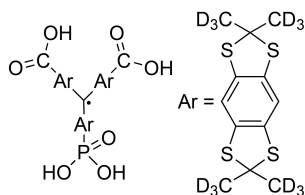


Рисунок 10. Структура триарилметильного радикала (dpTAM).

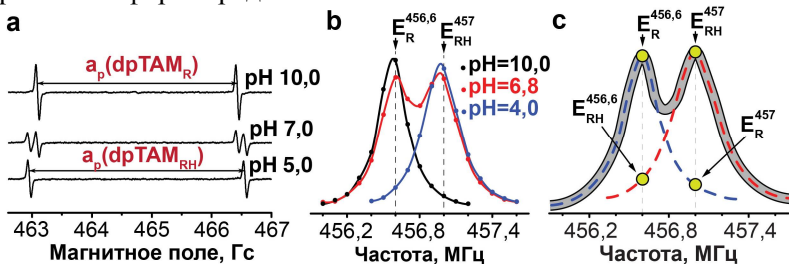


Рисунок 11. (a) Спектр ЭПР радикала dpTAM. $a_p(dpTAM_R)$ и $a_p(dpTAM_{RH})$ – константы СТВ депротонированной и протонированной формы радикала. (b) Высокочастотная компонента спектра ДПЯ 1 мМ раствора dpTAM при значениях pH 4,0, 6,8, 10,0. (c) Иллюстрация эффекта перекрывания двух спектральных компонент, соответствующих депротонированной и протонированной форме радикала. $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} – факторы

усиления сигнала для депротонированной и протонированной формы, $E_{RH}^{456,6}$ и E_R^{457} – факторы перекрытия.

Было установлено, что отношение факторов усиления депротонированной, $E_R^{456,6}$, и протонированной формы, E_{RH}^{457} , в виде $(E_R^{456,6} + 1)/(E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2)$, помимо зависимости от pH, обладает зависимостью от мощности накачки ЭПР. Были получены следующие выражения:

$$\frac{E_R^{456,6} + 1}{E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2} = \frac{R_{max}(P) + R_{min}(P) \cdot 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}}, \quad (2)$$

$$R_{max}(P) = \frac{s_1 + \alpha P}{s_2 + 2\alpha P}, \quad R_{min}(P) = \frac{s_3 + \alpha P}{s_4 + 2\alpha P},$$

где R_{max} и R_{min} – максимальное и минимальное значения кривой титрования, P – мощность накачки, pK – константа диссоциации радикала, α – фактор эффективности резонатора, s_1 , s_2 , s_3 и s_4 являются экспериментально определяемыми параметрами. На рисунке 12 приведена зависимость рассматриваемого отношения от pH, и показано, что параметры R_{max} и R_{min} действительно являются функциями от мощности накачки.

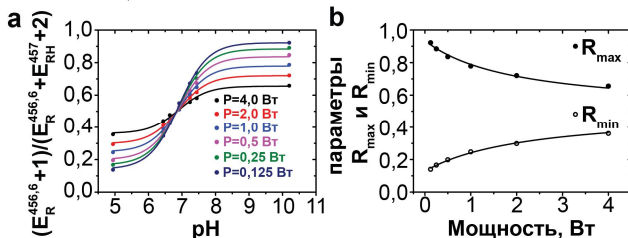


Рисунок 12. (а) Зависимость отношения факторов усиления $(E_R^{456,6} + 1)/(E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2)$ от pH при разных мощностях накачки ЭПР ($C = 1$ мМ, $pO_2 = 0$ мм рт. ст.). (б) Зависимость максимальных, R_{max} , и минимальных, R_{min} , значений кривой титрования pH от мощности накачки ЭПР.

Известно, что реакция протонного обмена радикала dpTAM с неорганическим фосфатом приводит к слиянию двух спектральных линий ЭПР [1]. В данной главе было показано, что интенсивность спектра ДПЯ в точке, находящейся между пиками спектральных линий двух форм ($E_m^{456,8}$), зависит от концентрации фосфатного буфера. Данный эффект проиллюстрирован на рисунке 13а, где изображена высокочастотная компонента спектра ДПЯ радикала

дрТАМ при разных концентрациях фосфатного буфера (от 0 до 5 мМ). Этот экспериментальный факт позволил разработать полуэмпирическое описание отношения $F(P) = E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ для определения P_i :

$$\begin{aligned} F(P)/F(P \rightarrow \infty) &= (g_+ + \alpha \cdot P)/(g_m + \alpha \cdot P), \\ g_+ &= (b_0 + C \cdot (b_1 + b_2 \cdot 10^{pK-pH})/(1 + 10^{pK-pH}) + b_3 \cdot pO_2)^2, \\ g_m &= b_4 \cdot g_+ - g_{Pi}, \\ g_{Pi} &= P_i \cdot \frac{|b_5 - (b_6 - b_7 \cdot P_i) \cdot pO_2 + (b_8 - b_9 \cdot P_i) \cdot C|}{1 + 10^{b_{10}-pH}}, \end{aligned} \quad (3)$$

где b_i экспериментально определяемые параметры. На рисунке 13b приведены характерные зависимости этого отношения от мощности накачки ЭПР при различных значениях C , pO_2 , pH и P_i (Рисунок 13c).

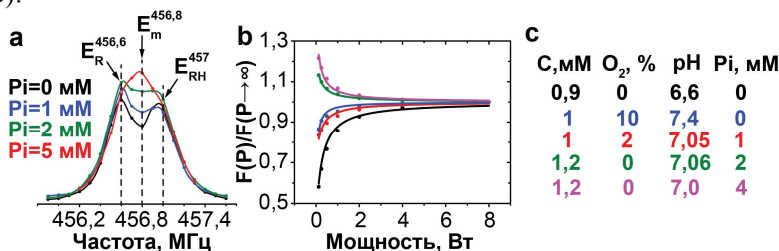


Рисунок 13. (а) Высокочастотная компонента спектра ДПЯ 1 мМ раствора дрТАМ в присутствии 0, 1, 2, 5 мМ фосфатного буфера при pH 6,9. (б) Зависимость отношения $F(P) = E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ от мощности, при разных значениях концентраций контрастного агента, кислорода, pH и фосфатного буфера, приведенных на рисунке (с).

Разработанный подход для определения C , pO_2 , pH и P_i был продемонстрирован на фантомных образцах с использованием шести изображений ОМРТ, полученных при трех частотах (456,6, 456,8, 457 МГц) и двух мощностях накачки ЭПР. На рисунке 14 изображены полученные двумерные карты распределения параметров для трех фантомных образцов. Каждый образец состоял из четырех ампул, заполненных раствором радикала дрТАМ при различных значениях C , pO_2 , pH и P_i . Фантомные образцы демонстрируют возможность одновременной визуализации следующих параметров: pO_2 и pH (Рисунки 14а и 14b), C и pO_2 (Рисунки 14с и 14d), P_i и pO_2 (Рисунки 14е-14f). Для всех образцов средние вычисленные значения находятся в согласии с экспериментальными значениями.

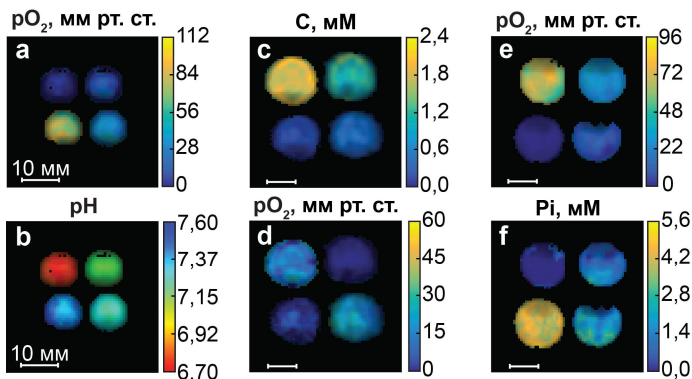


Рисунок 14. (a, b) Карты pO_2 и pH для первого фантомного образца (c, d) Карты распределения концентрации контрастного агента (C) и pO_2 для второго образца. (e, f) Карты pO_2 и Pi для третьего фантомного образца.

После успешных экспериментов с фантомными образцами были проведены эксперименты на животных *in vivo*. На рисунке 15 представлены карты распределения параметров C, pO_2 , pH и Pi в нормальной и опухолевой тканях молочной железы мышей. Томограммы показывают, что в нормальной ткани наблюдается практически однородное распределение высоких значений pO_2 , нейтральных значений pH и низких Pi . Средние значения параметров и их стандартные отклонения равны $1,0 \pm 0,4$ mM, 53 ± 6 мм рт. ст., $7,00 \pm 0,06$, $0,9 \pm 0,4$ mM для карт параметров C, pO_2 , pH и Pi соответственно. В то же время для злокачественного образования наблюдаются следующие характерные особенности: практически однородная область гипоксии, среднее значение pO_2 которой в два раза меньше значения для нормальной ткани; распределение pH с областями ацидоза и с нейтральными значениями pH; распределение Pi , среднее значение которого в два раза больше, чем для здоровой ткани. Средние значения параметров и их стандартные отклонения для опухолевой ткани равны $0,7 \pm 0,2$ mM, 26 ± 5 мм рт. ст., $6,95 \pm 0,07$, $2,2 \pm 0,6$ mM для карт параметров C, pO_2 , pH и Pi соответственно.

Аналогичные эксперименты были проведены для нескольких животных. Для того чтобы получить статистически достоверную информацию о характере распределения параметров, данные всех экспериментов были сгруппированы, как показано на рисунке 16. Из анализа данных гистограмм можно заключить, что значения pO_2

в опухоли описываются двумя нормальными распределениями, средние значения которых (27 ± 4 и 34 ± 11 мм рт. ст., здесь и далее приведено стандартное отклонение) существенно меньше среднего для нормальной ткани (45 ± 10 мм рт. ст.). Кроме того, распределение рН для злокачественной ткани сдвинуто относительно значений для здоровой ткани молочной железы примерно на 0,3 единицы рН в сторону кислых значений. В то же время многообразие значений P_i для опухолевой ткани описывается широким распределением со средним значением ($2,0 \pm 0,8$ мМ), практически в два раза превышающим значение для здоровой ткани ($1,3 \pm 0,3$ мМ). Таким образом, было показано, что два типа ткани имеют различные характеристики распределения параметров pO_2 , рН и P_i .

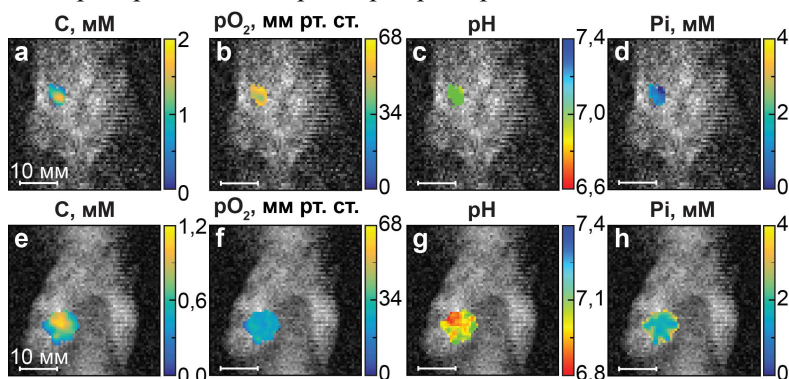


Рисунок 15. Карты концентрации контрастного агента (C), pO_2 , рН и P_i нормальной (a-d) и опухолевой (e-h) ткани молочной железы мышей. Карты совмещены с изображением МРТ.

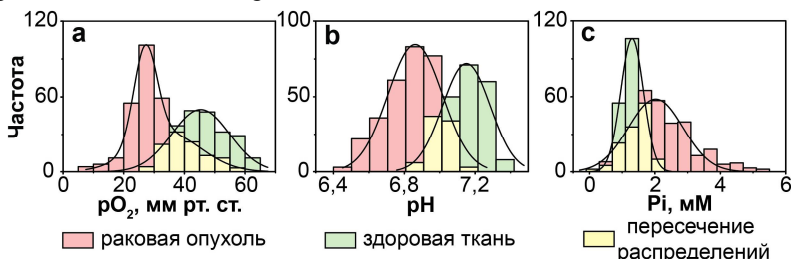


Рисунок 16. Гистограммы распределения параметров pO_2 (a), рН (b) и P_i (c) для опухолевой и здоровой ткани молочной железы мыши. Данные скомбинированы из нескольких томограмм (4 и 7 для опухолевой и здоровой ткани соответственно).

Результаты и Выводы

1. Разработан итерационный алгоритм реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР, позволяющий получать качественное изображение при относительно малом числе проекций, не искажая при этом спектральную информацию. С использованием разработанного алгоритма была продемонстрирована возможность визуализации pO_2 и рН в экспериментах с фантомными образцами.

2. Впервые были получены карты оксигенации и рН изолированного сердца крысы при региональной ишемии, а также карты оксигенации при перфузии и реперфузии.

3. Впервые в экспериментах ОМРТ было количественно исследовано влияние дополнительного парамагнитного агента на утечку спиновой поляризации в системе протоны воды – основной контрастный агент. С помощью экспериментов на фантомных образцах и опухолевых тканях *in vivo* было показано, что пренебрежение этим эффектом ведет к ошибкам определения значений концентраций контрастного агента и кислорода.

4. Получены полуэмпирические выражения для описания сигнала ОМРТ, позволяющие визуализировать параметры рН, pO_2 и Pi с использованием мультифункционального триарилметильного радикала в качестве контрастного агента. С использованием полученных выражений была продемонстрирована возможность одновременной визуализации концентрации контрастного агента и параметров рН, pO_2 и Pi в экспериментах с фантомными образцами.

5. Впервые одновременно были получены карты функциональных параметров рН, pO_2 и Pi в здоровой и опухолевой ткани молочной железы мыши *in vivo*. Анализ гистограмм искомых параметров выявил существенные различия в характере их распределения для нормальной и опухолевой ткани.

Цитируемая литература

1. Bobko A. A., Eubank T. D., Driesschaert B., Dhimitruka I., Evans J., Mohammad R., Tchekneva E. E., Dikov M. M., Khramtsov V. V. Interstitial inorganic phosphate as a tumor microenvironment marker for tumor progression //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – С. 41233.

2. Hui A. K., Armstrong B. H., Wray A. A. Rapid computation of the Voigt and complex error functions //Journal of Quantitative

Spectroscopy and Radiative Transfer. – 1978. – Т. 19. – №. 5. – С. 509-516.

3. Matsumoto S., Yasui H., Batra S., Kinoshita Y., Bernardo M., Munasinghe J. P., Utsumi H., Choudhuri R., Devasahayam N., Subramanian S., Mitchell J. B., Krishna M. C. Simultaneous imaging of tumor oxygenation and microvascular permeability using Overhauser enhanced MRI //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Т. 106. – №. 42. – С. 17898-17903.

Основные результаты изложены в следующих работах:

Статьи в международных рецензируемых журналах

[A1] **Gorodetsky A. A.**, Kirilyuk I. A., Khramtsov V. V., Komarov D. A. Functional electron paramagnetic resonance imaging of ischemic rat heart: Monitoring of tissue oxygenation and pH //Magnetic resonance in medicine. – 2016. – Т. 76. – №. 1. – С. 350-358.

[A2] **Gorodetskii A. A.**, Eubank T. D., Driesschaert B., Poncelet M., Ellis E., Khramtsov V. V., Bobko A. A. Oxygen-induced leakage of spin polarization in Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging: Application for oximetry in tumors //Journal of Magnetic Resonance. – 2018. – Т. 297. – С. 42-50.

[A3] **Gorodetskii A. A.**, Eubank T. D., Driesschaert B., Poncelet M., Ellis E., Khramtsov V. V., Bobko A. A. Development of multifunctional Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging for concurrent *in vivo* mapping of tumor interstitial oxygenation, acidosis and inorganic phosphate concentration //Scientific Reports. – 2019. doi: 10.1038/s41598-019-48524-3

Тезисы конференций

[A4] **Gorodetsky A.A.**, Komarov D.A., Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue pH and oxygenation // III School for young scientists “Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics”, September 7-11, 2014, Novosibirsk, Russia – P. 51.

[A5] **Gorodetsky A. A.**, Komarov D. A., Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue pH and oxygenation // VII International conference on nitroxide radicals “SPIN-2014”, September 14-20, 2014, Zelenogradsk, Russia – P. 71.

[A6] **Gorodetsky A.A.**, Kirilyuk I.A., Komarov D.A., Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue oxygenation and pH Joint Conference of 9th Asia-Pacific EPR/ESR Society Symposium, 1st International EPR (ESR) Society Symposium, 53rd SEST Annual Meeting, November 12-16, 2014, Nara, Japan – P-52.

[A7] **Gorodetskii A. A.**, Komarov D. A., Kirilyuk I. A. Functional EPR imaging of isolated and perfused rat heart: monitoring of tissue oxygenation and pH // The 49th Annual International Meeting of the ESR Spectroscopy Group of the Royal Society of Chemistry, April 3-7, 2016, Colchester, UK – P. T11, P13.

[A8] **Gorodetskii A. A.**, Bobko A. A., Driesschaert B., Poncelet M., Khramtsov V. V. Dynamic Nuclear Polarization Properties of phosphonated trityl radical: imaging of pH, oxygen and inorganic phosphate // Book of Abstracts of EPR 2017, July 16-22, 2017, Morgantown, USA – P. 84.

[A9] **Gorodetskii A. A.**, Bobko A. A., Driesschaert B., Poncelet M., Khramtsov V. V. Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging: simultaneous visualization of oxygen, pH and inorganic phosphate concentration // III International conference “Spin physics, spin chemistry and spin technology” (SPCT-2018), September 10-15, 2018, Novosibirsk, Russia – P. 60.

[A10] Bobko A.A., Driesschaert B., Poncelet M., **Gorodetskii A.**, Sanzhaeva U., Tseytlin M., Tseytlin O., Dikov M., Eubank T.D., Khramtsov V.V.. Novel EPR probes and instrumentation to profile tumor microenvironment // APES-IES 2018, Brisbane, Australia, September 23-27, 2018 – P. 33.

ГОРОДЕЦКИЙ Артем Александрович

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ ТОМОГРАФИИ ЭПР И ОМРТ ДЛЯ
ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОКСИГЕНАЦИИ И АЦИДОЗА
БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук