

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

На правах рукописи

ТРЕПАКОВА АЛЕКСАНДРА ИГОРЕВНА

**РАЗВИТИЕ МЕТОДА МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
ПО ЯДРАМ ^{13}C И ^{15}N ПОЛЯРИЗОВАННЫХ ПАРАВОДОРОДОМ
МОЛЕКУЛ**

1.3.17 Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Коптюг Игорь Валентинович

Новосибирск-2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
<i>Актуальность темы исследования</i>	6
<i>Степень разработанности темы исследования</i>	8
<i>Цели и задачи исследования</i>	9
<i>Научная новизна работы</i>	9
<i>Теоретическая и практическая значимость работы</i>	10
<i>Методология и методы исследования</i>	11
<i>Положения, выносимые на защиту</i>	11
<i>Степень достоверности полученных результатов</i>	12
<i>Личный вклад соискателя</i>	12
<i>Апробация результатов</i>	13
<i>Публикации</i>	13
<i>Соответствие специальности 1.3.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества</i>	14
<i>Объем и структура работы</i>	15
<i>Благодарности</i>	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Магнитно-резонансная томография	17
1.1.1. Основы магнитно-резонансной томографии	18
1.1.2. Создание МРТ изображения	20
1.1.3. Основные параметры, характеризующие МРТ	25
1.1.4. Гетероядерная томография	27
1.2. Методы гиперполяризации	29

1.2.1. Обзор методов гиперполяризации	29
1.2.2. Параводород.....	33
1.2.3. Индуцированная параводородом поляризация ядер (ИППЯ)	34
1.2.4. Усиление сигнала в процессе обратимого обмена.....	42
1.3. Перенос поляризации на гетероядро	45
1.3.1. Перенос поляризации на гетероядро в ИППЯ.....	46
1.3.2. Перенос поляризации на гетероядро в SABRE	50
1.4. Обзор работ по гетероядерной МРТ с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода	59
1.4.1. МРТ с использованием ИППЯ	59
1.4.2. МРТ с использованием SABRE.....	63
1.4.3. Особенности МРТ исследований с использованием методов гиперполяризации	64
1.5. Биосовместимость	64
1.6. Исследуемые молекулы и их значимость для исследований методом МРТ 66	
Пируват.....	68
Ацетат	70
Пиридин.....	70
Метронидазол и ниморазол	71
Никотинамид.....	71
Фампридин	72
4-Диметиламинопиридин	72
1.7. Обобщение литературного обзора и задачи исследования	72
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ.....	74

2.1. Материалы и реактивы	74
2.2. Получение параводорода	75
2.3. Методика проведения ИППЯ экспериментов	75
2.4. Методика проведения экспериментов SABRE.....	77
2.4.1. Эксперименты с ^{15}N -изотопологами метронидазола	77
2.4.2. Эксперименты с $^{15}\text{N}_3$ -ниморазолом	78
2.4.3. Эксперименты с переносом поляризации с помощью импульсных последовательностей	79
2.5. Параметры импульсных последовательностей для регистрации МР изображений	80
2.5.1. ^{13}C -этилацетат и ^{13}C -аллил пируват	81
2.5.2. $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_2$ -метронилазол.....	82
2.5.3. $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол	82
2.5.4. ^{15}N -пиридин и ^{15}N -никотинамид	82
2.5.5. 4-диметиламинопиридин и фампридин.....	83
2.5.6. ^{15}N -фампридин и H_2O	83
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	85
3.1. Сравнение эффективности методов переноса поляризации для гетероядерной МРТ с использованием ИППЯ с гидрированием по боковой цепи	85
3.1.1. Эксперименты с этилацетатом	85
3.1.2. Эксперименты с аллилпируватом	90
3.1.3. Эксперименты на томографе для животных	97
3.2. Гетероядерная МРТ с применением SABRE для создания гиперполяризации и использованием слабых магнитных полей для переноса поляризации на гетероядро	100

3.2.1. Эксперименты с метронидазолом	100
3.2.2. Эксперименты с ниморазолом.....	105
3.3. Гетероядерная МРТ с применением SABRE для создания гиперполяризации и использованием импульсных последовательностей для переноса поляризации на гетероядро.....	109
3.3.1. Оценка эффективности метода SLIC-SABRE	110
3.3.2. Выбор импульсной последовательности для МРТ в экспериментах с использованием SLIC-SABRE.....	117
3.3.3. ^{15}N МРТ соединений с естественным содержанием ядер ^{15}N	126
3.3.4. Сравнение уровней поляризации соединений с естественным содержанием ядер ^{15}N и обогащенных изотопом ^{15}N	131
3.3.5. ^{15}N ЗМ МРТ ^{15}N -фампридина.....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	144
ВЫВОДЫ	149
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	151
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ	170

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и магнитно-резонансной томографии (МРТ) получили широкое распространение не только в научных исследованиях, но и в медицинской диагностике. В научной практике данные методы используют для изучения протекания химических реакций, структур соединений, построения карт скоростей и температурных карт. В медицине МРТ используют для диагностики заболеваний, обнаружения патологических и воспалительных процессов, выявления опухолей. Такое большое распространение в медицине МРТ получила благодаря тому, что данный метод используется неинвазивно, то есть без вмешательства в организм и протекающие в нем биологические процессы.

Методы ЯМР и МРТ основаны на явлении магнитного резонанса. Интенсивность сигнала данных методов напрямую пропорциональна поляризации ядерных спинов в исследуемом образце. Поляризацией в ЯМР называется степень ориентации связанных с ядерным спином дипольных магнитных моментов по отношению к приложенному магнитному полю. Величина поляризации определяется разностью населенностей спиновых подуровней энергии с проекцией ядерного спина вдоль магнитного поля и против него. Из-за того, что энергия взаимодействия ядерных спинов с внешним магнитным полем крайне мала, разность населенностей спиновых состояний, определяемая в условиях теплового равновесия распределением Больцмана, также чрезвычайно мала. По этой причине методы ЯМР и МРТ обладают низкой чувствительностью в условиях теплового равновесия. В настоящий момент решение данной проблемы мировым научным сообществом осуществляется с помощью методов гиперполяризации. Они создают гиперполяризацию, то есть неравновесную заселенность спиновых уровней, что позволяет увеличить энергию взаимодействия ядерных спинов с внешним магнитным полем и, как следствие, чувствительность. В настоящее время

развитию и применению методов гиперполяризации ядерных спинов в мировой научной практике уделяется огромное внимание.

В данной работе использовались два метода: индуцированная параводородом поляризация ядер (ИППЯ) и усиление сигнала в процессе обратимого обмена (SABRE). Они основаны на использовании параводорода в реакции гидрирования в случае ИППЯ или в обратимом обмене в комплексе в случае SABRE. Параводородом называется спиновый изомер водорода, который обладает полным ядерным спином, равным нулю. Сам по себе параводород не наблюдаем в ЯМР. Однако соединения, которые гиперполяризованы с помощью методов ИППЯ или SABRE, обладают интенсивностью сигнала на 4-5 порядков большей, чем в случае теплового равновесия (без использования методов гиперполяризации).

Такое увеличение интенсивности сигнала значительно расширяет область применимости методов ЯМР и МРТ и позволяет наблюдать процессы и соединения, недоступные ранее. Например, значительное повышение чувствительности становится возможным при регистрации сигналов не только от протонов, но и от гетероядер (^{13}C , ^{15}N и др.). Основной проблемой использования гетероядер для регистрации сигнала является низкая интенсивность сигнала, которая возникает не только из-за низкой чувствительности метода, но и свойств самих гетероядер. Так, например, гиромагнитное отношение (γ) протонов примерно в 4 раза больше, чем γ ядер ^{13}C и примерно в 10 раз больше, чем γ ядер ^{15}N . Кроме того, естественное содержание изотопа ^1H в 100 раз больше, чем изотопа ^{13}C и ~ 280 раз больше, чем изотопа ^{15}N . Из-за того, что интенсивность сигнала в ЯМР и МРТ пропорциональна и γ , и естественному содержанию изотопа, ее значение в экспериментах с регистрацией сигнала по гетероядрам намного меньше, чем в экспериментах с регистрацией по протонам. В связи с этим методы гиперполяризации не только улучшают уже существующие методы исследований с помощью ЯМР и МРТ, но и увеличивают области применимости методов. В данной работе метод МРТ был применен для

получения МР изображений с использованием ядер ^{13}C и ^{15}N . В качестве объектов исследования были выбраны преимущественно совместимые с живыми организмами молекулы, которые в дальнейшем могут выступать в качестве контрастных агентов в *in vivo* исследованиях.

Таким образом, данная диссертационная работа посвящена решению актуальной проблемы – развитию гетероядерной магнитно-резонансной томографии с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время существует довольно много методов гиперполяризации ядерных спинов. Из них наиболее широко применяемыми являются динамическая поляризация ядер, спин-обменная накачка благородных газов, использование низких температур, ИППЯ и SABRE. Несмотря на то, что многие методы известны и применяются с конца XX столетия, методы гиперполяризации на основе параводорода для получения МР изображений по гетероядрам активно используются только с 2000-х годов. Наиболее популярными гетероядрами для регистрации сигнала являются ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F . Исследования с ядрами ^{15}N для регистрации МР изображений с применением методов гиперполяризации на основе параводорода отсутствовали до начала работ по теме данной диссертационной работы. Помимо создания гиперполяризации важным шагом является перенос поляризации на интересующее гетероядро. Для переноса существует два метода – применение слабых магнитных полей или импульсных последовательностей. Импульсные последовательности для переноса поляризации на гетероядро давно использовались в исследованиях ЯМР, однако, не применялись в МРТ экспериментах. В данной работе впервые объединено использование импульсных последовательностей для переноса поляризации на гетероядро и гиперполяризации на основе параводорода для получения МР изображений по гетероядрам.

Цели и задачи исследования

Цель работы – развитие метода гетероядерной магнитно-резонансной томографии с применением методов гиперполяризации на основе параводорода.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

- изучить эффективность различных методов для переноса поляризации на гетероядро в экспериментах по гетероядерной томографии с использованием индуцированной параводородом поляризации ядер с гидрированием по боковой цепи;
- изучить возможность применения импульсных последовательностей для переноса поляризации на гетероядро в экспериментах по гетероядерной томографии с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода;
- определить подходящие импульсные последовательности для регистрации МР изображений по гетероядрам в экспериментах с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода;
- оценить возможность использования методов гиперполяризации на основе параводорода для биомедицинских исследований.

Научная новизна работы

Проведено сравнение двух способов переноса поляризации на гетероядро в методе индуцированной параводородом поляризации ядер (ИППЯ) с гидрированием по боковой цепи для таких соединений как ^{13}C -этилацетат и ^{13}C -аллилпируват.

Выполнены ^{13}C 2М МРТ ^{13}C -этилацетата и ^{13}C -аллилпирувата, которые были гиперполяризованы с использованием метода ИППЯ с гидрированием по боковой цепи и импульсных последовательностей типа INEPT для переноса поляризации на гетероядро.

Были получены ^{15}N 2М МРТ $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола, $^{15}\text{N}_2$ - метронидазола и $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола с использованием метода SABRE и слабых магнитных полей

для переноса поляризации на гетероядро. Для $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола были зарегистрированы 16 последовательных ^{15}N 2М МР изображений, которые позволяют проследить за изменениями сигнала во времени.

Показано, что импульсная последовательность SLIC-SABRE для переноса поляризации на гетероядро применима для МРТ исследований с регистрацией сигнала по ядрам ^{15}N .

С помощью SLIC-SABRE гиперполяризованы такие соединения как ^{15}N -никотинамид, фампридин, ^{15}N -фампридин, 4-диметиламинопиридин.

Проведено сравнение двух импульсных последовательностей для регистрации ^{15}N МР изображений в экспериментах с использованием метода SLIC-SABRE.

Получены 2М ^{15}N МР изображения ^{15}N -никотинамида, фампридина, ^{15}N -фампридина, 4-диметиламинопиридина с использованием метода SLIC-SABRE.

Получено 3М ^{15}N МР изображение фампридина с использованием метода SLIC-SABRE.

Теоретическая и практическая значимость работы

Впервые получены МР изображения по ядрам ^{15}N с использованием метода SLIC-SABRE. Для ^{15}N -никотинамида, фампридина, ^{15}N -фампридина, 4-диметиламинопиридина получены 2М ^{15}N МР изображения, для фампридина также получено 3М ^{15}N МР изображение. Для каждого из субстратов были оптимизированы условия эксперимента и параметры импульсной последовательности SLIC-SABRE. В перспективе методология по получению ^{15}N МР изображений с помощью метода SLIC-SABRE является фундаментом для дальнейших практических применений в биомедицинской практике и для создания новых контрастных агентов.

Проведено сравнение эффективности методов переноса поляризации на гетероядро в исследованиях по ^{13}C МРТ с использованием ИППЯ с гидрированием по боковой цепи. Данные результаты дополняют имеющиеся текущие знания в области гетероядерной МРТ.

Получены МР изображения по ядрам ^{15}N с использованием метода SABRE и слабых магнитных полей для переноса поляризации для таких субстратов как $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол, $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол. Показано, что метод SABRE в совокупности с использованием слабых магнитных полей для переноса поляризации обеспечивают достаточную интенсивность сигнала, чтобы зарегистрировать последовательные изображения и пронаблюдать динамику изменения ^{15}N МР изображения.

Методология и методы исследования

В качестве основного метода исследования в диссертационной работе использовались спектроскопия ядерного-магнитного резонанса и магнитно-резонансная томография. Для усиления сигнала использовались методы индуцированной параводородом поляризации ядер и усиления сигнала в процессе обратимого обмена. Перенос поляризации на гетероядра проводился с использованием слабых магнитных полей и импульсных последовательностей.

Положения, выносимые на защиту

Результаты экспериментального сравнения двух методов по переносу поляризации на гетероядро ^{13}C в МРТ исследованиях с использованием индуцированной параводородом поляризации ядер. Использование слабых магнитных полей для переноса поляризации дает более высокие значения поляризации ядер ^{13}C и отношения сигнал/шум на МР изображениях таких соединений, как ^{13}C -этилацетат и ^{13}C -аллилпируват, чем использование импульсных последовательностей INEPT-типа.

Интенсивность сигнала, достигнутая методом SABRE с переносом поляризации на гетероядро ^{15}N с помощью слабого магнитного поля, является достаточной для регистрации МР изображений по ядрам ^{15}N таких соединений, как $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол, $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол.

Подход для получения МР изображений по ядрам ^{15}N с использованием метода SLIC-SABRE. На примере ряда соединений (никотинамид, 4-

диметиламинопиридин, фампридин) показано, что наиболее оптимальной для этого является импульсная последовательность FLASH.

Экспериментально установленная возможность получения двумерных и трехмерных МР изображений по ядрам ^{15}N с использованием метода SLIC-SABRE в комбинации с томографической импульсной последовательности FLASH.

Степень достоверности полученных результатов

Достоверность экспериментальных данных, анализа и выводов работы обеспечены использованием современного экспериментального оборудования и тщательной подготовкой к исследованию, а также высокой степенью воспроизводимости результатов экспериментов. Полученные экспериментальные данные согласуются с построенными теоретическими моделями и находятся в согласии с литературными данными, работами других групп. Корректность результатов работы также признана мировым научным сообществом, что подтверждается публикациями в ведущих рецензируемых международных журналах соответствующей тематики.

Личный вклад соискателя

Автор участвовал в планировании экспериментов, их проведении, анализе экспериментальных данных, обсуждение полученных результатов и их интерпретации. Автор участвовал в проведении всех исследований, описанных в работе, за исключением некоторых частей:

- спектроскопические исследования в работах с метронидазолом и ниморазолом на приборе 1.4 Тл (проведены к.х.н. О.Г. Сальниковым);
- моделирование уровней поляризации в экспериментах с использованием слабых магнитных полей и импульсных последовательностей типа INEPT для этилацетата и аллилпирувата (проведены В.П. Козиненко);
- эксперименты по подтверждению правильности выбранного слабого магнитного поля для переноса поляризации на гетероядро в молекулах этилацетата и аллилпирувата (проведены В.П. Козиненко);

- моделировании импульсной последовательности SLIC-SABRE для пиридина и фампридина (выполнено к.ф.-м.н. А.Н. Правдивцевым).

Подготовка тезисов докладов и статей проводилась автором совместно с научным руководителем и соавторами работ.

Апробация результатов

Основные результаты работы изложены в 7 статьях и были лично представлены автором и обсуждались на следующих школах и конференциях: OpenBio 2022 (Новосибирск, Россия, 2022), X International Voevodsky Conference "Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes" (Новосибирск, Россия, 2022), EUROISMAR-2019 (Берлин, Германия, 2019), ICMRM-2019 (Париж, Франция, 2019), Международная научная студенческая конференция МНСК-2019 (Новосибирск, Россия, 2019), The 7th Cross-Strait Magnetic Resonance Symposium (Тайбэй, Тайвань, 2018), V International School for Young Scientists (Санкт-Петербург, Россия, 2018).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus:

1. Pravdivtsev A. N., Skovpin I.V., **Svyatova (Trepakova) A.I.**, Chukanov N.V., Kovtunova L.M., Bukhtiyarov V.I., Chekmenev E. Y., Kovtunov K.V., Hövener J.-B. Chemical Exchange Reaction Effect on Polarization Transfer Efficiency in SLIC-SABRE // J. Phys. Chem. A. – 2018. – V. 122. – № 46. – P. 9107-9114. [DOI: 10.1021/acs.jpca.8b07163](https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b07163).

2. **Svyatova (Trepakova) A.**, Skovpin I.V., Chukanov N.V., Kovtunov K.V., Chekmenev E. Y., Pravdivtsev A.N., Hövener J.-B., Koptyug I.V. ¹⁵N MRI of SLIC-SABRE Hyperpolarized ¹⁵N-Labelled Pyridine and Nicotinamide // Chem. – A Eur. J. – 2019. – V. 25. – № 36. – P. 8465-8470. [DOI: 10.1002/chem.201900430](https://doi.org/10.1002/chem.201900430).

3. Skovpin I.V., **Svyatova (Trepakova) A.**, Chukanov N.V., Chekmenev E.Y., Kovtunov K.V., Koptyug I.V. ¹⁵N Hyperpolarization of Dalfampridine at Natural

Abundance for Magnetic Resonance Imaging // Chem. – A Eur. J. – 2019. – V. 25. – № 55. – P. 12694-12697. [DOI: 10.1002/chem.201902724](https://doi.org/10.1002/chem.201902724).

4. Salnikov O.G., Chukanov N.V., **Svyatova (Trepakova) A.**, Trofimov I.A., Kabir M.S.H., Gelovani J. G., Kovtunov K.V., Koptyug I.V., Chekmenev E. Y. ^{15}N NMR Hyperpolarization of Radiosensitizing Antibiotic Nimorazole via Reversible Parahydrogen Exchange in Microtesla Magnetic Fields // Angew. Chemie Int. Ed. – 2020. – V. 60. – № 5. – P. 2406-2413. [DOI: 10.1002/anie.202011698](https://doi.org/10.1002/anie.202011698).

5. Birchall J.R., Kabir M.S.H., Salnikov O.G., Chukanov N.V., **Svyatova (Trepakova) A.**, Kovtunov K.V., Koptyug I.V., Gelovani J.G., Goodson B.M., Pham W., Chekmenev E.Y. Quantifying the effects of quadrupolar sinks: Via ^{15}N relaxation dynamics in metronidazoles hyperpolarized via SABRE-SHEATH // Chem. Commun. – 2020. – V. 56. – № 64. – P. 9098-9101. [DOI: 10.1039/D0CC03994B](https://doi.org/10.1039/D0CC03994B).

6. **Svyatova (Trepakova) A.**, Kozinenko V.P., Chukanov N.V., Burueva D.B., Chekmenev E.Y., Chen Y.-W., Hwang D.W., Kovtunov K.V., Koptyug I.V. Phip hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate and $[1-^{13}\text{C}]$ acetate esters via PH-INEPT polarization transfer monitored by ^{13}C NMR and MRI // Sci. Rep. – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 5646. [DOI: 10.1038/s41598-021-85136-2](https://doi.org/10.1038/s41598-021-85136-2).

7. **Trepakova A.I.**, Skovpin I.V., Chukanov N.V., Salnikov O.G., Chekmenev E.Y., Pravdivtsev A.N., Hövener J.-B., Koptyug I.V. Subsecond Three-Dimensional Nitrogen-15 Magnetic Resonance Imaging Facilitated by Parahydrogen-Based Hyperpolarization // J. Phys. Chem. Lett. – 2022. – V. 13. – № 44. – P. 10253-10260. [DOI: 10.1021/acs.jpcclett.2c02705](https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.2c02705).

Соответствие специальности 1.3.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Диссертационная работа соответствует п. 1 «Атомно-молекулярная структура химических частиц и веществ, механизмы химического превращения, молекулярная, энергетическая, химическая и спиновая динамика элементарных процессов, теории скоростей химических реакций и экспериментальные методы исследования структуры и динамики химических

превращений, в том числе в межзвездной среде» Паспорта данной специальности.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и основных выводов, списка используемых сокращений, списка литературы и приложения. Полный объем диссертации составляет 171 страницу с 58 рисунками (из них 2 в приложении) и 4 таблицами. Список литературы содержит 172 наименования.

Работа проводилась по плану НИР Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института «Международного томографического центра» Сибирского отделения Российской академии наук (г. Новосибирск), в рамках проектов РФФИ 19-53-12013 (руководитель И.В. Коптюг), РФФИ 19-43-540004 (руководитель И.В. Коптюг), РФФИ 19-29-10003 (руководитель И.В. Коптюг), РФФИ 18-43-543023 (руководитель Н.В. Чуканов), РФФИ 18-33-20019 (руководитель И.В. Сковпин), РФФИ 17-54-33037 (руководитель И.В. Коптюг), РФФИ 16-03-00407 (руководитель И.В. Коптюг), РНФ 19-13-00047 (руководитель И.В. Коптюг), РНФ 17-73-20030 (руководитель К.В. Ковтунов), РНФ 21-73-10105 (руководитель О.Г. Сальников).

Благодарности

Автор выражает особую благодарность чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Коптюгу Игорю Валентиновичу за рекомендации, терпение, руководство и помощь в подготовке диссертации. Также автор благодарен своему первому научному руководителю в области ядерного магнитного резонанса – д.х.н. Ковтунову Кириллу Викторовичу, который научил работать в коллективе, ставить задачи и выполнять их.

Автор искренне благодарен к.ф.-м.н. Правдивцеву Андрею Николаевичу и д.ф.-м.н. Дзюбе Сергею Андреевичу за лекции и семинары по ядерному магнитному резонансу, которые развили у автора интерес к данной области.

Большая благодарность выражается коллективу лаборатории магнитно-резонансной микротомографии МТЦ СО РАН, с которыми мы прошли огонь, воду и пандемию. В частности:

- К.х.н. Д. Б. Буруевой за работу с производными ацетата и пирувата, поддержку и советы по ведению научной деятельности.
- К.х.н. О. Г. Сальникову за совместную работу с метронидазолом и ниморазолом и полезные научные дискуссии.
- К.х.н. И. В. Сковпину за совместную работу по развитию метода SLIC-SABRE и помощь в создании экспериментальных установок.
- К.х.н. Н. В. Чуканову за синтез соединений, которые использовались в работе.
- Е. В. Покочуевой за моральную поддержку.

Также автор благодарен проф., PhD Э. Ю. Чекменеву (Университет Уэйна, Детройт, США) за плодотворные научные дискуссии и продуктивное взаимодействие; PhD Д. В. Хвангу (Академия Синика, Тайбэй, Тайвань) за возможность выполнения совместных работ в Академии Синика с использованием оборудования для животных.

Автор выражает благодарность В. П. Козиненко за совместную работу с производными ацетата и пирувата, моделирование импульсных последовательностей.

Автор благодарен коллективу МТЦ СО РАН за благоприятную атмосферу в институте и возможность работы в комфортных условиях.

Также автор безгранично благодарен своей семье (И.С. Трепакову, Т.А. Литвиновой и Г. А. Литвинову) и друзьям за поддержку во всех начинаниях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Литературный обзор состоит из шести основных разделов. В первом разделе описаны принципы магнитно-резонансной томографии, второй раздел посвящен описанию методов гиперполяризации, в частности, методов на основе параводорода. Третий раздел раскрывает тему переноса гиперполяризации на гетероядра. Четвертый раздел представляет собой обзор работ с использованием методов гиперполяризации в гетероядерной магнитно-резонансной томографии. Пятый раздел уделяет внимание применимости методов гиперполяризации для исследования биологических объектов и описывает необходимые шаги для перехода от *in vitro* исследований к *in vivo*. В шестом разделе приведен обзор исследуемых в данной работе молекул.

1.1. Магнитно-резонансная томография

В настоящее время метод магнитно-резонансной томографии (МРТ) активно используется в биомедицинской практике для диагностики патологий внутренних органов, определения структур тканей, наблюдения за биологическими процессами внутри живого организма (пр., активностью головного мозга), контроля позиционирования иглы во время биопсии и других задач. Однако возможности МРТ настолько обширны, что она также активно используется в таких науках как химия, биология и физика. С помощью МРТ можно исследовать структуру и свойства материалов, диффузию, протекание химических реакций и образование промежуточных соединений, осуществлять термометрию и порометрию.

Явление магнитного резонанса было открыто в 1946 году Блохом [1] и Парселлом [2], которые в 1952 году получили Нобелевскую премию за свое открытие. Первое изображение было получено с помощью МРТ в 1973 году [3] с использованием протонов для регистрации. В качестве фантома использовались два тонких капилляра, заполненных водой и расположенные внутри трубки с дейтерированной водой.

1.1.1. Основы магнитно-резонансной томографии

Метод магнитно-резонансной томографии используется для регистрации пространственной информации об объекте. В МРТ используются похожие принципы, которые лежат в основе ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Во-первых, регистрация сигнала происходит от ансамбля спинов, который характеризуется суммарной намагниченностью \mathbf{M} . Во-вторых, сигнал генерируется при взаимодействии вектора \mathbf{M} с магнитными полями, в частности, с постоянным магнитным полем прибора \mathbf{B}_0 и переменным магнитным полем \mathbf{B}_1 . В равновесии вектор \mathbf{M} ориентирован по магнитному полю \mathbf{B}_0 . Вокруг вектора \mathbf{B}_0 спины вращаются с частотой ларморовской прецессии $\omega_0 = \frac{\gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi}$. Поворот вектора \mathbf{M} происходит с использованием радиочастотных (РЧ) импульсов, которые определяются переменным магнитным полем \mathbf{B}_1 , перпендикулярным по направлению магнитному полю \mathbf{B}_0 . РЧ импульсы обладают амплитудой B_1 и имеют некоторую длительность – эти два параметра определяют угол поворота α вектора намагниченности в плоскость, перпендикулярную \mathbf{B}_0 . Для простоты говорят, что поле \mathbf{B}_0 параллельно оси Z, а поворот вектора намагниченности происходит в плоскость XY. В-третьих, получение сигнала происходит путем регистрации наведенных в катушке токов, которые возникают из-за прецессии вектора намагниченности в плоскости XY вокруг оси Z. Такой сигнал также называют спадом свободной индукции (ССИ).

Фактически, при регистрации ССИ на образец воздействуют РЧ импульсом (такой импульс называется возбуждающим) с заданной энергией и значением частоты резонанса ω_0 в направлении, перпендикулярном \mathbf{B}_0 . Спины поглощают часть этой энергии и переходят из низкоэнергетического состояния (спин вверх) в высокоэнергетическое состояние (спин вниз). Такие переходы соответствуют вращению вектора намагниченности \mathbf{M} в плоскость XY. Величина резонансной энергии находится следующим образом: $\Delta E = \hbar \omega_0$, где \hbar – константа Планка и равняется 6.62×10^{-34} Дж·с. При длительном

воздействии на ансамбль спинов с достаточной энергией происходит полный поворот вектора намагниченности \mathbf{M} в плоскость XU , тогда говорят, что на систему воздействовали возбуждающим 90° -импульсом. При прекращении действия возбуждающего импульса происходит релаксация, а именно переход с возбужденных уровней на нижние с излучением энергии ΔE . Это соответствует повороту вектора намагниченности обратно в положение, параллельное магнитному полю \mathbf{B}_0 .

Важными параметрами ЯМР и МРТ экспериментов являются времена релаксации T_1 и T_2 . Время T_1 называется временем продольной или спин-решеточной релаксации, а T_2 – временем поперечной или спин-спиновой релаксации. При отклонении спиновой системы от состояния теплового равновесия начинают работать различные механизмы релаксации, которые возвращают ее в начальное состояние. В контексте ЯМР, о релаксации T_1 говорят при возвращении вектора намагниченности из плоскости XU обратно в состояние, параллельное оси Z . Такой процесс происходит из-за энергетического обмена между спинами и их окружением, в результате чего спины переходят из высокоэнергетического состояния в низкоэнергетическое состояние, которое статистически наиболее вероятно. Временем релаксации T_1 называется время, когда вектор намагниченности достигает примерно 63% (т.е., $(1 - \frac{1}{e}) \cdot 100\%$) от максимально возможного значения. Релаксация T_2 происходит в результате расфазировки спинов в плоскости XU из-за того, что спины в плоскости XU непрерывно взаимодействуют друг с другом без передачи энергии, что вызывает изменение фаз. Время релаксации T_2 соответствует времени, необходимому для падения значения поперечной намагниченности до 37% (т.е., $\frac{1}{e} \cdot 100\%$) от его начального значения. Время T_2 обычно меньше времени T_1 . При наличии неоднородностей магнитного поля \mathbf{B}_0 , вызванных, например, дефектами магнита, вводят время T_2^* , которое связано со временем T_2 следующим образом: $\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'}$, где T_2' учитывает релаксацию только за счет неоднородности поля \mathbf{B}_0 . В таком случае, если спины находятся в

немного разных локальных магнитных полях, то они прецессируют с разной скоростью, и расфазировка происходит быстрее. Время T_2^* может быть меньше или равно времени T_2 . Значения времен релаксации зависят от структуры молекулы, от приложенного магнитного поля, от процессов, протекающих в системе.

При регистрации простейшего спектра ЯМР с помощью 90° -импульса интенсивность сигнала ЯМР пропорциональна амплитуде намагниченности M в плоскости XY после завершения действия возбуждающего импульса, но до того как начал действовать механизм релаксации. Также важными параметрами являются частота сигнала и его фаза относительно фазы РЧ приемника сигнала. Если изначально все спины (одного типа) испытывали одно и то же значение магнитного поля \mathbf{B}_0 , то в ССИ будет наблюдаться лишь одна частота, однако на практике такого не наблюдается из-за разных локальных магнитных полей, вызванных как окружением, так и инструментальными неоднородностями. В результате этих неоднородностей ССИ состоит из множества сигналов с разным значением частот. При использовании преобразования Фурье можно перейти от временного пространства к пространству частот, где по относительным значениям интенсивностей разных пиков в спектре можно определить химический состав и структуру исследуемого образца.

Частота, соответствующая отдельному спину ω_i , формируется двумя источниками: магнитным полем \mathbf{B}_0 и молекулярным окружением, которое создает локальные магнитные поля и формирует химический сдвиг в спектре:

$$\delta_i [\text{м. д.}] = \frac{\omega_i [\text{Гц}] - \omega_{\text{отн}} [\text{Гц}]}{\omega_{\text{отн}} [\text{Гц}]} \cdot 10^6, \quad (1)$$

где $\delta_i [\text{м. д.}]$ – относительная частота спина, измеряемая в миллионных долях, $\omega_i [\text{Гц}]$ – частота прецессии выбранного спина, $\omega_{\text{отн}} [\text{Гц}]$ – частота, относительно которой проводятся измерения.

1.1.2. Создание МРТ изображения

Для регистрации МРТ изображения применяются градиенты магнитного поля. Магнитное поле в i -ой точке:

$$\mathbf{B}_i = \mathbf{B}_0 + \mathbf{G} \times \mathbf{r}_i, \quad (2)$$

где \mathbf{B}_i – магнитное поле в точке \mathbf{r}_i , а оператор « \times » - обозначает умножение матрицы \mathbf{G} на вектор \mathbf{r}_i . Самый простейший вариант использования градиентов – это применение линейного градиента к магнитному полю направленному по Z. Если использовать только градиент в направлении X, то для Z-компоненты магнитного поля данное выражение можно представить следующим образом:

$$B_z = B_{0z} + G_x \cdot x, \quad (3)$$

$$\text{где } G_x = \frac{dB_z}{dx}.$$

При использовании градиентов ларморовская частота прецессии становится зависимой от расположения спинов в пространстве: $\omega_i = \gamma \cdot (B_0 + \mathbf{G} \cdot \mathbf{r}_i)$, где ω_i – частота ларморовской прецессии в точке \mathbf{r}_i . С помощью градиентов магнитного поля становится возможным получить информацию о расположении спинов в пространстве. В МРТ экспериментах полученные данные записываются в матрицу k-пространства. Далее, с помощью двумерного или трехмерного преобразования Фурье (в зависимости от эксперимента) матрица преобразуется в двумерные или трехмерные изображения.

Пример простейшей импульсной последовательности для записи двумерного МР изображения представлен на Рисунок 1. Эта последовательность состоит из возбуждающего 90° -импульса, фазо-кодирующего и частотно-кодирующего градиента. Направления градиентов перпендикулярны друг другу. Например, частотно-кодирующий градиент направлен по оси X, а фазо-кодирующий по оси Y. Фазо-кодирующий градиент обычно включается между возбуждающим импульсом и читающим градиентом (см. Рисунок 1). Фазовое кодирование выполняется несколькими циклами, в каждом из которых изменяется амплитуда фазо-кодирующего градиента и, как следствие, величина расфазировки спинов. В итоге, между сигналами, полученными в каждом отдельном цикле, будет наблюдаться разница в фазах.

Причем чем ближе к изоцентру ($Y = 0$) находились спины, тем меньше они будут расфазироваться в каждом цикле. В дальнейшем по значениям

разницы фаз можно определить расположение в пространстве спинов, которые дают вклад в сигнал. Увеличение числа фазо-кодирующих циклов значительно увеличивает время эксперимента, так как для записи каждого нового цикла необходимо, чтобы система пришла в свое начальное состояние (отрелаксировала).

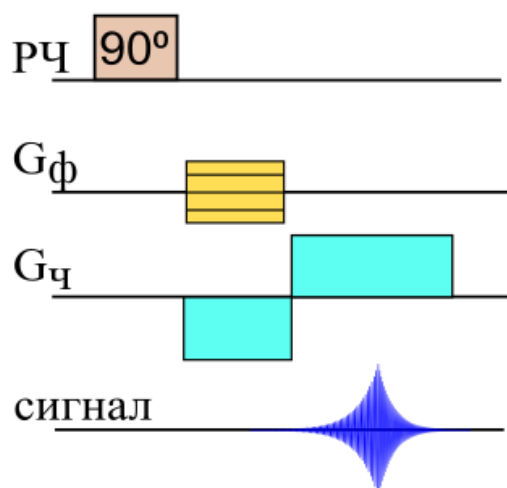


Рисунок 1. Простейшая импульсная последовательность для записи МР изображения. Оранжевый прямоугольник обозначает неселективный 90° РЧ импульс, желтый прямоугольник – фазо-кодирующий градиент магнитного поля G_ϕ , голубой прямоугольник – частотно-кодирующий градиент G_χ .

Для записи трехмерного изображения используется несколько подходов. Один из них заключается в добавлении третьего градиента (фазо-кодирующего градиента) по оси Z . Второй – в последовательной или одновременной записи нескольких двумерных слоев. Для этого перед регистрацией каждого двумерного слоя одновременно с возбуждающим РЧ импульсом необходимо включить градиент выбора слоя. В таком случае будут возбуждаться спины только в выбранном интервале. Второй метод регистрации 3М изображения занимает меньшее время, так как нет необходимости ждать пока произойдет релаксация сигнала для записи нового слоя.

Ранее была упомянута матрица, в которую записываются все необработанные данные до преобразования Фурье, данная матрица также называется k -пространством. Все записанные в матрицу числа являются комплексными, то есть содержат реальную и мнимую компоненты. Матрица

имеет симметрию, в которой верхняя правая четверть матрицы и нижняя левая четверть одинаковы. Также одинаковы верхняя левая и нижняя правая четверти матрицы. Центральная линия матрицы соответствует отсутствию расфазировочного градиента. Все линии, которые находятся ниже или выше центральной линии, соответствуют сигналам с ненулевым градиентом. Кроме того, из-за симметрии становится возможным, получив данные лишь о половине матрицы, восстановить ее оставшуюся часть. То есть можно произвести запись верхней или нижней части матрицы, либо правой или левой части, после чего восстановить вторую ее половину. Периферийные участки k -пространства соответствуют высоким частотам и отвечают за пространственное разрешение изображения, а центральная часть матрицы соответствует низким частотам и отвечает за отношение сигнал-шум (ОСШ) и контраст изображения.

При регистрации МР изображений используются понятия спинового и градиентного эха. Спиновое эхо возникает при воздействии на исследуемую систему последовательностью РЧ импульсов: первый импульс – 90° импульс, далее через время τ прикладывается 180° импульс и спустя еще время τ происходит запись сигнала, что соответствует максимуму спинового эха. Стоит отметить, что часто сигнал спинового эха записывают не от времени формирования максимума, а целиком. При возбуждении 90° импульсом вся намагниченность переходит в плоскость XY, в связи с релаксацией T_2 происходит расфазировка спинов, однако при применении 180° происходит процесс, обратный расфазировке из-за релаксации T_2^* , спины восстанавливают свои фазы, и сигнал возрастает. Такой сигнал называется «спиновым эхом» (см. Рисунок 2а). О градиентном эхе говорят, когда его формирование происходит с помощью градиентов магнитного поля, а не РЧ импульсов. Для формирования градиентного эха необходимо после применения частотно-кодирующего градиента одного знака, который вызывает расфазировку спинов, включить градиент, противоположный ему по знаку, тогда прецессия спинов будет происходить в направлении, противоположном начальной расфазировке, собирая сигнал обратно (см. Рисунок 2б). При работе с импульсными

последовательностями пользуются понятиями время эха (TE) и время повторения (TR). Время эха – это временной интервал между возбуждающим РЧ импульсом и пиком сигнала эха. Время повторения – это интервал между двумя последовательными повторениями импульсной последовательности.

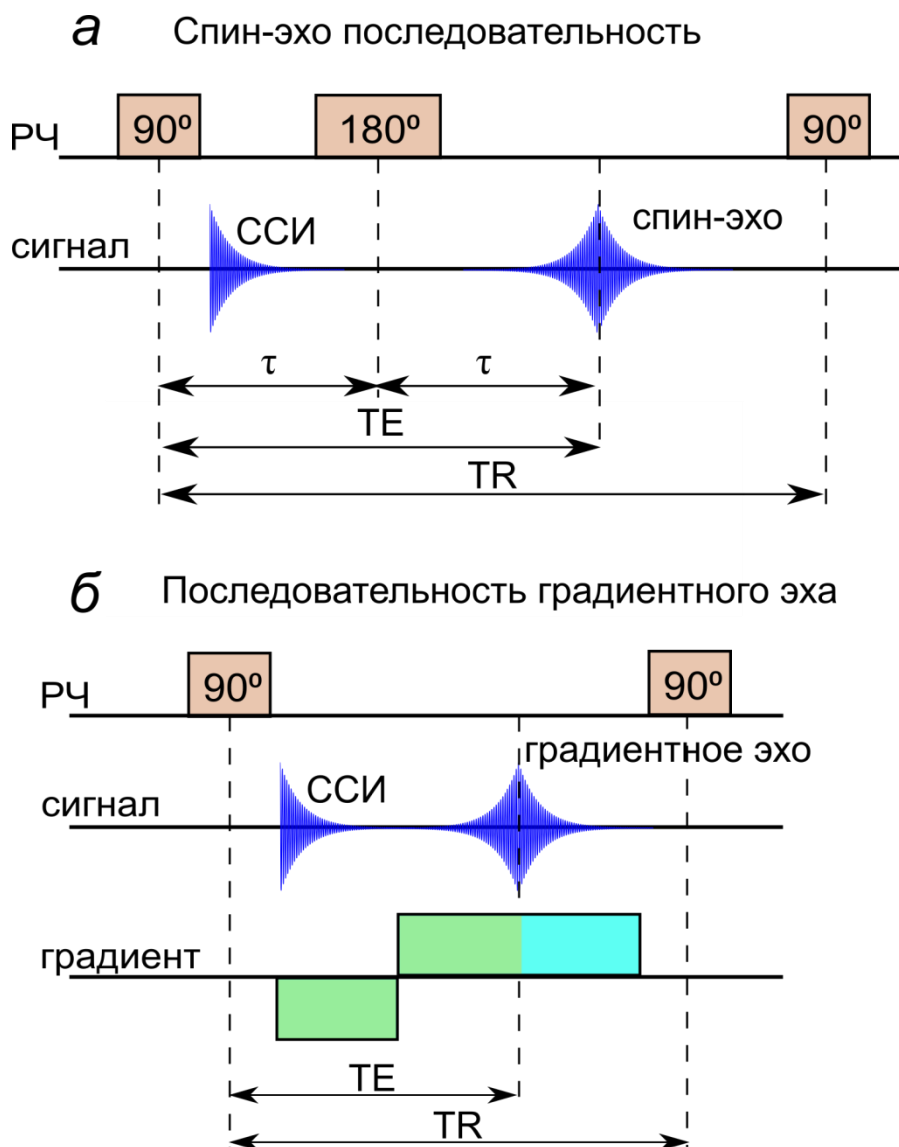


Рисунок 2. Последовательность спин-эхо (а) и последовательность градиентного эха (б). Оранжевый прямоугольник обозначает неселективный 90° или 180° РЧ импульс, зеленый и голубой прямоугольники – градиент магнитного поля. Зеленым отмечены равные по площади значения градиента.

Импульсные последовательности, которые используются в МРТ, зачастую носят названия в виде аббревиатур. Например, к импульсным последовательностям, которые используют спиновое эхо для регистрации сигнала, относятся SE (spin echo, спин эхо), TSE (turbo spin echo, турбо спин эхо), EPI (echo planar imaging, эхо-планарная томография). Последовательности

градиентного эха: FLASH (fast low angle shot, быстрая томография с малыми углами), TurboFLASH (сверхбыстрая томография с малыми углами), FISP (fast imaging with steady state precession, быстрая томография со стационарным состоянием прецессии).

1.1.3. Основные параметры, характеризующие МРТ

Современные МРТ исследования стремятся к минимизации времени эксперимента без потери в качестве МР изображения, то есть в его пространственном разрешении и контрасте. Однако для улучшения качества МР изображения зачастую необходимо тратить больше времени. Ниже приведено описание основных параметров, которые необходимы как для оценки времени эксперимента, так и для оценки качества полученного МР изображения.

Время получения изображения. На время получения МР изображения влияют несколько факторов. В первую очередь, количество накоплений сигнала, так как при каждом новом повторении необходимо не только потратить время на повтор импульсной последовательности, но и дождаться пока система вернется в начальное состояние посредством релаксации. Далее, важным параметром является чувствительность к ядру, по которому регистрируется МР изображение. Наиболее распространенными ядрами для регистрации сигнала являются протоны ^1H , ядра фосфора ^{31}P и фтора ^{19}F . Это связано с тем, что они обладают большими значениями гиромагнитного отношения, и их магнитные изотопы широко распространены в природе. Таким образом, понадобится меньшее число накоплений сигнала, чтобы получить МР изображение приемлемого качества. Также на время регистрации изображения влияет выбранная импульсная последовательность, а именно – количество импульсов, градиентов, задержки между ними и их длительность. Еще одним важным фактором является размерность матрицы, чем больше матрица – тем больше время записи.

Пространственное разрешение. Пространственное разрешение зависит от размеров области регистрации МР изображения и размеров матрицы. При увеличении размерности матрицы увеличивается пространственное разрешение, что позволяет лучше различать детали на МР изображении. Однако МР изображение с высоким пространственным разрешением может быть малоинформативным. Это происходит при настолько малом размере пикселя (или вокселя), что полезный сигнал становится сравнимым по интенсивности с шумом.

Отношение сигнал-шум. ОСШ показывает отношение интенсивности полезного сигнала к интенсивности шума. Под интенсивностью шума понимается стандартное отклонение интенсивности сигнала, полученного от фона на МР изображении. ОСШ пропорционален размеру пикселя (или вокселя) и квадратному корню числа усреднений, то есть при увеличении числа усреднений (NA), например, $NA = 4$, ОСШ увеличится в 2 раза.

Контраст. Контраст изображения – это разница в интенсивности пикселей, которая позволяет различать детали и границы разных областей. При высоком контрасте становится возможным определение границ органов, опухолей и различных тканей. При низком контрасте интенсивности пикселей во всей матрице сравнимы, поэтому МР изображение становится неинформативным.

Для увеличения контраста используются контрастные агенты. Контрастные агенты существуют нескольких типов. Наиболее распространены контрастные агенты, которые уменьшают времена релаксации T_1 или T_2 . Такие контрастные агенты включают в себя парамагнитные (контрастные агенты на основе гадолиния или марганца) или суперпарамагнитные частицы (контрастные агенты на основе оксида железа или железо-платиновые контрастные агенты). Для того чтобы понять механизм действия контрастных агентов рассмотрим образец, в одну область которого вводят контрастный агент. Протоны в образце взаимодействуют с электронами контрастного агента. Из-за протон-электронного дипольного взаимодействия ускоряется спин-

решеточная релаксация (уменьшается время релаксации T_1 образца в области введения). Тогда при коротких временах TR сигнал от данной области будет более интенсивным на МР изображении. Такие МР изображения называются T_1 -взвешенными изображениями. При введении контрастного агента с целью уменьшить время релаксации T_2 , полученные изображения записываются с длинными временами TE и называются T_2 -взвешенными. При коротких временах TE и длинных TR изображения называются взвешенные по протонной плотности, так как не обладают T_1 или T_2 контрастом.

Сейчас также активно развиваются контрастные агенты с использованием методов гиперполяризации ядерных спинов. Основная идея таких контрастных агентов заключается в том, что они обладают усиленным МР сигналом, и области их введения подсвечиваются ярче на МР изображениях.

Таким образом, контрастные агенты помогают улучшить контраст на МР изображении путем уменьшения или увеличения интенсивности сигнала необходимой области исследования. Это позволяет использовать меньшие магнитные поля, снизить время эксперимента или увеличить детализацию изображения.

1.1.4. Гетероядерная томография

В методе МРТ изображение регистрируется зачастую по протонам, так как они являются наиболее распространенными и обладают большим значением гиромагнитного отношения. Однако изображения, полученные по протонам, обладают низким контрастом, в особенности в биомедицинских приложениях, так как концентрация протонов в тканях варьируется лишь незначительно. Также при использовании ^1H для регистрации сигнала возникают дополнительные трудности, например, в исследовании легких, где концентрация протонов в газовой фазе очень мала, как следствие, становится невозможно записать МР изображение за приемлемое время. Указанные

проблемы могут быть решены путем использования гетероядер, таких как углерод ^{13}C , азот ^{15}N , фосфор ^{31}P , фтор ^{19}F .

Гетероядерная томография также позволяет получать информацию, которая недоступна в случае протонной томографии. Например, она позволяет следить за метаболическими превращениями, что невозможно в случае ^1H МРТ из-за малой дисперсии химического сдвига для разных метаболитов. Также ^1H МРТ исследования затруднены наличием фонового сигнала от большого количества протонов воды в организме. Однако интенсивность сигнала, полученного с использованием гетероядер, будет значительно ниже, чем интенсивность протонного сигнала, из-за низкого гиромагнитного отношения и естественного содержания необходимого изотопа по сравнению с протонами. В Таблица 1 приведены значения естественного содержания и гиромагнитного отношения для протонов и гетероядер, которые использовались в данной работе.

Таблица 1. Естественное содержание и гиромагнитное отношение изотопов ^1H , ^{13}C , ^{15}N .

	^1H	^{13}C	^{15}N
Естественное содержание изотопа, %	99.985	1.11	0.36
γ (МГц/Тл)	42.578	10.708	-4.316

В клинической практике распространено использование протонов для регистрации МР изображений. В связи с этим большинство аппаратов МРТ, которые используются в клиниках, непригодны для регистрации изображений от гетероядер. Для регистрации МР изображений по ядрам отличных от протонов необходимо оснащение специальными компонентами (катушки, усилители и др.), которые настроены на исследуемое гетероядро.

Метод гетероядерной томографии обладает рядом плюсов и минусов и может стать дополняющим методом к ^1H МРТ для получения ранее недоступной, уникальной информации.

1.2. Методы гиперполяризации

Как было упомянуто ранее, одним из видов контрастных агентов являются контрастные агенты, полученные с помощью методов гиперполяризации. В данном разделе будет приведено описание результатов в области ЯМР и МРТ с использованием наиболее популярных методов гиперполяризации. Также более подробно будут описаны методы гиперполяризации на основе параводорода, которые использовались в данной работе.

1.2.1. Обзор методов гиперполяризации

В равновесии разница между населенностями спиновых энергетических уровней (поляризация, P) мала из-за чего чувствительность методов ЯМР и МРТ крайне низкая. Это связано с тем, что сигнал ЯМР и МРТ пропорционален поляризации. Рассмотрим поляризацию для ^1H при 300 К в магнитном поле 3 Тл. Она составляет всего порядка 10^{-5} , то есть лишь один из 100000 спинов дает вклад в сигнал.

Проблема низкой чувствительности методов может быть решена созданием неравновесной заселенности спиновых энергетических уровней и увеличением поляризации на несколько порядков величины. При увеличении поляризации по сравнению с равновесной говорят о «гиперполяризации», а методы, с помощью которых это можно осуществить, называют «методами гиперполяризации». Сейчас активно развиваются такие методы, как спин-обменная накачка благородных газов (SEOP), динамическая поляризация ядер с растворением образца (ДПЯ с растворением образца, d-DNP), усиление сигнала в процессе обратимого обмена (SABRE) и индуцированная параводородом поляризация ядер (ИППЯ). Гиперполяризованные с помощью данных методов биологически совместимые молекулы могут выступать в роли экзогенных контрастных агентов, которые могут быть введены в живой организм внутривенно или с помощью ингаляций.

При обсуждении методов гиперполяризации необходимо ввести такое понятие как усиление сигнала ЯМР (ε). ε – это отношение интенсивности сигнала ЯМР в экспериментах, полученных с использованием метода гиперполяризации, к интенсивности сигнала в случае теплового равновесия. Усиление сигнала ЯМР также равно отношению поляризаций в случае с использованием методов гиперполяризации и без них.

$$\varepsilon = \frac{I_{\text{ГП}}}{I_{\text{равн}}} = \frac{P_{\text{ГП}}}{P_{\text{равн}}}, \quad (4)$$

где $I_{\text{ГП}}$ – интенсивность сигнала в экспериментах с использованием методов гиперполяризации, $I_{\text{равн}}$ – интенсивность сигнала в условиях теплового равновесия, $P_{\text{ГП}}$ – поляризация в экспериментах с использованием методов гиперполяризации, $P_{\text{равн}}$ – поляризация в условиях теплового равновесия.

Поляризация в условиях теплового равновесия находится следующим образом:

$$P_{\text{равн}} = \frac{\gamma h B_0}{2\pi k T}, \quad (5)$$

где γ – гиромагнитное отношение, h – постоянная Планка ($6.63 \cdot 10^{-34}$ Дж·с), B_0 – магнитное поле, π – число Пи, k – константа Больцмана ($1.38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К), T – температура.

Рассмотрим более подробно методы SEOP и ДПЯ с растворением образца.

Спин-обменная накачка благородных газов. Метод SEOP используется для гиперполяризации благородных газов, таких как ксенон ^{129}Xe , гелий ^3He , криптон ^{83}Kr . Все эти газы инертны. Кроме того, стоимость этих газов высока. Гиперполяризованные (ГП) с помощью SEOP газы в биомедицинском контексте преимущественно используются для исследования легких. По сравнению с ^1H МРТ, которая используется для визуализации анатомических особенностей легких, МРТ с использованием ГП газов предоставляет информацию о полых пространствах легких. Такая информация позволяет оценить функциональность легких. Преимуществом метода является то, что функциональное изображение легких можно получить за одну задержку

дыхания, что снижает нагрузку на пациента и увеличивает доступность метода для разных категорий пациентов.

Поляризация благородных газов при использовании метода SEOP может составлять от 10 до 50% в зависимости от экспериментальных условий [4–6]. Время релаксации T_1 ГП газа составляет порядка 1-2 часов, однако при исследовании легких время релаксации уменьшается до ~ 30 секунд из-за контакта с кислородом, который парамагнитен [7,8].

Первые МР изображения биологических систем с помощью ГП ^{129}Xe были получены в 1994 году Альбертом и др. [9]. Их группой были продемонстрированы изображения, в которых для регистрации сигнала использовались протоны ^1H или ядра ^{129}Xe . На ^1H МРТ видно расположение сердца, однако в области легких сигнал отсутствовал. В то время как на изображениях записанных с помощью ядер ^{129}Xe отчетливо выделяется область легких и отсутствовал сигнал от сердца. Такие результаты подтверждают, что протонная и гетероядерная томография могут дополнять друг друга и увеличивать качество комплексной диагностики. Первая ^3He МРТ с использованием ГП ^3He была продемонстрирована Миддлтоном и др. в 1995 году [10]. Было получено изображение легких морской свинки.

После получения первых изображений метод ^3He МРТ развивался активнее, чем ^{129}Xe МРТ. Это связано с тем, что гироманнитное отношение ^3He больше, чем ^{129}Xe : $\gamma(^3\text{He}) = -32.434$ МГц/Тл, $\gamma(^{129}\text{Xe}) = -11.777$ МГц/Тл. Однако из-за нехватки ^3He в мире [11,12] цена на этот газ сильно возросла. В настоящее время лидирующую позицию заняла томография с использованием ГП ^{129}Xe . Дальнейшие исследования показали, что ксенон-129 обладает липофильными свойствами, поэтому растворяется в биологических тканях. Также полезным свойством ^{129}Xe оказалось то, что химический сдвиг ксенона чувствителен к окружению. Разница химических сдвигов ксенона растворенного в крови и находящегося в газовой фазе, в 60 раз больше разницы химических сдвигов протонов воды и жира [7]. Данные свойства ксенона позволяют проводить исследования по газообмену легких и крови. С помощью МРТ с ГП ^{129}Xe были

проведены исследования людей с хронической обструктивной болезнью легких [4,13–16], астмой [4,13,14,17], фиброзом легких [5,18,19], легочной артериальной гипертензией и сердечно-легочными заболеваниями [20,21] и др. Также благодаря тому, что ксенон-129 растворяется в крови и попадает через кровотоки в мозг, были выполнены исследования мозга с помощью ^{129}Xe МРТ [22,23].

Динамическая поляризация ядер с растворением образца. Метод ДПЯ с растворением образца был создан в 2003 году [24]. Несколько субстратов, гиперполяризованных с помощью ДПЯ, сейчас активно используются для биомедицинских исследований. Один из них – ^{13}C -меченный пируват. В поляризаторах, которые уже сейчас используются в клинической практике, уровни поляризации ^{13}C -пирувата достигают 50% [25]. Стоит отметить, что в раковых клетках конверсия пирувата в лактат увеличивается [26–28]. Поэтому с помощью записи ^{13}C МРТ и знаниях о конверсии $[1-^{13}\text{C}]$ пирувата в $[1-^{13}\text{C}]$ лактат в организме проводится дифференциация здоровых и раковых клеток и мониторинг развития рака.

В методе ДПЯ с растворением образца сейчас активно используются и другие молекулы: $[2-^{13}\text{C}]$ пируват – для исследований метаболизма в митохондриях [29]; $[^{13}\text{C}]$ мочевина – для исследований перфузии [30–32]; $[1,4-^{13}\text{C}_2]$ фумарат для исследований некроза в раковых клетках [33–35]; $[^{13}\text{C}]$ гидрокарбонат – для исследований pH в клетке [36,37].

К настоящему моменту ДПЯ с растворением образца используется и в *in vivo* исследованиях людей. Первое исследование на людях с использованием поляризованного с помощью ДПЯ $[1-^{13}\text{C}]$ пирувата было выполнено в 2013 году [38] для оценки изменения метаболизма у пациентов с раком предстательной железы. В 2021 году впервые метод ДПЯ применялся для исследований патологического метаболизма в сердце человека [39]. В данном исследовании принимали участие два человека в качестве исследуемых. Было показано, что в нежизнеспособных областях миокарда, пораженных инфарктом, отсутствует сигнал таких продуктов $[1-^{13}\text{C}]$ пирувата, как $[^{13}\text{C}]$ гидрокарбонат и $[1-^{13}\text{C}]$ лактат,

в то время как в жизнеспособных областях, пораженных инфарктом незадолго до ^{13}C МРТ исследования, $[^{13}\text{C}]$ гидрокарбонат и $[1-^{13}\text{C}]$ лактат присутствовали. Позднее в работе [40] также была показана применимость ГП $[1-^{13}\text{C}]$ пирувата для исследований метаболических изменений в сердце человека; в работе исследовали 6 человек.

Несмотря на то, что метод ДПЯ с растворением образца активно используется в биомедицинских исследованиях, стоимость оборудования для реализации данного метода составляет порядка нескольких миллионов долларов [41]. В связи с этим возникает необходимость альтернативных методов, которые увеличат доступность методов гиперполяризации. В качестве таких методов могут выступать методы, где в качестве источника гиперполяризации используется параводород – ИППЯ и SABRE.

1.2.2. Параводород

Молекула водорода H_2 имеет два спиновых изомера – параводород (п- H_2) и ортоводород (о- H_2). Параводород обладает полным ядерным спином I равным 0 (спины атомов H в составе молекулы H_2 антипараллельны), а ортоводород – 1 (спины параллельны). Таким образом, образуется две группы состояний: синглет, которому соответствует антипараллельное состояние $\psi_{\text{п}}$, и триплет, которому соответствует симметричное состояние $\psi_{\text{о}}$.

Волновые функции можно записать следующим образом:

$$\psi_{\text{п}} = \frac{|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle}{\sqrt{2}} = |S\rangle - \text{синглет}, \quad (6)$$

$$\psi_{\text{о}} = \begin{cases} |\alpha\alpha\rangle = |T_+\rangle \\ \frac{|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle}{\sqrt{2}} = |T_0\rangle - \text{триплет}, \\ |\beta\beta\rangle = |T_-\rangle \end{cases} \quad (7)$$

где волновая функция п- H_2 соответствует синглету, который также обозначается как $|S\rangle$, а волновая функция о- H_2 соответствует триплету, состояния которого обозначены как $|T_+\rangle$, $|T_0\rangle$ и $|T_-\rangle$; обозначения α и β соответствуют проекции спина $+1/2$ (спин «вверх») и $-1/2$ (спин «вниз»).

В нормальных условиях газ H_2 (н- H_2) представляет собой смесь двух изомеров, которая согласно статистике состоит из 75% о- H_2 и 25% п- H_2 . При понижении температуры доля п- H_2 растет. Однако процесс орто-пара конверсии медленный, поэтому для обогащения н- H_2 фракцией п- H_2 необходимо использовать катализаторы орто-пара конверсии. При охлаждении н- H_2 над катализатором магнитная эквивалентность двух протонов нарушается, вызывая орто-пара переходы. В качестве катализатора могут выступать такие вещества как $\text{Fe}(\text{OH})_3$, Fe_2O_3 , Cr_2O_3 и другие [42]. При температуре 77 К соотношение между о- H_2 и п- H_2 составляет 1:1, при 20 К водород полностью переходит в пара-состояние.

Стоит отметить, что п- H_2 невозможно зарегистрировать сам по себе с помощью методов ЯМР или МРТ, так как он обладает нулевым полным ядерным спином. Однако параводород используется как источник спинового порядка в методах гиперполяризации. Основная задача данных методов – нарушить симметрию молекулы п- H_2 , чтобы атомы молекулы п- H_2 оказались в магнитно-неэквивалентных позициях. Один из таких методов называется индуцированная параводородом поляризация ядер. В методе ИППЯ п- H_2 используется в реакции гидрирования, где атомы п- H_2 парно присоединяются к ненасыщенному субстрату (например, алкену или алкину). Парное присоединение необходимо для сохранения спиновой корреляции между атомами водорода из одной молекулы п- H_2 . Другой метод называется усиление сигнала в процессе обратимого обмена. В данном методе реакции гидрирования не происходит, однако в процессе обратимого обмена поляризация с параводорода переносится на молекулу субстрата. Более подробно данные методы будут обсуждаться ниже.

1.2.3. Индуцированная параводородом поляризация ядер (ИППЯ)

Как было отмечено выше, метод ИППЯ основан на использовании п- H_2 в реакции гидрирования. Молекула п- H_2 необратимо реагирует с субстратом, образуя ГП продукт. Для наблюдения эффектов ИППЯ необходимо выполнить

несколько условий. Во-первых, время протекания реакции должно быть меньше или сравнимо со временем спиновой релаксации. Во-вторых, субстрат обязательно должен иметь ненасыщенную связь, чтобы $p\text{-H}_2$ вступил в реакцию. Из-за этого условия количество потенциальных молекул, для которых применим метод ИППЯ, ограничено. В-третьих, реакция гидрирования должна обязательно протекать с парным присоединением молекулы $p\text{-H}_2$ к субстрату. Оба атома водорода из одной молекулы $p\text{-H}_2$ должны присоединиться вместе к одному и тому же субстрату. Нарушение магнитной или химической эквивалентности атомов водорода при парном присоединении приводит к гиперполяризации и усилению сигнала. Если при образовании продукта атомы водорода оказались в магнитно-эквивалентных позициях, то спиновый порядок $p\text{-H}_2$ сохраняется, а сигнал остается ненаблюдаемым.

Существует два типа экспериментов ИППЯ: PASADENA (parahydrogen and synthesis allow dramatically enhanced nuclear alignment) [43] и ALTADENA (adiabatic longitudinal transport after dissociation engenders nuclear alignment) [44]. В экспериментах PASADENA реакция гидрирования происходит в сильном магнитном поле, и там же происходит регистрация сигнала. Наибольшее значение интенсивности сигнала достигается при использовании 45° РЧ импульса для регистрации сигнала [45] вместо 90° импульса. В экспериментах PASADENA спектр принимает антифазный вид. В экспериментах ALTADENA гидрирование происходит в слабом магнитном поле. Исследуемый образец гиперполяризуют в слабом магнитном поле, а затем его переносят в сильное магнитное поле для регистрации сигнала. Наибольшее значение интенсивности сигнала достигается при использовании 90° импульса для регистрации.

Разделение на слабое и сильное магнитное поле основано на константе гомоядерного взаимодействия протонов, которые образованы из молекулы $p\text{-H}_2$, в продукте гидрирования. В экспериментах PASADENA режим слабосвязанной системы, в ALTADENA – сильносвязанной системы. Слабосвязанная система соответствует случаю, когда константа спин-

спинового взаимодействия (КССВ) протонов намного меньше, чем разница их химических сдвигов:

$$|2 \cdot \pi \cdot J| \ll |\gamma \cdot \Delta\delta \cdot B_0|, \quad (8)$$

где π – число Пи, J – константа спин-спинового взаимодействия, γ – гиромагнитное отношение, $\Delta\delta$ – разница химических сдвигов протонов образованных из молекулы $p\text{-H}_2$, B_0 – внешнее магнитное поле. Слабосвязанную систему называют АХ системой.

Для сильносвязанной системы условие выглядит следующим образом:

$$|2 \cdot \pi \cdot J| \geq |\gamma \cdot \Delta\delta \cdot B_0|. \quad (9)$$

Создать нужные условия можно правильным подбором магнитного поля B_0 , при этом стоит учесть, что разница химических сдвигов зависит от магнитного поля B_0 , а КССВ не зависит.

Во внешних магнитных полях спиновые уровни расщепляются, такое явление получило название – эффект Зеемана. При рассмотрении двухспиновой системы возникает диаграмма энергетических уровней, каждый из которых соответствует одному из четырех состояний (см. Рисунок 3). В условиях теплового равновесия расщепление энергетических уровней настолько мало, что все уровни заселены практически одинаково. В спектре при этом будет наблюдаться два дублета, интенсивности которых пропорциональны поляризации при тепловом равновесии. В условиях эксперимента PASADENA заселяются уровни $|\alpha\beta\rangle$ и $|\beta\alpha\rangle$. Спектр ЯМР в таком случае содержит также два дублета, но антифазной формы. Так как при этом значение поляризации увеличилось, то и интенсивность сигналов будет значительно больше, чем при тепловом равновесии. В условиях эксперимента ALTADENA, то есть при гидрировании в слабом магнитном поле, заселяется только одно состояние. При адиабатическом переносе в сильное магнитное поле заселенным остается также лишь один уровень. В спектре ЯМР наблюдается два сигнала соответствующих эмиссии и адсорбции с этого уровня.

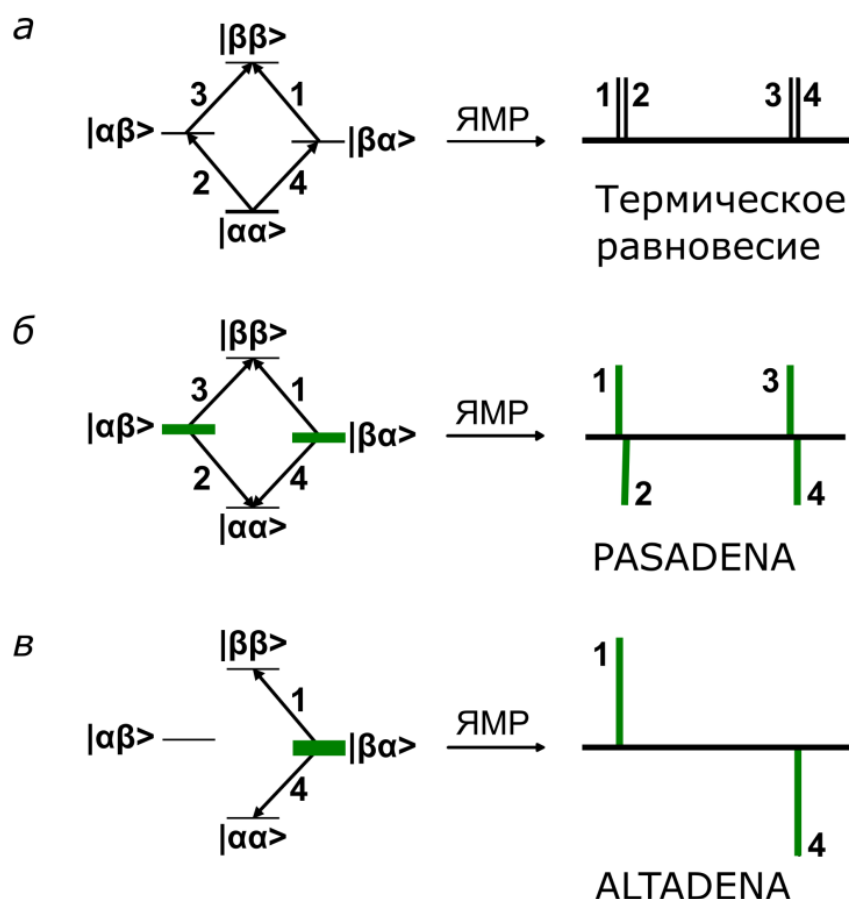


Рисунок 3. Диаграммы населенностей спиновых уровней двухспиновой системы и вид спектра в случае теплового равновесия (а), PASADENA (б) и ALTADENA (в) экспериментов. На диаграммах стрелками указаны переходы между уровнями, ширина зеленого прямоугольника на диаграммах населенностей спиновых уровней пропорциональна числу спинов на этом уровне. Сигналы в спектре ЯМР пронумерованы в соответствии с переходами, указанными на диаграмме спиновых уровней.

Максимально возможные уровни поляризации в экспериментах ИППЯ можно примерно оценить, используя анализ заселенностей спиновых уровней представленных на Рисунок 3. В экспериментах PASADENA параводород заселяет уровни $|\alpha\beta\rangle$ и $|\beta\alpha\rangle$, то есть доля параводорода $\chi_{\text{п}}$ в смеси распределяется на два уровня. Ортоводород в свою очередь заселяет каждый из уровней, причем на уровень $|\alpha\alpha\rangle$ и $|\beta\beta\rangle$ приходится по $1/3$ от доли ортоводорода $\chi_{\text{о}}$, а оставшая часть делится между уровнями $|\alpha\beta\rangle$ и $|\beta\alpha\rangle$. Итого, уровни $|\alpha\beta\rangle$ и $|\beta\alpha\rangle$ заселены пара- и ортоводородом следующим образом: $\frac{\chi_{\text{п}}}{2} + \frac{\chi_{\text{о}}}{3 \cdot 2}$, а уровни $|\alpha\alpha\rangle$ и $|\beta\beta\rangle$: $\frac{\chi_{\text{о}}}{3}$. Для оценки поляризации вычтем из

населенности уровня $|\alpha\beta\rangle$ населенность уровня $|\alpha\alpha\rangle$ и учтем, что $\chi_{\pi} + \chi_0 = 1$.

$$\text{Тогда } P_{PASADENA} = \frac{4\chi_{\pi}-1}{6}.$$

В эксперименте ALTADENA параводородом заселяется только один уровень, поэтому один из уровней $|\alpha\beta\rangle$ или $|\beta\alpha\rangle$ заселен следующим образом: χ_{π} , а остальные три уровня заселены как $\frac{\chi_0}{3}$, так как они соответствовали триплетной функции. В таком случае поляризация $P_{ALTADENA} = \chi_{\pi} - \frac{\chi_0}{3} = \frac{4\chi_{\pi}-1}{3}$.

Максимальное теоретическое усиления сигнала ЯМР в случае PASADENA и ALTADENA тогда определяется по формуле (10) и (11):

$$\varepsilon_{PASADENA} = \frac{\frac{4\chi_{\pi}-1}{6}}{\frac{\gamma\hbar B_0}{4\pi kT}} = \frac{2\pi kT(4\chi_{\pi}-1)}{3\gamma\hbar B_0} \quad (10)$$

$$\varepsilon_{ALTADENA} = \frac{\frac{4\chi_{\pi}-1}{3}}{\frac{\gamma\hbar B_0}{4\pi kT}} = \frac{4\pi kT(4\chi_{\pi}-1)}{3\gamma\hbar B_0} \quad (11)$$

Дополнительная классификация экспериментов ИППЯ происходит в зависимости от того, в каких условиях происходит реакция: с использованием гомогенного или гетерогенного катализатора.

В гомогенной ИППЯ катализатор реакции гидрирования и субстрат находятся в одном фазовом состоянии (жидкость) в растворе. В качестве катализаторов для гомогенной ИППЯ используются комплексы переходных металлов, в основном в их составе содержится родий. Некоторые катализаторы необходимо активировать до того, как использовать их в экспериментах ИППЯ. Например, одним из таких катализаторов является $\text{Rh}(\text{dppb})(\text{COD})\text{BF}_4$, где dppb – это бис(дифенилфосфино)бутан, COD – циклооктадиен. В процессе активации лиганд COD покидает комплекс, на место которого присоединяется p-H_2 и субстрат. В качестве катализатора помимо комплексов родия могут быть использованы комплексы иридия, платины, рутения и других металлов [46].

В гомогенной ИППЯ используются как обычные растворители, так и дейтерированные. Последние используются для увеличения времени релаксации продукта, что позволяет лучше зарегистрировать сигнал ЯМР.

Также растворитель дополнительно дегазируют, чтобы избежать присутствия в нем кислорода. Дегазирование является необходимым шагом, так как кислород парамагнитен. В связи с этим кислород увеличивает скорость конверсии $p\text{-H}_2$ в $n\text{-H}_2$ и сокращает время релаксации T_1 гиперполяризованного продукта. Для увеличения скорости реакции раствор могут нагревать.

Гомогенная ИППЯ применяется для различного типа задач, от каталитических до биомедицинских. В одной из первых экспериментальных работ [43] по наблюдению эффектов ИППЯ использовался гомогенный катализатор Уилкинсона (хлортрис(трифенилфосфин) родий (I), $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$) в реакции гидрирования акрилонитрила в пропионитрил. Усиление сигнала наблюдалось не только на продукте гидрирования, но и на дигидридных металлокомплексах $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3(\text{H})_2$, которые образовывались в результате присоединения $p\text{-H}_2$ к катализатору. Такое наблюдение продемонстрировало возможность изучать промежуточные продукты в реакциях гидрирования.

На начальной стадии развития ИППЯ основной областью применения были механистические исследования гомогенных каталитических процессов в жидкости [47,48]. С помощью ИППЯ удалось зарегистрировать некоторые промежуточные продукты, что ранее было невозможно стандартными методами ЯМР. Далее на основе данного метода стали получать гиперполяризованные контрастные агенты, в частности благодаря работам по переносу поляризации на гетероядро [49–51].

Несмотря на прогресс ИППЯ с использованием гомогенных катализаторов, возникает вопрос применимости такого метода для *in vivo* приложений. Основной проблемой при работе с гомогенными растворами является отделение катализатора, который токсичен для живого организма. В связи с этим, к настоящему моменту выполнено большое число работ, где используется ИППЯ с гетерогенным катализатором. Такой катализатор проще удалить из раствора по сравнению с гомогенным [52,53]. Кроме того, гетерогенный катализатор позволяет создавать ГП продукты в непрерывном режиме продолжительное время. Однако стоит отметить, что уровни

поляризации, которые наблюдаются в гетерогенной ИППЯ, ниже, чем в гомогенной [54].

В гетерогенной ИППЯ используются нанесенные металлические катализаторы или катализаторы в виде комплексов металлов платиновой группы, иммобилизованных на твердом носителе. Носителями могут быть как неорганические (например, SiO_2 [55,56]), так и органические материалы (например, стиролдивинилбензольный сополимер [55]). Впервые эффекты гетерогенной ИППЯ были продемонстрированы в 2007 году с использованием трех разных иммобилизованных катализаторов [55]. В работе эксперименты проводились в двух разных фазах – жидкой и газообразной. В первом случае гидрировался стирол, во втором – пропилен. Было показано, что и в PASADENA, и в ALTADENA условиях наблюдается усиление сигнала ЯМР ^1H .

Ранее считалось, что нанесенные металлические катализаторы неприменимы для экспериментов ИППЯ [57], так как полагалось, что не выполняется основное требование для ИППЯ – парное присоединение параводорода. Однако в 2008 году было показано, что в работе с такими катализаторами, как $\text{Pt}/\text{Al}_2\text{O}_3$ и $\text{Pd}/\text{Al}_2\text{O}_3$, эффекты ИППЯ в газовой фазе при гидрировании пропилена в пропан наблюдаются [58]. Эффекты ИППЯ на ядрах ^1H в жидкой фазе были показаны с использованием таких гетерогенных катализаторов, как Pt/SiO_2 и Pd/SiO_2 в 2009 году [53]. В дальнейших работах исследовались различные катализаторы, например, Pt/SiO_2 [59], Pt/ZrO_2 [59], Rh/TiO_2 [60,61], Pt/TiO_2 [62], Ir/TiO_2 [62], Pd/TiO_2 [63,64] и другие.

Выбор субстратов, которые могут быть использованы в экспериментах с применением ИППЯ, ограничен, так как субстрат должен иметь ненасыщенную связь. В связи с этим в 2015 году возникла еще одна разновидность ИППЯ – это ИППЯ с гидрированием по боковой цепи (см. Рисунок 4) [65]. В данном методе молекула, которая выбрана в качестве ГП контрастного агента (например, [1- ^{13}C]ацетат или [1- ^{13}C]пируват), функционализована боковой цепью (например, винильной или пропаргиловой группой). Данная цепь должна содержать ненасыщенную связь. Весь раствор с катализатором, субстратом и

параводородом находится изначально в органическом растворителе. После гидрирования ненасыщенной связи гиперполяризация переносится на гетероядро, далее в раствор добавляется водный раствор основания, чтобы отщепить боковую цепь путем гидролиза. В итоге интересующая молекула оказывается в водной фазе, а боковая цепь - в органической (гидрофобной) фазе.

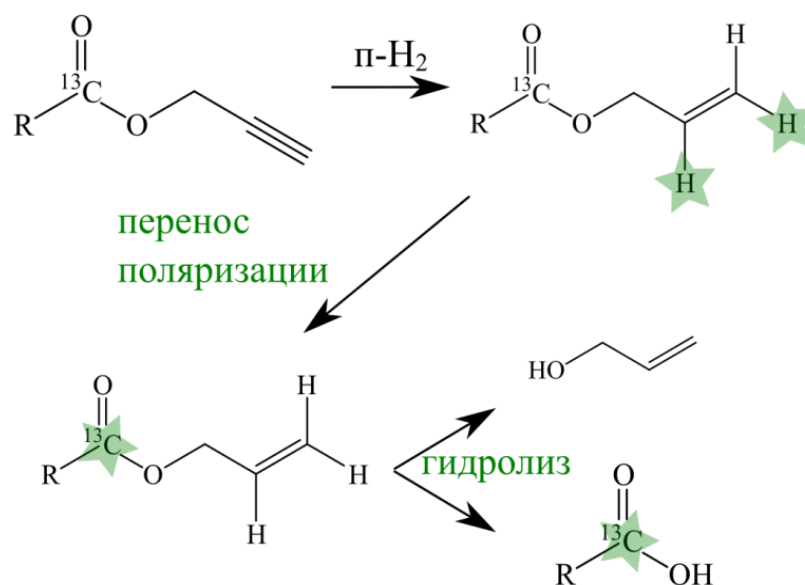


Рисунок 4. Схема ИППЯ с гидрированием по боковой цепи. Звездочками указаны поляризованные ядра.

В работе Эйме и др. [65] методом ИППЯ с гидрированием по боковой цепи были гиперполяризованы ацетат и пируват. При гидрировании винилацетата параподородом в условиях ALTADENA образовывался ГП этилацетат ($P \sim 20\%$). Далее путем добавления гидроксида натрия проводился гидролиз с образованием ГП ацетата в водной фазе. Также было проведено гидрирование пропаргилацетата в аллилацетат с дальнейшим гидролизом, в результате чего также получался ГП ацетат. Уровни поляризации ГП ацетата имели схожие значения и при гидрировании винилацетата, и при гидрировании пропаргилацетата. Также были выполнены эксперименты с гидрированием пропаргилпирувата с последующим гидролизом и получением ГП пирувата. Также гиперполяризация была создана на таких молекулах, как $[1-^{13}\text{C}]$ ацетат [66,67] и $[1-^{13}\text{C}]$ лактат [68].

Примеры работ с использованием как гомогенного, так и гетерогенного ИППЯ для получения МР изображений представлены в разделе 1.4.

1.2.4. Усиление сигнала в процессе обратимого обмена

Метод усиления сигнала в процессе обратимого обмена (SABRE) был предложен группой Дакетта в 2009 году [69]. Особенностью данного метода гиперполяризации на основе параводорода является отсутствие стадии гидрирования. Гиперполяризация создается в комплексе переходного металла (зачастую – иридия [70]). Такой комплекс также называют «катализатором SABRE». В данном комплексе в качестве лигандов выступают молекулы параводорода и субстрата, которые постоянно обмениваются со своими аналогами, находящимися в растворе (см. Рисунок 5). Благодаря обмену в растворе накапливается ГП субстрат, который сохранил свою начальную структуру. Сохранение структуры является важным свойством метода SABRE, в частности, при использовании SABRE в биомедицинских приложениях, где необходимо точно знать структуру полученного ГП соединения. Усиление сигнала в экспериментах SABRE зависит от концентрации катализатора, параводорода и субстрата, также от констант спин-спинового взаимодействия, скоростей релаксации и констант скорости реакции [71].

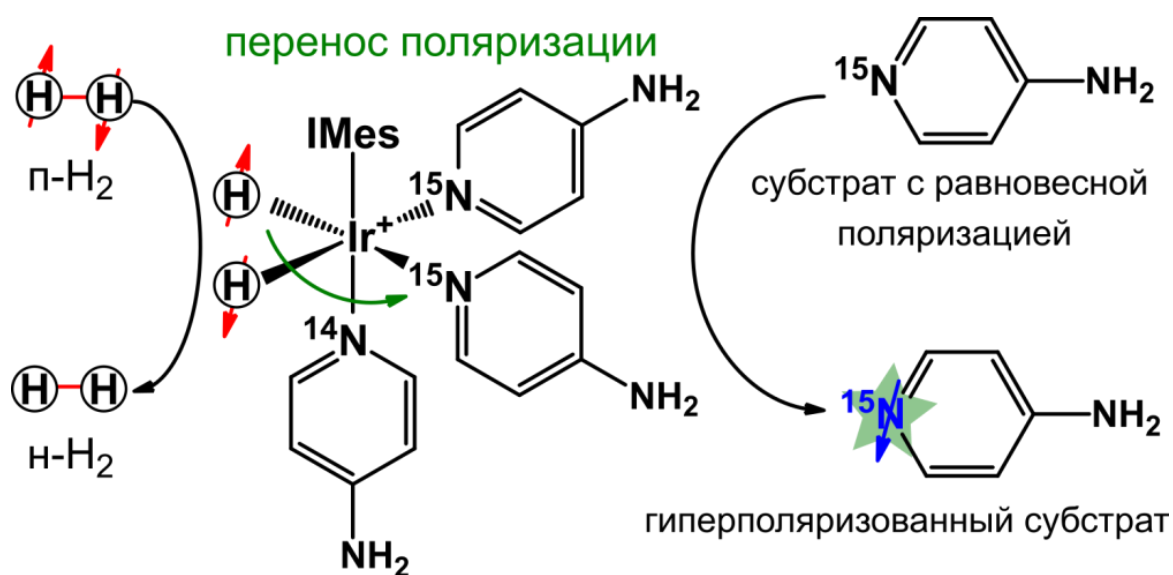


Рисунок 5. Схема метода усиления сигнала в процессе обратимого обмена SABRE. Субстрат (^{15}N -фампридин) и $p\text{-H}_2$ одновременно координируются на комплексе иридия. В результате

после переноса поляризации на гетероядро субстрата после диссоциации комплекса образуется ГП субстрат в растворе.

В работе [69] использовался комплекс $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{PCy}_3)(\text{MeCN})]\text{BF}_4$, где Cy – циклогексил, COD – циклооктадиен. Данный комплекс при обмене с p-H_2 и субстратом образовывал комплекс $[\text{Ir}(\text{H})_2(\text{PCy}_3)(\text{субстрат})_3]\text{BF}_4$, где в качестве субстрата использовался пиридин. Активация переноса поляризации происходила путем встряхивания раствора (растворитель – метанол- d_4) с комплексом, субстратом и p-H_2 в слабом магнитном поле. Встряхивание позволяло растворить p-H_2 в растворе. Спектры ЯМР полученные по ^1H показали усиленные сигналы от свободного пиридина в растворе, а также слабые сигналы от связанного пиридина. Усиление интенсивности сигнала ЯМР по ^1H для пиридина составило 550 раз. Усиление сигнала также наблюдалось на ядрах ^{13}C и ^{15}N . Дополнительно было показано усиление сигнала для таких субстратов как хинолин, хиноксалин, хиназолин, пурин, 3-фторпиридин, дибензотиофен, никотин и никотинамид. Для пиридина также была показана МРТ по ^1H с использованием импульсной последовательности TrueFISP.

Стоит отметить, что SABRE основывается на нескольких явлениях:

- Образование и диссоциация комплекса, в котором происходит перенос поляризации на субстрат с параводорода.
- Перенос поляризации (детальнее данный пункт будет обсуждаться в разделе 1.3).
- Продольная релаксация.

При больших временах жизни комплекса гиперполяризация на связанном субстрате может оказаться практически нулевой из-за релаксации. Кроме того, стоит отметить, что скорость релаксации связанного субстрата в 10-20 раз больше скорости релаксации свободного субстрата, находящегося в растворе [72]. При коротких временах жизни комплекса может быть недостаточно времени для переноса поляризации с параводорода на субстрат.

Метод SABRE применяют для различного рода задач. Например, с помощью SABRE стало возможным зарегистрировать вещества в концентрациях порядка 1 мкМ [72]. В работе [72] была продемонстрирована возможность поляризовать с помощью метода SABRE пиридин в концентрации ~ 1 мкМ. Для наблюдения эффектов SABRE при низких концентрациях субстрата необходим косубстрат (в работе [72] – 1-метил-1,2,3-тиразол), который подходит по нескольким критериям. Во-первых, косубстрат должен связываться с металлическим комплексом с гораздо более высоким сродством, чем растворитель. Однако его сродство должно быть ниже или сравнимо со сродством исследуемого субстрата. Во-вторых, косубстрат должен быть в избытке относительно концентрации предшественника металлического комплекса, который участвует в процессе переноса поляризации на ядра субстрата. В-третьих, асимметричный комплекс $[\text{Ir}(\text{IMes})(\text{H})_2(\text{косубстрат})_2(\text{субстрат})]\text{Cl}$ должен иметь время жизни подходящее для экспериментов SABRE. В-четвертых, сигналы косубстрата по ^1H не должны перекрываться с сигналами исследуемого субстрата. Полученная линейная зависимость усиления интенсивности сигнала ^1H от концентрации субстрата показывает, что в дальнейшем можно расширить применимость метода и до концентраций ~ 1 нМ.

Также с помощью метода SABRE стала возможной регистрация 2D спектров [73–75]. Например, для хинолина (2 мкМ) были получены спектры $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ НМВС (heteronuclear multiple bond correlation, гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия) и ^1H COSY (correlated spectroscopy, корреляционная спектроскопия) [73].

Эксперименты SABRE, как и ИППЯ, могут проводиться как в гомогенных растворах, так и в гетерогенных взвешях. Первая работа с методом SABRE в гетерогенной взвеси была представлена группой Гудсона в 2014 году [76]. В качестве катализатора SABRE использовался иммобилизованный иридиевый комплекс на микрополимерных гранулах. В процессе создания гиперполяризации раствор также встряхивался. После встряхивания

катализатор оседал на дно ампулы ЯМР, тем самым отделяясь от раствора в области регистрации сигнала ЯМР. Усиление сигнала по ^1H для пиридина составило ~ 5 раз в гетерогенном случае и ~ 70 раз в гомогенном в магнитном поле спектрометра 9.4 Тл. Несмотря на низкое значение усиления сигнала данная работа продемонстрировала возможность гетерогенного SABRE.

В дальнейшем также группой Гудсона в 2015 году [77] было предложено использовать гетерогенные катализаторы SABRE полученные за счет координационного связывания гомогенного комплекса Ir с ковалентно закрепленными лигандами модифицированного диоксида титана. Диоксид титана был покрыт полиметакриловой кислотой. Оболочка из полиметакриловой кислоты была функционализирована 4-аминопиридином. Второй катализатор представлял собой иммобилизованный на поливинилпиридиновые частицы комплекс Ir. Усиление сигнала по ^1H для пиридина составило ~ 40 раз или ~ 7 раз в магнитном поле 9.4 Тл соответственно для первого и второго катализатора.

В 2017 году с помощью гетерогенного SABRE было показано усиление сигнала по ядрам ^{15}N [78]. Иридиевый комплекс был присоединен к микрогранулам SiO_2 , функционализированных полимером. Усиление сигнала по ядрам ^{15}N для ^{15}N -пиридина в поле 9.4 Тл составило ~ 100 раз.

1.3. Перенос поляризации на гетероядро

Как упоминалось выше, созданную с помощью ИППЯ или SABRE гиперполяризацию необходимо перенести на гетероядро. Для этого используются различные методы, такие как циклирование магнитного поля или использование импульсных последовательностей. В данном разделе представлены наиболее популярные методы для переноса поляризации на гетероядро.

1.3.1. Перенос поляризации на гетероядро в ИППЯ

Перенос поляризации в экспериментах ALTADENA происходит в слабых магнитных полях, либо при циклировании магнитного поля [50,51,79,80].

Эксперименты с использованием слабого магнитного поля для переноса поляризации происходят следующим образом:

1. Гидрирование субстрата параводородом происходит в слабом магнитном поле, которое достигается с помощью магнитного экрана. Этот экран состоит из μ -металла, который подавляет внешнее магнитное поле.
2. Адиабатический перенос образца из слабого магнитного поля в магнитное поле спектрометра ЯМР или томографа МРТ для регистрации сигнала. Медленное перемещение образца обеспечивает адиабатичность переноса.

В слабых магнитных полях процесс переноса происходит спонтанно благодаря спин-спиновому взаимодействию протонов и гетероядра. Допустим, что в реакции гидрирования два протона из молекулы параводорода ассиметрично связаны с третьим спином (X). В результате будет образована трехспиновая система AA'X. В таком случае поляризованными будут состояния $I_Z^A I_Z^X$ и $I_Z^{A'} I_Z^X$, спиновая система при этом сильносвязанная. Доля поляризации, которая перейдет на гетероядро, по сравнению с той, что останется на протонах определяется следующим выражением: $\frac{J_{AX} - J_{AX'}}{2J_{AA'}}$ [81]. В этой формуле числитель равен нулю, когда $J_{AX} = J_{AX'}$, что соответствует случаю, когда два протона симметрично связаны с гетероядром.

В одной из работ с использованием слабых полей для переноса поляризации на гетероядро было получено усиление сигнала ядер $^{19}\text{F} \sim 20$ раз [82]. Причем в качестве слабого магнитного поля использовалось магнитное поле Земли, в котором раствор с субстратом и $p\text{-H}_2$ встряхивали в течении 10 секунд. Также усиление сигнала было достигнуто на ядрах ^{13}C при гидрировании в магнитном поле Земли для ряда алкинов [83].

Альтернативным вариантом переноса поляризации является – циклирование магнитного поля. Протокол эксперимента выглядит следующим образом:

1. Гидрирование образца в слабом магнитном поле, например, в поле Земли (50 мкТл).
2. Диабатический (быстрый) перенос образца в почти нулевое магнитное поле (~ 10 нТл). В таких магнитных полях можно считать, что остается только спин-спиновое взаимодействие, так как частоты ларморовской прецессии стремятся к нулю.
3. Адиабатический (медленный) перенос образца в слабое магнитное поле, которое было в начале, или в сильное магнитное поле для регистрации сигнала.

С помощью метода циклирования магнитного поля были получены уровни поляризации $\sim 20\%$ на ядрах ^{13}C для гидроксиэтилпропионата [51]. Гидрирование субстрата (гидроксиэтилакрилат) происходило в магнитном поле 100 мкТл, с дальнейшим переносом в магнитное поле 30 нТл. Время диабатического переноса составляло всего 1 мс. Далее образец из поля 30 нТл переносился обратно в поле 100 мкТл за время порядка нескольких секунд, чтобы обеспечить адиабатический перенос. Полученный ГП гидроксиэтилпропионат помещали в спектрометр ЯМР для регистрации сигнала ЯМР, либо в шприц, с помощью которого ГП продукт вводился в животное для МРТ.

Сейчас развиваются и другие варианты циклирования магнитного поля для переноса поляризации на гетероядра. Например, в работе [80] был предложен следующий протокол:

1. Гидрирование ацетилендикарбоновой кислоты параводородом проводилось в магнитном поле 2 мкТл.
2. Образец диабатически помещался в магнитное поле -2 мкТл.
3. Магнитное поле, в котором находился образец, адиабатически изменялось от -2 мкТл до +2 мкТл, проходя через нулевое значение.

4. Образец переносился в сильное магнитное поле настольного спектрометра ЯМР (1.4 Тл) для регистрации сигнала ЯМР по ядрам ^{13}C .

Усиление сигнала по ядрам ^{13}C ГП малеиновой кислоты составило 10500 раз, что соответствует $\sim 1\%$ поляризации.

В сильных магнитных полях перенос поляризации осуществляется с помощью импульсных последовательностей. При использовании импульсной последовательности для переноса поляризации необходимо правильно подобрать задержки между импульсами, углы поворота и длительности импульсов, форму селективного импульса, частоту настройки селективного импульса. Также необходимо учесть длительность последовательности целиком, так как при ее увеличении неизбежен вклад релаксационных эффектов.

В 1996 году были предложены импульсные последовательности для наблюдения сигнала на гетероядре в экспериментах PASADENA: PH-INEPT (insensitive nuclei enhanced by polarization transfer, нечувствительные ядра, усиленные с помощью переноса поляризации) и PH-INEPT+ [84] (см. Рисунок 6). PH-INEPT и PH-INEPT+ являются производными последовательностями от INEPT [85], однако в этих двух последовательностях первый 90° импульс заменен на 45° по каналу ^1H для обеспечения максимально достижимой поляризации в условиях эксперимента PASADENA. При использовании PH-INEPT конечная структура сигнала ЯМР имеет антифазный вид. В последовательности PH-INEPT+ благодаря дополнительному блоку со 180° импульсами по двум каналам структура сигнала принимает синфазный вид.

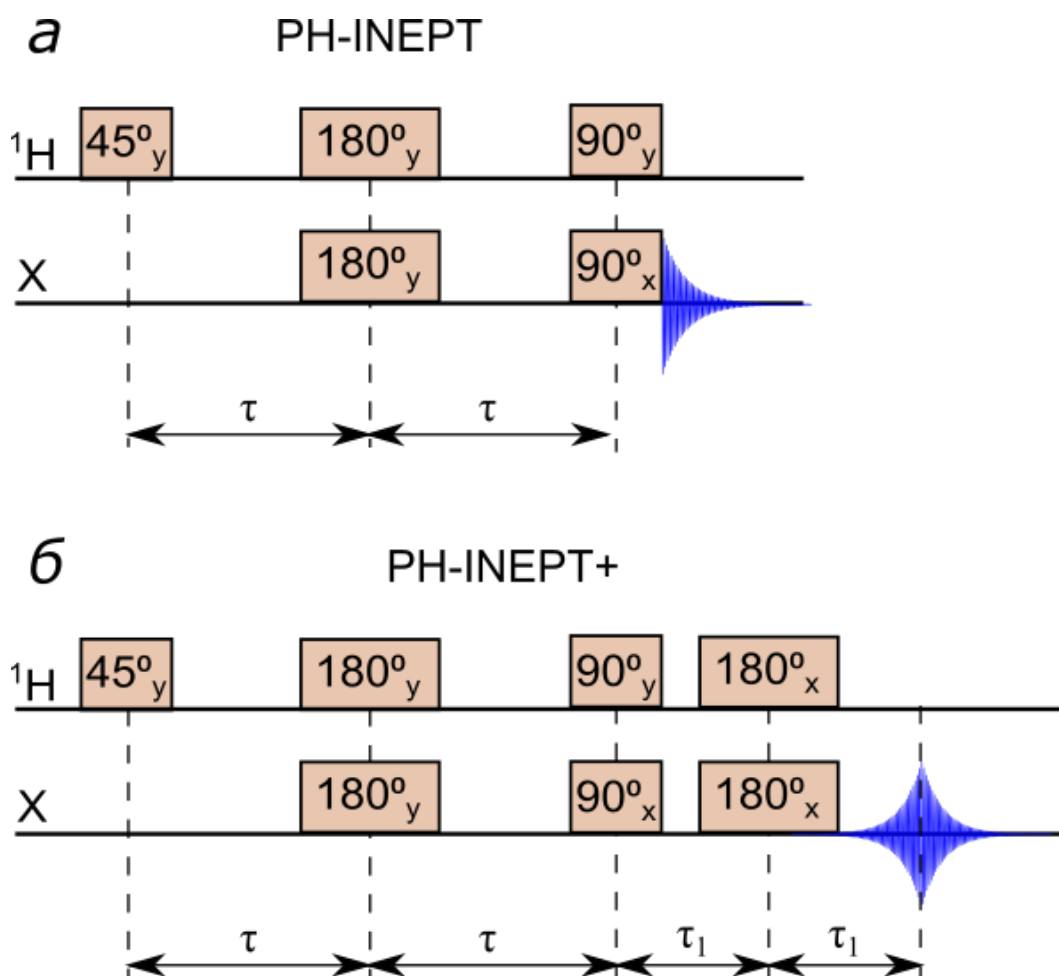


Рисунок 6. Импульсная последовательность PH-INEPT (а) и PH-INEPT+ (б). Оранжевый прямоугольник обозначает неселективный РЧ импульс. X – канал гетероядра.

В работе [84] помимо теоретического объяснения последовательностей PH-INEPT и PH-INEPT+ были также проведены эксперименты с использованием 1,4-дифенилбута-1,3-диина и (триметилсилил)ацетилена в реакции гидрирования с параводородом. Полученное значение усиление интенсивности сигнала ^{13}C при гидрировании 1,4-дифенилбута-1,3-диина составляло 300 раз, а усиление сигнала ^{29}Si при гидрировании (триметилсилил)ацетилена составляло 500 раз. PH-INEPT и PH-INEPT+ были также применены в экспериментах в газовой фазе с гидрированием пропилена в пропан [86]. Для более точного определения задержек между импульсами было проведено моделирование системы состоящей из восьми протонов и одного ядра ^{13}C . Стоит отметить, что в последовательности PH-INEPT необходимо оптимизировать всего одну задержку (τ), в то время как в PH-INEPT+ – две задержки (τ , τ_1). Полученные с помощью PH-INEPT усиления сигнала ^{13}C

составили ~ 10-30 раз, а с помощью последовательности PH-INEPT+ ~ 10 раз. Меньшее значение усиления сигнала в экспериментах с PH-INEPT+ связано с длительностью последовательности, которая увеличилась из-за дополнительного блока. На временах действия данной последовательности начинает давать вклад релаксация T_2 .

Еще одной импульсной последовательностью для переноса поляризации на гетероядро является последовательность ESOTHERIC (efficient spin order transfer to heteronuclei via relayed INEPT chains, эффективный перенос спинового порядка к гетероядрам через связанные INEPT цепи) [87]. Она также состоит из блоков INEPT, которые последовательно переносят поляризацию с одного ядра на другое. На примере дважды ^{13}C -меченного коричневого эфира пировиноградной или уксусной кислоты был показан последовательный перенос поляризации на ядро $^{13}\text{C}_3$ и $^{13}\text{C}_4$ (см Рисунок 7). Уровни поляризации на ядрах ^{13}C составили до ~ 20%.

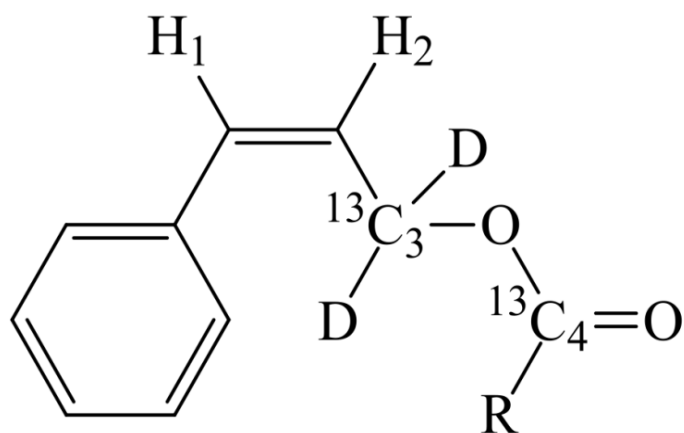


Рисунок 7. Дважды ^{13}C -меченный коричневый эфир пировиноградной или уксусной кислоты.

В других работах с ESOTHERIC уровень поляризации ^{13}C достигал ~ 60% [88]. Разработка импульсных последовательностей до сих пор является актуальной задачей, поэтому существует множество работ на эту тему [49,89–91].

1.3.2. Перенос поляризации на гетероядро в SABRE

В SABRE перенос гиперполяризации на гетероядро также, как и в случае ИППЯ, может происходить как в слабых, так и в сильных магнитных полях.

Существует два основных механизма, которые отвечают за спонтанный перенос поляризации в постоянном магнитном поле: когерентное перераспределение и кросс-релаксация. Когерентное распределение является преобладающим механизмом в слабых магнитных полях, а кросс-релаксация в сильных магнитных полях. Причем эффективность переноса поляризации с помощью кросс-релаксации значительно ниже, чем в случае с когерентным перераспределением.

Для понимания процесса переноса поляризации используют понятие «антипересечение уровней». Простейший пример антипересечения уровней (см. Рисунок 8) можно рассмотреть на примере двух собственных Зеемановских состояний $|M\rangle$ и $|L\rangle$, которые при отсутствии спин-спинового взаимодействия пересекаются. Однако при наличии спин-спинового взаимодействия пересечения состояний $|M\rangle$ и $|L\rangle$ не происходит. При этом происходит смешивание состояний. Смешивание состояний используют для того, чтобы перевести населенность одного состояния, например, со спинового порядка протонов $p\text{-H}_2$, в населенность состояния субстрата. Управлять антипересечениями уровней можно с помощью внешнего магнитного поля, так как расщепление Зеемановских уровней зависит от магнитного поля, а величина КССВ – нет.

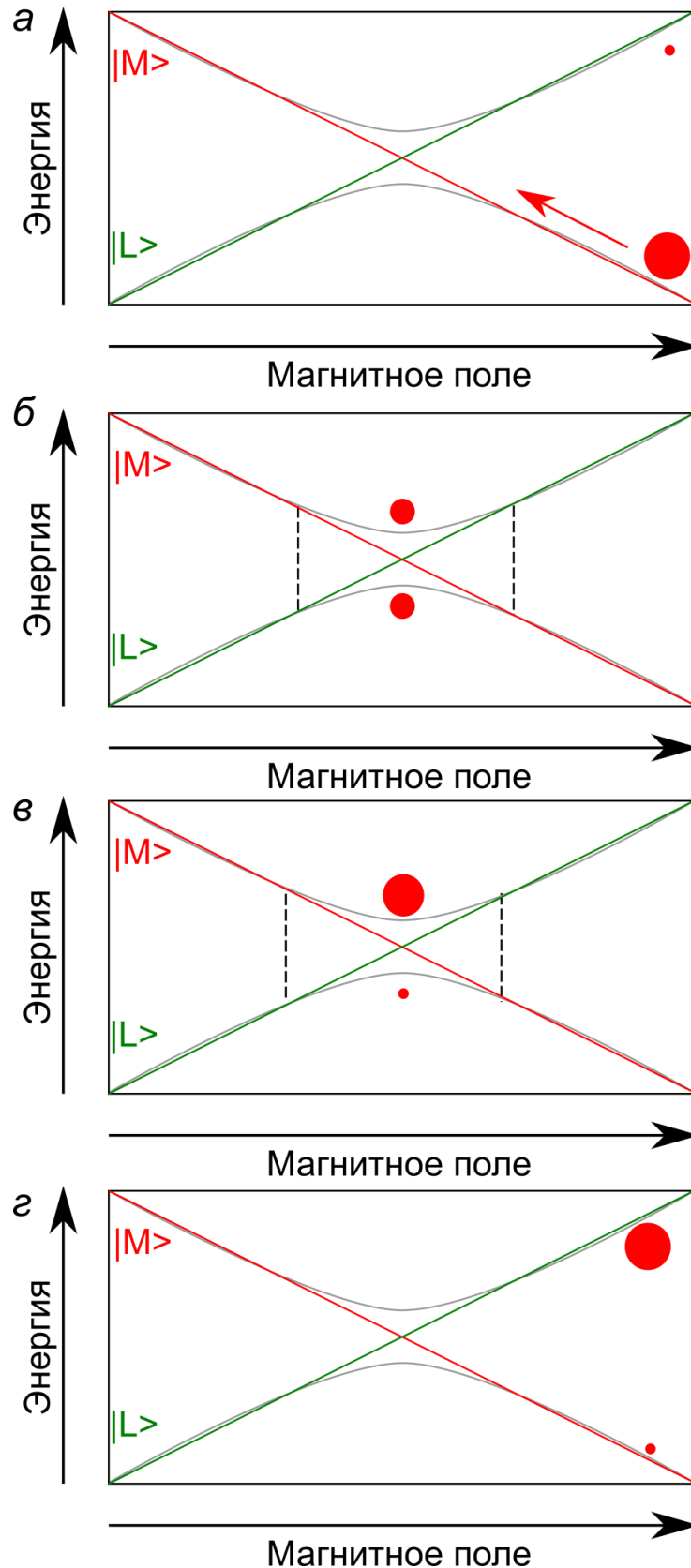


Рисунок 8. Принцип антипересечения уровней. В начальном состоянии после присоединения параводорода только один из уровней заселен (заселенность уровня показана красным кружком) (*a*). Далее при понижении магнитного поля достигается условие антипересечения уровней, так как уровни $|L\rangle$ и $|M\rangle$ связаны, и происходит когерентное перераспределение населенностей уровней (*б*). После пребывания в условиях

антипересечения и достижения максимального возможного переноса (ϵ) происходит увеличение магнитного поля (z).

В экспериментах с циклированием магнитного поля образец переносят из внешнего магнитного поля в магнитное поле, при котором происходит эффективный перенос поляризации (создаются условия антипересечения уровней). Было показано, что таким образом гиперполяризацию можно создать на таких ядрах, как ^{13}C [92–94], ^{15}N [92,95], ^{31}P [96,97], ^{19}F [98,99], ^{119}Sn [100], ^{29}Si [100]. Оптимальные значения магнитного поля для переноса поляризации на ^1H составляют порядка мТл [101], в то время как для переноса поляризации на гетероядра оптимальные значения магнитного поля – порядка мкТл [102,103]. Такая разница связана с тем, что спонтанный перенос поляризации происходит через связывание спинов, а в комплексе КССВ для пары ^1H - ^{15}N больше, чем для ^1H - ^1H [104]. С помощью SABRE и переноса гиперполяризации на гетероядра в слабых магнитных полях уже были гиперполяризованы такие биологически совместимые молекулы, как аминокислоты [105], витамин B_3 [95,106], пируват [94], метронидазол [95,107,108] и орнидазол [109] (противопаразитное средство), противогрибковые средства [110] и другие.

Основным минусом метода с переносом поляризации в слабых полях является необходимость переноса образца из слабого магнитного поля, где происходит перенос поляризации, в сильное магнитное поле, чтобы зарегистрировать сигнал. За время переноса образца теряется часть полученной гиперполяризации из-за спин-решеточной релаксации. Решением данной проблемы стало открытие спонтанного (без применения импульсных последовательностей) переноса гиперполяризации на субстрат в сильном магнитном поле [111]. Было продемонстрировано усиление сигнала ЯМР ^1H пиридина при барботировании раствора параводородом в магнитном поле 9.4 Тл. Первые ^{15}N 2М МРТ изображения со спонтанным переносом гиперполяризации на гетероядра (^{15}N) в сильном магнитном поле 9.4 Тл были получены для $^{15}\text{N}_2$ -имидазола и ^{15}N -никотинамида [112].

Для увеличения эффективности переноса поляризации в сильных магнитных полях можно использовать последовательности РЧ импульсов.

Основной идеей применения импульсных последовательностей является создание антипересечений уровней, когда образец находится в сильном магнитном поле. Одна из последовательностей, в которой создаются условия антипересечения уровней, – это LIGHT-SABRE (low-irradiation generation of high tesla-SABRE, генерация SABRE в высоких магнитных полях с использованием маломощного облучения) [113]. В ней используется маломощный длительный («непрерывный») импульс (см. Рисунок 9а) настроенный на резонанс субстрата, который присоединен к комплексу SABRE в экваториальной позиции. «Непрерывный» импульс позволяет создать условия антипересечения уровней. В импульсной последовательности также присутствует селективный 90° импульс, который переводит намагниченность экваториально-связанного субстрата параллельно Z, не допуская расфазировки. Блок из «непрерывного» и 90° импульса повторяется n раз для максимизации полученной на гетероядре гиперполяризации. После n повторений производится регистрация сигнала. На примере с ^{15}N -обогащенным пиридином было получено усиление ~ 500 раз.

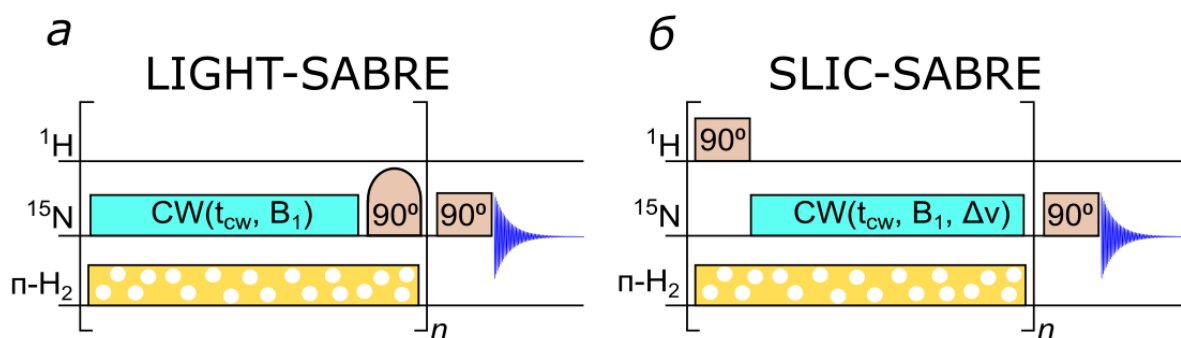


Рисунок 9. Импульсная последовательность LIGHT-SABRE (а) и импульсная последовательность SLIC-SABRE (б). Оранжевый прямоугольник обозначает неселективный РЧ импульс, прямоугольник со скругленным верхом – селективный РЧ импульс, голубой прямоугольник с надписью CW означает маломощный «непрерывный» импульс, t_{cw} – длительность импульса, B_1 – амплитуда импульса, $\Delta\nu$ – смещение от частоты резонанса, желтый прямоугольник с белыми кругами – барботирование раствора параводородом, n – число повторений выделенного блока.

Позднее в работе Кнехта и др. [114] было показано, что LIGHT-SABRE не демонстрирует максимальной эффективности. В LIGHT-SABRE предполагалось, что начальное состояние протонов образованных из молекулы

$p\text{-H}_2$, которые присоединились к комплексу SABRE, соответствует синглетному состоянию. Однако при присоединении $p\text{-H}_2$ к комплексу SABRE происходит синглет-триплетная конверсия. В таком случае населенность уровней поровну разделяется между состояниями $|S\rangle$ и $|T_0\rangle$, что уменьшает поляризацию, которую можно перенести на гетероядро. Простейшим способом восстановления синглетного порядка является применение 90° неселективного импульса по каналу ^1H . В связи с этим последовательность LIGHT-SABRE была модифицирована в SLIC-SABRE (spin lock induced crossing-SABRE, SABRE вызванное спиновым запираем) (см. Рисунок 9б). Основное отличие SLIC-SABRE – это наличие 90° неселективного импульса по каналу ^1H в блоке для переноса поляризации, а также то, что непрерывный импульс не настроен на резонанс ядра ^{15}N экваториально-связанного субстрата. Выигрыш в усилении сигнала при замене импульсной последовательности LIGHT-SABRE на импульсную последовательность SLIC-SABRE в работе [114] составил ~ 20 раз.

Другая последовательность, которая используется для создания гиперполяризации на гетероядрах в сильных магнитных полях, называется ADAPT-SABRE (alternating delays achieve polarization transfer-SABRE, перенос поляризации в SABRE с использованием переменных задержек) [115] (см. Рисунок 10). Блок ADAPT состоит из повторяющихся блоков РЧ импульсов и задержек и 90° импульса для перевода полученной намагниченности параллельно Z. Сам блок ADAPT может повторяться n раз для увеличения намагниченности. То есть основным фактором, определяющим длительность последовательности, является длина задержки Δ и числа повторений m и n . Протокол ADAPT может выполняться как с отсутствием импульсов по каналу ^1H , так и в присутствии «непрерывного» импульса на канале ^1H для обеспечения химической эквивалентности протонов гидрида. При использовании такого импульса усиление сигнала на 30-40% больше, чем в его отсутствии. Полученное усиление сигнала ЯМР ^{15}N молекулы ^{15}N -этилникотината составило ~ 1000 раз.

ADAPT

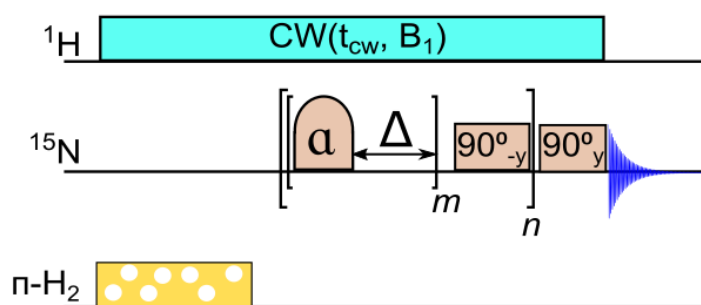


Рисунок 10. Импульсная последовательность ADAPT. Оранжевый прямоугольник обозначает неселективный РЧ импульс, прямоугольник со скругленным верхом – селективный РЧ импульс, голубой прямоугольник с надписью CW означает маломощный непрерывный импульс, t_{cw} – длительность импульса, B_1 – амплитуда импульса, желтый прямоугольник с белыми кругами – барботирование раствора параводородом, m и n – число повторений выделенных блоков.

Одной из классических последовательностей для переноса гиперполяризации, как и в случае ИППЯ, является последовательность INEPT. Она была использована в работе Правдивцева и др. [116] в экспериментах SABRE для регистрации сигнала ^{15}N ЯМР и 2М спектра ЯМР. С помощью трех последовательностей, основанных на INEPT, исследовалось значение усиления сигнала на таких субстратах, как ^{15}N -пиридин и $^{15}\text{N}_2$ -имидазол. Помимо последовательностей PH-INEPT и PH-INEPT+ использовалась последовательность SABRE-INEPT. SABRE-INEPT (см. Рисунок 11а) формирует интегральную намагниченность на связанном и свободном субстрате в растворе. PH-INEPT+ и SABRE-INEPT были применены для экспериментов SABRE впервые в работе Аткинсона и др. [70]

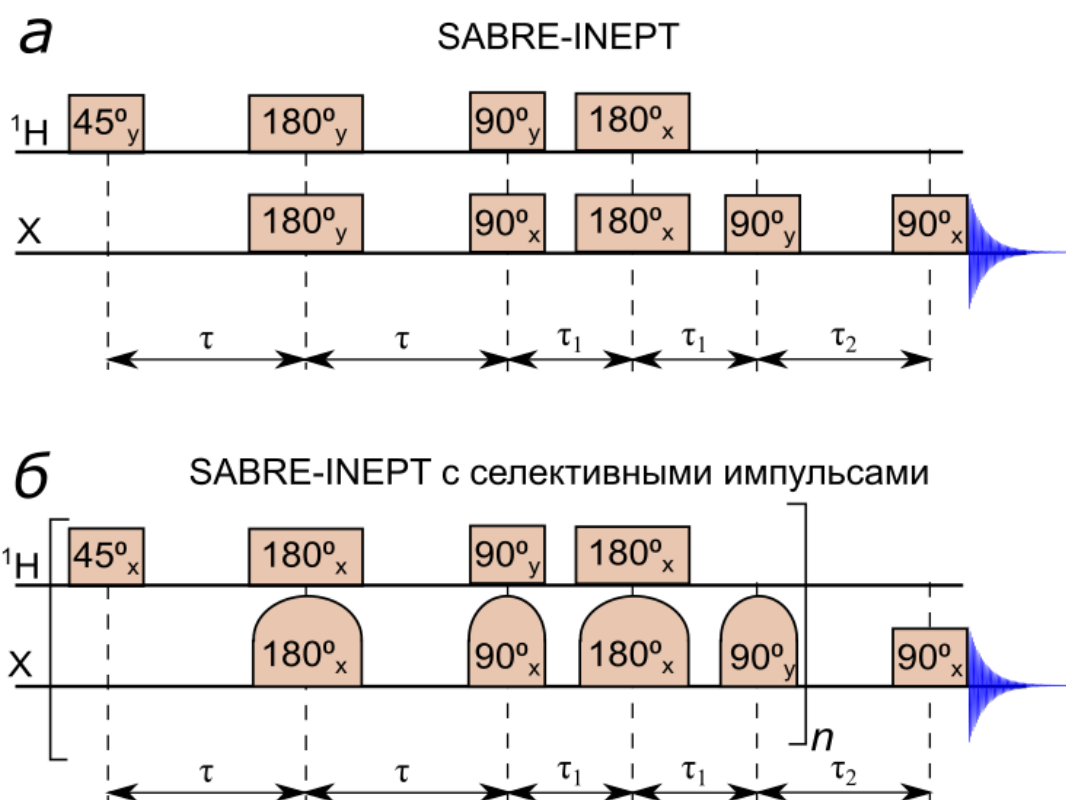


Рисунок 11. Последовательность SABRE-INEPT (а) и SABRE-INEPT с селективными импульсами (б). Оранжевый прямоугольник обозначает неселективный РЧ импульс, прямоугольник со скругленным верхом – селективный РЧ импульс.

При использовании последовательности PH-INEPT [116] усиление сигнала для ^{15}N -пиридина, находящегося в комплексе в экваториальной позиции, составило ~ 3200 ; для свободного субстрата также наблюдалось небольшое усиление сигнала. Основным недостатком данной последовательности является антифазный вид сигнала ЯМР. При недостаточном спектральном разрешении положительная и отрицательная часть такого сигнала могут аннулировать друг друга. Использование последовательности PH-INEPT+ позволяет решить данную проблему. Полученное усиление сигнала для экваториального ^{15}N -пиридина составило ~ 2000 . Данное значение немного ниже усиления, полученного с помощью PH-INEPT, так как в два раза увеличилась длительность импульсной последовательности. Несмотря на синфазную структуру сигнала экваториального ^{15}N -пиридина, свободный субстрат имел антифазную структуру сигнала. При использовании SABRE-INEPT наблюдалось усиление

сигнала свободного субстрата в ~ 200 раз, а форма сигнала имела синфазный вид. Такое усиление на порядок ниже, чем усиление, которое наблюдалось для связанного субстрата в других импульсных последовательностях. Это связано в первую очередь с тем, что сигнал свободного субстрата при тепловом равновесии в 10 раз больше, чем сигнал от связанного субстрата. Для $^{15}\text{N}_2$ -имидазола усиление сигнала экваториально-связанного субстрата составляло ~ 1500 при использовании PH-INEPT+.

Дальнейшее развитие метод SABRE-INEPT получил в работе Кнехта и др. [117] Было предложено повторять блок, ответственный за перенос поляризации, n раз, а также заменить неселективные импульсы по каналу ^{15}N на селективные (см. Рисунок 11б). Использование селективных импульсов позволяет поляризовать только связанные субстраты, повторяя блок с переносом поляризации несколько раз, при этом не влияя на свободные субстраты, которые уже гиперполяризованы и находятся в растворе. То есть при каждом повторении блока поляризуется только связанный субстрат. Однако стоит учесть, что одновременно с процессом гиперполяризации происходит уменьшение намагниченности свободного субстрата из-за релаксации T_1 . Таким образом, при увеличении числа повторов можно достичь стационарного состояния, когда дальнейшее увеличение числа повторов не будет давать увеличение сигнала. Наибольшее значение усиления сигнала составило ~ 2350 при 60 повторениях блока переноса поляризации, в то время как однократное приложение обеспечивало усиление сигнала только ~ 260 на свободном ^{15}N -пиридине.

Несмотря на разработку различных импульсных последовательностей для переноса поляризации на гетероядро в экспериментах SABRE, работ, в которых бы объединили данный метод переноса и последующую запись МР изображений, до сих пор не проводилось.

1.4. Обзор работ по гетероядерной МРТ с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода

1.4.1. МРТ с использованием ИППЯ

ИППЯ с применением гомогенных катализаторов.

Первое гетероядерное МРТ исследование с использованием гомогенного ИППЯ *in vivo* было выполнено в 2001 году [50]. В качестве субстрата был выбран диметиловый эфир ацетилендикарбоновой кислоты, который был мечен изотопом ^{13}C в карбонильной группе. После гидрирования субстрата параводородом образовывался ГП диметиловый эфир $[1-^{13}\text{C}]$ малеиновой кислоты, меченный изотопами ^{13}C (см. Рисунок 12). Перенос поляризации осуществлялся с помощью циклирования магнитного поля. Для увеличения времени релаксации был использован дейтерированный растворитель – ацетон- d_6 . В *in vivo* экспериментах раствор ГП продукта вводился через хвостовую вену крысы. В результате были получены ^{13}C МРТ изображения, на которых полые вены и некоторые их ответвления четко выделяются, при этом уровень ^{13}C поляризации составлял 0.3%, а время записи изображения – 0.9 с.

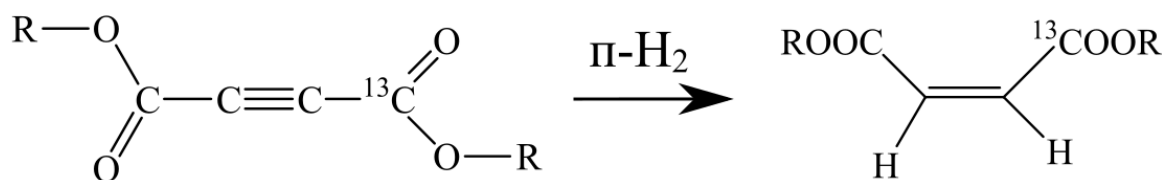


Рисунок 12. Реакция гидрирования диметилового эфира $[1-^{13}\text{C}]$ ацетилендикарбоновой кислоты параводородом.

Далее были проведены и другие исследования, где с применением гомогенной ИППЯ стали возможными *in vivo* исследования диффузии и перфузии субстрата [118–120], а также исследования субстратов, которые принимают участие в метаболизме в цикле Кребса [121–123]. Еще одним направлением МРТ стала визуализация катетера, который вводится в живой организм. Такая возможность была продемонстрирована в *in vivo* исследовании с использованием ГП 2-гидроксиэтил $[1-^{13}\text{C}]$ пропионата, который находился

внутри катетера [124]. Катетер перемещался по аорте свиньи, при этом уровень ОСШ достигал 80.

В одной из последних работ с применением гомогенной ИППЯ в МРТ исследованиях был получен гиперполяризованный ^{13}C -фумарат [125]. Было проведено сравнение результатов полученных с помощью ИППЯ и ДПЯ. Для ДПЯ экспериментов использовался коммерческий поляризатор. Уровни поляризации ^{13}C оказались сравнимыми (~ 20%). С помощью ГП ^{13}C -фумарата были проведены МР исследования по изучению перфузии и метаболических превращений в мыши *in vivo*. На 2М МР изображениях, зарегистрированных по ядрам ^{13}C , были видны нижняя полая вена, сердце, левая и правая почечные вены, а также левая и правая общие сонные артерии. В магнитном поле 7 Тл в экспериментах с ДПЯ была видна перфузия почек, в то время как в ИППЯ экспериментах в магнитном поле 7 Тл она была практически незаметна. Перфузия почек в экспериментах ИППЯ становилась заметной в магнитном поле 11.7 Тл. Для исследования метаболических превращений использовались мыши с подкожной лимфомой EL-4. Была проведена магнитно-резонансная спектроскопия с записью спектров в каждом пикселе (^{13}C CSI) *in vivo*. В случае с ДПЯ интенсивность сигналов была в два раза больше, чем в экспериментах с ИППЯ. Тем не менее, оба метода предоставляли одинаковую информацию о соотношении фумарата и малата.

ИППЯ с применением гетерогенных катализаторов.

МРТ с использованием ИППЯ с гетерогенными катализаторами была показана в 2007 году [126]. 2М МРТ изображения по ^1H были получены с использованием иммобилизованного на SiO_2 катализатора Уилкинсона. Благодаря развитию ИППЯ с гетерогенными катализаторами, в частности, с металлическими катализаторами, нанесенными на твердый носитель, было показано, что наиболее эффективным катализатором является Rh/TiO_2 [60]. В работе [60] при гидрировании пропилена параводородом были использованы три катализатора: Pt/TiO_2 , Pd/TiO_2 и Rh/TiO_2 . Несмотря на то, что все три катализатора показали свою активность, наибольшее значение интенсивности

сигнала достигалось при использовании Rh/TiO₂. Большая интенсивность сигнала позволила провести МРТ исследование, где фантомы представляли собой изогнутые пластиковые капилляры в виде букв. Полученное ¹H 3М МР изображение на МР томографе с магнитным полем 9.4 Тл имело пространственное разрешение 0.625 × 0.625 × 0.625 мм³/пиксель, ОСШ = 13. Стоит отметить, что время записи ¹H 3М МР изображения было примерно в 20 раз короче, чем время записи полученное в другой работе ранее при записи ¹H 2М МР изображения ГП пропана [126]. В другой работе [61] получали ГП пропан-d₆, используя также Rh/TiO₂. В результате были получены ¹H 3М МР изображения с пространственным разрешением 0.5 × 0.5 × 0.5 мм³/пиксель в магнитном поле 9.4 Тл за 17.7 с при уровне поляризации ~ 1%. Дополнительно были получены ¹H 2М МР изображения в магнитном поле 0.0475 Тл с пространственным разрешением 0.88 × 0.88 мм²/пиксель за 0.7 с при P ~ 0.1%. В еще одной работе с ГП пропаном, полученным в реакции гидрирования с использованием Rh/TiO₂, было проведено сравнение импульсных последовательностей для ¹H 2М МРТ – UTE и FLASH [127]. В результате было получено, что UTE является более быстрой импульсной последовательностью. Также в работе была показана возможность разделения сигналов пропана и пропилена. Для этого в ампулу с диаметром 15 мм концентрично помещали в ампулу с диаметром 10 мм. В первой ампуле располагался пропан, а во второй – пропилен. После подавления сигнала пропана на МР изображении оставался вклад только от пропилена.

В другой работе для проведения реакции гидрирования параводородом использовался биметаллический нанесенный катализатор Pd-In/Al₂O₃[128]. В результате были получены ¹H МРТ изображения ГП продуктов гидрирования пропина. В этой работе томография проводилась селективно по группам пропилена – CH, CH₂ и C₃.

Несмотря на разнообразие работ, стоит отметить, что работы по МРТ с использованием гетероядер для регистрации изображения, где в качестве метода гиперполяризации использовалась бы гетерогенная ИППЯ, отсутствуют.

ИППЯ с гидрированием по боковой цепи.

Метод ИППЯ с гидрированием по боковой цепи получил большее распространение в МРТ исследованиях благодаря тому, что стало возможно создать гиперполяризацию с помощью параводорода таких соединений, которые ранее использовались в ДПЯ (ацетат и пируват).

В работах [67,79] ИППЯ с гидрированием по боковой цепи была использована для получения ^{13}C 3М МР изображений таких соединений как ^{13}C -аллилпирувата [79] и ^{13}C -этилацетат [67,79] в метаноле- d_4 . В работе [79] максимальное значение ОСШ для ^{13}C -аллилпирувата составило ~ 130 , а для ^{13}C -этилацетата ~ 150 . В работе [67] ОСШ равнялось 35 для ^{13}C -этилацетата. Кроме того, в работе [79] были получены ^{13}C 2М МР изображения этих соединений в D_2O . ОСШ для ^{13}C -аллилпирувата составило ~ 15 , а для ^{13}C -этилацетата ~ 135 . Несмотря на то, что замена метанола- d_4 на D_2O привела к падению сигнала и, как следствие, значение ОСШ, такой переход и достигнутые ОСШ показывают возможность перехода к *in vivo* исследованиям, где необходимо, чтобы растворитель был нетоксичным для живого организма.

Однако стоит отметить, что в этих работах [67,79] была опущена стадия гидролиза. В работе Рейнери и др. [129] также использовался ^{13}C -аллилпируват, поляризация на ядрах ^{13}C в данной молекуле составила $6.2 \pm 0.3\%$. После гидролиза поляризация на ядрах ^{13}C в молекуле $[1-^{13}\text{C}]$ пирувата составила $3.5 \pm 0.5\%$. Несмотря на уменьшения уровня поляризации была выполнена магнитно-резонансная спектроскопия с записью спектров в каждом пикселе (^{13}C CSI, ^{13}C chemical shift imaging). С помощью ^{13}C CSI было зарегистрировано распределение $[1-^{13}\text{C}]$ лактата и $[1-^{13}\text{C}]$ пирувата в сердце здоровой мыши и мыши с дилатационной кардиомиопатией. На основе этих распределений было оценено, что скорость конверсии пируват-лактат ниже в случае мыши с заболеванием сердца.

1.4.2. МРТ с использованием SABRE

В работе Адамса и др. [69], в которой впервые был продемонстрирован метод SABRE, была также показана возможность выполнить МРТ пиридина по ^1H . МР изображения были получены с помощью последовательности TrueFISP за 0.7 секунды. В качестве фантома была выбрана 8 мм трубка, внутри которой были помещены стеклянные капилляры диаметром 1 мм. Далее в 2015 году впервые было получено 2М изображение по ядрам ^{15}N [130]. В качестве субстрата использовался обогащенный изотопом ^{15}N пиридин; уровень поляризации ядер ^{15}N составлял $\sim 1\%$ в поле 4.7 Тл. Перенос поляризации на гетероядро происходил в слабом магнитном поле. Время записи изображения составило всего 0.4 секунды. Также в 2015 году Живонитко и др. [97] продемонстрировали возможность 2М МРТ по ядрам ^{31}P трифенилфосфина. Уровень поляризации ядер ^{31}P составлял $\sim 0.3\%$, время записи изображения составило менее одной секунды. Группой Дакетта была показана возможность записи 2М МРТ изображений по ядрам ^{31}P различных фосфатных эфиров [96]. Позднее группой Чекменева была продемонстрирована 2М МРТ на ядрах ^{19}F для 3- ^{19}F -пиридина [98] при уровне поляризации ^{19}F $\sim 0.2\%$. 3- ^{19}F -пиридин также является потенциальным агентом для измерения уровня pH, так как значения его химических сдвигов зависят от pH среды. Далее 2М МР изображения по ядрам ^{19}F были получены для различных фторированных соединений группой Дакетта [99]. В работе Ховенера и др. [131] были получены ^{13}C 2М МР изображения ^{13}C -обогащенного никотинамида. Уровень поляризации ядер ^{13}C составлял 0.03%; несмотря на такое небольшое значение, изображение было получено за ~ 1 секунду. В недавней работе 2022 года с помощью метода SABRE и переноса поляризации в слабых магнитных полях был получен уровень гиперполяризации ^{13}C $\sim 10\%$ для [1- ^{13}C]пирувата [94]. Такой уровень гиперполяризации позволил выполнить ^{13}C 3М МРТ за 1.5 секунды.

1.4.3. Особенности МРТ исследований с использованием методов гиперполяризации

МРТ с использованием ГП соединений имеет основное отличие от МРТ с использованием соединений с равновесной намагниченностью – гиперполяризация не восстанавливается со временем, как это происходит в случае релаксации T_1 для соединений с равновесной поляризацией ядерных спинов. Для восстановления значения намагниченности необходимо заново проводить процесс гиперполяризации. В связи с этим возникает ограничение на число усреднений, которое можно сделать в течение эксперимента.

В МРТ с использованием ГП соединений предпочтение отдают быстрым импульсным последовательностям, а также последовательностям, где для регистрации используется малый угол поворота. Наиболее распространенные последовательности – FLASH [60,61,128,132], FISP [118,122,133], UTE (ultrashort TE, томография с использованием ультракоротких TE) [127] и RARE (rapid acquisition with relaxation enhancement, также называется TSE) [82,120].

Дополнительным затруднением является антифазная форма сигнала ЯМР, например, в экспериментах PASADENA или ALTADENA. При неправильно подобранных параметрах импульсной МРТ последовательности части сигнала с противоположными знаками могут полностью скомпенсировать друг друга. В результате суммарная намагниченность будет равняться нулю. Для устранения такой проблемы применяется импульсная последовательность, которая приводит антифазную структуру сигнала к синфазному виду [134,135].

1.5. Биосовместимость

При работе с биологическими объектами важно, чтобы вводимые контрастные агенты (ГП соединения и их растворы) были совместимы с живыми организмами.

В работе [136] было проведено исследование токсичности каждого из компонентов раствора в экспериментах SABRE. Основным токсичным компонентом оказался катализатор SABRE. Схожая проблема возникает и при

использовании гомогенных катализаторов в методах ИППЯ. В связи с этим одной из главных задач является отделение катализатора от раствора. Существуют несколько методов очистки растворов от катализатора, чтобы их концентрация стала меньше токсичной дозы, и раствор был бы пригоден для клинических исследований. Среди них – фильтрация [137], жидкостная экстракция [65,138,139] и осаждение [140,141].

Не менее важным является выбор правильного растворителя для проведения экспериментов с использованием гиперполяризации. Наиболее привлекательными для биомедицинских целей являются растворы с использованием воды в качестве растворителя или смеси этанола с водой, хотя наибольшие уровни поляризации с использованием методов гиперполяризации были достигнуты при использовании таких растворителей, как метанол- d_4 или этанол- d_6 . При использовании водных растворов уровни поляризации значительно падали. В работе [136] исследовалась цитотоксичность растворителя на клеточных линиях A549 и MCF7. Клетки подвергались воздействию этанола- d_6 с различной степенью разбавления в D_2O . Жизнеспособность обоих типов клеток падала при воздействии 100%-го этанола- d_6 в течение 6 часов на клетки. При разбавлении (1:1) жизнеспособность клеток практически не изменялась по сравнению с применением D_2O . Однако при увеличении времени воздействия до 24 часов жизнеспособность клеток заметно падала при использовании 50%-го этанола- d_6 . При использовании 30%-го этанола- d_6 жизнеспособность клеток сохранилась спустя 24 часа и более. Получается, что при использовании растворителя с содержанием этанола- d_6 выше 30% необходимо учитывать время воздействия на живой организм. Стоит отметить, что при использовании 100% этанола- d_6 в эксперименте SABRE усиление сигнала 1H составляло более 2800 раз, в то время как при использовании смеси этанола- d_6 с D_2O усиление составило всего ~ 100 раз в магнитном поле 9.4 Тл для метил[4,6- d_2]никотината.

В настоящий момент выполнено множество работ с использованием воды [109,139,142–146] или смеси воды и этанола [95,144,147] в качестве

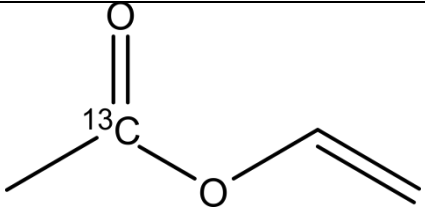
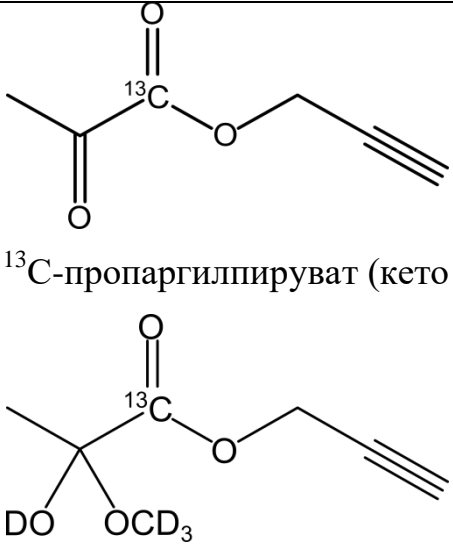
растворителя для исследований ЯМР с использованием методов гиперполяризации.

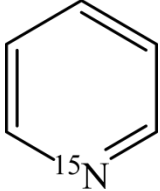
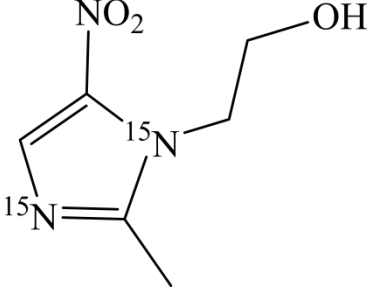
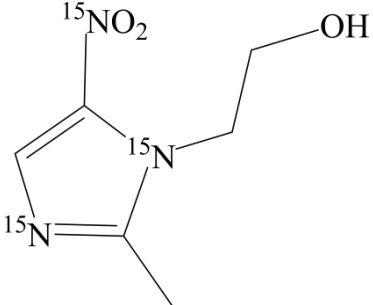
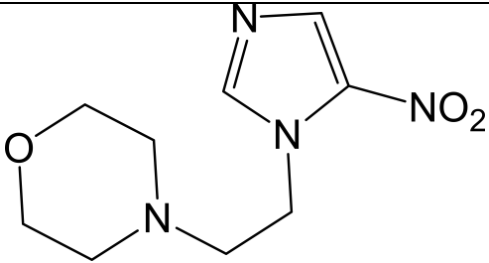
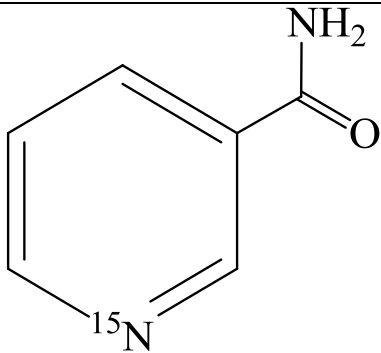
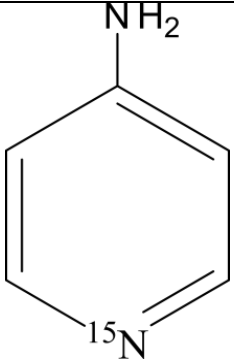
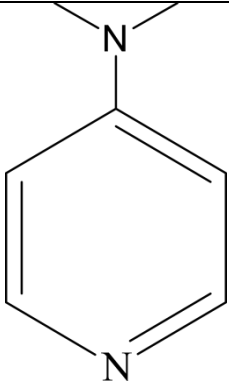
1.6. Исследуемые молекулы и их значимость для исследований методом МРТ

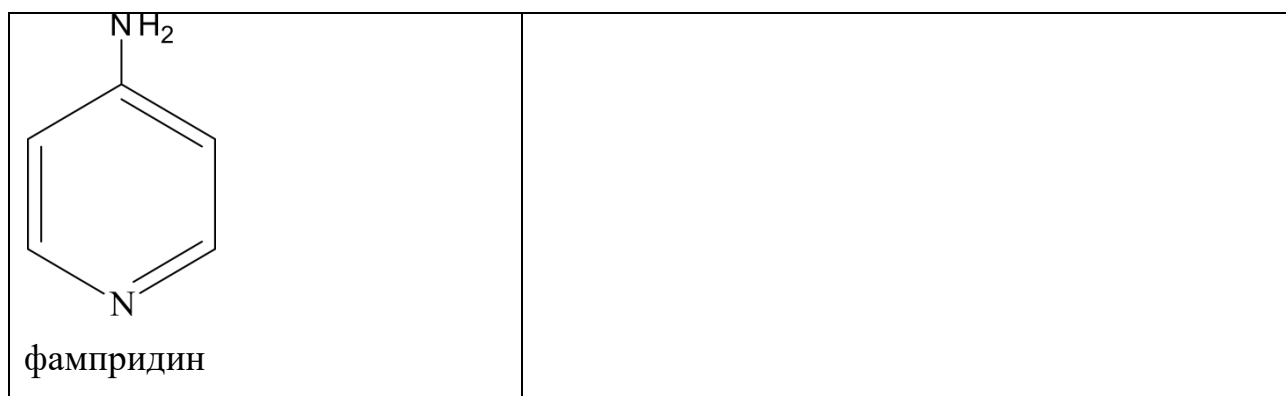
В данной работе в качестве объектов исследования преимущественно были использованы молекулы, которые не оказывают токсического эффекта на живой организм и биологически совместимы с ним. В работе по ИППЯ с гидрированием по боковой цепи использовались производные ацетата и пирувата – ^{13}C -винилацетат и ^{13}C -пропаргилпируват. В работе с использованием SABRE и слабых магнитных полей для переноса поляризации – ^{15}N -изотопологи метронидазола и ниморазол- $^{15}\text{N}_3$. В работе с переносом поляризации с помощью импульсных последовательностей и использованием SABRE – гетероциклические основания, такие как пиридин, никотинамид, фампридин и 4-диметиламинопиридин как с естественным содержанием ядер ^{15}N , так и с естественным содержанием ядер ^{15}N .

Структуры используемых соединений представлены в Таблица 2.

Таблица 2. Структура соединений, используемых в работе.

 <p>^{13}C-винилацетат</p>	 <p>^{13}C-пропаргилпируват (кето форма)</p> <p>^{13}C-пропаргилпируват (полукетальная форма)</p>
---	---

 <p>^{15}N-пиридин</p>	 <p>$^{15}\text{N}_2$-метронидазол</p>  <p>$^{15}\text{N}_3$-метронидазол</p>
 <p>$^{15}\text{N}_3$-ниморазол</p>	 <p>^{15}N-никотинамид</p>
 <p>^{15}N-фампридин</p>	 <p>4-диметиламинопиридин</p>



Ниже более подробно будет описана роль соединений и их производных в биологических процессах, а также достигнутые результаты по гиперполяризации данных соединений.

Пируват

Пируват занимает центральную роль в клеточном метаболизме (см. Рисунок 13). Продуктами метаболизма ^{13}C -пирувата являются ^{13}C -лактат, ^{13}C -аланин и ^{13}C -гидрокарбонат ($\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$). Значения химических сдвигов ^{13}C данных продуктов равны ~ 183 м.д., ~ 176 м.д., ~ 162 м.д., в то время как значение химического сдвига для пирувата ~ 171 м.д. Такая большая разница значений позволяет проследить за метаболическими превращениями пирувата в организме. В зависимости от состояния клетки она будет обладать разной концентрацией метаболитов, которая зависит от количества кислорода в клетке и кислотности.

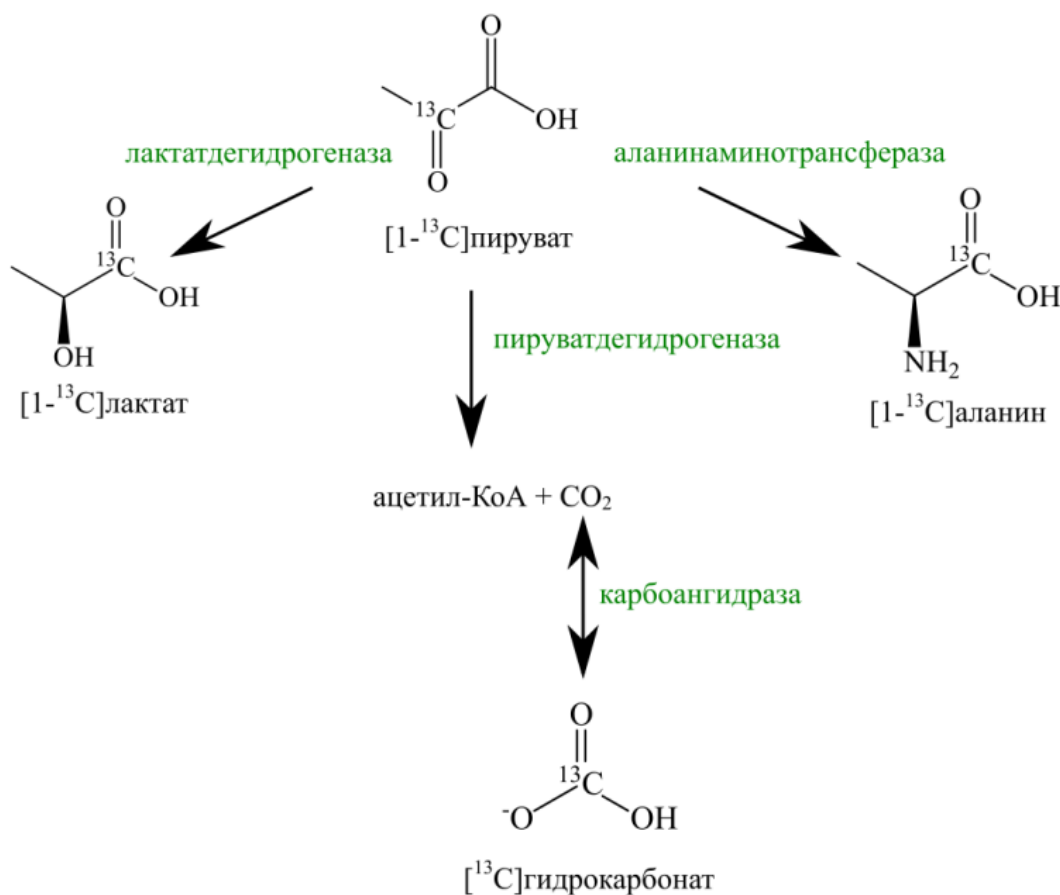


Рисунок 13. Метаболомные пути превращения [1-¹³C]пирувата.

Гидрокарбонат является внеклеточным буфером, который сохраняет значение кислотного баланса в клетке с помощью интерконверсии с диоксидом углерода CO₂. Патологические изменения в клетке, такие как ишемия, заболевания почек и заболевания легких связаны с изменением pH клетки [148–150]. Изменение pH среды в свою очередь вызывает изменение количества гидрокарбоната, поэтому он может использоваться в качестве зонда для исследования этих болезней. К настоящему времени было выполнено множество ¹³C МРТ in vivo исследований с использованием гиперполяризованного [¹³C]гидрокарбоната [36,37,151].

Конверсия [1-¹³C]пирувата в [1-¹³C]лактат в организме используется для дифференциации здоровых и раковых клеток и мониторинга развития рака, т.к. в раковых клетках конверсия пирувата в лактат увеличивается [26–28]. Таким образом, ¹³C МРТ позволяет дифференцировать раковые клетки от нормальных тканей.

Пируват активно используется для исследований МРТ с использованием методов гиперполяризации, так как он обладает длинным временем релаксации T_1 (~ 25-60 секунд [27]), быстро распространяется в клетках и метаболизируется [152].

Ацетат

Мозг человека получает большую часть энергии (молекулы аденозинтрифосфорной кислоты) из метаболизма глюкозы в цикле Кребса. В большинстве случаев глюкоза используется для исследований метаболизма нейронов. Ацетат является альтернативным источником энергии мозга, который представляет собой глиа-специфичную молекулу. Ацетат метаболизируется преимущественно в глиии астроцитами, но не в нейронах. Из-за такой особенности исследования с использованием ацетата стали дополняющими к исследованиям с глюкозой, что позволило отдельно исследовать глиальный и нейронный метаболизм. Также при использовании ацетата можно определить болезни, которые протекают непосредственно в глиии. Исследования ЯМР мозга с ацетатом *in vivo* проводились несколькими группами исследователей как на животных [153,154], так и на людях [155,156].

С помощью введения ацетата в цикл Кребса изучались влияние трийодтиронина (гормон щитовидной железы, который используется для лечения болезней щитовидной железы) на энергетический метаболизм [157] и роль разобщающего белка в энергетическом метаболизме [158] *in vivo* в мышцах.

Пиридин

В первой работе с использованием SABRE [69] пиридин использовался как субстрат, усиление по ^1H составляло 550 раз, по ядрам ^{13}C – 823 раза. С тех пор он является модельной молекулой, на которой апробируются новые протоколы SABRE. Это связано с тем, что пиридин обладает простой структурой и хорошо связывается с комплексом SABRE. Интересным свойством пиридина является его чувствительность химического сдвига к pH

среды. В работе [159] было показано, что ^{15}N -пиридин может использоваться в МР исследованиях в качестве детектора значения рН среды, причем разница в расположение резонансных пиков в спектре ЯМР отличаются до 90 м.д. при разных рН. Стоит отметить, что пиридин является токсичным веществом.

Метронидазол и ниморазол

Метронидазол – это лекарственный препарат, который относится к классу нитроимидазолов. Он используется как противопаразитное и противомикробное средство. Метронидазол также может использоваться как индикатор гипоксии, то есть участков пониженной концентрации кислорода. Гипоксия развивается в раковых опухолях, поэтому обнаружение таких участков позволит более точно выделять пораженный раком очаги и направлять туда большие дозы радиации при противораковом лечении [160]. Ниморазол, как и метронидазол, используется для борьбы с бактериями и в качестве сенсора гипоксии. Ниморазол также применяется для лечения плоскоклеточного рака [161].

Метронидазол [162] и $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол [163] были гиперполяризованы с помощью метода SABRE с переносом поляризации с помощью изменения магнитных полей. В работе [163] было показано, что время релаксации T_1 в поле 1.4 Тл составило ~ 9.7 минут для $^{15}\text{NO}_2$ группы, и ~ 3.1 и ~ 3.8 минут для ядер $^{15}\text{N-1}$ и $^{15}\text{N-3}$. При этом уровень поляризации для каждого из трех ядер составил $\sim 16\%$.

Никотинамид

Никотинамид (витамин РР или В₃) активно используется в терапевтических целях в первую очередь для лечения авитаминозов. Никотинамид нетоксичен и используется в качестве добавки к еде. Сейчас никотинамид проходит испытания в качестве потенциального средства для предотвращения развития сахарного диабета I типа у людей с высоким риском заболевания [164]. Структура никотинамида представляет собой пиридиновое кольцо с амидной группой. Благодаря своей структуре данный субстрат

применим для экспериментов SABRE. В работе [165] для ^{15}N -никотинамида было получено усиление ~ 11000 раз в поле 9.4 Тл. Время релаксации T_1 для ^{15}N в поле 9.4 Тл составило ~ 20 секунд.

Фампридин

Фампридин (4-аминопиридин, далфампридин) имеет терапевтическое значение. Его используют для контроля симптомов демиелинизации и при нарушениях нервно-мышечной передачи [166]. Фампридин восстанавливает проводимость в демиелинизированных аксонах за счет блокирования калиевых (K^+) каналов и усиливает нейрональную или нервно-мышечную передачу в нормально миелинизированных нейронах за счет увеличения притока кальция (Ca^{2+}). Структура фампридина также содержит пиридиновое кольцо, поэтому фампридин является подходящим субстратом для экспериментов SABRE. ^{15}N -фампридин был гиперполяризован в работе [167], для переноса поляризации использовалось циклирование магнитного поля. Уровень ^{15}N поляризации составил $\sim 2\%$ в поле 7.1 Тл.

4-Диметиламинопиридин

4-диметиламинопиридин является производным от пиридина соединением. Он используется в качестве катализатора реакции ацилирования спиртов и аминов, катализатора этерификации, катализатора силилирования и тритилирования спиртов. В отличие от большинства соединений используемых в данной работе 4-диметиламинопиридин является токсичным веществом, вызывает раздражение кожи [168]. Ранее он не использовался в экспериментах по созданию гиперполяризации.

1.7. Обобщение литературного обзора и задачи исследования

В завершение данного литературного обзора необходимо отметить, что получение МР изображений по гетероядрам, гиперполяризованным с помощью параводорода, ранее преимущественно осуществлялось с применением метода ИППЯ с гидрированием по боковой цепи и метода SABRE с переносом

поляризации с помощью слабых магнитных полей. При этом до начала выполнения описываемых ниже исследований отсутствовали не только работы по сравнению эффективности методов переноса поляризации на основе слабых магнитных полей и с использованием импульсных последовательностей в контексте МРТ, но и работы с использованием импульсных последовательностей для переноса поляризации с целью выполнения экспериментов по МРТ. Это связано в первую очередь с тем, что процесс оптимизации и внедрения импульсных последовательностей в эксперимент трудоемкий.

В связи с этим задачами данной диссертационной работы являются:

- выбор, оптимизация и применение импульсных последовательностей для переноса поляризации на гетероядро в экспериментах с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода;
- изучение эффективности различных методов переноса поляризации на гетероядра в экспериментах по гетероядерной томографии с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода;
- определение наиболее оптимальных импульсных последовательностей для регистрации МР изображений по гетероядрам в экспериментах с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

В данной главе приведено описание используемых материалов и экспериментальных методик, которые применялись в работе.

2.1. Материалы и реактивы

В работе по гетероядерной МРТ соединений, поляризованных с помощью метода ИППЯ с гидрированием по боковой цепи, использовались следующие материалы и реактивы: водород, винилацетат с естественным содержанием ядер ^{13}C (Sigma-Aldrich), пропаргилпируват с естественным содержанием ядер ^{13}C , обогащенные изотопами ^{13}C ^{13}C -винилацетат и ^{13}C -пропаргилпируват. В качестве катализаторов использовался катализатор $[\text{Rh}(\text{NBD})(\text{dppb})\text{BF}_4]$, приготовленный из $[\text{Rh}(\text{NBD})_2]\text{BF}_4$ (Strem Chemicals, 96%) и лиганда dppb (Sigma-Aldrich, 98%) в соотношении 1 к 1, и $[\text{Rh}(\text{dppb})(\text{COD})]\text{BF}_4$ (Sigma-Aldrich, 98%), где NBD – 2,5-норборнадиен, dppb – 1,4-бис(дифенилфосфинобутан). Растворитель – дейтерированный метанол (CD_3OD).

В работе по гетероядерной МРТ соединений, гиперполяризованных с помощью метода SABRE, с переносом поляризации с помощью слабых магнитных полей использовались следующие материалы и реактивы: водород, $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол, $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол, $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол, ^{15}N -пиридин, катализатор SABRE – $[\text{Ir}(\text{IMes})(\text{COD})]\text{Cl}$, растворитель – дейтерированный метанол (CD_3OD).

В работе по гетероядерной МРТ соединений, гиперполяризованных с помощью метода SABRE, с переносом поляризации с помощью импульсных последовательностей использовались следующие реактивы: водород, ^{15}N -пиридин, ^{15}N -никотинамид, $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол, фампридин, 4-диметиламинопиридин, ^{15}N -фампридин, «катализатор» SABRE – $[\text{Ir}(\text{IMes})(\text{COD})]\text{Cl}$, растворитель – дейтерированный метанол (CD_3OD).

2.2. Получение параводорода

Обогащение водорода пара-фракцией проводилось несколькими способами.

Самый простейший метод обогащения до ~ 50% проводится с помощью медленного протекания водорода при низких температурах над катализатором орто-пара конверсии FeO(OH). Для реализации медленного тока водорода используется скрученная в спираль медная трубка. Низкие температуры достигаются применением жидкого азота. Медную трубку с катализатором орто-пара конверсии погружают в сосуд Дьюара с жидким азотом и пропускают через нее водород. Следующий способ получения обогащенного пара-фракцией водорода заключался в использовании генератора параводорода BRNG-90 от компании Bruker. В результате концентрация параводорода могла достигать от 80 до 92%. С помощью метода, описанного в работе [169], можно было получить концентрации $p\text{-H}_2$ ~ 99%.

В разделе 3.1. концентрация параводорода составляла 85% практически во всех экспериментах. Только в экспериментах с регистрацией сигнала ЯМР и МР изображений на МР томографе для животных концентрация $p\text{-H}_2$ составляла 50%.

В разделе 3.2 концентрация $p\text{-H}_2$ равнялась ~ 99%, кроме экспериментов с записью изображения, в которых концентрация составляла ~ 86-87%.

В разделах 3.3.1 и 3.3.2 концентрация $p\text{-H}_2$ составляла 90%, в разделе 3.3.3 – 87%, в разделах 3.3.4 и 3.3.5 – 82%.

2.3. Методика проведения ИППЯ экспериментов

Для записи спектров ЯМР использовался спектрометр ЯМР Bruker Avance 300 с магнитным полем 7.1 Тл, для записи МР изображений – исследовательский МР томограф Bruker Avance 400 с магнитным полем 9.4 Тл и МР томограф Bruker BioSpec для животных с магнитным полем 7.1 Тл. В качестве регистрирующей катушки на приборе Bruker Avance 300 использовалась 5 мм регистрирующая катушка, на МР томографе Bruker

Avance 400 использовались двухканальные $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ катушки диаметром 25 мм в экспериментах с ^{13}C -винилацетатом и 30 мм – с ^{13}C -пропаргилпируватом, на МР томографе Bruker BioSpec – объемная $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ катушка с диаметром 40 мм.

Для создания и переноса поляризации в слабых магнитных полях параводород барботировался через раствор, который находился в магнитном экране в 5 мм ампуле ЯМР, после чего образец переносился в сильное магнитное поле прибора для регистрации сигнала. Схема экспериментальной установки представлена на Рисунок 14. Аналогичная установка используется и в экспериментах SABRE с переносом поляризации с помощью слабых магнитных полей.

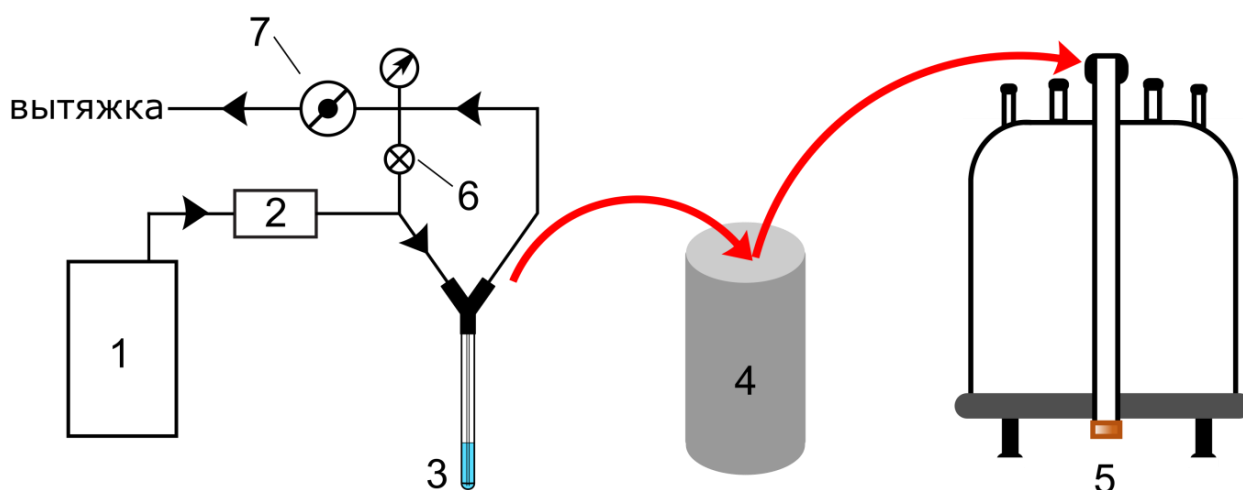


Рисунок 14. Схема экспериментальной установки для проведения ИППЯ экспериментов с переносом поляризации с помощью слабых магнитных полей. 1 – баллон с параводородом, 2 – регулятор подачи газа, 3 – ампула ЯМР с раствором, 4 – магнитный экран, 5 – прибор для регистрации сигнала (спектрометр ЯМР или МР томограф), 6 – кран для регуляции направления потока, 7 – клапан для регуляции обратного давления газа.

Объем образца составлял 0.6 мл. Магнитный экран состоял из трех коаксиально расположенных слоев из μ -металла, дополнительно внутри был установлен соленоид для контроля магнитного поля внутри экрана. Время переноса образца из слабого магнитного поля в поле Земли составляло ~ 1 с, после чего образец переносился в сильное поле прибора для регистрации сигнала. Запись спектра ЯМР проводилась через 0.3 с после помещения образца в спектрометр ЯМР. В экспериментах с использованием импульсной последовательности перенос образца отсутствовал, так как гидрирование и перенос поляризации проводились внутри прибора.

Барботирование проводилось с помощью тонкого капилляра ~ 1.6 мм, который был помещен в раствор. Скорость подачи газа в раствор составляла 0.5 мл/с. Время барботирования во всех экспериментах равнялось 20 с. Давление $p\text{-H}_2$ составляло 2.8-3 бар, температура – 45 °С. Для записи спектров ЯМР с помощью спектрометра ЯМР с магнитным полем 7.1 Тл использовался 90°-импульс.

Эксперименты на МР томографе Bruker BioSpec проводились следующим образом: образец под давлением помещался в магнитный экран с магнитным полем ~ 0.1 мкТл, где нагревался с помощью теплового фена. В случае с ^{13}C -пропаргилпируватом образец дополнительно предварительно нагревался также тепловым феном. Барботирование раствора ^{13}C -винилацетата составляло 15 секунд, раствора ^{13}C -пропаргилпирувата в экспериментах ЯМР – 45 с и раствора ^{13}C -пропаргилпирувата в экспериментах МРТ – 60 с. Скорость подачи $p\text{-H}_2$ в систему составляла 0.42 мл/с, давление – 2.8 бар.

2.4. Методика проведения экспериментов SABRE

2.4.1. Эксперименты с ^{15}N -изотопологами метронидазола

Эксперименты проводились с концентрацией субстрата 20 мМ и концентрацией катализатора $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{IMes})\text{Cl}]$ 2 мМ, в качестве растворителя использовался метанол- d_4 . Раствор барботировался аргоном в течение 2 минут, после чего активировался. В экспериментах SABRE активация катализатора является обязательным шагом. Активация проводилась барботированием $p\text{-H}_2$ через раствор в течение 100 минут со скоростью 0.67 мл/с. Раствор объемом 0.6 мл помещался в 5 мм ампулу ЯМР для экспериментов по измерению уровней поляризации. Для выполнения переноса поляризации ампула с образцом помещалась в магнитный экран. Раствор барботировался $p\text{-H}_2$ в течение 1 минуты, скорость потока равнялась 1.17 мл/с, добавочное давление составляло 1.7 бар. Для записи спектров ЯМР использовался настольный спектрометр ЯМР с магнитным полем 1.4 Тл (NMR Pro 60, Nanalysis) или .

В МРТ экспериментах концентрация субстрата составляла 0.1 М, а катализатора SABRE – 5 мМ. Активация раствора проводилась в течение 60 минут со скоростью 0.13 мл/с при добавочном давлении 1.7 бар. Для регистрации МР изображений использовался МР томограф Bruker Avance 400 с магнитным полем 9.4 Тл. Для регистрации использовалась двухканальная катушка $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ с диаметром 25 мм. Время переноса образца в МР томограф составляло ~ 20 с.

2.4.2. Эксперименты с $^{15}\text{N}_3$ -ниморазолом

Образец объемом 0.6 мл состоял из субстрата с концентрацией 0.1 М и 5 мМ катализатора SABRE $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{IMes})\text{Cl}]$ в метаноле- d_4 . Раствор помещался в 5 мм ампулу ЯМР, которая была погружена в сосуд с водой для поддержания необходимой температуры. Температура воды равнялась 20 °С при регистрации спектров ЯМР, 49 °С при регистрации изображений в проекции XZ и 54 °С при регистрации изображений в проекции XY. Сам сосуд располагался в магнитном экране с контролируемым внутри магнитным полем. Активация катализатора для экспериментов ЯМР проводилась путем барботирования раствора в течение 120 минут при скорости подачи п- H_2 равной 0.33 мл/с и давлении 7.8 бар, для экспериментов МРТ параметры были следующими: 75 минут, 0.17 мл/с и 4 бар.

Для создания гиперполяризации раствор барботировался п- H_2 в течение 60 секунд со скоростью 1.17 мл/с и давлении 7.8 бар. После остановки потока ампула ЯМР извлекалась из сосуда и протиралась бумажным полотенцем. Далее ампула помещалась в настольный спектрометр ЯМР с магнитным полем 1.4 Тл (NMR Pro 60, Nanalysis) для регистрации спектров ЯМР. В случае МРТ экспериментов раствор барботировался п- H_2 при давлении 4 бара. Регистрация МР изображения проводилась в МР томографе Bruker Avance 400. Для регистрации использовалась двухканальная катушка $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ с диаметром 25 мм.

2.4.3. Эксперименты с переносом поляризации с помощью импульсных последовательностей

Основным отличием экспериментов с использованием импульсных последовательностей для переноса поляризации и экспериментов с использованием слабых магнитных полей является отсутствие шага по переносу образца в сильное магнитное поле для регистрации сигнала. В качестве импульсной последовательности для переноса поляризации была выбрана импульсная последовательность SLIC-SABRE. Барботирование $p\text{-H}_2$ проводилось во время действия импульсной последовательности SLIC-SABRE. В большинстве экспериментов барботирование останавливалось за несколько секунд до начала регистрации сигнала, кроме экспериментов из Раздела 3.3.1. и 3.3.2. (исключение – эксперименты с импульсной последовательностью FLASH).

Для записи спектров ЯМР использовался спектрометр ЯМР Bruker Avance 300 с магнитным полем 7.1 Тл, кроме Раздела 3.3.5., где приведены спектры ЯМР зарегистрированные с помощью МР томографа Bruker Avance 400 с магнитным полем 9.4 Тл. В качестве регистрирующей катушки на приборе Bruker Avance 300 использовалась катушка диаметром 5 мм, на приборе Bruker Avance 400 – двухканальная катушка $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ с диаметром 25 мм. Во всех экспериментах раствор помещался в 5 мм ампулу ЯМР, кроме экспериментов по регистрации МР изображений в Разделах 3.3.3. – 3.3.5, где раствор помещался в ампулу ЯМР с диаметром 10 мм. Остальные экспериментальные условия указаны в Таблица 3.

Таблица 3. Экспериментальные условия проведения экспериментов SABRE с использованием последовательности SLIC-SABRE для переноса поляризации на гетероядра

Раздел	Субстрат и его концентрация	Концентрация катализатора	Условия активации
3.3.1.	0.1 М ^{15}N -пиридин	5 мМ	20 мин 0.12 мл/с 3.7 бар

3.3.2.	0.1 М ¹⁵ N-пиридин или ¹⁵ N-никотинамид Кроме: 1 М ¹⁵ N-пиридин в эксперименте по регистрации МР изображения; 0.05 М ¹⁵ N-никотинамид в эксперименте по записи спектра ЯМР в условиях теплового равновесия	5 мМ Кроме: 50 мМ в экспериментах по регистрации МР изображения ¹⁵ N-пиридина	20 мин 0.33 мл/с 3.7 бар
3.3.3.	0.1 М 4-диметиламинопиридин и фампридин в экспериментах по регистрации спектров ЯМР; 0.5 М 4-диметиламинопиридин и фампридин в экспериментах по регистрации МР изображений	5 мМ	30 минут 0.33 мл/с 3.7 бар
3.3.4 и 3.3.5	0.1 М ¹⁵ N-фампридин	5 мМ	2 часа 0.33 мл/с 3.7 бар

2.5. Параметры импульсных последовательностей для регистрации МР изображений

В экспериментах с регистрацией МР изображений важным параметром для оценки качества изображения является ОСШ.

Значение ОСШ вычислялось по данной формуле:

$$\text{ОСШ} = \frac{I - I_{\text{шум}}}{\sigma} \quad (12)$$

где I – среднее значение интенсивности полезного сигнала, $I_{\text{шум}}$ – среднее значение интенсивности шума, σ – среднеквадратичное отклонение шума.

Далее будут приведены параметры импульсных последовательностей для регистрации МР изображений.

2.5.1. ^{13}C -этилацетат и ^{13}C -аллилпируват

МР изображения на приборе Bruker Avance 400 были зарегистрированы с помощью импульсной последовательности FLASH, которая была реализована в программном обеспечении TopSpin 3.0. Параметры последовательности были следующие: TR = 3.1 мс, TE = 1.5 мс, RG (receiver gain, усиление приемника) = 2050 (максимально возможное приборное значение), матрица 64×16 заполнялась нулями до размера 64×64 , диапазон частот (bandwidth, BW) = 20 кГц, FOV (field of view, область регистрации изображения) = $3.07 \times 3.07 \text{ см}^2$. Длительность фазо-кодирующего и частотно-кодирующего градиента равнялись 400 мкс и 2.1 мс, мощность градиентов – 6 Гс/см. Угол поворота равнялся 15° в экспериментах с ^{13}C -винилацетатом и 5° в экспериментах с ^{13}C -пропаргилпируватом (большая интенсивность сигнала позволила уменьшить угол поворота). Пространственное разрешение составило $0.48 \times 1.92 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$ (после заполнения нулями – $0.48 \times 0.48 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$). Сигнал регистрировался от всего объема образца.

МР изображения на приборе Bruker BioSpec были зарегистрированы с помощью импульсной последовательности RARE и программного обеспечения ParaVision 6. Для регистрации изображения ^{13}C -этилацетата: толщина среза, от которого регистрировался сигнал, = 45 мм, RARE фактор = 32, TR = 163 мс, TE = 61.8 мс, RG = 203, BW = 18 кГц, матрица = 32×32 , FOV = $5 \times 5 \text{ см}^2$. Пространственное разрешение = $1.56 \times 1.56 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$. Для регистрации изображения ^{13}C -аллилпирувата: толщина среза = 10 мм, RARE фактор = 32, TR = 163 мс, TE = 61.8 мс, RG = 64, BW = 18 кГц, матрица 32×32 , FOV = $5 \times 5 \text{ см}^2$. Пространственное разрешение = $1.56 \times 1.56 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$.

2.5.2. $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_2$ -метронилазол

Для регистрации МР изображений использовался прибор Bruker Avance 400, импульсная последовательность TrueFISP и программное обеспечение ParaVision 5.

Для записи изображений в XY плоскости время TE составляло 3.6 мс, TR = 7.2 мс. Угол поворота 15° , RG = 2050, BW = 5 кГц, FOV = $3.1 \times 3.1 \text{ см}^2$, матрица = 32×32 , 16 усреднений, пространственное разрешение = $0.975 \times 0.975 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$. Для записи изображений в XZ плоскости: TE = 2 мс, TR = 4 мс, угол поворота = 15° , RG = 2050, BW = 10 кГц, FOV = $2.9 \times 2.9 \text{ см}^2$, матрица = 32×32 , 8 усреднений, пространственное разрешение = $0.894 \times 0.894 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$. В обоих случаях матрицы были заполнены нулями до матрицы 512×512 . Заполнение нулями позволяет сократить время записи изображения без значительных потерь в спектральном разрешении или ОСШ. Заполнение нулями добавляет нули в матрицу данных до преобразования Фурье.

2.5.3. $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол

Для регистрации МР изображений использовался прибор Bruker Avance 400, импульсная последовательность TrueFISP и программное обеспечение ParaVision 5. Параметры импульсной последовательности следующие: TR = 14 мс, TE = 7 мс, BW = 5 кГц, угол поворота 30° , RG = 2050. Отстройка по частоте подбиралась так, чтобы совпадать с частотой $^{15}\text{NO}_2$ группы. Для каждой из проекций XY и XZ были записаны серии из 16 последовательных МР изображений. Для проекции XY матрица равнялась 32×32 (заполнялась нулями до 512×512), FOV = $16 \times 16 \text{ мм}^2$, пространственное разрешение = $0.5 \times 0.5 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$. Для проекции XZ использовалась матрица 64×64 (также заполнена нулями до 512×512), FOV = $7.8 \times 7.8 \text{ мм}^2$, пространственное разрешение = $1.2 \times 1.2 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$.

2.5.4. ^{15}N -пиридин и ^{15}N -никотинамид

В экспериментах по сравнению двух импульсных последовательностей для регистрации МР изображений использовался прибор Bruker Avance 400 с

регистрирующей двухканальной $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ катушкой с диаметром 25 мм. Последовательности SPI и FLASH были реализованы в программном обеспечении TopSpin 3.

Параметры последовательности SPI были следующие: $\text{RG} = 2050$ (максимально возможное приборное значение), матрица 16×16 заполнялась нулями до размера 128×128 , $\text{BW} = 12$ кГц, $\text{FOV} = 0.9 \times 0.9$ см². Длительность фазо-кодирующих градиентов составляла 300 мкс, мощность градиентов – 67.5 Гс/см. Угол поворота равнялся 90°. Пространственное разрешение составило 0.565×0.565 мкм²/пиксель. Сигнал регистрировался от всего объема образца.

В последовательности FLASH используется как фазо-кодирующий, так и частотно-кодирующий градиент. Длительность градиентов составляла 400 мкс и 2.1 мс, мощность – 12 Гс/см и 6 Гс/см соответственно. $\text{RG} = 2050$, $\text{TR} = 3.1$ мс, $\text{TE} = 1$ мс, $\text{BW} = 10$ кГц, угол поворота 30°. Матрица = 128×8 , она заполнялась нулями до матрицы 128×128 и 256×256 в случае ^{15}N -пиридина и ^{15}N -никотинамида соответственно. Пространственное разрешение равнялось 0.15×2.4 мм²/пиксель и 0.3×4.8 мм²/пиксель, $\text{FOV} = 1.9 \times 1.8$ мм² и 3.8×3.8 мм² для ^{15}N -пиридина и ^{15}N -никотинамида соответственно.

2.5.5. 4-диметиламинопиридин и фампридин

Регистрация МР изображений проводилась аналогично пункту 2.5.4. с использованием импульсной последовательности FLASH. Длительность градиентов составляла 400 мкс и 2.1 мс, мощность – 12 Гс/см и 6 Гс/см. $\text{RG} = 2050$, $\text{TR} = 3.1$ мс, $\text{TE} = 1.5$ мс, $\text{BW} = 10$ кГц, угол поворота 30°. Матрица = 128×16 , она заполнялась нулями до матрицы 128×128 . Пространственное разрешение равнялось 0.3×2.4 мм²/пиксель, $\text{FOV} = 3.8 \times 3.8$ мм². Изображения получено с помощью 4 накоплений.

2.5.6. ^{15}N -фампридин и H_2O

В качестве импульсной последовательности для регистрации изображений также использовалась импульсная последовательность FLASH.

Параметры для регистрации ^{15}N 2М МР изображения ^{15}N -фампридина: угол поворота 10° , $\text{RG} = 2050$, $\text{TR} = 2$ мс, $\text{TE} = 1$ мс, $\text{BW} = 10$ кГц. Длительность градиентов составляла 400 мкс и 1.1 мс, мощность – 12 Гс/см и 6 Гс/см для фазо-кодирующего и частотно-кодирующего градиентов соответственно. Матрица = 128×16 , она заполнялась нулями до матрицы 128×128 . Пространственное разрешение равнялось 0.3×2.4 мм²/пиксель, $\text{FOV} = 3.8 \times 3.8$ мм².

Параметры для регистрации ^1H 2М МР изображения H_2O : угол поворота 10° , $\text{RG} = 2050$, $\text{TR} = 2$ мс, $\text{TE} = 1$ мс, $\text{BW} = 10$ кГц. Длительность градиентов составляла 400 мкс и 1.1 мс, мощность – 1.2 Гс/см и 0.6 Гс/см для фазо-кодирующего и частотно-кодирующего градиентов соответственно. Матрица = 128×16 , она заполнялась нулями до матрицы 128×128 . Пространственное разрешение равнялось 0.3×2.4 мм²/пиксель, $\text{FOV} = 3.8 \times 3.8$ мм².

Параметры для регистрации ^{15}N 3М МР изображения ^{15}N -фампридина: угол поворота 10° , $\text{RG} = 2050$, $\text{TR} = 2$ мс, $\text{TE} = 1$ мс, $\text{BW} = 5$ кГц. Длительность фазо-кодирующих градиентов составляла 400 мкс, мощность – 5.7 Гс/ см и 3.75 Гс/см. Длительность частотно-кодирующего градиента – 1 мс, мощность – 2.85 Гс/см. $\text{FOV} = 6.1 \times 4.0 \times 4.0$ мм³, матрица = $128 \times 8 \times 8$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Сравнение эффективности методов переноса поляризации для гетероядерной МРТ с использованием ИППЯ с гидрированием по боковой цепи

Как было отмечено в разделе 1.6, пируват и ацетат являются молекулами, совместимыми с живыми организмами. Также их можно применять в качестве контрастных агентов для получения МР изображений *in vivo*. Для увеличения контраста и качества МР изображений сигнал от контрастных агентов можно увеличить с помощью метода гиперполяризации, а именно с помощью индуцированной параводородом поляризации ядер с гидрированием по боковой цепи. В данной части работы были гиперполяризованы молекулы этилацетата и аллилпирувата, обогащенные изотопом ^{13}C . Перенос поляризации осуществлялся двумя методами – с помощью слабого магнитного поля и с помощью импульсной последовательности типа INEPT. Было выполнено сравнение полученных уровней поляризации и ОСШ в экспериментах с использованием импульсных последовательностей для переноса поляризации и с использованием слабых магнитных полей.

3.1.1. Эксперименты с этилацетатом

Для оценки оптимального значения магнитного поля, при котором перенос поляризации на гетероядро максимален, было проведено моделирование зависимости интенсивности сигнала от величины магнитного поля, в котором осуществлялся перенос поляризации. Данное моделирование проведено одним из соавторов исследования (Козиненко В.П.). Метод расчетов основан на применении формализма матрицы спиновой плотности. Для расчетов использовались следующие значения КССВ в молекуле ^{13}C -этилацетата (см. Рисунок 15): $J(^{13}\text{C}-\text{H}_a) = -7$ Гц, $J(\text{H}_c-\text{H}_b) = 7.2$ Гц, $J(^{13}\text{C}-\text{H}_b) = 3.1$ Гц, $J(^{13}\text{C}-\text{H}_c) = -0.3$ Гц.

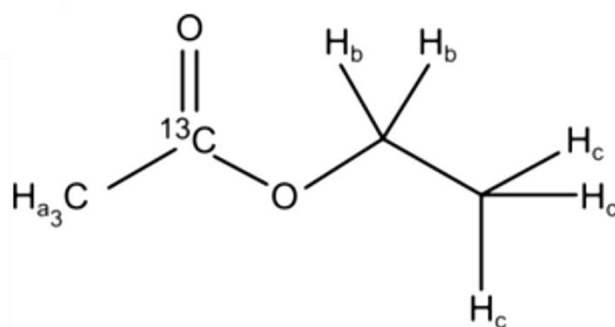


Рисунок 15. Структура молекулы этилацетата.

В результате было получено, что наибольшее значение поляризации наблюдается при значении магнитного поля = 400 нТл. Результаты моделирования были подтверждены Козиненко В.П. экспериментально с использованием молекулы этилацетата с естественным содержанием ядер ^{13}C . Полученное экспериментально оптимальное значение магнитного поля также составило 400 нТл.

Далее, используя полученные результаты моделирования, были проведены эксперименты ЯМР и МРТ с использованием ^{13}C -этилацетата. Для этих экспериментов был использован раствор 80 мМ ^{13}C -винилацетата и 5 мМ катализатора. В эксперименте для создания гиперполяризации на гетероядре раствор барботировался параводородом при 45 °С и давлении параводорода 2.8 бар в магнитном поле 400 нТл. После барботирования образец переносился в сильное магнитное поле для регистрации сигнала ЯМР или МР изображения. Во всех экспериментах с винилацетатом, обогащенным изотопом ^{13}C , конверсия в ^{13}C -этилацетат составляла 40%, поэтому концентрация ГП этилацетата, обогащенного изотопом ^{13}C , равнялась 32 мМ. В результате в исследованиях ЯМР усиление сигнала составило 1100 раз, что соответствует уровню поляризации ^{13}C $0.65 \pm 0.05\%$ в магнитном поле 7.1 Тл (см. Рисунок 16). Для расчета уровня поляризации интенсивность сигнала гиперполяризованного ^{13}C -этилацетата сравнивалась с интенсивностью ^{13}C -этилацетата в условиях теплового равновесия. Несмотря на то, что количество накоплений в обоих случаях одинаковое и равно единице, усиление приемника в случае экспериментов при тепловом равновесии в 724 раза больше.

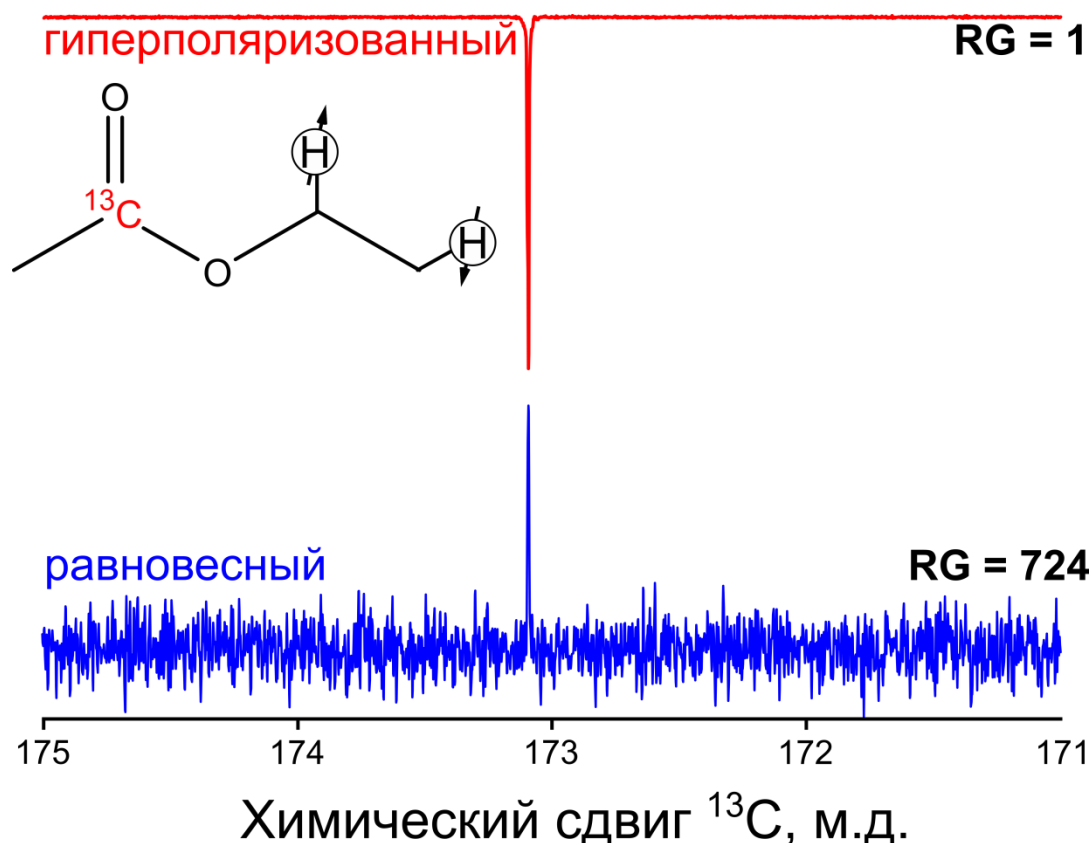


Рисунок 16. Спектры ЯМР по ядрам ^{13}C при проведении реакции гидрирования параводородом винилацетата, обогащенного изотопом ^{13}C . На рисунке представлена структура ^{13}C -этилацетата. Красный спектр получен с применением ИППЯ с гидрированием по боковой цепи с переносом поляризации с помощью слабого магнитного поля. Синий спектр получен без использования метода гиперполяризации. Оба спектра получены с использованием развязки по протонам.

После экспериментов ЯМР были проведены МРТ исследования. Для этого использовался прибор с магнитным полем 9.4 Тл. При регистрации изображения использовался $\text{FOV} = 3.07 \times 3.07 \text{ см}^2$, однако для представления результатов использован больший масштаб, чтобы исключить неинформативные участки. На полученном изображении видны границы ампулы ЯМР, в которой находился раствор. Вблизи стенок интенсивность сигнала снижается, так как в пиксель попадает не только раствор, но и сами стенки ампулы. Полученное в результате эксперимента пространственное разрешение составило $0.48 \times 1.92 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$ (после заполнения нулями – $0.48 \times 0.48 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$), отношение сигнал-шум = 300 (см. Рисунок 17).

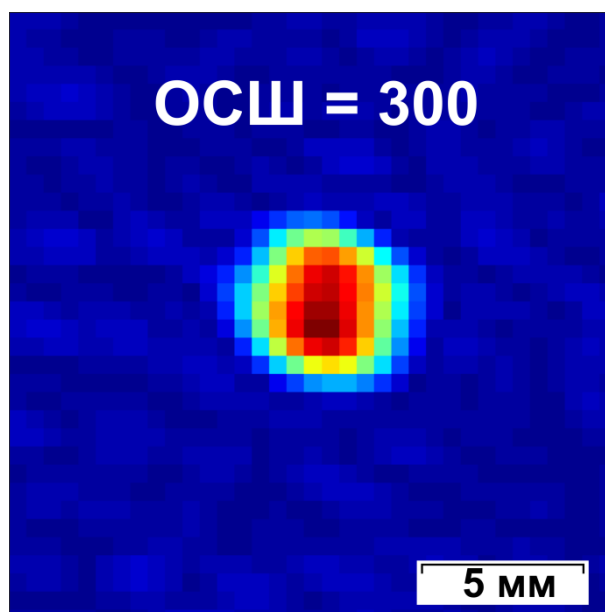


Рисунок 17. МР изображение по ядрам ^{13}C при проведении реакции гидрирования параводородом винилацетата обогащенного изотопом ^{13}C . Белый прямоугольник на МР изображении соответствует 5 мм и представлен для оценки масштаба.

В следующей части исследования с помощью математического моделирования Козиненко В.П. была оптимизирована последовательность РН-INEPT+. Основными параметрами для оптимизации последовательности являются задержки между импульсами (см. Рисунок 6). Было получено, что наиболее эффективен перенос при использовании задержек $\tau = 57$ мс и $\tau_1 = 284$ мс. Стоит отметить, что в моделировании интенсивность сигнала падала на 25% при изменении задержек на ± 7 мс.

Используя полученные в моделировании значения задержек, были проведены эксперименты, в которых с помощью последовательности РН-INEPT+ было получено значение $P(^{13}\text{C}) = 0.19 \pm 0.02\%$ в магнитном поле 7.1 Тл (см. Рисунок 18). Значение поляризации было посчитано также путем сравнения интенсивности сигнала ГП ^{13}C -этилацетата с сигналом ^{13}C -этилацетата полученного в условиях теплового равновесия. В отличие от предыдущих экспериментов при регистрации спектра ГП ^{13}C -этилацетата не была использована развязка по протонам, поэтому сигнал расщеплен, в то время как в экспериментах в условиях теплового равновесия развязка по протонам была использована. Использование развязки по протонам имеет положительный эффект для увеличения ОСШ в спектрах ЯМР, в частности, в

случае теплового равновесия. Увеличение ОСШ позволяет более точно оценить значение поляризации. Однако интегральная интенсивность сигнала не изменяется при записи спектров с развязкой по протонам или без нее, поэтому не всегда является необходимой.

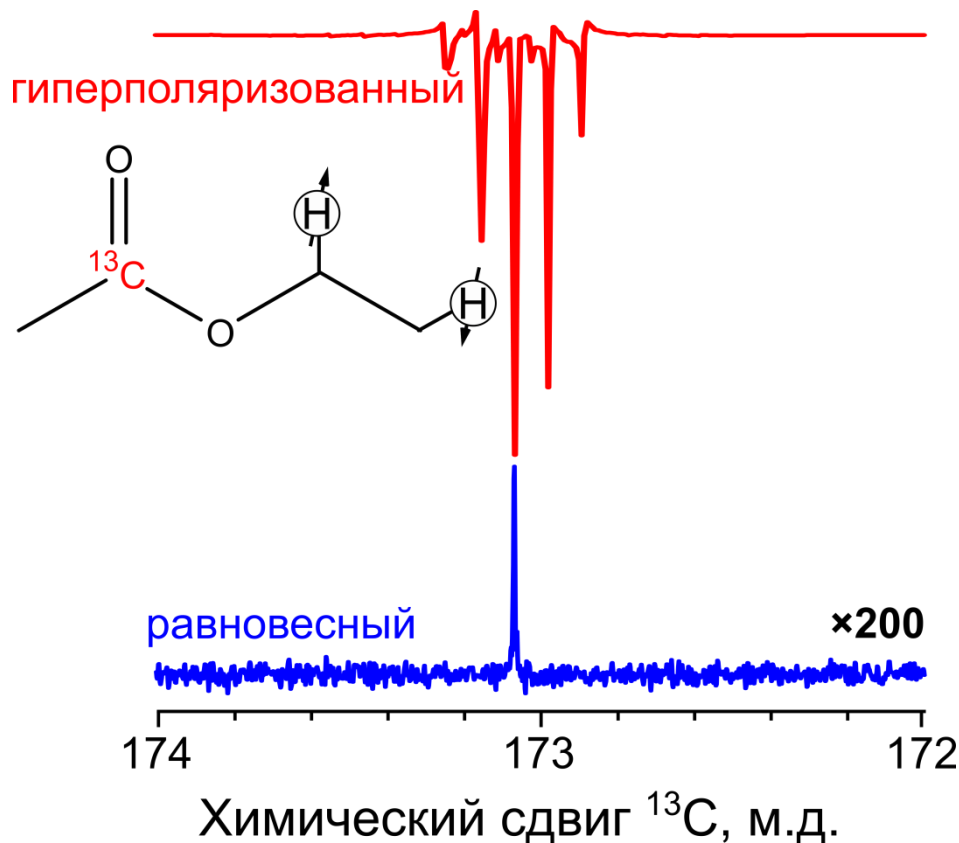


Рисунок 18. Спектры ЯМР ^{13}C при проведении реакции гидрирования параводородом винилацетата обогащенного изотопом ^{13}C . На рисунке представлена структура ^{13}C -этилацетата. Красный спектр получен с применением ИППЯ с гидрированием по боковой цепи с переносом поляризации с помощью импульсной последовательность PH-INERT+. Синий спектр получен без использования метода гиперполяризации с развязкой по протонам при записи спектра, для лучшего представления результата спектр увеличен в 200 раз.

МРТ эксперименты проводились аналогично экспериментам с использованием слабого магнитного поля для переноса поляризации. Отношение сигнал-шум на МР изображении, полученном в приборе с магнитным полем 9.4 Тл, составило 100 (см. Рисунок 19).

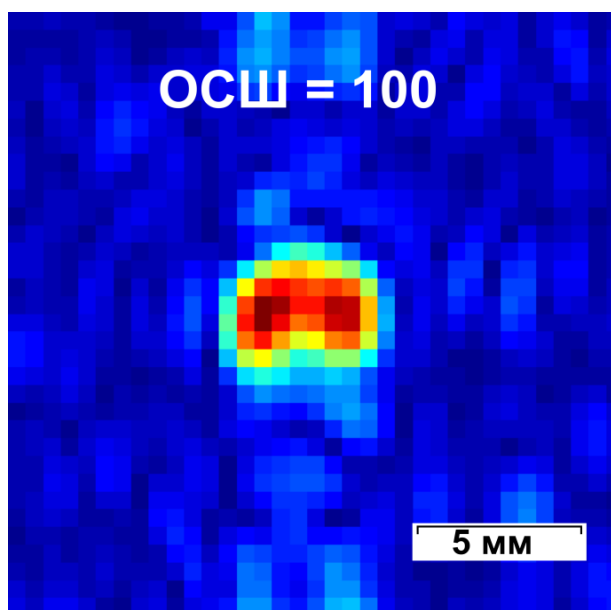


Рисунок 19. МР изображение по ядрам ^{13}C полученное при проведении реакции гидрирования параводородом винилацетата обогащенного изотопом ^{13}C . FOV = 3.07×3.07 см². Белый прямоугольник на МР изображении соответствует 5 мм и представлен для оценки масштаба.

Как можно заметить, уровни поляризации ^{13}C отличаются примерно в три раза в экспериментах с использованием слабого магнитного поля для переноса поляризации и импульсной последовательности. Значения ОСШ также отличаются в три раза.

3.1.2. Эксперименты с аллилпироватом

В экспериментах с гидрированием пропаргилпировата было также сначала проведено моделирование Козиненко В.П. значения оптимального магнитного поля для переноса поляризации. Для этого в молекуле аллилпировата (см. Рисунок 20) использовались следующие КССВ: $J(^{13}\text{C}-\text{H}_a) = 1.5$ Гц, $J(\text{H}_b-\text{H}_c) = 5.6$ Гц, $J(\text{H}_b-\text{H}_d) = 1.4$ Гц, $J(\text{H}_b-\text{H}_e) = 1.7$ Гц, $J(^{13}\text{C}-\text{H}_b) = 3.15$ Гц, $J(\text{H}_c-\text{H}_d) = 10.5$ Гц, $J(\text{H}_c-\text{H}_e) = 17.2$ Гц, $J(^{13}\text{C}-\text{H}_c) = -0.18$ Гц, $J(\text{H}_d-\text{H}_e) = 1.4$ Гц, $J(^{13}\text{C}-\text{H}_d) = 0.2$ Гц, $J(^{13}\text{C}-\text{H}_e) = 0.08$ Гц.

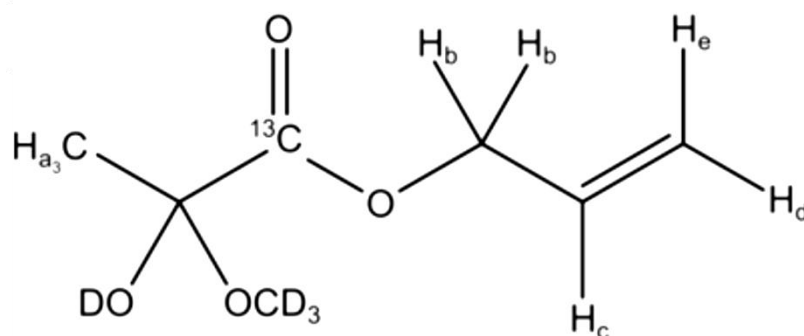


Рисунок 20. Структура молекулы аллилпирувата.

Для аллилпирувата оптимальное значение магнитного поля для переноса поляризации составило 200 нТл, что также было подтверждено Козиненко В.П. экспериментально.

В дальнейших экспериментах с использованием результатов моделирования был гиперполяризован раствор с 80 мМ пропаргилпирувата, обогащенного изотопом ^{13}C , и 5 мМ катализатора. Раствор барботировался параводородом при 45 °С и давлении параводорода 2.8 бар. Стоит отметить, что конверсия в случае с ^{13}C -пропаргилпируватом в ^{13}C -аллилпируват составила 80-90%, то есть значительно больше, чем при гидрировании ^{13}C -винилацетата. В связи с этим концентрация ГП ^{13}C -аллилпирувата составила ~ 64-72 мМ.

В экспериментах ЯМР полученный уровень $P(^{13}\text{C})$ составил $3.95 \pm 0.05\%$ в поле 7.1 Тл (см. Рисунок 21). При этом стоит отметить, что уровни поляризации представлены для полукетальной формы, которая является преобладающей в растворе CD_3OD . Разница RG в экспериментах с ^{13}C -аллилпируватом с применением метода гиперполяризации и в условиях теплового равновесия составляла 5793 раз.

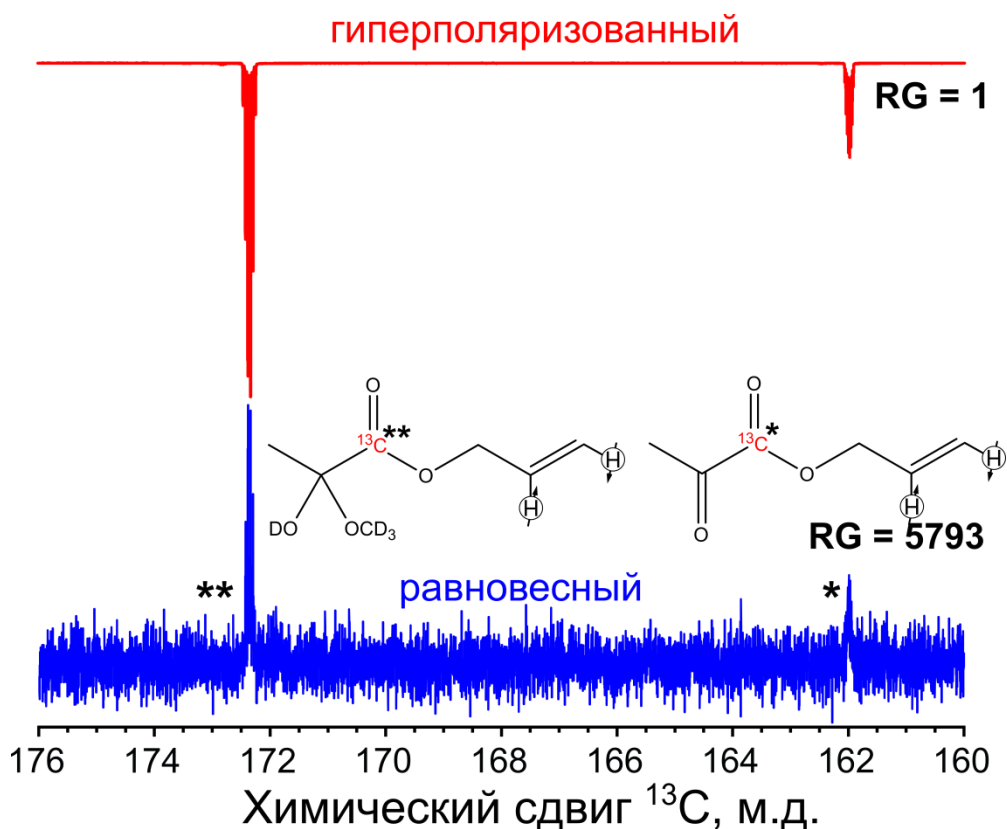


Рисунок 21. Спектры ^{13}C ЯМР при проведении реакции гидрирования параводородом пропаргилпирувата, обогащенного изотопом ^{13}C . Красный спектр получен с применением ИППЯ с гидрированием по боковой цепи с переносом поляризации с помощью циклирования магнитного поля. Синий спектр получен без использования метода гиперполяризации. * отмечен пик ^{13}C в ^{13}C -аллилпирувате, который находится в кето форме, а ** – в полукетальной форме.

Эксперименты по переносу поляризации в ИППЯ с гидрированием по боковой цепи с помощью циклирования магнитного поля были выполнены ранее. Например, в работе [170] поляризация, которая наблюдалась на ядрах ^{13}C ^{13}C -аллилпирувата, составила 5%. Разница уровней поляризации связана в первую очередь с протоколом по переносу поляризации на гетероядро. В работе [170] гидрирование проходило в магнитном поле Земли (образец встряхивали несколько раз), после чего образец переносили в магнитный экран и потом в сильное магнитное поле спектрометра для регистрации сигнала. В отличие от этого, в данном исследовании образец гидрировался непосредственно в слабом магнитном поле в магнитном экране. Несмотря на большую эффективность протокола, который использовался в работе [170], экспериментальные результаты, которые были получены при гидрировании в магнитном экране, проще сравнивать с математическим моделированием.

Также такие эксперименты более воспроизводимы, так как меньшее число раз вручную производится перенос образца (отсутствует перенос из магнитного поля Земли в магнитное поле экрана).

При проведении МР экспериментов было получено МР изображение со значением ОСШ = 2200 в магнитном поле 9.4 Тл (см. Рисунок 22). Можно заметить, что в направлении фазо-кодирующего градиента (горизонтальное направление) на изображении наблюдаются артефакты. Данные артефакты связаны с приборными ошибками. Стоит отметить, что наличие артефактов не связано со временем релаксации T_1 , так как T_1 для ^{13}C -аллилпирувата порядка 30-40 с, в то время как запись изображения занимала около 1 с. Также данные артефакты не связаны с большой интенсивностью сигнала, так как для возбуждения использовались 5° -импульсы.

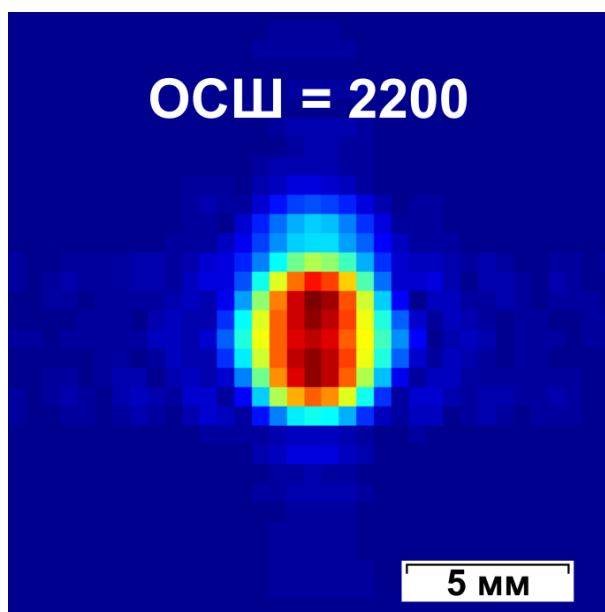


Рисунок 22. МР изображение по ядрам ^{13}C полученное при проведении реакции гидрирования параводородом пропаргилпирувата, обогащенного изотопом ^{13}C . Белый прямоугольник на МР изображении соответствует 5 мм и представлен для оценки масштаба.

В отличие от случая с гидрированием ^{13}C -винилацетата, где протоны из молекулы p-H_2 присоединяются к молекуле субстрата на расстоянии 3-4 связей от целевого ядра ^{13}C , при гидрировании ^{13}C -пропаргилпирувата протоны присоединяются на расстоянии 4-5 связей от целевого ядра. В связи с этим эффективность последовательности PH-INEPT+ падает в случае с ^{13}C -аллилпируватом, так как значения констант спин-спинового взаимодействия

очень малы. С помощью моделирования (выполнено Козиненко В.П.) были получены оптимальные задержки для импульсной последовательности. Они составили $\tau = 786$ мс и $\tau_1 = 2046$ мс. На практике такие значения задержек неприменимы, так как они значительно увеличивают длительность импульсной последовательности. За такое продолжительное время действия импульсной последовательности интенсивность сигнала протонов уменьшится из-за релаксации T_2 , а молекулы диффундируют в растворе. Из-за этого для переноса поляризации на гетероядро было решено использовать последовательность РН-ЕCHO-INEPT+ (см. Рисунок 23).

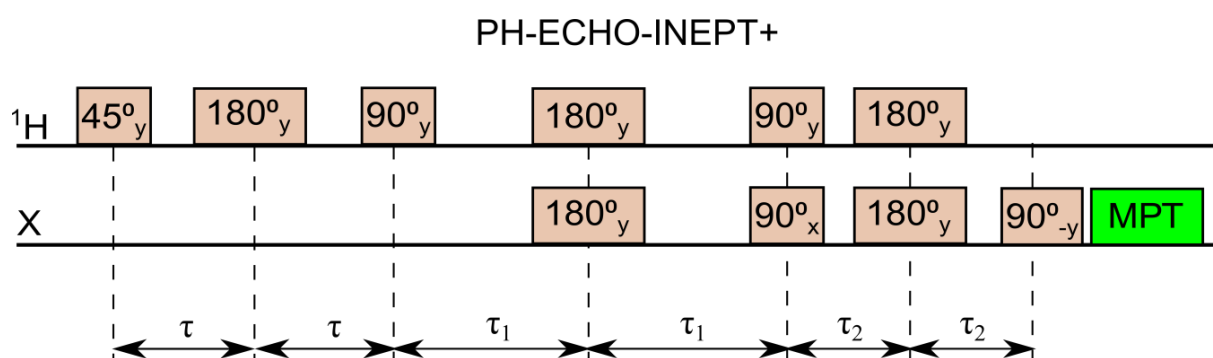


Рисунок 23. Импульсная последовательность РН-ЕCHO-INEPT+.

Основная идея РН-ЕCHO-INEPT+ заключается в последовательном переносе поляризации на гетероядро через промежуточную группу. В случае с ^{13}C -аллилпируватом промежуточными являются протоны метиленовой группы в аллильном фрагменте. Оптимальные значения задержек импульсной последовательности были получены с помощью моделирования (выполнено Козиненко В.П.) и составили $\tau = 115$ мс, $\tau_1 = 45$ мс и $\tau_2 = 35$ мс.

Используя полученные задержки, были проведены эксперименты ЯМР, уровень $P(^{13}\text{C})$ составил $0.66 \pm 0.04\%$ в магнитном поле 7.1 Тл (см. Рисунок 24). При сравнении вида спектра ЯМР в случае с использованием слабых магнитных полей и импульсной последовательности можно заметить, что соотношение между кето- и полукетальной формой различно. Это связано с тем, что были использованы разные методы переноса поляризации. Например, для разных форм эффективность импульсной последовательности РН-ЕCHO-INEPT+ разная, потому что немного отличаются КССВ.

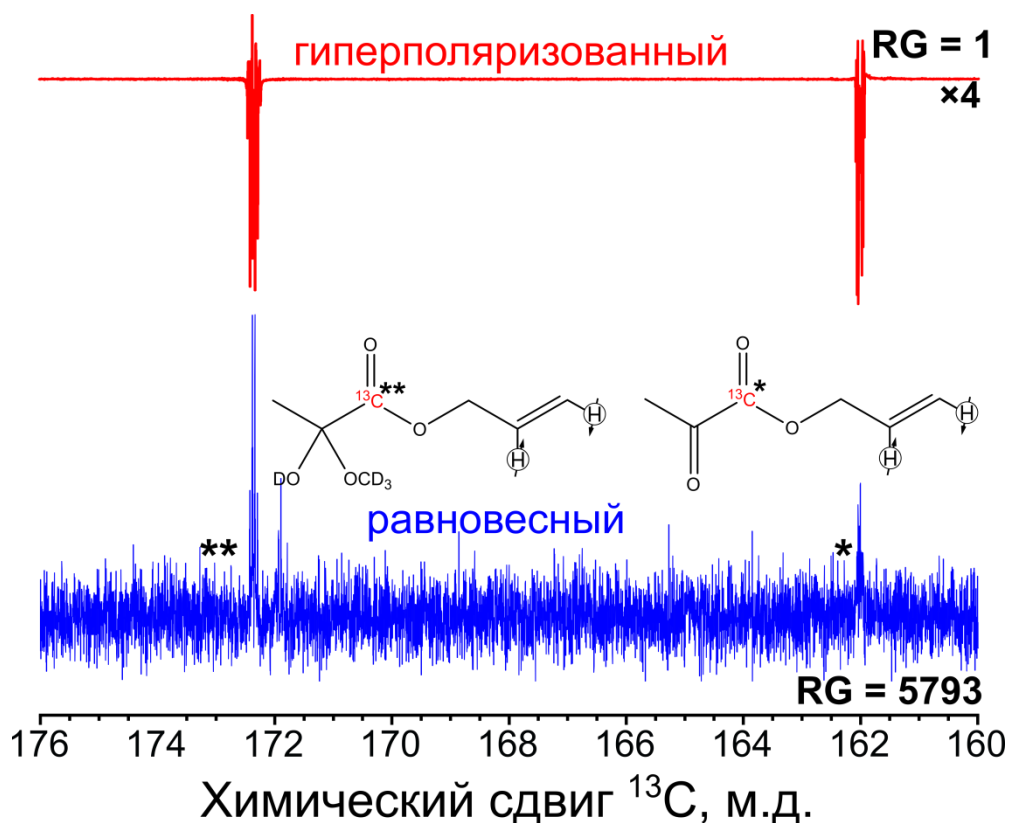


Рисунок 24. Спектры ^{13}C ЯМР полученные при проведении реакции гидрирования параводородом пропаргилпирувата, обогащенного изотопом ^{13}C . На рисунке представлена структура ^{13}C -аллилпирувата в кето (*) и полукетальной (**) формах. Красный спектр получен с применением ИППЯ с гидрированием по боковой цепи с переносом поляризации с помощью PH-ECHO-INEPT+, спектр увеличен в 4 раза. Синий спектр получен без использования метода гиперполяризации.

В экспериментах МРТ были получены изображения с ОСШ = 300 в магнитном поле 9.4 Тл (см. Рисунок 25).

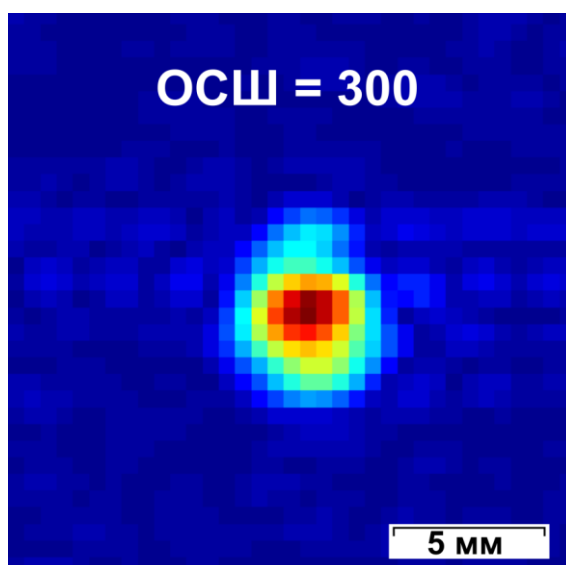


Рисунок 25. МР изображение по ядрам ^{13}C полученное при проведении реакции гидрирования параводородом пропаргилпирувата, обогащенного изотопом ^{13}C . Белый прямоугольник на МР изображении соответствует 5 мм и представлен для оценки масштаба.

Таким образом, значение $R(^{13}\text{C})$ больше в ~ 6 раз для экспериментов с использованием слабого магнитного поля для переноса поляризации по сравнению с экспериментами с использованием импульсной последовательности, ОСШ отличаются ~ 7 раз.

Из полученных результатов видно, значения $R(^{13}\text{C})$ и ОСШ больше в случае ^{13}C -аллилпирувата по сравнению с ^{13}C -этилацетатом. Это в значительной степени связано с большей конверсией в случае гидрирования ^{13}C -пропаргилпирувата. В обоих случаях и с ^{13}C -аллилпируватом, и с ^{13}C -этилацетатом $R(^{13}\text{C})$ и ОСШ больше в экспериментах с использованием слабых магнитных полей для переноса поляризации, а не с использованием импульсных последовательностей. Эффективность переноса поляризации с помощью импульсных последовательностей зависит от значений КССВ протонов из молекулы p-H_2 и интересующего гетероядра в молекуле продукта. При малых значениях констант эффективность переноса уменьшается. С одной стороны, проблема того, что эффективность INEPT падает с уменьшением значения КССВ решается заменой последовательности INEPT на другую импульсную последовательность, например, ESOTHERIC. Но с другой стороны у ESOTHERIC есть ряд минусов. Стоит отметить, что ESOTHERIC представляет собой последовательность блоков INEPT, как было сказано в разделе 1.3.1., многократное повторение блоков увеличивает длительность импульсной последовательности, в то время как предпочтительно сохранять импульсную последовательность как можно более простой и короткой, чтобы не возникало нежелательных эффектов в эволюции спиновой системы. Кроме того, при работе с ESOTHERIC зачастую используют меченные изотопами ^{13}C и ^2H соединения. Такое обогащение изотопами значительно повышает стоимость используемых молекул. В данном исследовании винилацетат и пропаргилпируват были обогащены только изотопом ^{13}C , но не ^2H .

3.1.3. Эксперименты на томографе для животных

Так как в методе с использованием слабых магнитных полей уровни поляризации выше, то данная процедура была опробована на приборе Bruker BioSpec 7.1 Тл, предназначенном для экспериментов МРТ с животными, в Академии Синика (Тайвань). Основным отличием экспериментов на исследовательском томографе и томографе для животных является устройство прибора. В случае с исследовательским томографом ампула ЯМР с образцом располагается в приборе вертикально и доставляется туда за короткое время. В томографе для животных ампула ЯМР располагается горизонтально и время переноса образца на ~ 5-10 секунд дольше из-за конфигурации прибора.

В экспериментах на томографе для животных для гидрирования субстратов использовался водород с 50%-ой долей параводорода. Концентрация субстратов была увеличена с 80 мМ до 0.8 М для винилацетата и до 0.18 М для пропаргилпирувата, обогащенных изотопом ^{13}C . Увеличение концентрации было необходимым шагом для того, чтобы скомпенсировать потери из-за увеличения длины пути при переносе образца из магнитного экрана в область регистрации сигнала ЯМР. Для переноса поляризации использовалось слабое магнитное поле ~ 0.1 мкТл, так как оно является стандартным значением для простейших магнитных экранов, у которых отсутствует возможность дополнительной настройки магнитного поля внутри.

Спектры ЯМР и МР изображения, полученные с помощью импульсной последовательности RARE на приборе Bruker BioSpec 7.1 Тл, показаны на Рисунке 26. RARE является быстрой импульсной последовательностью, основанной на эффекте спинового эха. В RARE после первого 90° -импульса применяется серия 180° -импульсов. Количество 180° -импульсов после одного возбуждающего 90° -импульса называют RARE фактором. После каждого 180° -импульса происходит регистрация сигнала и заполняется одна строка в k-пространстве. Таким образом, время записи МР изображения значительно сокращается. При использовании данной импульсной последовательности были получены МР изображения со значением ОСШ, равным 70 для ^{13}C -этилацетата

и 560 для ^{13}C -аллилпирувата, несмотря на то, что толщина среза составляла 45 мм для ^{13}C -этилацетата и 10 мм для ^{13}C -аллилпирувата.

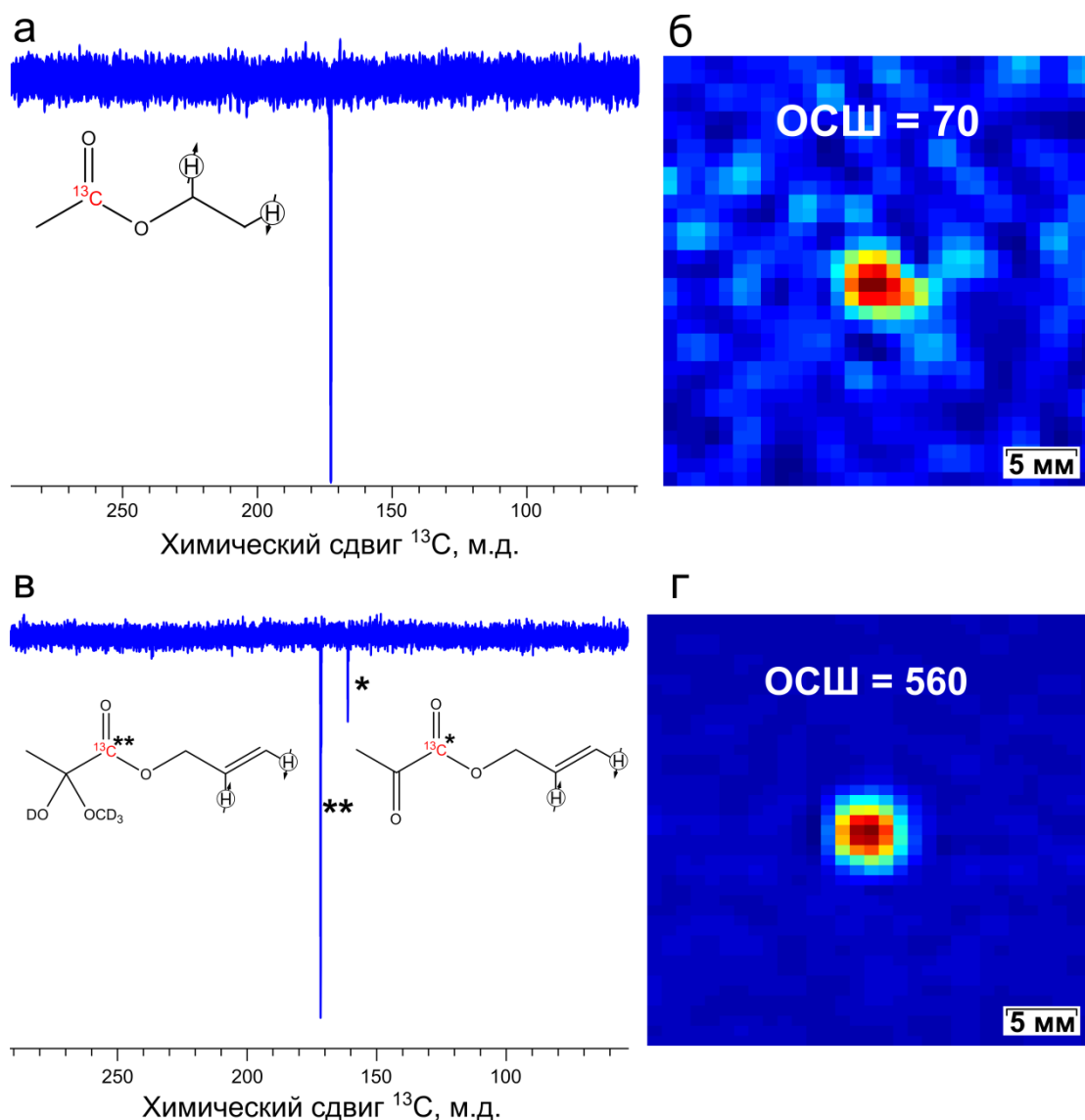


Рисунок 26. Спектры ^{13}C ЯМР (а, в) и МР изображение по ядрам ^{13}C (б, г) полученные с помощью МР томографа для животных Bruker BioSpec 7.1 Тл при проведении реакции гидрирования параводородом ^{13}C -винилацетата и ^{13}C -пропаргилпирувата. На рисунке представлена структура ^{13}C -этилацетата, ^{13}C -аллилпирувата в кето (*) и полукетальной (**) формах. Результаты получены с использованием ИППЯ с гидрированием по боковой цепи и применением слабого магнитного поля (0.1 мкТл) для переноса поляризации на гетероядро. Белый прямоугольник на МР изображении соответствует 5 мм и представлен для оценки масштаба.

Полученные значения ОСШ на порядок ниже, чем полученные на исследовательском томографе. Это связано с рядом факторов, которые уже были описаны выше: использованием неоптимального магнитного поля для переноса поляризации, увеличением длины пути переноса образца до области регистрации, использованием водорода с содержанием параводорода = 50%,

уменьшением объема образца (сигнал регистрировался не от всего образца, а от среза толщиной 10 или 45 мм). Также негативное влияние оказала замена 25-30 мм катушки для регистрации сигнала на катушку с диаметром 40 мм. Однако, несмотря на ряд негативных факторов, на полученных МР изображениях по ядрам ^{13}C отчетливо видно месторасположение ампулы с ГП соединениями. Данные результаты подтверждают возможность применения метода ИППЯ в биомедицинских исследованиях даже с использованием базового оборудования.

Таким образом, в данной части работы было проведено сравнение двух методов для переноса поляризации на гетероядро при использовании метода ИППЯ с гидрированием по боковой цепи. В качестве субстратов были выбраны производные ацетата и пирувата. В качестве первого метода переноса поляризации были использованы слабые магнитные поля. Полученные уровни поляризации ^{13}C составили $3.95 \pm 0.05\%$ для ^{13}C -аллилпирувата и ^{13}C и $0.65 \pm 0.05\%$ для ^{13}C -этилацетата. Второй метод заключался в использовании импульсных последовательностей типа INEPT. Полученные уровни поляризации ядер ^{13}C составили $0.66 \pm 0.04\%$ для ^{13}C -аллилпирувата и $0.19 \pm 0.02\%$ для ^{13}C -этилацетата. Также были получены МР изображения по ядрам ^{13}C как на исследовательском томографе с магнитным полем 9.4 Тл, так и на томографе для исследования животных с магнитным полем 7.1 Тл. Данное исследование является принципиально важным для оценки уровней поляризации и значения ОСШ на МР изображениях в будущих экспериментах *in vivo*.

Так как метод переноса поляризации с помощью слабого магнитного поля показал большую эффективность, то дальнейшее исследования было проведено также с его использованием, но с другим методом гиперполяризации – вместо ИППЯ был использован метод SABRE.

3.2. Гетероядерная МРТ с применением SABRE для создания гиперполяризации и использованием слабых магнитных полей для переноса поляризации на гетероядро

Данный раздел посвящен гетероядерной магнитно-резонансной томографии соединений, которые были гиперполяризованы с помощью метода SABRE и применения слабого магнитного поля для переноса поляризации на гетероядро. Как было упомянуто в разделе 1.3.2, перенос поляризации на гетероядро происходит спонтанно при правильном значении магнитного поля (порядка микротесла для гетероядер). Для создания таких условий используется магнитный экран. В качестве субстрата, на который переносится поляризация, используются гетероциклические основания, которые хорошо координируются на иридиевом комплексе. В данном разделе представлены работы с такими субстратами, как метронидазол и ниморазол.

3.2.1. Эксперименты с метронидазолом

В работе использовался метронидазол, обогащенный изотопом ^{15}N в двух или трех положениях: 2-(2-метил-5-нитро-[1,3- $^{15}\text{N}_2$]имидазол-1-ил)этанол (метронидазол- $^{15}\text{N}_2$) и 2-(2-метил-5-[^{15}N]нитро-[1,3- $^{15}\text{N}_2$]имидазол-1-ил)этанол (метронидазол- $^{15}\text{N}_3$) (см. Рисунок 27).

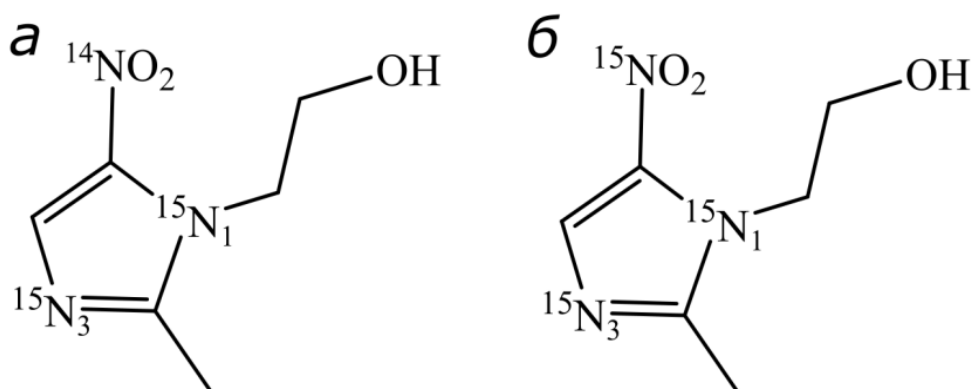


Рисунок 27. Структура соединений $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол (а) и $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол (б). Нижние индексы при ^{15}N обозначают номер ядра.

Для создания гиперполяризации на гетероядре ^{15}N в молекуле метронидазола использовался метод SABRE с переносом поляризации в слабых

магнитных полях. Эксперименты были проведены соавтором работы к.х.н. Сальниковым О.Г. и заключались в измерении уровней поляризации в магнитном поле 1.4 Тл. Для этого интенсивность ГП сигнала сравнивалась с интенсивностью сигнала ^{15}N -пиридина полученного в условиях теплового равновесия. Концентрация ^{15}N -пиридина составляла 12.4 М. Спектры записывались с помощью возбуждающего 90° -импульса.

Усиление сигнала вычислялось по следующей формуле:

$$\varepsilon = \frac{I_{\text{ГП}}}{I_{\text{равн}}} \cdot \frac{C_{\text{равн}}}{C_{\text{ГП}}} \cdot \frac{A_{\text{равн}}}{A_{\text{ГП}}}, \quad (13)$$

где $I_{\text{ГП}}$ и $I_{\text{равн}}$, $C_{\text{ГП}}$ и $C_{\text{равн}}$ – это интенсивность сигнала и концентрация в экспериментах с созданием гиперполяризации и в условиях теплового равновесия, соответственно. Отношение $A_{\text{равн}}/A_{\text{ГП}}$ учитывает разницу объемов образцов. Учет данного отношения не обходим, так как эксперименты с ^{15}N -пиридином проводились в стандартной ампуле ЯМР, а эксперименты с $^{15}\text{N}_2$ -метронидазолом и $^{15}\text{N}_3$ -метронидазолом проводились в толстостенной ампуле ЯМР, в которой был погружен капилляр для подачи параводорода в систему.

Данное отношение вычислялось следующим образом:

$$\frac{A_{\text{равн}}}{A_{\text{ГП}}} = \frac{4.14^2}{3.43^2 - 1.6^2} \sim 1.85,$$

где 4.14 мм – это внутренний диаметр стандартной ампулы ЯМР с внешним диаметром 5 мм, 3.43 мм – это внутренний диаметр ампулы ЯМР с внешним диаметром 5 мм и толстыми стенками, 1.6 мм – это внешний диаметр капилляра, через который параводород поступал в систему.

Уровни поляризации вычислялись умножением полученного значения ε на равновесное значение $P(^{15}\text{N})$ в магнитном поле 1.4 Тл при 298 К, то есть $P(^{15}\text{N}) = 4.9 \times 10^{-5}\%$.

Итого усиления сигнала составили

- для $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола:

$$\varepsilon(^{15}\text{N}_1) = \frac{2.123}{0.0359} \cdot \frac{12.4}{0.014} \cdot 1.85 = 9.8 \cdot 10^4, P(^{15}\text{N}_1) = 4.8\%.$$

$$\varepsilon(^{15}\text{N}_3) = \frac{1.885}{0.0359} \cdot \frac{12.4}{0.014} \cdot 1.85 = 8.7 \cdot 10^4, P(^{15}\text{N}_3) = 4.3\%.$$

- для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола:

$$\varepsilon(^{15}\text{N}_1) = \frac{6.842}{0.0359} \cdot \frac{12.4}{0.014} \cdot 1.85 = 3.2 \cdot 10^5, P(^{15}\text{N}_1) = 15.4\%.$$

$$\varepsilon(^{15}\text{N}_3) = \frac{5.192}{0.0359} \cdot \frac{12.4}{0.014} \cdot 1.85 = 2.4 \cdot 10^5, P(^{15}\text{N}_3) = 11.7\%.$$

$$\varepsilon(^{15}\text{NO}_2) = \frac{7.78}{0.0359} \cdot \frac{12.4}{0.014} \cdot 1.85 = 3.6 \cdot 10^5, P(^{15}\text{NO}_2) = 17.5\%.$$

Таким образом, после оптимизации экспериментальных условий поляризация ^{15}N составляла $\sim 5\%$ в экспериментах с $^{15}\text{N}_2$ -метронидазолом и 12-17% в экспериментах с $^{15}\text{N}_3$ -метронидазолом в магнитном поле 1.4 Тл.

Полученные значения позволили сделать вывод, что интенсивности сигнала будет достаточно для проведения экспериментов МРТ. Поэтому следующим шагом было проведение экспериментов ЯМР в МР томографе с магнитным полем 9.4 Тл (см. Рисунок 28). Усиления сигнала высчитывалось также по формуле 13, но возникал дополнительный множитель ($N_{\text{равн}}/N_{\text{ГП}}$). Возникновение данного множителя связано с заменой референсного образца на $^{15}\text{N}_2$ -имидазол, которые имеет два ядра ^{15}N , которые дают вклад в сигнал. Таким образом, $N_{\text{равн}} = 2$, $N_{\text{ГП}} = 1$. Кроме того, $^{15}\text{N}_2$ -имидазол находился в ампуле ЯМР с диаметром 10 мм, поэтому изменилось отношение $A_{\text{равн}}/A_{\text{ГП}}$. Значение $P(^{15}\text{N})$ в условиях теплового равновесия = $33 \times 10^{-5}\%$ в магнитном поле 9.4 Тл при 298 К. В итоге, уровни поляризации составили для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола: $P(^{15}\text{N}_1) = 0.13\%$, $P(^{15}\text{N}_3) = 0.08\%$ и $P(^{15}\text{NO}_2) = 0.01\%$; для $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола: $P(^{15}\text{N}_1) = 0.07\%$, $P(^{15}\text{N}_3) = 0.03\%$.

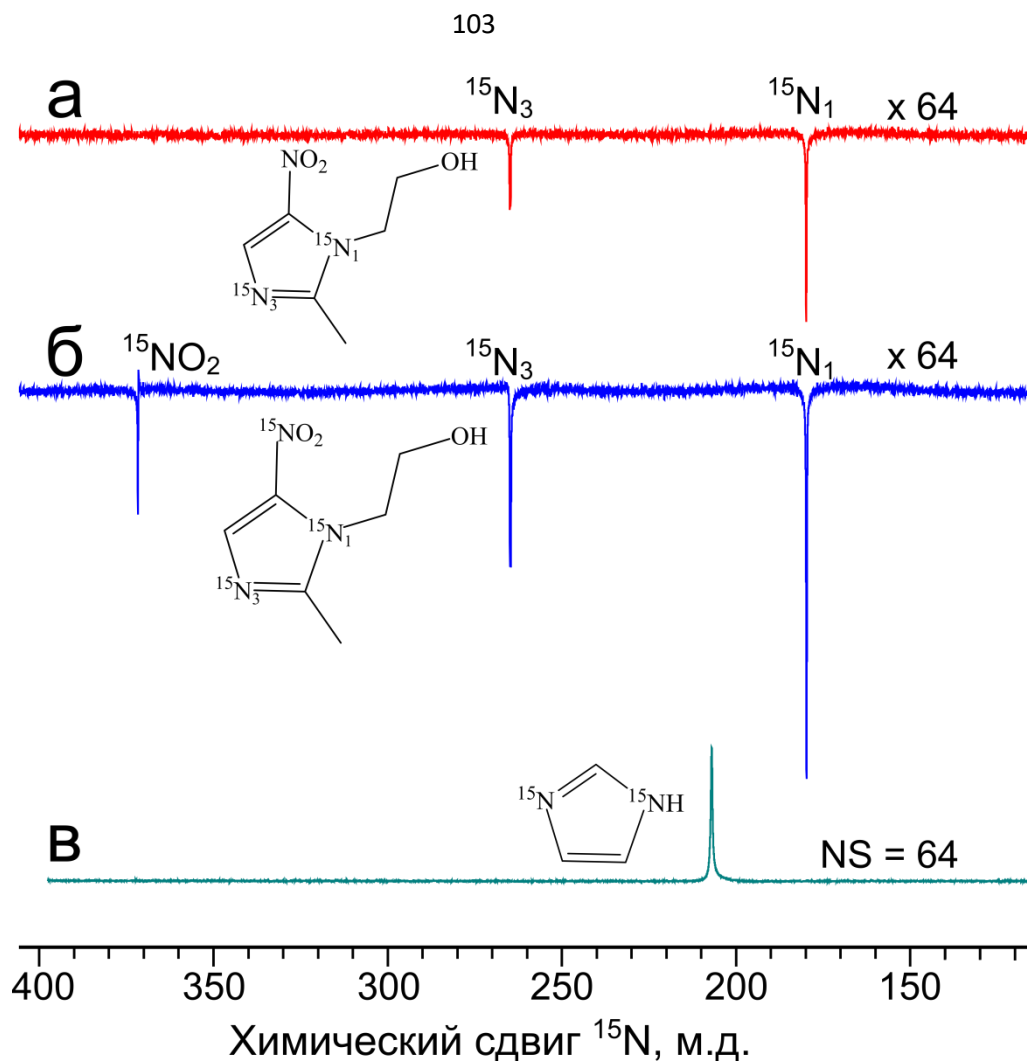


Рисунок 28. Спектр ЯМР по ядрам ^{15}N $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола (а), $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола (б) и $^{15}\text{N}_2$ -имидазола (в) в магнитном поле 9.4 Тл. Спектры ЯМР (а) и (б) увеличены в 64 раза для лучшего представления результатов. Спектр ЯМР (в) получен с помощью 64 накоплений.

Как и в предыдущей части работы, при переходе к МР томографу уровни поляризации уменьшились в первую очередь из-за устройства прибора, а именно, увеличения длины пути переноса образца из слабого магнитного поля в сильное магнитное поле для регистрации сигнала. Стоит также отметить, что значение $P(^{15}\text{N})$ в экспериментах на приборе с магнитным полем 9.4 Тл для $^{15}\text{NO}_2$ меньше по сравнению с остальными сигналами, в то время как в экспериментах на приборе с магнитным полем 1.4 Тл сигнал от $^{15}\text{NO}_2$ является максимальным.

Тем не менее, несмотря на уменьшение значений уровней поляризации была продемонстрирована ^{15}N 2М томография в магнитном поле 9.4 Тл. Двумерные изображения по ядрам ^{15}N были записаны с помощью импульсной последовательности TrueFISP. TrueFISP – это быстрая импульсная

последовательность, в которой время TR значительно меньше, чем времена релаксации T_1 и T_2 . В TrueFISP градиенты сбалансированы, поэтому фаза намагниченности сохраняется в начале и конце повторения. Также в конце каждого повторения остаточную намагниченность переводят в продольную, а не разрушают ее. Однако, намагниченность ГП соединений, созданная с помощью методов гиперполяризации, постепенно расходуется, поэтому с помощью TrueFISP достигается только псевдоустойчивое состояние.

При записи изображений использовалось 16 усреднений, полное время эксперимента для XY плоскости составило 33 секунды и 344 мс, для XZ было использовано 8 усреднений, время эксперимента – 16 секунд 672 мс.

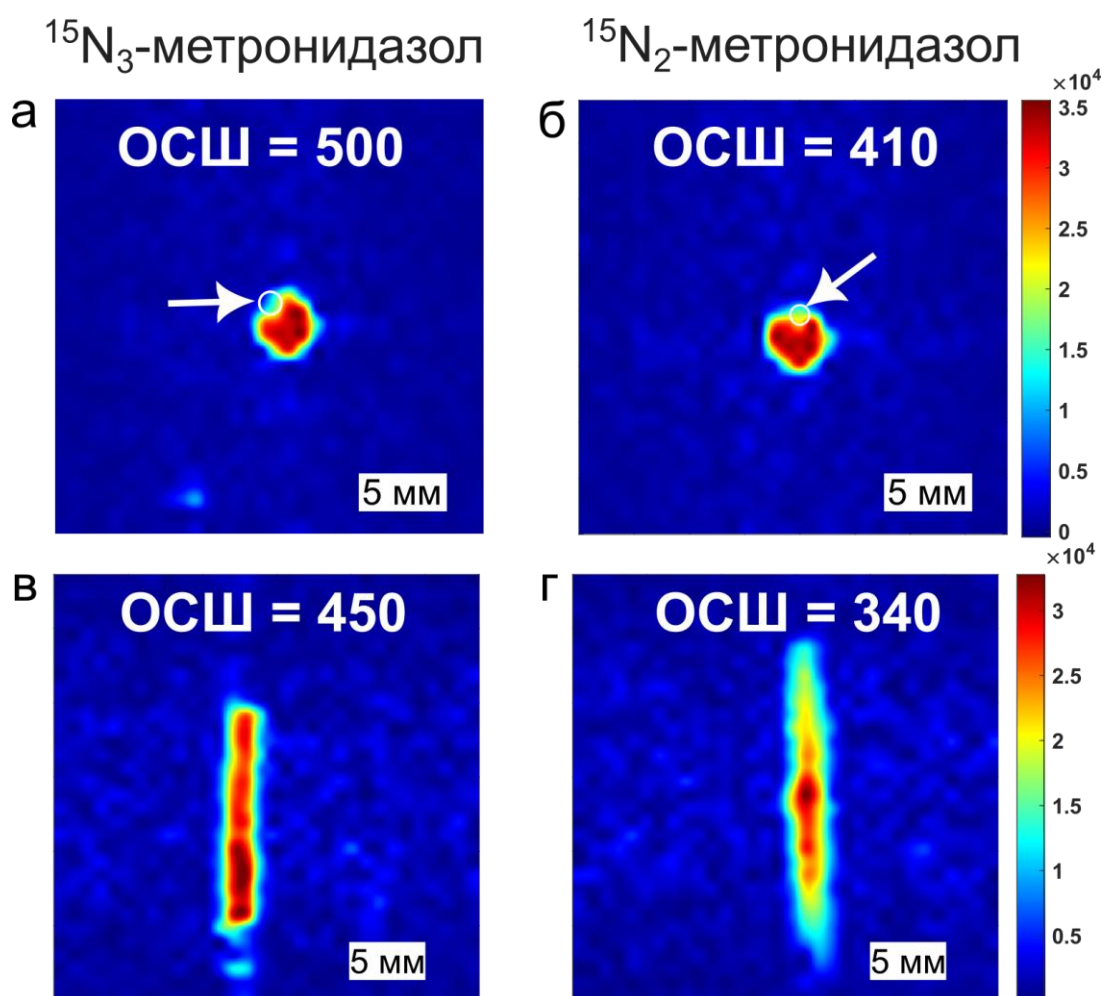


Рисунок 29. ^{15}N МР изображения в плоскости XY от гиперполяризованных с помощью метода SABRE $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола (а) и $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола (б), в плоскости XZ от $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола (в) и $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола (г). Разница в уровнях (длине вертикального столба) раствора на МР изображениях в плоскости XZ связана с потерями раствора во время эксперимента. Белый прямоугольник на МР изображении соответствует 5 мм и представлен

для оценки масштаба, белый кружок и стрелочка обозначают месторасположение капилляра, через который параводород поступал в систему.

ОСШ на МР изображениях в проекциях XY и XZ составил 500 и 450 соответственно для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола, а также 410 и 340 для $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола (см. Рисунок 29). Пространственное разрешение составляло $0.9 \times 0.9 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$, что является наиболее высоким среди имеющихся работ по ^{15}N МРТ. На МР изображениях в проекции XY четко видно очертание контура ампулы, также заметно месторасположение капилляра (оно соответствует области с низким значением интенсивности сигнала). На рисунке месторасположение капилляра отмечено кружком и стрелочкой. На МР изображениях в проекции XZ видно, что высота столба с образцом меньше для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола по сравнению с $^{15}\text{N}_2$ -метронидазолом. Это связано с тем, что часть образца испарилась в процессе проведения эксперимента.

Таким образом, в экспериментах было показано, что метод SABRE с использованием слабых магнитных полей для переноса поляризации применим для усиления сигнала такого потенциального контрастного агента как $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол. При этом ОСШ в случае $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола больше, так как достигнутые уровни поляризации больше по сравнению с $^{15}\text{N}_2$ -метронидазолом.

3.2.2. Эксперименты с ниморазолом

В следующем исследовании с использованием метода SABRE и применением слабого магнитного поля для переноса поляризации использовался субстрат 4-[2-(5-[^{15}N]нитро-[1,3- $^{15}\text{N}_2$]имидазол-1-ил)этил]морфолин ($^{15}\text{N}_3$ -ниморазол, см. Рисунок 30), который также может быть использован в качестве контрастного агента *in vivo*. Наибольшая интенсивность сигнала наблюдалась при магнитном поле для переноса поляризации, равном 0.4 мкТл (значение получено к.х.н. Сальниковым О.Г.), что совпадает со значением для экспериментов с метронидазолом, обогащенным изотопом ^{15}N . Усиления сигнала рассчитывались по формуле 13. В качестве образца для сравнения был использован 12.4 М ^{15}N -пиридин. В

результате было получено, что в экспериментах SABRE поляризация наблюдалась на всех трех ядрах ^{15}N : $P(^{15}\text{N}_1) = 2.4\%$, $P(^{15}\text{N}_3) = 1.9\%$ и $P(^{15}\text{NO}_2) = 3.2\%$.

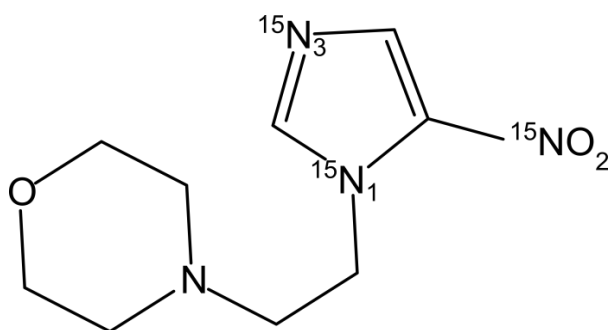


Рисунок 30. Структура соединения ниморазол- $^{15}\text{N}_3$. Нижние индексы ^{15}N означают номер ядра.

Стоит отметить, что наибольшее значение $P(^{15}\text{NO}_2) = 3.2\%$ значительно меньше, чем полученное для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола (17%), хотя концентрация субстрата в экспериментах с $^{15}\text{N}_3$ -ниморазолом в ~ 4 раза больше. Это может быть связано с тем, что в $^{15}\text{N}_3$ -ниморазоле отсутствует CH_3 группа, которая, вероятно, улучшает эффективность переноса поляризации. При этом перенос поляризации идет последовательно. Сначала поляризация переносится на $^{15}\text{N}_3$ с протонов параводорода, далее от $^{15}\text{N}_3$ переносится на $^{15}\text{N}_1$, после чего с $^{15}\text{N}_1$ к $^{15}\text{NO}_2$.

Для перехода к МРТ экспериментам была выполнена спектроскопия ЯМР в МР томографе с магнитным полем 9.4 Тл (см. Рисунок 31). Уровни поляризации составили: $P(^{15}\text{N}_1) = 0.003\%$, $P(^{15}\text{N}_3) = 0.33\%$ и $P(^{15}\text{NO}_2) = 0.78\%$.

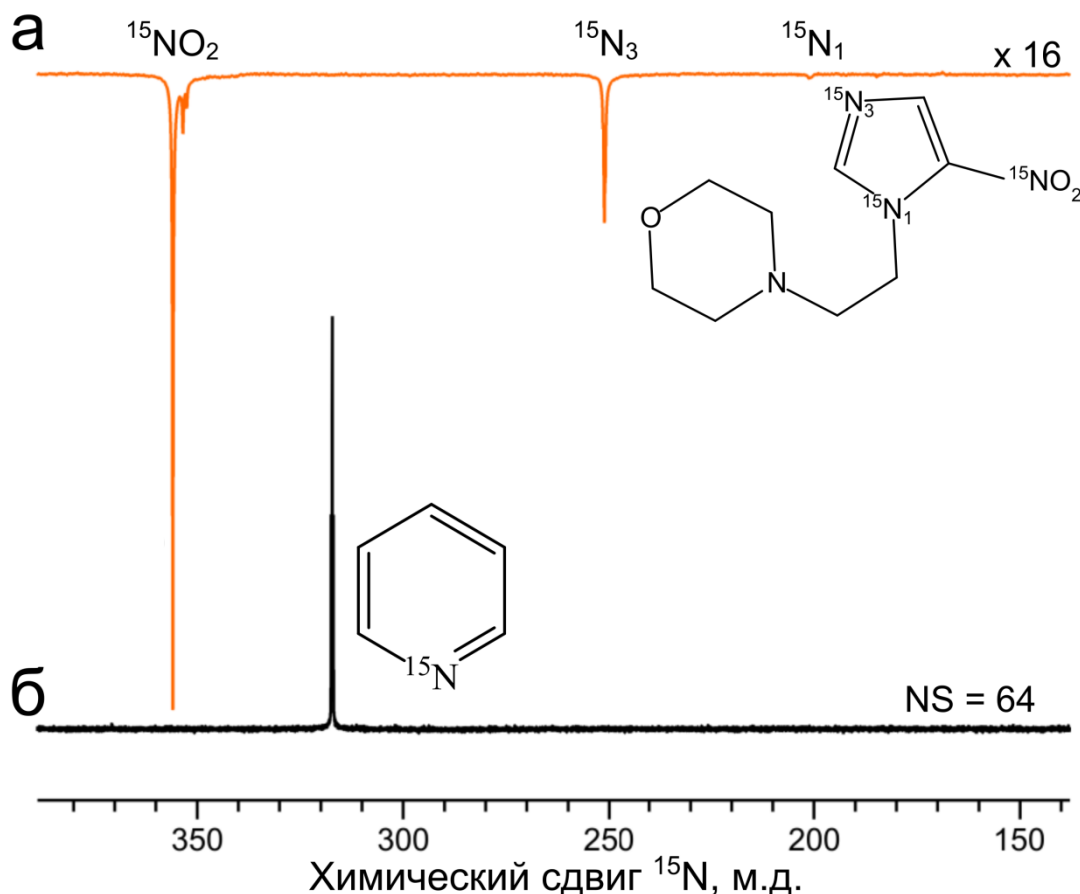


Рисунок 31. Спектр ЯМР по ядрам ^{15}N ГП $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола (а) и ^{15}N -пиридина в условиях теплового равновесия (б). Спектр ЯМР (а) увеличен в 16 раз для лучшего представления данных. Для эксперимента использовался раствор с концентрацией субстрата ~ 107 мМ, ~ 5.4 мМ катализатора. Для переноса поляризации использовалось магнитное поле 0.4 мкТл. Спектр (б) получен с помощью 64 накоплений. Сигнал получен от чистого ^{15}N -пиридина.

Далее, была выполнена ^{15}N 2М МРТ с помощью последовательности TrueFISP. Регистрация сигнала проводилась с отстройкой по частоте на группу $^{15}\text{NO}_2$, так как для этого ядра ^{15}N наблюдалось большее значение интенсивности сигнала. В МРТ эксперименте было зарегистрировано 16 последовательных ^{15}N МР изображений как в плоскости XY, так и в плоскости XZ (см. рис. П1 и рис. П2). На Рисунок 32 представлены ^{15}N 2М МР изображения по два из каждой серии в плоскостях XY и XZ. Изображения были получены от 5 мм ампулы ЯМР с раствором ~ 110 мМ ГП $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола. Наибольшие значения ОСШ составили ~ 100 . При этом было достигнуто пространственное разрешение 0.5×0.5 мм²/пиксель в плоскости XY и 1.2×1.2 мм²/пиксель в плоскости XZ. Регистрация одного изображения занимала 365 мс для плоскости XY и 684 мс для плоскости XZ. На данных МР изображениях, как и в случае с ^{15}N -

изотопологами метронидазола, видно границы ампулы и месторасположение капилляра.

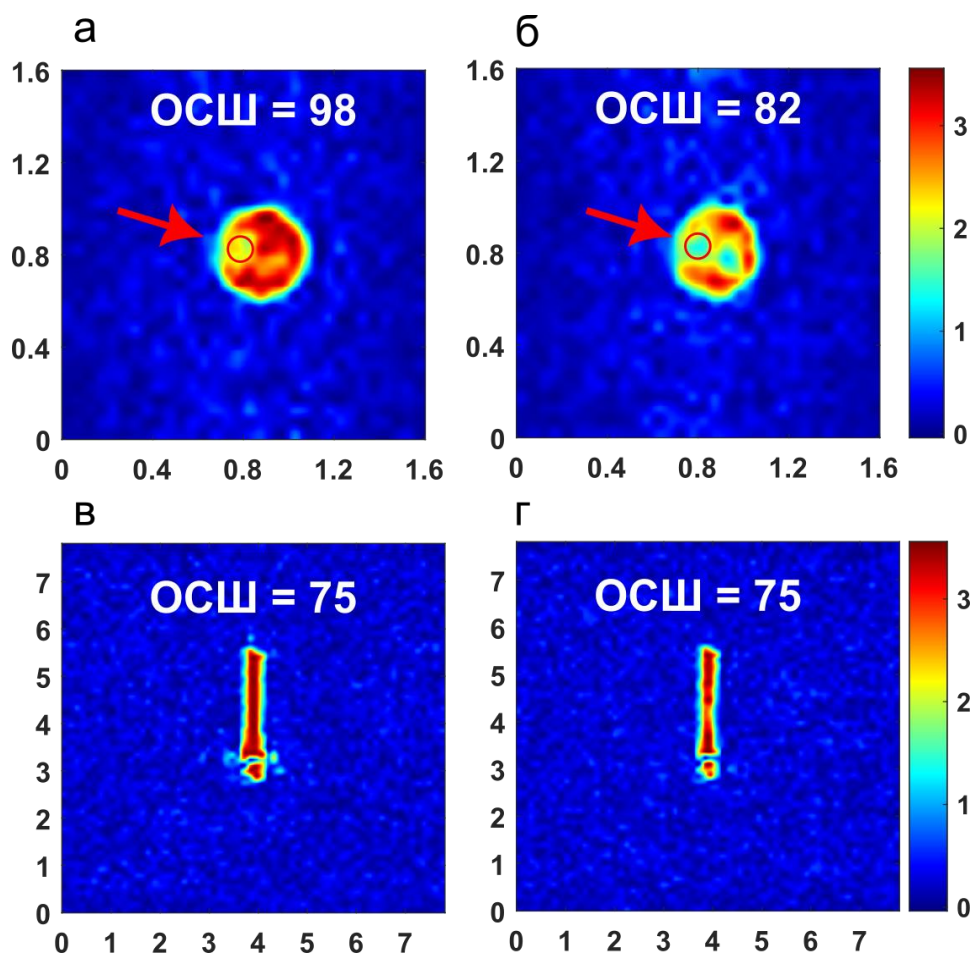


Рисунок 32. Первые два ^{15}N МР изображения из серии 16 последовательно-записанных изображений в плоскости XY (а, б) от гиперполяризованного с помощью метода SABRE $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола и в плоскости XZ (в, г). МР изображения были получены от сигнала $^{15}\text{NO}_2$ группы. Время записи одного изображения в плоскости XY = 356 мс. Время записи одного изображения в плоскости XZ = 684 мс. Красной стрелкой и кружочком отмечено месторасположение капилляра.

Результаты исследования показывают, что $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол является перспективным контрастным агентом для МР исследований по ядрам ^{15}N , так как полученные с его помощью МР изображения обладают большим значением ОСШ, хотя и меньшими в сравнении со значениями ОСШ для ^{15}N -изотопологов метронидазола. Кроме того, благодаря своим свойствам $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол может использоваться в качестве сенсора гипоксии в опухолях, что позволит улучшить диагностику раковых заболеваний.

Проведенные исследования с использованием метода SABRE и применения слабых магнитных полей для переноса поляризации показывают,

что данный подход имеет огромный потенциал для дальнейших биомедицинских исследований, так как полученные МР изображения по ядрам ^{15}N имеют большое значение ОСШ (порядка нескольких сотен). Тот факт, что активация катализатора занимает несколько часов, не накладывает ограничений для исследований *in vivo*. Это связано с тем, что активацию можно провести с использованием нормального водорода до начала процедур, в которых используются методы гиперполяризации и параводород. Сам же процесс гиперполяризации субстрата занимает порядка 1 минуты, причем генерируется достаточное количество ГП соединения для выполнения исследований с мелкими грызунами.

Однако, как можно заметить по результатам исследований в разделах 3.1. и 3.2., метод переноса поляризации с использованием слабых магнитных полей имеет недостаток. Данный недостаток связан с тем, что длина пути переноса образца из слабого магнитного поля в область регистрации значительно влияет на интенсивность регистрируемых сигналов. Таким образом, при изменении места проведения МР экспериментов и оборудования невозможно предсказать достижимые уровни поляризации. В связи с этим, следующая часть работы была посвящена исследованию применимости метода переноса поляризации с помощью импульсных последовательностей. Замена на данный метод позволит стандартизировать протокол исследований и использовать методы гиперполяризации на основе параводорода в биомедицинских исследованиях.

3.3. Гетероядерная МРТ с применением SABRE для создания гиперполяризации и использованием импульсных последовательностей для переноса поляризации на гетероядро

Данный раздел посвящен циклу исследований по использованию импульсной последовательности SLIC-SABRE для переноса поляризации на гетероядро в таких соединениях, как пиридин, никотинамид, 4-диметиламинопиридин и фампридин, и получению МР изображений ГП

соединений. Часть исследования, посвященная моделированию, была выполнена соавтором работы – к.ф.-м.н. Правдивцевым А.Н.

3.3.1. Оценка эффективности метода SLIC-SABRE

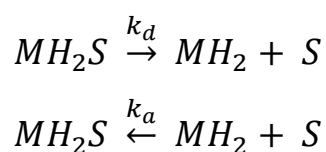
В сильных магнитных полях при использовании методов гиперполяризации наиболее эффективно не полагаться на спонтанный перенос поляризации на гетероядра, а осуществлять перенос поляризации с помощью импульсных последовательностей, которые создают условия антипересечения уровней. Стоит отметить, что в экспериментах с использованием импульсных последовательностей для переноса поляризации на достижимую поляризацию на субстрате влияет множество факторов: во-первых, экспериментальные условия, такие как концентрация катализатора SABRE и субстрата, скорость подачи $p\text{-H}_2$ в систему, растворитель, давление и температура, а, во-вторых, непосредственно параметры импульсной последовательности. Первое исследование данного раздела посвящено оптимизации условий эксперимента и исследованию эффективности импульсной последовательности SLIC-SABRE. Как было сказано в Разделе 1.3.2, импульсная последовательность SLIC-SABRE более эффективна по сравнению с LIGHT-SABRE и толерантна к $S\text{-T}_0$ конверсии.

В данном исследовании в экспериментах использовался раствор 0.1 M ^{15}N -пиридина и 5 mM катализатора SABRE $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{IMes})\text{Cl}]$ в метаноле- d_4 . Активация раствора проводилась в течение 20 минут, в результате пиридин связывался с комплексом SABRE, образуя $[\text{IrH}_2\text{IMes}(\text{Py})_3]$ и свободный пиридин в концентрации 1:17. Такое соотношение концентраций возникает из-за того, что к катализатору SABRE присоединяется три молекулы субстрата, то есть в растворе $3 \times 5 \text{ mM} = 15 \text{ mM}$ субстрата находится в связанном состоянии. Свободного же субстрата в растворе остается $100 \text{ mM} - 15 \text{ mM} = 85 \text{ mM}$. Итого, 5 mM катализатора : 85 mM свободного субстрата = 1 : 17. Раствор барботировался параводородом через тонкий капилляр ($\sim 0.16 \text{ см}$). Скорость подачи параводорода составляла 0.12 мл/с при давлении 3.7 бар. В качестве

импульсной последовательности для переноса поляризации использовалась импульсная последовательность SLIC-SABRE.

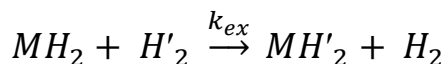
Первым шагом в исследовании было проведение компьютерного моделирования (выполнено соавтором работы к.ф.-м.н. Правдивцевым А.Н.) для определения параметров SLIC-SABRE, при которых будет наблюдаться максимально эффективный перенос поляризации на гетероядро. В компьютерном моделировании для описания процесса необходимо учесть как протекание химической реакции, так и эволюцию спиновой системы.

Химический обмен может быть описан следующим образом:

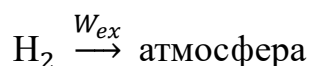


где MH_2S – это комплекс SABRE, к которому присоединен H_2 и субстрат (S), MH_2 – короткоживущий интермедиат, k_d – константа диссоциации, k_a – константа ассоциации.

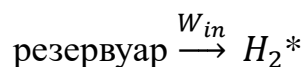
Водородный обмен:



Потеря водорода в атмосферу:

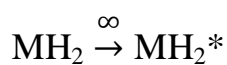
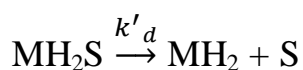
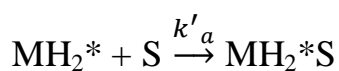


Подача $p\text{-}H_2$ в систему:



Полученная система уравнений нелинейная, поэтому для ее решения было принято несколько упрощений. Во-первых, резервуар с газом бесконечный, в нем находится неограниченное количество водорода, причем пара-фракция составляет 100%. Во-вторых, химический обмен H_2 с комплексом М быстрый, то есть в MH_2 всегда находится чистый $p\text{-}H_2$. Для удобства обозначений такое промежуточное соединение далее обозначено как MH_2^* .

Итого, после данных упрощений система уравнений будет иметь следующий вид:



где k'_a и k'_d – это константы ассоциации и диссоциации в упрощенной модели, то есть они не совпадают полностью по значению с k_a и k_d .

Из-за того, что $p\text{-H}_2$ поступает в систему в течение длительного времени, становится возможным введение константы ассоциации, соответствующей стационарному состоянию:

$$W_a = k'_a [\text{MH}_2] = k'_d \frac{[\text{MH}_2\text{S}]}{[\text{S}]} \quad (14)$$

Из эксперимента известно отношение $[\text{MH}_2\text{S}]/[\text{S}]$, поэтому остается только один изменяемый параметр в модели – k'_d , при этом значение $\tau = 1/k'_d$ соответствует среднему времени жизни комплекса MH_2S .

С помощью моделирования были получены значения параметров «непрерывного» импульса, которые обеспечивают наибольшую поляризацию ^{15}N на свободном субстрате: амплитуда импульса $V_1 = 5$ Гц, длительность импульса $t_{\text{cw}} = 1.17$ с, количество циклов SLIC = 20 и отстройка по частоте $\Delta\nu = 17$ Гц. Максимальное теоретически полученное значение поляризации ^{15}N составило $\sim 25\%$. Начальные расчеты были выполнены для системы из четырех спинов $1/2$ в комплексе SABRE $[\text{MH}_2\text{S}_2]$, где S – это одно ядро ^{15}N . Было показано, что интенсивность сигнала имеет антисимметричный вид относительно частоты связанного субстрата, а два полученных экстремума имеют разные знаки.

Данный факт был подтвержден экспериментально (см. Рисунок 33). При проведении экспериментов была использована развязка по протонам WALTZ-16 [171], которая включалась во время регистрации сигнала. Использование развязки по протонам позволяет приблизить реальную систему к четырехспиновой системе, которая была использована в моделировании. В результате наблюдалась антисимметричная зависимость интенсивности от

частоты отстройки $\Delta\nu$ (см. Рисунок 33). В полученном графике зависимости интенсивности сигнала от $\Delta\nu$ наблюдается два основных экстремума $\Delta\nu = \pm 17$ Гц и два экстремума с меньшим значением интенсивности сигнала при $\Delta\nu = \pm 5$ Гц.

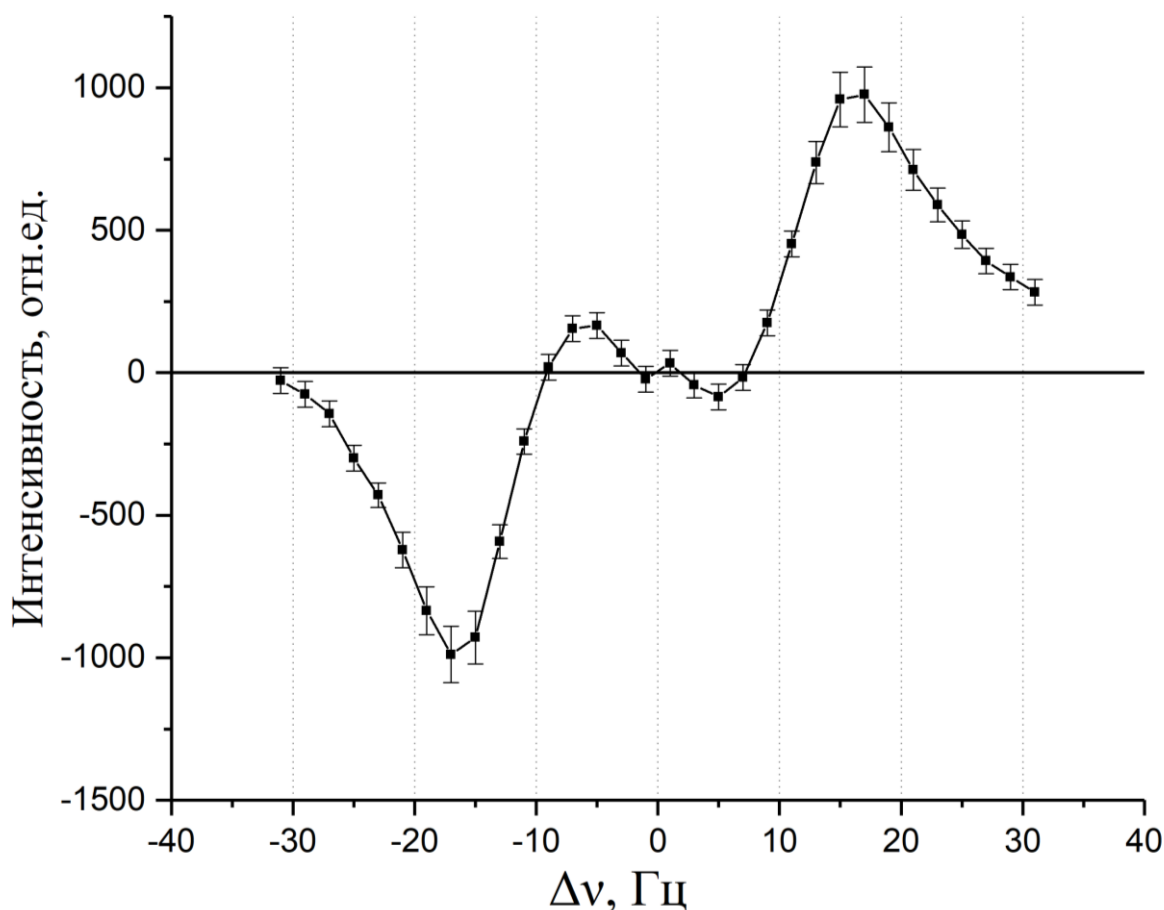


Рисунок 33. Зависимость интенсивности сигнала ^{15}N свободного ^{15}N -пиридина от частоты отстройки от резонанса $\Delta\nu$. Для переноса поляризации на гетероядро и регистрации сигнала использовалась импульсная последовательность SLIC-SABRE с развязкой по протонам $B_1 = 5$ Гц, $n = 20$, $T = 15$ °C.

Моделирование было проведено также для системы из шести спинов, где дополнительно были учтены по одному протону каждого из двух субстратов, присоединенных к комплексу. В результате моделирования было получено, что максимальное значение поляризации уменьшилось в 2.5 раза. Таким образом, «усеченная» спиновая система из четырех спинов является предпочтительнее. Провести еще более детальное моделирование с учетом двух протонов из каждого субстрата, то есть системы из восьми спинов, оказалось невозможным из-за ограниченности вычислительной мощности компьютера.

Экспериментально была получена зависимость интенсивности сигнала от отстройки по частоте без использования развязки по протонам. В результате наблюдались только основные экстремумы при $\Delta\nu = \pm 20$ Гц (см. Рисунок 34). Также стоит отметить, что полученная в экспериментах интенсивность сигнала больше в экспериментах с использованием спиновой развязки.

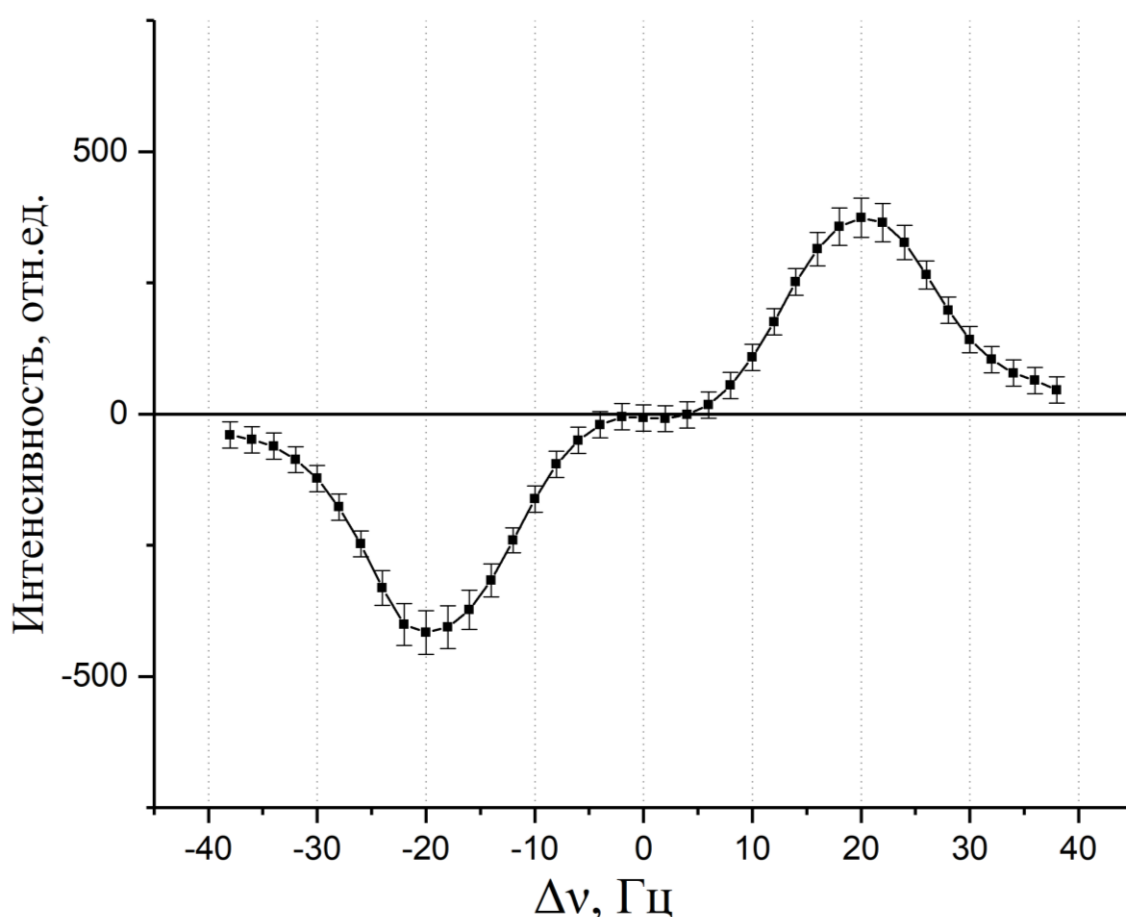


Рисунок 34. Зависимость интенсивности сигнала ^{15}N свободного ^{15}N -пиридина от частоты отстройки от резонанса $\Delta\nu$. Для переноса поляризации на гетероядро и регистрации сигнала использовалась импульсная последовательность SLIC-SABRE без развязки по протонам. $B_1 = 5$ Гц, $n = 20$, $T = 15$ °С.

Также экспериментально было проведено исследование зависимости интенсивности сигнала от B_1 и $\Delta\nu$ при разных температурах (см. Рисунок 35). В экспериментах температура изменялась с шагом 5 °С в диапазоне от 0 до 25 °С, амплитуда «непрерывного» импульса изменялась с шагом 5 Гц в диапазоне от 5 до 20 Гц, а $\Delta\nu$ изменялась с шагом 1-2 Гц в диапазоне от -8 до 25 Гц. Как видно из полученной зависимости, интенсивность сигнала сохраняет антисимметричный вид при разных температурах и амплитудах.

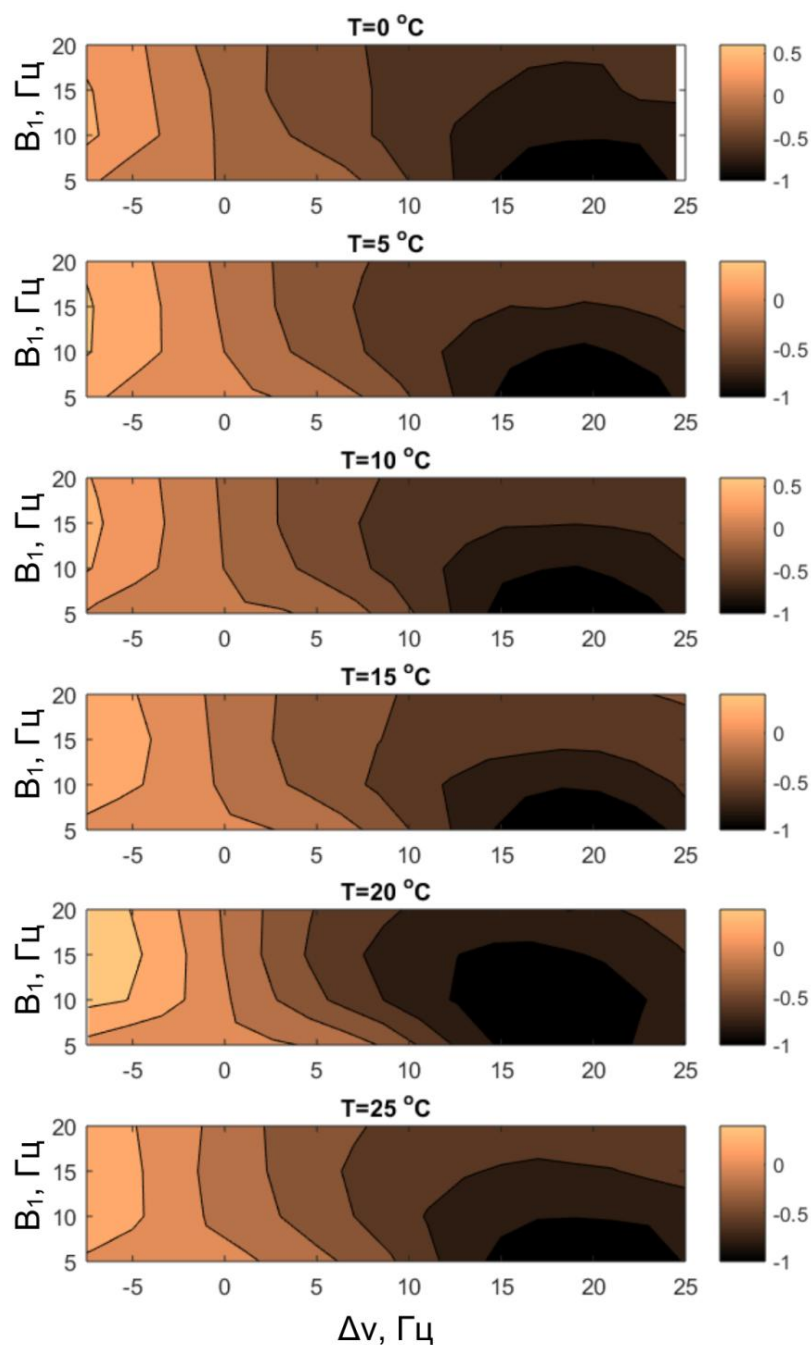


Рисунок 35. Зависимость уровня поляризации ^{15}N от B_1 , $\Delta\nu$ и температуры в экспериментах с использованием SLIC-SABRE. Результаты получены в приборе с магнитным полем 7.1 Тл. $t_{\text{cw}} = 1.17$ с, $n = 20$.

Несмотря на то, что в моделировании наибольшее значение $P(^{15}\text{N})$ составило $\sim 25\%$ (для случая четырехспиновой системы), однако в эксперименте наибольшее значение поляризации, которое получено с использованием SLIC-SABRE с развязкой по протонам, составило $\sim 0.45\%$ (см. Рисунок 36), что значительно отличается от полученного теоретического значения. Сравнение экспериментальных данных с результатами других работ,

в которых использовалась импульсная последовательность LIGHT-SABRE, показало, что во всех работах значения $P(^{15}\text{N})$ были небольшими ($\sim 0.007\%$ [114] - 0.157% [113]), а для SLIC-SABRE $P(^{15}\text{N}) \sim 0.135\%$ [114]. Однако даже такие уровни поляризации позволяют наблюдать интенсивный сигнал.

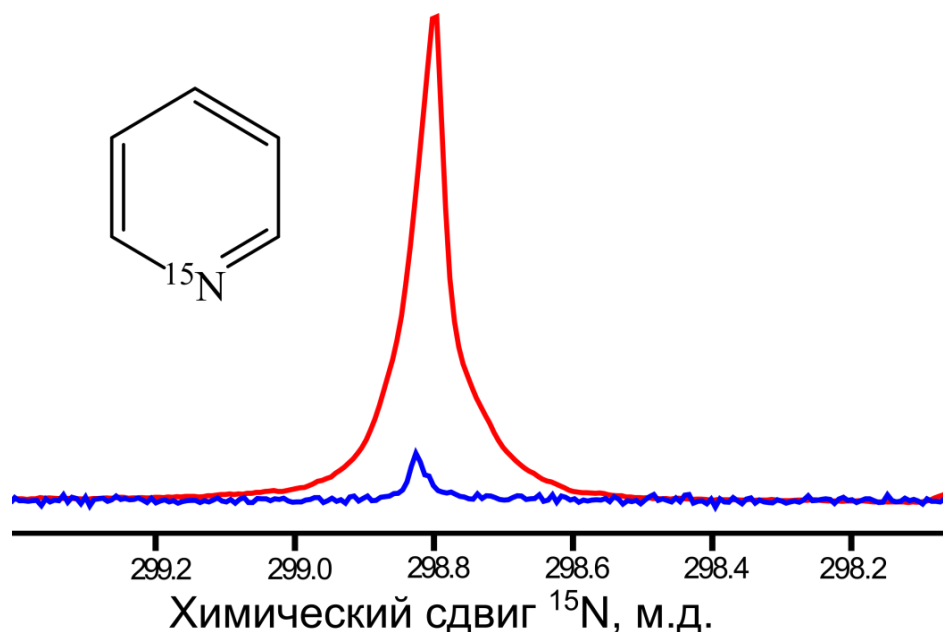


Рисунок 36. Спектр ЯМР полученный по ядрам ^{15}N гиперполяризованного с помощью метода SLIC-SABRE ^{15}N -пиридина (красный) и спектр полученный в условиях теплового равновесия (синий).

Отличие экспериментального и теоретического значений связано с несколькими факторами. Во-первых, не весь образец находится в РЧ катушке, в связи с этим лишь часть исследуемого образца подвергается воздействию РЧ импульсов. Кроме того, из-за постоянного барботирования образца происходит перемешивание, то есть постоянно изменяется область, на которую воздействуют РЧ импульсы. Во-вторых, на краях РЧ катушки возникают градиенты переменного магнитного поля, что приводит к неоптимальному воздействию РЧ импульсов на образец. В-третьих, барботирование также вызывает неоднородности магнитного поля, что приводит к снижению эффективности импульсной последовательности SLIC-SABRE. В-четвертых, анизотропия химического сдвига ^{15}N уменьшает время релаксации T_1 в сильных магнитных полях, что уменьшает потенциально доступную поляризацию ^{15}N . Решить данные проблемы можно переходом в более слабые магнитные поля,

например, сейчас распространены настольные спектрометры с магнитным полем 1.4 Тл.

Таким образом, в данном исследовании был проведен анализ метода SLIC-SABRE для переноса поляризации на гетероядро, где в качестве модельного субстрата использовался ^{15}N -пиридин. Полученное значение поляризации составило 0.45% для 0.1 М раствора ^{15}N -пиридина в метаноле в поле 7.1 Тл. Метод SLIC-SABRE продемонстрировал более высокую эффективность по сравнению с результатами, показанными в других работах с использованием метода LIGHT-SABRE.

3.3.2. Выбор импульсной последовательности для МРТ в экспериментах с использованием SLIC-SABRE

Следующая часть исследования посвящена получению ^{15}N 2М МР изображений соединений, гиперполяризованных с помощью подхода SLIC-SABRE. В качестве соединений был также выбран ^{15}N -пиридин как модельный объект и ^{15}N -никотинамид, который известен как витамин B_3 (более детальное описание никотинамида было представлено в разделе 1.6). Для ^{15}N -пиридина были использованы параметры SLIC-SABRE, полученные ранее: $\nu_1 = 5$ Гц, $\Delta\nu \approx 17$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.17$ с. Для ^{15}N -никотинамида были использованы такие же параметры, как и для ^{15}N -пиридина, потому что эти два соединения обладают схожей структурой и, как следствие, их КССВ в комплексе примерно равны.

Количество циклов SLIC-SABRE и скорость подачи p-H_2 в систему были оптимизированы (см. Рисунок 37) в начале эксперимента. Полученные результаты показали, что при числе циклов SLIC-SABRE 30 и 40 для ^{15}N -пиридина и ^{15}N -никотинамида наблюдается максимальное значение интенсивности сигнала. Дальнейшее увеличение числа циклов вызывает падение интенсивности сигнала, так как при длительном воздействии на образец РЧ импульсами происходит нагревание образца. Это в свою очередь вызывает изменение химического сдвига субстрата и, как следствие, оптимальные параметры SLIC-SABRE изменяются. Также дальнейшее

увеличение числа циклов значительно увеличивает длительность импульсной последовательности, что достаточно критично, так как при больших значениях константы диссоциации комплекса субстрат может диссоциировать раньше, чем закончится время действия импульсной последовательности.

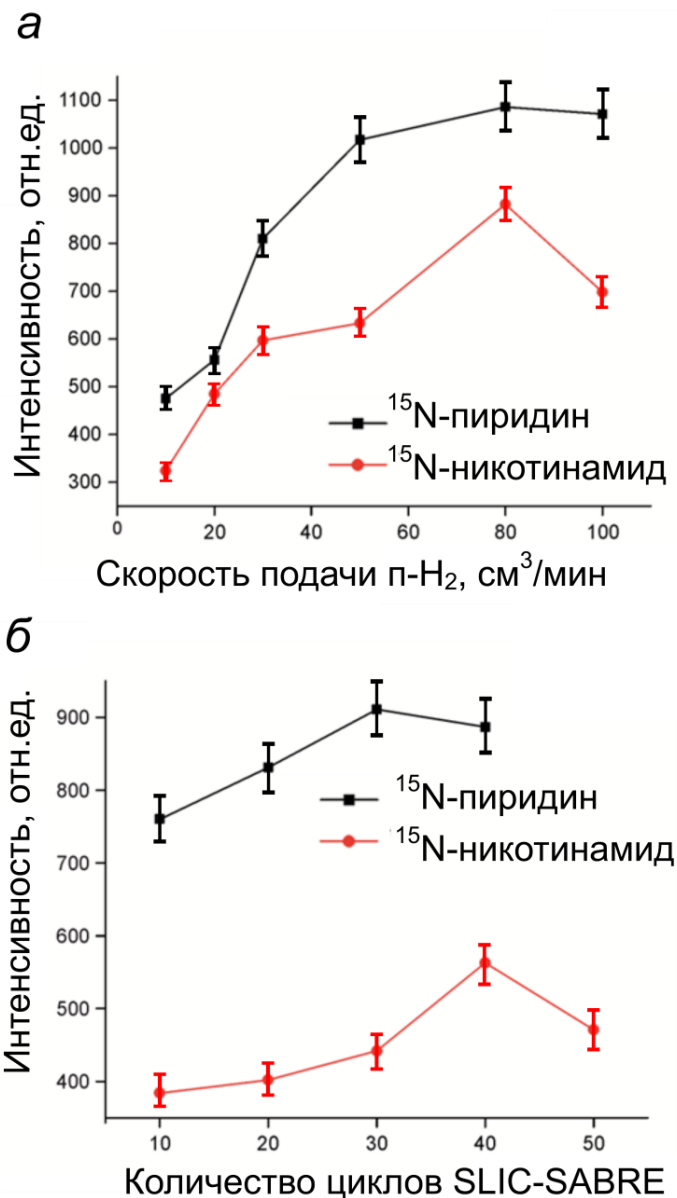


Рисунок 37. Зависимость интенсивности сигнала ЯМР ¹⁵N от скорости подачи p-H₂ в систему (а) и количества циклов SLIC-SABRE (б). Черные графики соответствуют ¹⁵N-пиридину, красные – ¹⁵N-никотинамиду. Спектры ЯМР записывались после остановки подачи p-H₂ в систему. Все эксперименты проводились при комнатной температуре и давлении 4.4 бар. Параметры SLIC-SABRE: V₁ = 5 Гц, t_{cw} = 1.17 с, для ¹⁵N-пиридина Δν = 17 Гц, для ¹⁵N-никотинамида Δν = 16 Гц.

В экспериментах использовались растворы, содержащие 0.1 М субстрата и 5 мМ катализатора SABRE [Ir(COD)(IMes)Cl] в метаноле-d₄. В результате

были получены значения усиления ~ 1400 раз, что соответствует $P(^{15}\text{N}) \sim 0.3\%$ для свободного ^{15}N -пиридина, и ~ 800 раз для ^{15}N -никотинамида, что соответствует $P(^{15}\text{N}) \sim 0.2\%$ в магнитном поле спектрометра Bruker Avance 300 7.1 Тл (см. Рисунок 38).

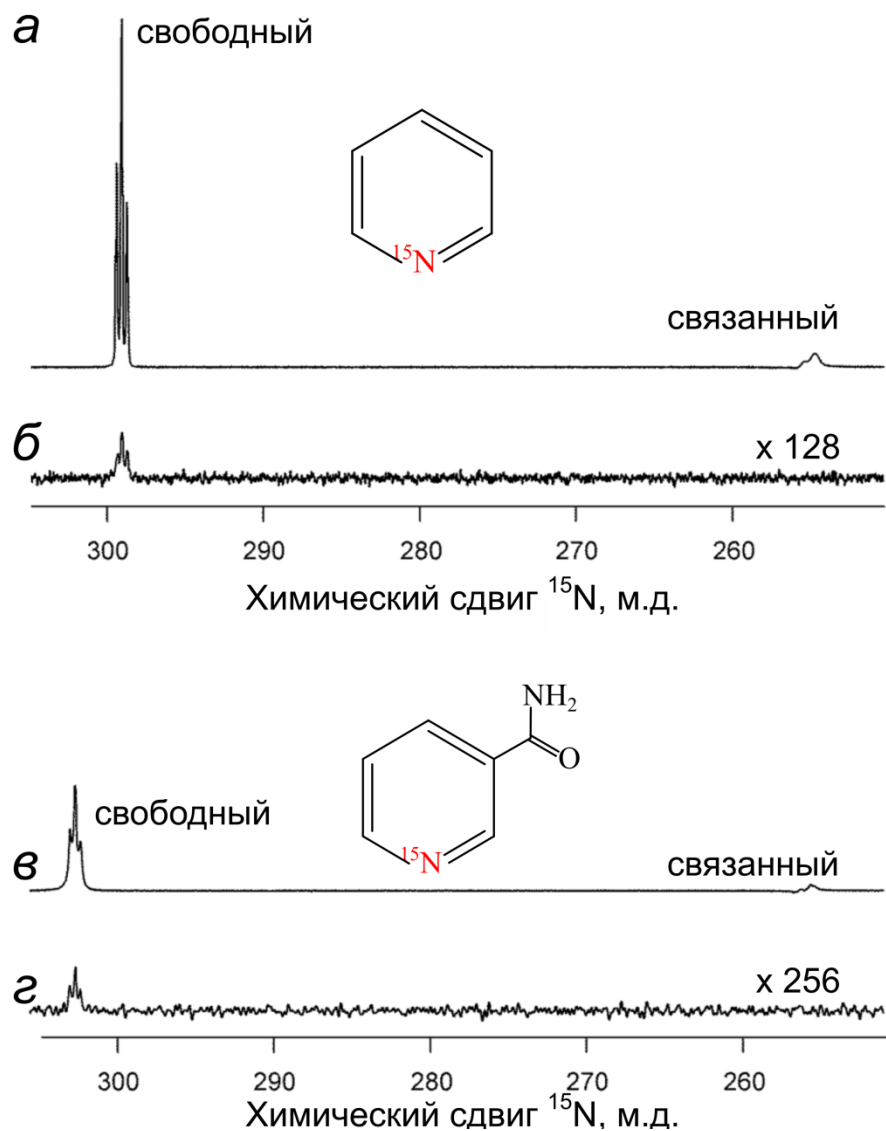


Рисунок 38. Спектры ЯМР ^{15}N в магнитном поле 7.1 Тл ^{15}N -пиридина (а, б) и ^{15}N -никотинамида (в, з). Спектры (а) и (в) записаны с использованием метода SLIC-SABRE. Эксперименты со SLIC-SABRE проводились при давлении 4.4 бар, комнатной температуре и скорости подачи п- H_2 в систему 1.33 мл/с. Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.17$ с, для ^{15}N -пиридина $\Delta\nu = 17$ Гц, для ^{15}N -никотинамида $\Delta\nu = 16$ Гц. Спектры (б) и (з) записаны в условиях теплового равновесия с числом усреднений 128 и 256, соответственно. Концентрация субстрата в растворе составляла 0.1 М при записи спектров (а, б, в) и 0.05 М для спектра (з).

Усиления сигналов были определены путем сравнения интенсивности сигналов в случае с применением метода SLIC-SABRE с интенсивностями сигналов, записанных в условиях теплового равновесия.

$$\varepsilon = \frac{I_{\text{ГП}}}{I_{\text{равн}}} \cdot \frac{NS_{\text{равн}}}{NS_{\text{ГП}}} \cdot \frac{RG_{\text{равн}}}{RG_{\text{ГП}}} \cdot \frac{C_{\text{равн}}}{C_{\text{ГП}}}, \quad (16)$$

где $I_{\text{ГП}}$ и $I_{\text{равн}}$, $NS_{\text{ГП}}$ и $NS_{\text{равн}}$, $RG_{\text{ГП}}$ и $RG_{\text{равн}}$, $C_{\text{ГП}}$ и $C_{\text{равн}}$ – это интенсивность сигнала, количество усреднений, чувствительность приемника и концентрация в экспериментах со SLIC-SABRE и в условиях теплового равновесия, соответственно. Количество усреднений в экспериментах при тепловом равновесии составляло 128 и 256 для ^{15}N -пиридина и ^{15}N -никотинамида, соответственно. При меньшем числе накоплений спектры ЯМР обладали низким значением ОСШ. В экспериментах с обоими соединениями $RG_{\text{равн}} = 9195$, в то время как $RG_{\text{ГП}} = 4096$. Такая разница в значениях RG связана с тем, что при больших значениях $RG_{\text{ГП}}$ наблюдались артефакты в сигнале ЯМР из-за большой интенсивности сигнала. Для ^{15}N -никотинамида концентрация в экспериментах при тепловом равновесии была в два раза меньше, чем в экспериментах с гиперполяризацией. В результате коэффициенты усиления были вычислены следующим образом:

$$\varepsilon(^{15}\text{N} - \text{пиридин}) = \frac{1008}{216} \cdot 128 \cdot 2.3 \cdot 1 \sim 1400.$$

$$\varepsilon(^{15}\text{N} - \text{никотинамид}) = \frac{632}{233} \cdot 256 \cdot 2.3 \cdot \frac{1}{2} \sim 800.$$

Помимо усиления сигнала ЯМР с помощью метода SLIC-SABRE были измерены времена релаксации T_1 для ядер ^{15}N . Для этого в импульсной последовательности SLIC-SABRE была добавлена задержка t_d между повторением циклов для переноса поляризации на гетероядро и регистрирующим импульсом (см. Рисунок 39).

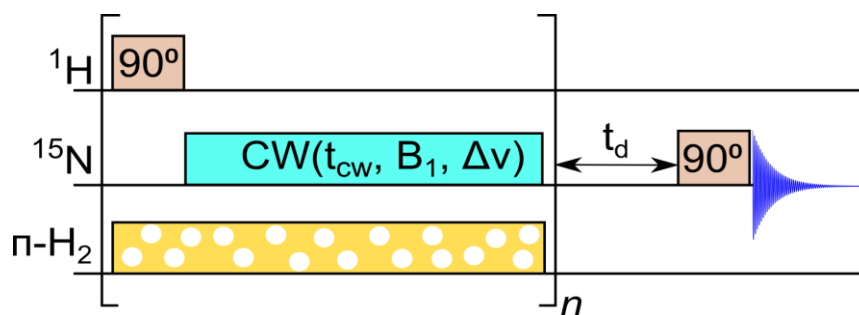


Рисунок 39. Импульсная последовательность SLIC-SABRE для измерения времени релаксации T_1 . В экспериментах варьировалась задержка t_d .

С помощью варьирования t_d было получено, что время релаксации T_1 для ^{15}N -пиридина составляет 63 ± 2 секунд, а для ^{15}N -никотинамида – 15 ± 2 с (см. Рисунок 40). Для биомедицинских исследований время релаксации T_1 критически важно. Это связано в первую очередь с тем, что при введении субстрата в живой организм необходимо, чтобы за время, которое образец достигает нужной области исследования, интенсивность сигнала осталась достаточной для регистрации.

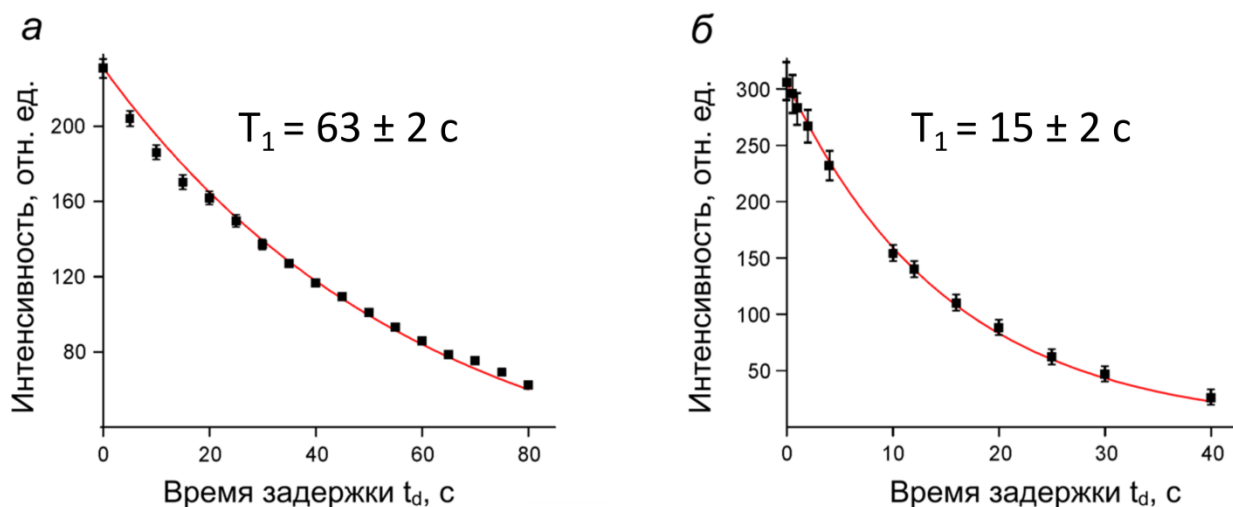


Рисунок 40. Результаты измерения времени релаксации T_1 для ^{15}N -пиридина (а) и ^{15}N -никотинамида (б) в магнитном поле 7.1 Тл. Черными точками отмечены экспериментальные данные, красная линия – аппроксимация экспериментальных данных. Эксперименты проводились при давлении 3.7 бар, комнатной температуре и скорости подачи $p\text{-H}_2$ в систему 0.17 мл/с. Параметры «непрерывного» импульса: $B_1 = 5$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.17$ с, количество циклов SLIC-SABRE = 20, для ^{15}N -пиридина $\Delta\nu = 17$ Гц, для ^{15}N -никотинамида $\Delta\nu = 16$ Гц. Концентрация субстрата в растворе составляла 0.1 М.

Для проведения МРТ экспериментов использовался следующий протокол:

1. Гиперполяризация субстрата с помощью импульсной последовательности SLIC-SABRE;

2. Возбуждение сигнала ^{15}N с помощью прямоугольного РЧ импульса;
3. Пространственное кодирование с помощью градиентов магнитного поля;
4. Запись сигнала ЯМР ^{15}N .

Для выполнения пунктов 3 и 4 использовались две импульсные последовательности (см. Рисунок 41, Рисунок 43): первая состояла из двух фазо-кодирующих градиентов (SPI), вторая из частотно- и фазо-кодирующего градиента (FLASH). Регистрация МР изображений проводилась с помощью исследовательского томографа Bruker Avance 400 с магнитным полем 9.4 Тл.

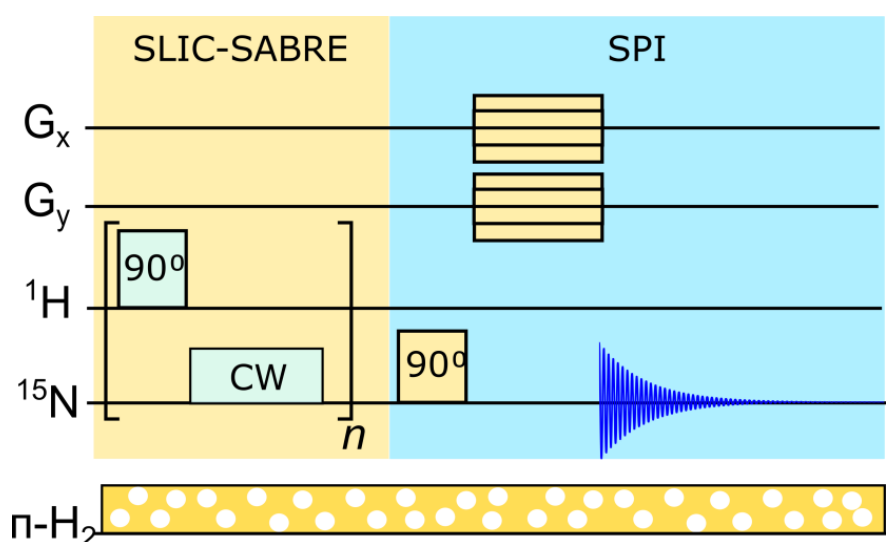


Рисунок 41. Импульсная последовательность для проведения МРТ экспериментов с использованием метода SLIC-SABRE для переноса гиперполяризации на гетероядро и методики SPI для регистрации МР изображения.

Импульсная последовательность SPI [172] основана на использовании только фазо-кодирующих градиентов и регистрации ССИ. SPI получила свое распространение в твердотельном ЯМР из-за того, что получаемые МР изображения обладают высоким пространственным разрешением. SPI основана на том, что после применения возбуждающего импульса происходит регистрация одной точки в k -пространстве, после чего система приходит в равновесие. Далее, снова используется возбуждающий импульс и регистрируется следующая точка в k -пространстве. Таким образом, каждый шаг в k -пространстве сопровождается новым возбуждением. В работе была реализована 2М импульсная последовательность SPI в программе TopSpin 3.

Каждая точка в k -пространстве записывалась после возбуждения 90° -импульсом и применением двух фазо-кодирующих градиентов в направлении X и Y . Для записи изображений (см. Рисунок 42) использовалась матрица 16×16 , то есть было записано 256 точек. В результате были получены изображения с пространственным разрешением 565×565 мкм²/пиксель. Запись изображения проводилась при постоянном барботировании образца параводородом. Несмотря на барботирование, которое вызывает неоднородности магнитного поля, на изображениях не наблюдалось артефактов. Стоит отметить, что постоянное барботирование образца позволяло быстро и непрерывно получать гиперполяризованный субстрат, что невозможно, например, в таких методах, как ДПЯ. Высокое пространственное разрешение позволило различить на изображении тонкий капилляр (~ 1.6 мм), через который $p\text{-H}_2$ поступал в систему. Несмотря на все преимущества данного метода, в контексте биомедицинского применения данная импульсная последовательность непрактична, потому что время записи МР изображения ^{15}N -пиридина составляло 5.5 минут, а ^{15}N -никотинамида - 27 минут. Такое длинное время записи связано в первую очередь с тем, что ГП продукт создается каждый раз заново с помощью метода SLIC-SABRE перед регистрацией очередной точки в k -пространстве.

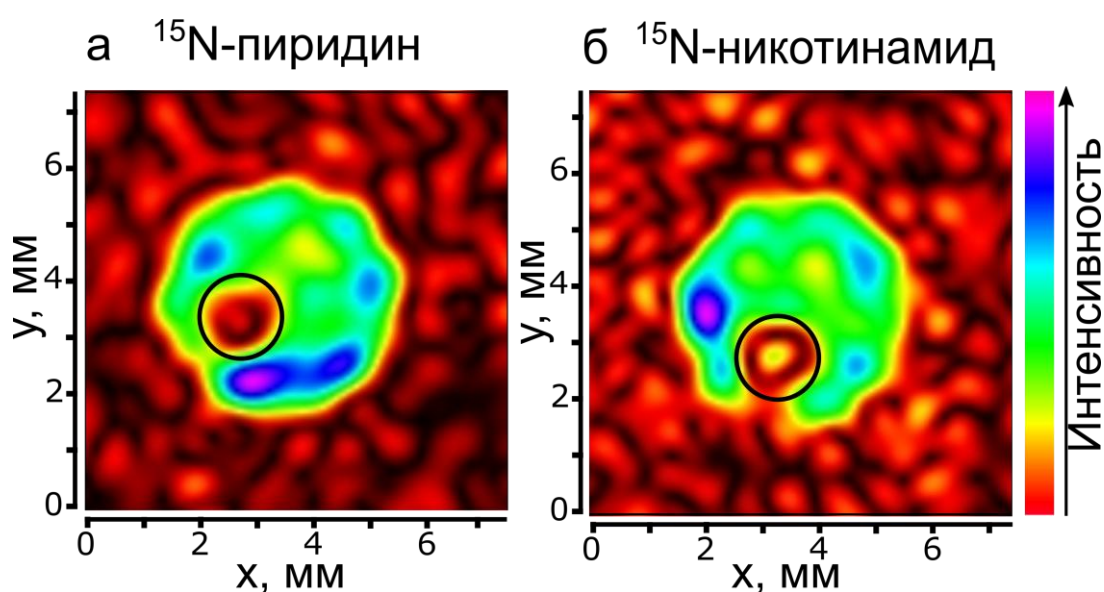


Рисунок 42. МР изображения по ядрам ^{15}N гиперполяризованных с помощью метода SLIC-SABRE ^{15}N -пиридина (а) и ^{15}N -никотинамида (б), зарегистрированные с помощью

импульсной последовательности SPI в магнитном поле 9.4 Тл. Эксперименты проводились при давлении 2.7 бар, комнатной температуре и скорости подачи п-Н₂ в систему 0.12 мл/с. Черным кругом отмечено месторасположения капилляра, через который п-Н₂ подавался в систему. Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{cw} = 1.17$ с, для ¹⁵N-пиридина $\Delta\nu = 17$ Гц, для ¹⁵N-никотинамида $\Delta\nu = 16$ Гц. Число циклов SLIC-SABRE равнялось 1 для ¹⁵N-пиридина и 5 для ¹⁵N-никотинамида. Один цикл имел длительность ~ 1.2 с.

Другая импульсная последовательность, которая использовалась в данном исследовании, – это FLASH. Она основана на явлении градиентного эха. Импульсные последовательности градиентного эха считаются быстрыми и позволяют уменьшать время записи изображения до времен ~ 1 секунды. Также в импульсной последовательности FLASH используются малые углы поворота намагниченности; в данном исследовании использовался угол 30° . В экспериментах с применением FLASH вся матрица k-пространства записывалась после одного применения SLIC-SABRE. Такой метод более применим к биомедицинским приложениям, так как пропадает необходимость каждый раз заново создавать гиперполяризацию во вводимом субстрате, как это происходило в экспериментах с использованием SPI.

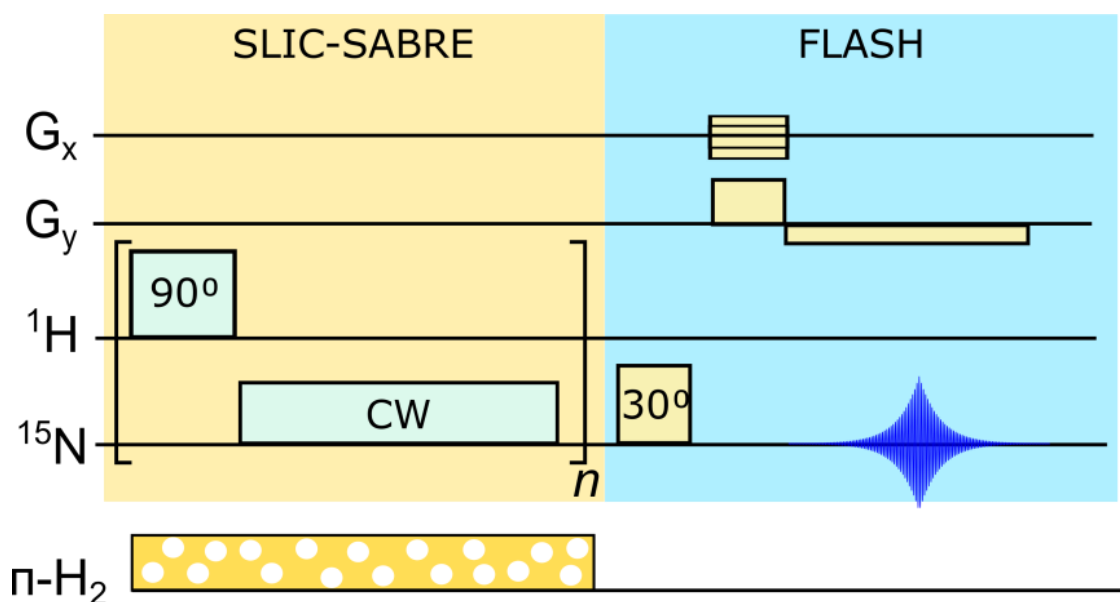


Рисунок 43. Импульсная последовательность для проведения МРТ экспериментов с использованием импульсной последовательности SLIC-SABRE для переноса гиперполяризации на гетероядро и импульсной последовательности FLASH для регистрации МР изображения.

Время, за которое получалось изображение, в экспериментах с использованием SLIC-SABRE и FLASH значительно меньше, чем в случае с SPI.

Это связано в первую очередь с тем, что SLIC-SABRE занимает 13 секунд, а запись изображения с помощью FLASH происходит менее чем за 1 секунду. Стоит отметить, что во время переключений импульсной последовательности SLIC-SABRE на FLASH возникала задержка в $\sim 2-4$ секунды из-за особенностей программного обеспечения.

В результате были получены изображения (см. Рисунок 44) с пространственным разрешением 0.15×2.4 мм²/пиксель для ¹⁵N-пиридина и 0.3×4.8 мм²/пиксель для ¹⁵N-никотинамида. Барботирование параводородом прекращалось одновременно с окончанием действия импульсной последовательности SLIC-SABRE.

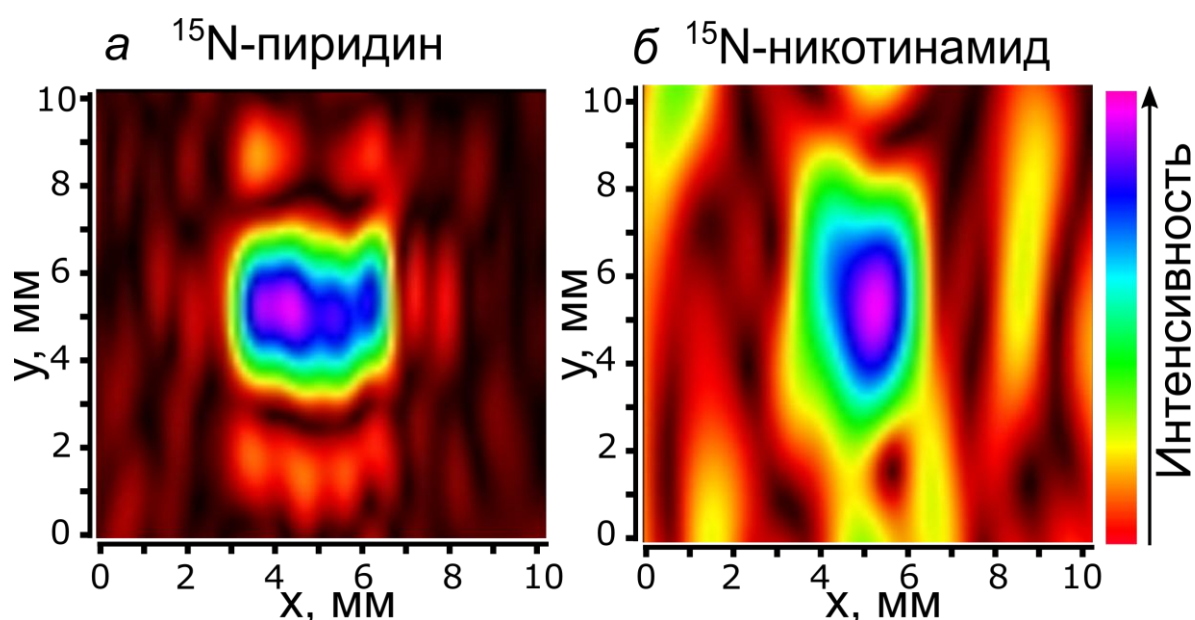


Рисунок 44. МР изображения по ядрам ¹⁵N гиперполяризованных с помощью метода SLIC-SABRE ¹⁵N-пиридина (а) и ¹⁵N-никотинамида (б), зарегистрированные с помощью импульсной последовательности FLASH в магнитном поле 9.4 Тл. Эксперименты проводились при давлении 4.5 бар, комнатной температуре и скорости подачи п-Н₂ в систему 0.58 мл/с. Черным кругом отмечено месторасположения капилляра, через который п-Н₂ подавался в систему. Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{cw} = 1.17$ с, для ¹⁵N-пиридина $\Delta\nu = 17$ Гц, для ¹⁵N-никотинамида $\Delta\nu = 16$ Гц, число циклов SLIC-SABRE = 10, один цикл имел длительность ~ 1.2 с. Концентрация ¹⁵N-пиридина в растворе составляла 1 М, а ¹⁵N-никотинамида – 0.1 М, концентрация катализатора SABRE составляла 50 мМ и 5 мМ для ¹⁵N-пиридина и ¹⁵N-никотинамида, соответственно.

Данное исследование является первым исследованием, где была продемонстрирована быстрая ¹⁵N МРТ с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода. Уровни поляризации были достаточные для проведения экспериментов МРТ с такими соединениями, как

^{15}N -пиридин и ^{15}N -никотинамид. Основным преимуществом метода SLIC-SABRE является то, что поляризация и, как следствие, большая интенсивность сигнала создавались непосредственно в приборе, где происходила запись МР изображения. Необходимость в создании внешнего поляризатора, то есть внешней системы, в которой создается поляризация, отсутствовала. Также отсутствовали потери, связанные с релаксацией T_1 при переносе образца из поляризатора в прибор для записи МР изображения.

3.3.3. ^{15}N МРТ соединений с естественным содержанием ядер ^{15}N .

Дальнейшее исследование с использованием метода SLIC-SABRE заключалось в оценке применимости метода для соединений с естественным содержанием гетероядер, в частности, ^{15}N . Необходимость такого исследования возникает из-за того, что обогащение изотопами является дорогостоящей процедурой, поэтому поиск контрастных агентов с естественным содержанием интересующих изотопов является актуальной задачей. В качестве субстратов были выбраны такие соединения, как фампридин и 4-диметиламинопиридин. Описание данных соединений приведено в разделе 1.6.

Первым шагом была выполнена оптимизация импульсной последовательности SLIC-SABRE и экспериментальных условий (см. Рисунок 45). Используя те же параметры, что были использованы в предыдущей части работы ($A = 5$ Гц и $t_{\text{CW}} = 1.17$ с), была выполнена оптимизация значения отстройки по частоте $\Delta\nu$. Было получено, что наибольшее значение интенсивности сигнала наблюдается при $\Delta\nu = 13$ Гц. Оптимальное количество циклов SLIC-SABRE составило 30 для 4-диметиламинопиридина и 40 для фампридина. Эксперименты по оптимизации скорости подачи $p\text{-H}_2$ в систему были проведены при различных давлениях (1 бар, 2.4 бар, 4.4 бар). Было получено, что интенсивность сигнала возрастает с ростом скорости подачи $p\text{-H}_2$ и с ростом давления. Однако из-за наличия приборных ограничений, дальнейшие эксперименты проводились при 4.4 бар и максимально возможной скорости подачи $p\text{-H}_2$.

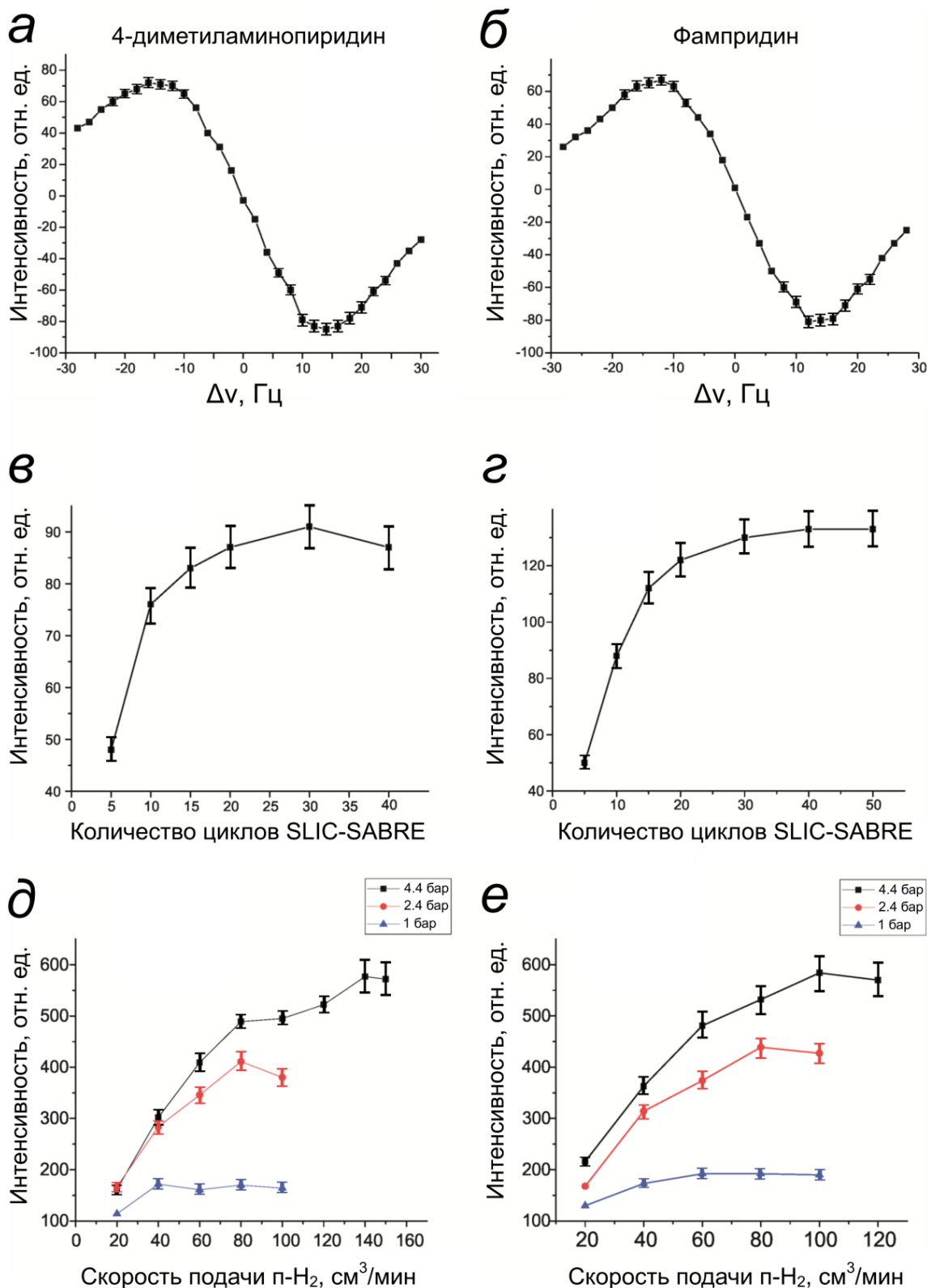


Рисунок 45. Зависимость интенсивности сигнала ЯМР ^{15}N от частоты отстройки от резонанса $\Delta\nu$ (*а, б*), количества циклов SLIC-SABRE (*в, г*), скорости подачи p-H_2 (*д, е*) для 4-диметиламинопиридина и фампридина. Все эксперименты проводились при комнатной температуре, давлении 3.7 бар в магнитном поле 7.1 Тл. В экспериментах (*а, б*) p-H_2 непрерывно подавался в систему, число циклов SLIC-SABRE составляло 10, $B_1 = 5$ Гц, $t_{\text{CW}} = 1.17$ с. В экспериментах (*в, г*) подача p-H_2 в систему прекращалась во время записи спектра ЯМР. Параметры SLIC-SABRE: $B_1 = 5$ Гц, $\Delta\nu = 13$ Гц, $t_{\text{CW}} = 1.17$ с. Скорость подачи p-H_2 в систему составляла 0.33 мл/с в экспериментах (*а-г*). В экспериментах (*д, е*) число циклов

составляло 30 для 4-диметиламинопиридина и 40 для фампридина. Параметры SLIC-SABRE: $B_1 = 5$ Гц, $\Delta\nu = 13$ Гц, $t_{CW} = 1.17$ с.

Полученные спектры ЯМР показали, что усиление сигнала 4-диметиламинопиридина составило ~ 29800 раз, что соответствует $P(^{15}\text{N}) \sim 7.2\%$ в магнитном поле 7.1 Тл (см. Рисунок 46). Данное значение поляризации примерно на порядок больше, чем полученные ранее значения другими методами с использованием импульсных последовательностей. Усиление сигнала в случае фампридина составило ~ 32000 раз, что соответствует $P(^{15}\text{N}) \sim 7.8\%$ в магнитном поле 7.1 Тл (см. Рисунок 46). Можно заметить, что усиление сигнала немного больше в экспериментах с фампридином, чем с 4-диметиламинопиридином.

Усиления вычислялись путем сравнения интенсивности сигнала от гиперполяризованных соединений с интенсивностью сигнала 4-диметиламинопиридина, полученного в условиях теплового равновесия. Регистрация спектра ЯМР 4-диметиламинопиридина в условиях теплового равновесия происходила для раствора с концентрацией 4.9 М для обеспечения большей интенсивности сигнала. Кроме того, число накоплений составляло 512. Задержка между записью спектров ЯМР составляла 420 с для предотвращения влияния эффектов релаксации T_1 .

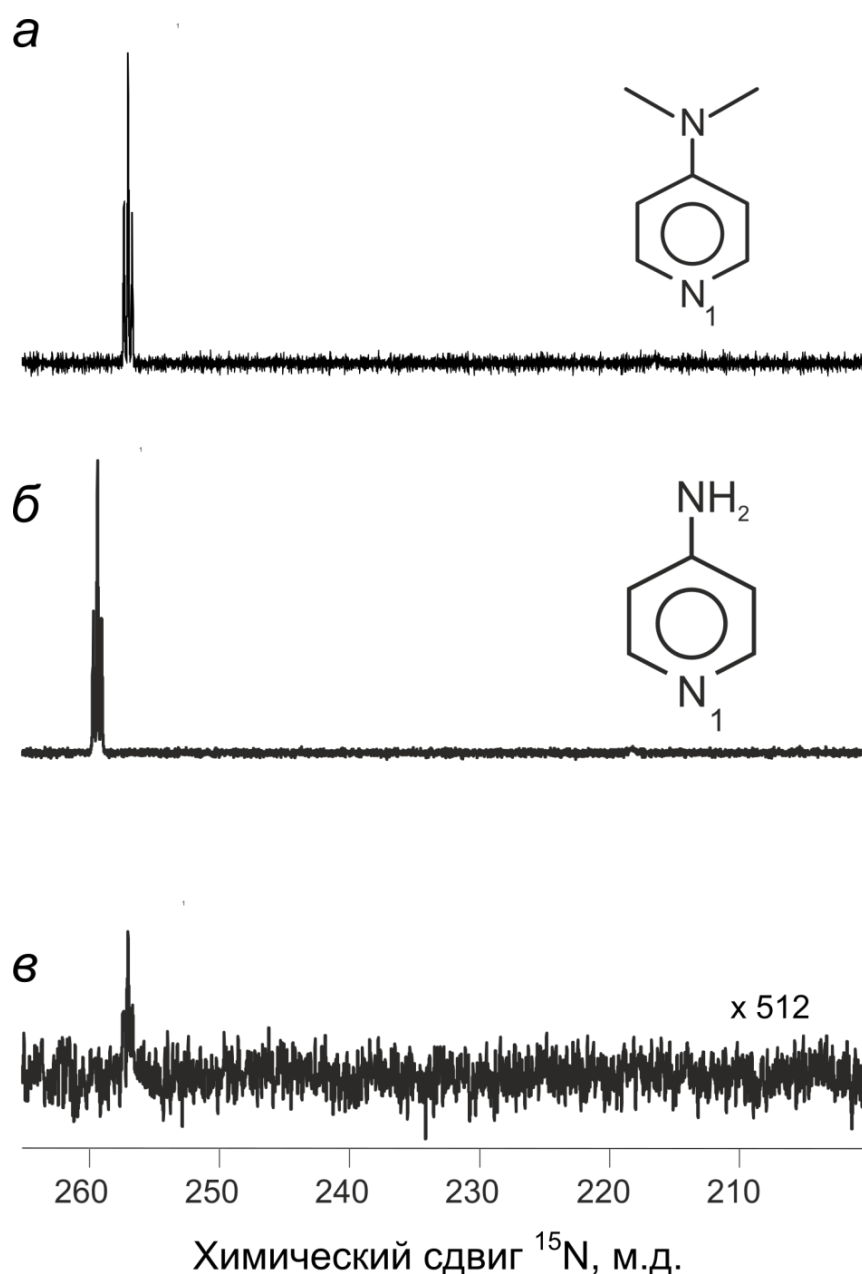


Рисунок 46. Спектры ЯМР ^{15}N в магнитном поле 7.1 Тл гиперполяризованного 0.1 М раствора 4-диметиламинопиридина (а), 0.1 М раствора гиперполяризованного фампридина (б) и 4.9 М раствора 4-диметиламинопиридина в условиях теплового равновесия (в). Спектры (а) и (б) записаны с использованием метода SLIC-SABRE. Эксперименты со SLIC-SABRE проводились при давлении 4.4 бар, комнатной температуре и скорости подачи p-H_2 в систему 1.33 мл/с. Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.17$ с, $\Delta\nu = 13$ Гц, количество циклов SLIC-SABRE составляло 30 (а) и 40 (б). Спектр ЯМР (в) записан с помощью 512 накоплений.

Далее были проведены эксперименты по измерению времени релаксации T_1 с помощью метода SLIC-SABRE (см. Рисунок 47). Измерение проводилось аналогично методу, описанному ранее (см. Рисунок 39). Время релаксации T_1 для 4-диметиламинопиридина составило 38 ± 2 с, фампридина – 37 ± 2 с в магнитном поле 7.1 Тл.

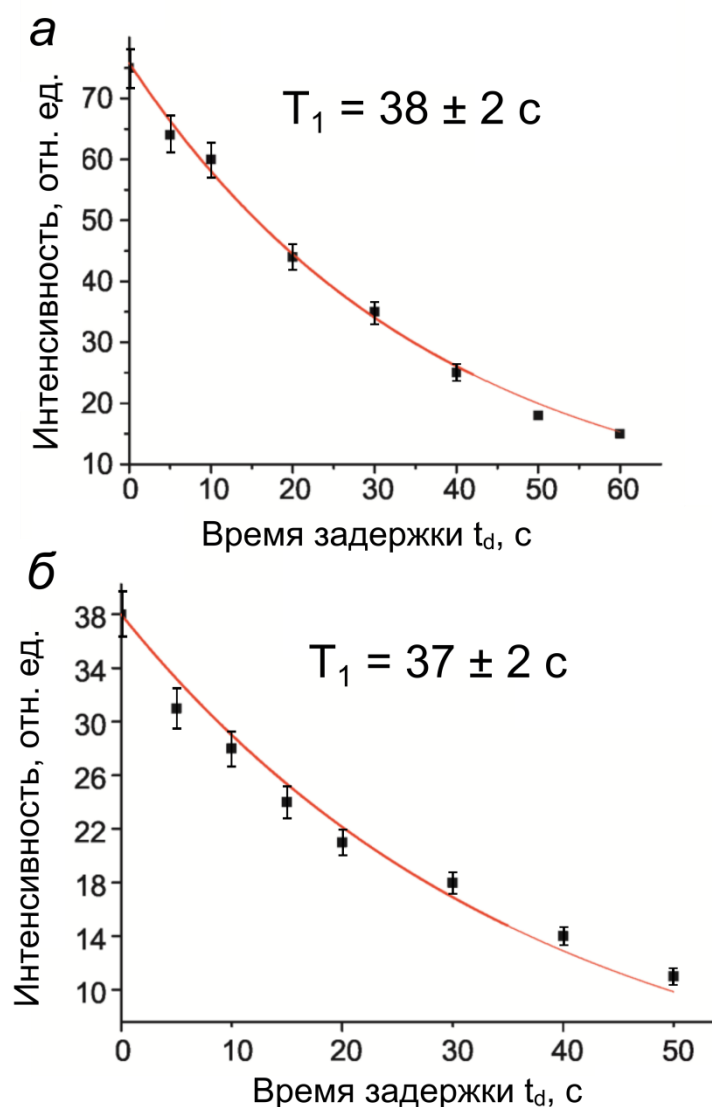


Рисунок 47. Результаты измерения времени релаксации T_1 для 4-диметиламинопиридина (а) и фампридина (б) в магнитном поле 7.1 Тл. Черными точками отмечены экспериментальные данные, красная линия – аппроксимация экспериментальных данных. Эксперименты проводились при давлении 3.7 бар, комнатной температуре и скорости подачи $p\text{-H}_2$ в систему 0.33 мл/с. Спектры ЯМР записывались после остановки подачи $p\text{-H}_2$. Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{cw} = 1.17$ с, количество циклов SLIC-SABRE = 10, $\Delta\nu = 13$ Гц.

После оптимизации параметров SLIC-SABRE, оптимизации экспериментальных условий и измерения времени релаксации T_1 была выполнена ^{15}N MPT (Рисунок 48). Полное время эксперимента с учетом создания и переноса поляризации на гетероядро, а также записи МР изображения, составило ~ 45 с. При этом для регистрации МР изображения использовалась импульсная последовательность FLASH, которая была выбрана в качестве оптимальной в предыдущей части исследования. Время записи

изображения также составило около 1 секунды. На изображении также видно отсутствие сигнала в области, в которой расположен капилляр.

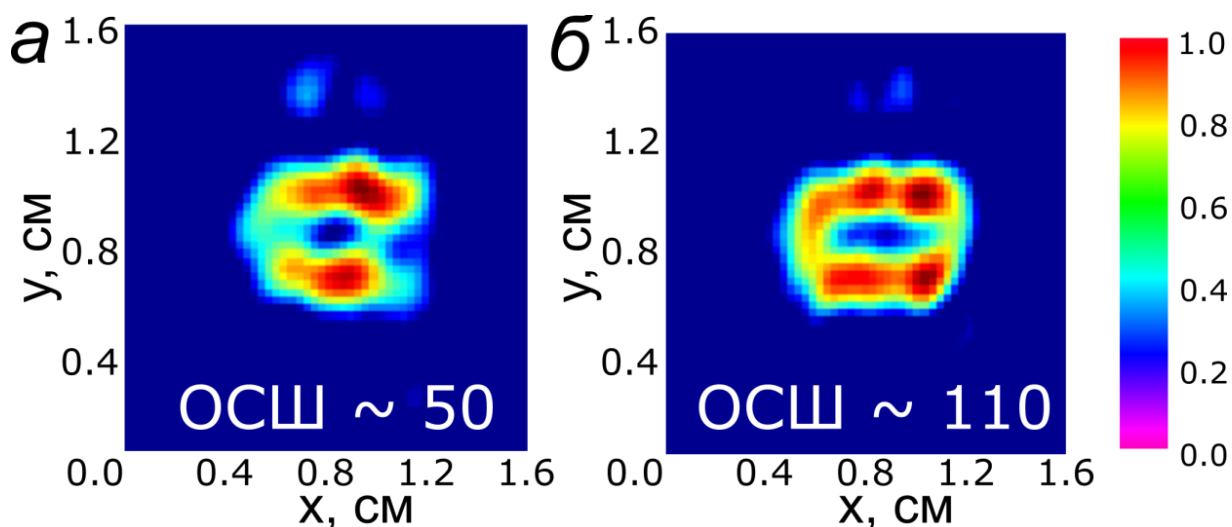


Рисунок 48. МР изображения по ядрам ^{15}N , гиперполяризованных с помощью метода SLIC-SABRE 4-диметиламинопиридина (а) и фампридина (б), зарегистрированные с помощью импульсной последовательности FLASH в магнитном поле 9.4 Тл. Эксперименты проводились при давлении 5.4 бар и комнатной температуре. Скорость подачи $p\text{-H}_2$ в систему равнялась 2.33 мл/с (а) и 1.67 мл/с (б). Отсутствие сигнала в центре изображения соответствует месторасположению капилляра, через который $p\text{-H}_2$ подавался в систему. Параметры «непрерывного» импульса: $B_1 = 5$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.17$ с, $\Delta\nu = 13$ Гц, число циклов SLIC-SABRE = 30 (а) и 40 (б).

Ранее никто не выполнял гетероядерную 2М МРТ по ядрам ^{15}N соединений с естественным содержанием ^{15}N , поэтому данное исследование является первой демонстрацией ^{15}N МРТ небогатенных изотопами ^{15}N биологически совместимых соединений. Однако интенсивности сигнала было недостаточно для выполнения 3М МРТ.

3.3.4. Сравнение уровней поляризации соединений с естественным содержанием ядер ^{15}N и обогащенных изотопом ^{15}N

Следующая часть работы с использованием метода SLIC-SABRE посвящена сравнению уровней поляризации для фампридина с естественным содержанием ядер ^{15}N и обогащенного изотопом ^{15}N .

Во всех предыдущих исследованиях в разделе 3.3. использовались гетероциклические соединения, для которых оптимальные параметры SLIC-SABRE составляли $B_1 = 5$ Гц и $t_{\text{cw}} = 1.17$ с. При этом значение $\Delta\nu$ зависело от соединения и экспериментальных условий, поэтому возникала необходимость в

оптимизации $\Delta\nu$ непосредственно перед началом экспериментов. Примерное значение $\Delta\nu$ составляет 17-18 Гц. Другие оптимальные параметры – это число циклов SLIC-SABRE ~ 40 , скорость подачи $p\text{-H}_2$ в систему ~ 1.33 мл/с (80 см³/мин), давление $p\text{-H}_2 = 4.4$ бар и комнатная температура.

Используя данные значения, с помощью метода SLIC-SABRE было получено значение поляризации меченного изотопом ^{15}N фампридина $P(^{15}\text{N}) = 4\%$ в магнитном поле 7.1 Тл. Спектры были получены от раствора 0.1 М ^{15}N -фампридина расположенного в 5 мм ампуле ЯМР.

Интересно отметить, что значение $P(^{15}\text{N})$ для ^{15}N -фампридина в 2 раза меньше, чем для фампридина с естественным содержанием изотопа ^{15}N при тех же экспериментальных условиях. Объяснить такую разницу можно с помощью простой механистической модели метода SABRE. Рассмотрим комплекс SABRE при использовании фампридина с естественным содержанием изотопа ^{15}N . Вероятность того, что в комплексе будут находиться два или три субстрата, содержащие ядра ^{15}N , крайне мала из-за естественного содержания изотопа $^{15}\text{N} \sim 0.36\%$. В то же время, при использовании ^{15}N -фампридина в качестве субстрата, в комплексе все три присоединенных субстрата будут иметь изотоп ^{15}N (см. Рисунок 49). В методе SABRE поляризация переносится только на субстраты, находящиеся в экваториальной позиции. Это связано с тем, что субстрат в аксиальной позиции медленно обменивается со свободными субстратами и спин-спиновое взаимодействие азота ^{15}N данного субстрата с гидридами $p\text{-H}_2$, присоединенными к комплексу, пренебрежимо мало. Таким образом, поляризация переносится с протонов из молекулы $p\text{-H}_2$ на ядра ^{15}N субстратов, расположенных в экваториальной позиции.

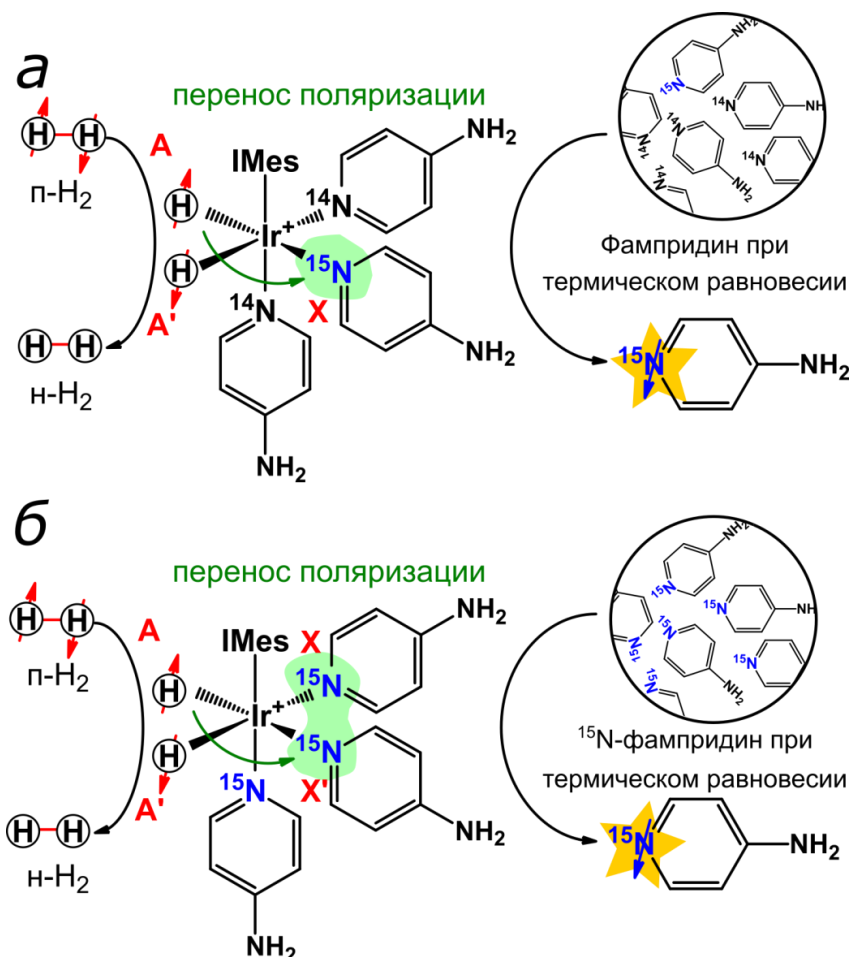
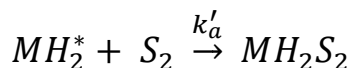
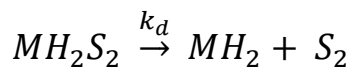


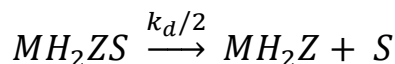
Рисунок 49. Простая механистическая модель химического обмена и переноса поляризации в методе SABRE для экспериментов с фампридином с естественным содержанием ядер ^{15}N (a) и обогащенного изотопом ^{15}N (б). В случае (a) только $0.36\% \times 2 = 0.72\%$ от всех комплексов SABRE имеют ^{15}N -фампридин в экваториальной позиции.

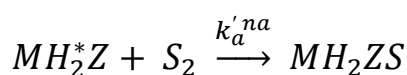
Процесс SABRE с использованием ^{15}N -фампридина можно описать следующим образом:



где M – это катализатор SABRE, MH_2 – короткоживущий интермедиат, в котором отсутствуют экваториальные субстраты, S – обогащенный изотопом ^{15}N фампридин. При присоединении $p\text{-H}_2$ к MH_2 интермедиат моментально преобразуется в MH_2^* , где H_2^* – это 100% $p\text{-H}_2$.

В случае экспериментов с фампридином с естественным содержанием ядер ^{15}N описание процесса выглядит иначе:





где Z – это фампридин с ^{14}N , а S – фампридин с ^{15}N .

С помощью данной модели соавтором данной работы (к.ф.-м.н. Правдивцевым А.Н.) было проведено моделирование зависимости $P(^{15}\text{N})$ для систем $AA'X = {}^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}$ и $AA'XX' = {}^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ (см. Рисунок 50). Параметры системы, которые использовались в моделировании представлены в Таблица 4.

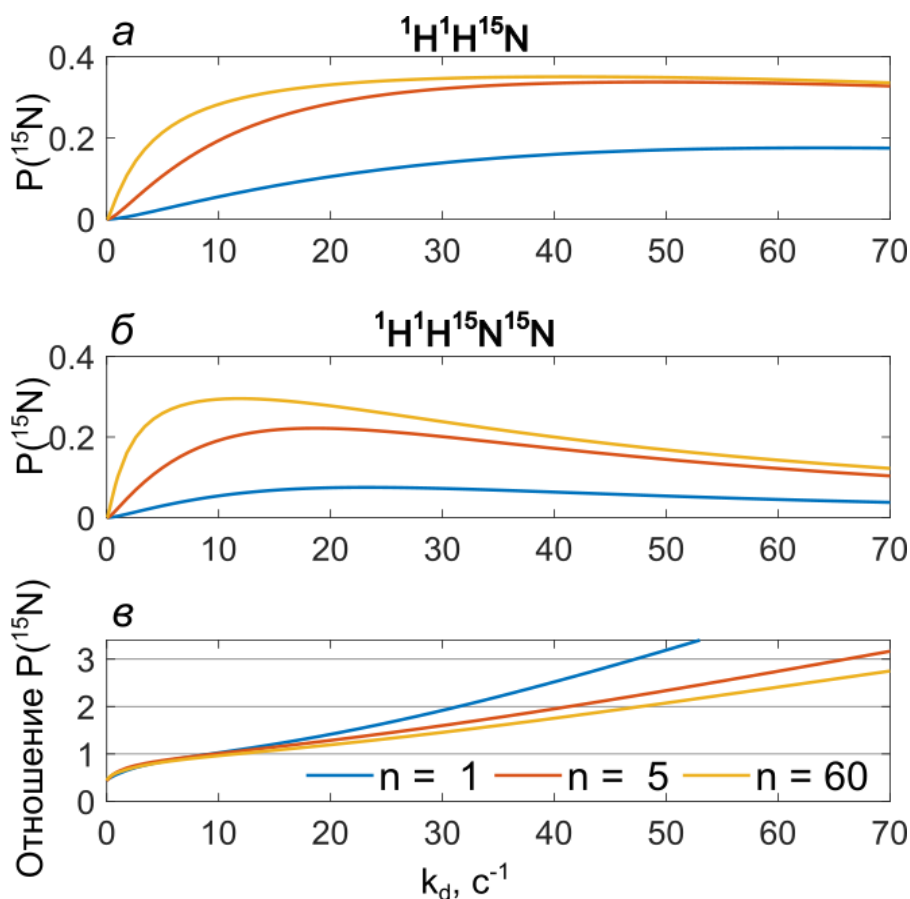


Рисунок 50. Моделирование зависимости поляризации $P(^{15}\text{N})$ от k_d для систем $AA'X$ (а) и $AA'XX'$ (б), отношение значения поляризации системы $AA'X$ к $AA'XX'$ (в). Для моделирования использовались следующие параметры SLIC-SABRE: $B_1 = 5$ Гц, $\Delta\nu = 18$ Гц, $t_{\text{CW}} = 1.17$ с, количество циклов SLIC-SABRE равнялось 1 (голубые графики), 5 (красные графики) или 60 (желтые графики), магнитное поле 7.1 Тл.

Таблица 4. Параметры системы SABRE для моделирования SLIC-SABRE. Время релаксации T_1 приближительное, так как измерение точного значения времени T_1 невозможно из-за химического обмена.

Система	Химические сдвиги, м.д.	Время релаксации T_1 , с	КССВ, Гц
${}^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}$	MH_2ZS (-22, -22, 200) S (300)	MH_2ZS (1, 1, 6) S (60)	В комплексе MH_2ZS :

			$J_{\text{HN}}^2 = -7.7 \text{ Гц}$ $J_{\text{HN}}^{2, \text{ транс}} = -20.9$ $J_{\text{HN}}^{2, \text{ цис}} = 0.6$
$^1\text{H}^1\text{H}^{15}\text{N}^{15}\text{N}$	MH_2S_2 (-22, -22, 200, 200) S_2 (300, 300)	MH_2S_2 (1, 1, 6, 6) S_2 (60, 60)	В комплексе MH_2S_2 : $J_{\text{HN}}^2 = -7.7 \text{ Гц}$ $J_{\text{HN}}^{2, \text{ транс}} = -20.9$ $J_{\text{HN}}^{2, \text{ цис}} = 0.6$ $J_{\text{NN}}^2 = 0.4$

Моделирование показало, что при быстром обмене ($k_d \sim 50 \text{ с}^{-1}$) отношение значений уровня поляризации $P(^{15}\text{N})$ в случае системы $\text{AA}'\text{X}$ к значению уровня поляризации для $\text{AA}'\text{XX}'$ системы равно 2, что сходится со значениями, полученными экспериментально. При медленном обмене ($k_d \sim 1 \text{ с}^{-1}$) отношение составляет ~ 1 . Однако стоит отметить, что моделирование демонстрирует лишь качественные результаты, так как значения k_d , которые использованы в моделировании, напрямую не соответствуют экспериментальным значениям k_d , а являются лишь приближением. В работе [167] k_d было оценено как 3.4 с^{-1} при комнатной температуре, однако в таком случае уровни поляризации должны быть примерно равны, что не согласуется с экспериментом. Такая разница может быть объяснена тем, что экспериментальные параметры не были идеальными, например, в моделировании считалось, что p-H_2 может поступать в систему непрерывно, в то время как в экспериментах скорость подачи p-H_2 и скорость перемешивания p-H_2 в растворе ограничены. Кроме того, в моделировании использовалась упрощенная модель SABRE, которая не учитывает все условия, такие как, например, наличие других спинов в системе.

Несмотря на то, что усиления сигнала и уровень поляризации были ниже для ^{15}N -фампридина, суммарная интенсивность сигнала была больше для ^{15}N -фампридина. Это легко увидеть, если рассмотреть молярную поляризацию:

$$P_{\text{мол}}(^{15}\text{N}) = P(^{15}\text{N}) \times C \times \gamma$$

где $P(^{15}\text{N})$ – поляризация, которая посчитана умножением усиления сигнала на значение поляризации в условиях теплового равновесия, C – концентрация субстрата, γ – содержание изотопа ^{15}N .

В случае с ^{15}N -фампридином: $P(^{15}\text{N}) = 0.04$, $C = 85$ мМ, $\gamma = 0.99$. Для фампридина с естественным содержанием ядер ^{15}N : $P(^{15}\text{N}) = 0.08$, $C = 85$ мМ, $\gamma = 0.0036$. Итого $P_{\text{мол}}(^{15}\text{N})$ для ^{15}N -фампридина ~ 3.366 мМ, а для фампридина с естественным содержанием ядер ^{15}N $P_{\text{мол}}(^{15}\text{N}) \sim 0.025$ мМ.

3.3.5. ^{15}N 3М МРТ ^{15}N -фампридина

Дальнейший шаг в исследовании заключался в выполнении МРТ, которая проводилась на МР томографе Bruker Avance 400 с магнитным полем 9.4 Тл. Смена прибора создала необходимость в изменении экспериментальной установки. Изменения включали в себя замену ампулы ЯМР, в которой находился раствор, с 10 мм на 5 мм ампулу ЯМР, так как в таком случае большее число образца будет давать сигнала. Однако такая замена вызвала трудности с перемешиванием образца, что является необходимым для присоединения p-H_2 к комплексу SABRE. В связи с этим эффективность метода SLIC-SABRE снизилась. Также все эксперименты по МР визуализации проводились с использованием фантома в виде пластикового куба (см. Рисунок 53а), который портил однородность магнитного поля. Еще одним отягчающим фактором являлось то, что минимальный размер регистрирующей катушки составлял 25 мм, в то время как ампула ЯМР с раствором имела диаметр 10 мм. В предыдущих экспериментах с записью спектров ЯМР и оценкой поляризации использовался прибор с магнитным полем 7.1 Тл, 5 мм ампула ЯМР и регистрирующая катушка с диаметром 5 мм.

Для получения максимального значения поляризации также была выполнена оптимизация экспериментальных условий для проведения экспериментов с использованием SLIC-SABRE. Было оптимизировано количество циклов SLIC-SABRE и скорость подачи p-H_2 (см. Рисунок 51).

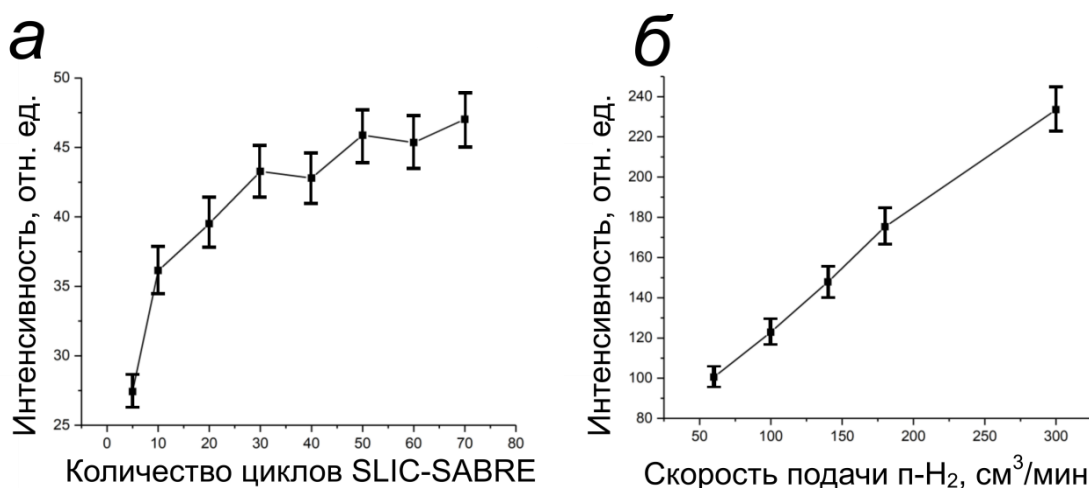


Рисунок 51. Зависимость интенсивности сигнала ^{15}N от количества циклов SLIC-SABRE (а), скорости подачи p-H_2 (б) для ^{15}N -фампридина. Все эксперименты проводились при комнатной температуре и давлении 4.4 бар в магнитном поле 9.4 Тл. В экспериментах (а) p-H_2 непрерывно подавался в систему со скоростью 2 мл/с (120 cm^3/min), раствор находился в 5 мм ампуле ЯМР. В экспериментах (б) использовалось 30 циклов SLIC-SABRE, раствор находился в 10 мм ампуле ЯМР. Параметры SLIC-SABRE: $B_1 = 5$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.34$ с.

В результате после оптимизации SLIC-SABRE были получены спектры ЯМР ^{15}N в магнитном поле 9.4 Тл (см. Рисунок 52).

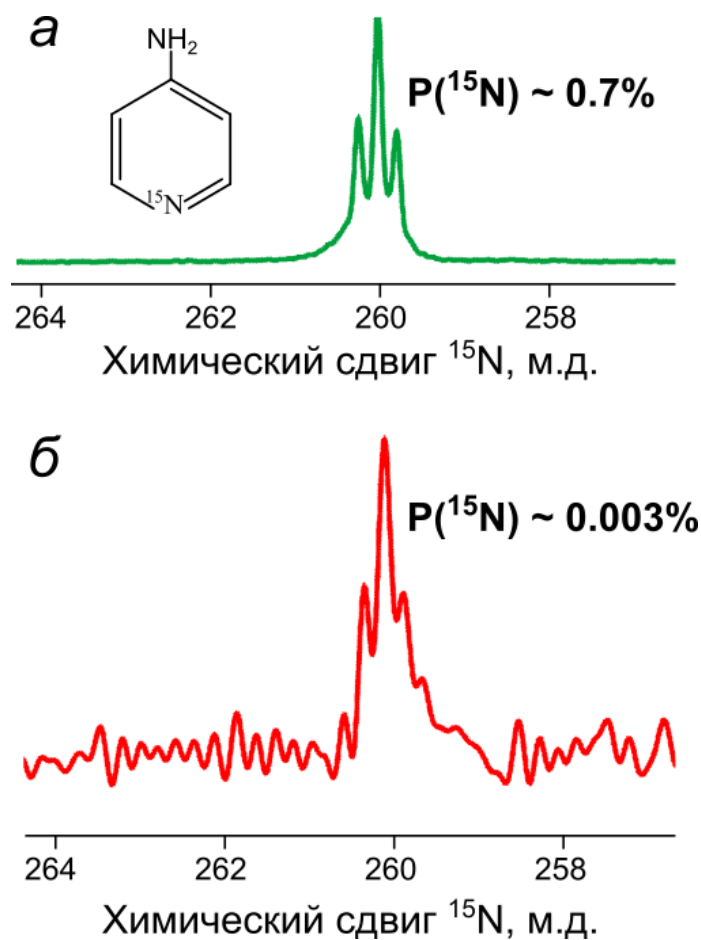


Рисунок 52. Спектры ЯМР ^{15}N в магнитном поле 9.4 Тл гиперполяризованного с помощью метода SLIC-SABRE 0.1 М раствора ^{15}N -фампридина (а) и 0.7 М раствора ^{15}N -фампридина в

условиях теплового равновесия (б). Эксперименты со SLIC-SABRE проводились при давлении 4.4 бар, комнатной температуре и скорости подачи п-Н₂ в систему 5 мл/с (300 см³/мин). Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{cw} = 1.34$ с, $\Delta\nu = 10$ Гц, количество циклов SLIC-SABRE составляло 30. Спектры ЯМР записаны при использовании одного накопления (а) и 170 накоплений (б).

Усиление сигнала было вычислено путем сравнения интенсивности сигнала ЯМР в экспериментах с 0.1 М раствором ГП ¹⁵N-фампридина с интенсивностью сигнала 0.7 М раствора ¹⁵N-фампридина, полученного в условиях теплового равновесия.

Количество усреднений в экспериментах составляло 1 и 170 в экспериментах с использованием метода SLIC-SABRE и в условиях теплового равновесия, соответственно. В экспериментах использовались значения $RG_{\text{равн}} = 2050$ (максимально возможное значение) и $RG_{\text{ГП}} = 912$. Значение $RG_{\text{ГП}}$ было выбрано максимально возможным и не вызывающим артефакты при записи сигнала из-за избытка сигнала.

Итого, по формуле 16:

$$\varepsilon(^{15}\text{N} - \text{фампридин}) = \frac{232}{309} \cdot 170 \cdot \frac{2050}{912} \cdot \frac{0.7}{0.1} \sim 2000.$$

При этом значение поляризации в условиях теплового равновесия, вычисленное по формуле 5:

$$P_{\text{равн}} = \frac{4.316 \cdot 10^{-6} \cdot 6.626 \cdot 10^{-34} \cdot 9.4}{2 \cdot 3.14 \cdot 1.38 \cdot 10^{-23} \cdot 298} \cdot 100\% \sim 0.00033\%$$

Тогда поляризация в экспериментах с использованием импульсной последовательности SLIC-SABRE:

$$P(^{15}\text{N}) = 0.00033\% \cdot 2000 \sim 0.7\%$$

Таким образом, усиление сигнала в магнитном поле 9.4 Тл составило 2000 раз, что соответствует значению поляризации $P(^{15}\text{N}) \sim 0.7\%$. Данное значение поляризации меньше полученного на приборе с магнитным полем 7.1 Тл из-за ряда факторов, упомянутых выше. С использованием полученного уровня поляризации $P(^{15}\text{N})$ была выполнена ¹⁵N 2М МРТ раствора ГП ¹⁵N-фампридина (см. Рисунок 53б). На изображении отчетливо видны границы ампулы и месторасположение фантома.

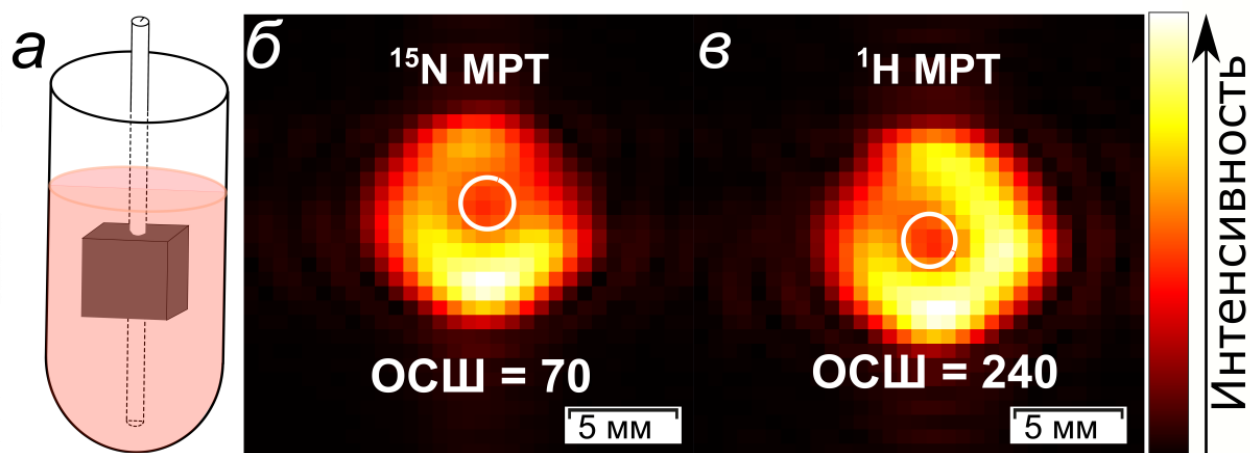


Рисунок 53. Схема экспериментальной установки для МРТ экспериментов (а), ^{15}N 2М МРТ гиперполяризованного раствора 0.1 М ^{15}N -фампридина (б) и ^1H 2М МРТ 0.1 М раствора H_2O в D_2O (в) Экспериментальная установка состояла из 10 мм ампулы ЯМР, в которой располагался надетый на стеклянный капилляр пластиковый куб. Стеклянный капилляр использовался для подачи $p\text{-H}_2$ в систему.

Для оценки качества полученного МР изображения была также выполнена МР томография 0.1 М раствора H_2O в D_2O по протонам (см. Рисунок 53в). ОСШ в случае с ^{15}N -фампридином составило 70, а в случае с H_2O 240, то есть ОСШ ^1H МРТ воды всего в ~ 3.4 раза больше, чем ОСШ ^{15}N МРТ ^{15}N -фампридина при использовании одинаковых параметров для регистрации МР изображения. Этот факт особенно важен, так как разница в чувствительности регистрации сигнала по ^1H и ^{15}N примерно ~ 1000 раз, если учесть их разницу в значении гиромагнитного отношения γ .

Время релаксации T_1 для ^{15}N -фампридина в магнитном поле 9.4 Тл составило 27 ± 3 с (см. Рисунок 54).

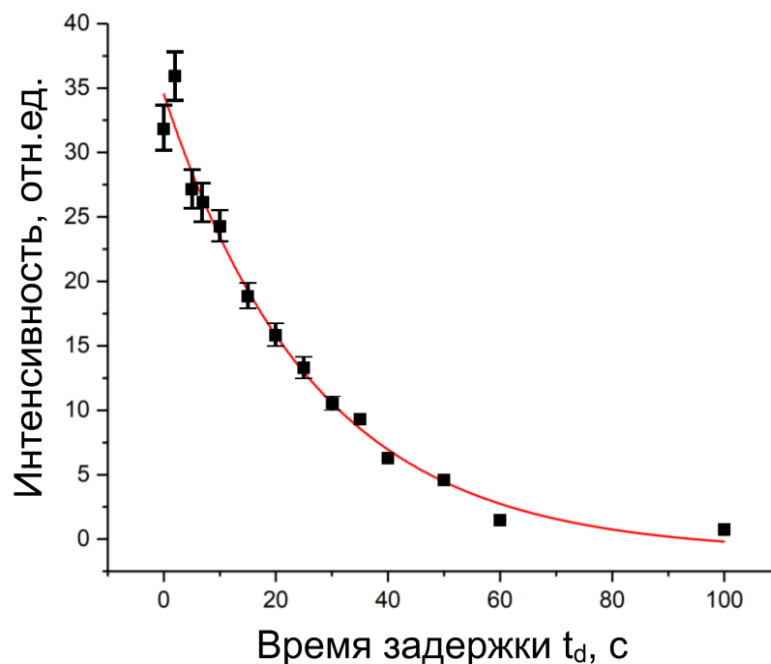


Рисунок 54. Результаты измерения времени релаксации T_1 для ^{15}N -фампридина в магнитном поле 9.4 Тл. Черными точками отмечены экспериментальные данные, красная линия – аппроксимация экспериментальных данных. Эксперименты проводились при давлении 4.4 бар, комнатной температуре и скорости подачи $p\text{-H}_2$ в систему 1.33 мл/с. Спектры ЯМР записывались после остановки подачи $p\text{-H}_2$. Параметры «непрерывного» импульса: $V_1 = 5$ Гц, $t_{\text{cw}} = 1.34$ с, количество циклов SLIC-SABRE = 30.

Учитывая то, что время релаксации $T_1 = 27 \pm 3$ с, ОСШ = 70 для $P(^{15}\text{N}) = 0.7\%$ и на изображении отсутствует фоновый сигнал, то можно однозначно утверждать, что ^{15}N МРТ с использованием ^{15}N -фампридина имеет потенциал, чтобы стать дополняющим методом к протонной МР томографии в экспериментах по исследованию *in vivo* процессов.

Дополнительно в работе была получена ^{15}N 3М МРТ с пространственным разрешением $0.5 \times 5 \times 5$ мм³/пиксель (см. Рисунок 55). На МР изображении отчетливо видно местоположение куба в системе, что соответствует отсутствию сигнала, а также границы ампулы ЯМР. 3М импульсная последовательность была реализована добавлением второго фазо-кодирующего градиента в третьем направлении.

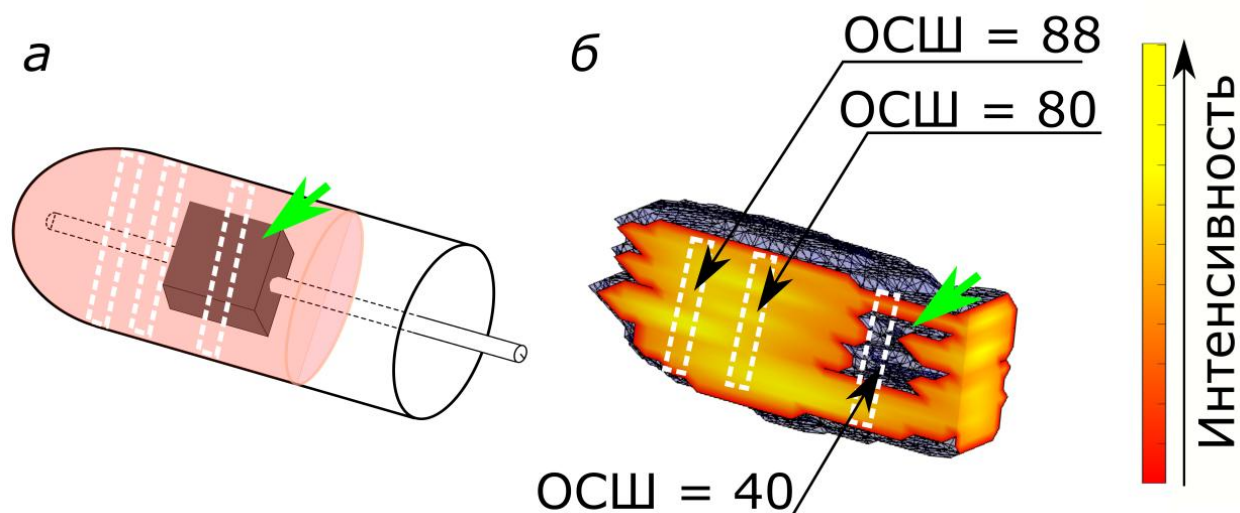


Рисунок 55. Схема образца, который использовалась в экспериментах по МРТ (а), ^{15}N 3М МРТ гиперполяризованного с помощью метода SLIC-SABRE раствора 0.1 М ^{15}N -фампридина (б). Для экспериментов использовалась 10 мм ампула ЯМР, в которую помещался стеклянный капилляр для подачи параводорода в систему и куб, который располагался на стеклянном капилляре. На рисунке зеленой стрелкой отмечен куб, как он расположен в системе (а) и его местоположение на 3М МРТ (б). Изображение было получено в магнитном поле 9.4 Тл. 3М МР визуализация представлена в виде 3М модели, которая была разрезана двумя плоскостями (ZY – вдоль ампулы ЯМР и XY – перпендикулярно ампуле ЯМР).

Значения ОСШ варьировались в зависимости от среза (см. Рисунок 5б), так как различные срезы соответствовали разным областям ампулы ЯМР. Так, например, ОСШ в срезе №15 составило ~ 150 (максимальное значение из всех). Данный срез соответствует части системы, где присутствует только раствор и капилляр, то есть неоднородности магнитного поля малы. Падение значения ОСШ в срезе №35 произошло из-за присутствия куба, который вызывал дополнительные неоднородности магнитного поля и уменьшения объема образца, который давал вклад в сигнал ЯМР.

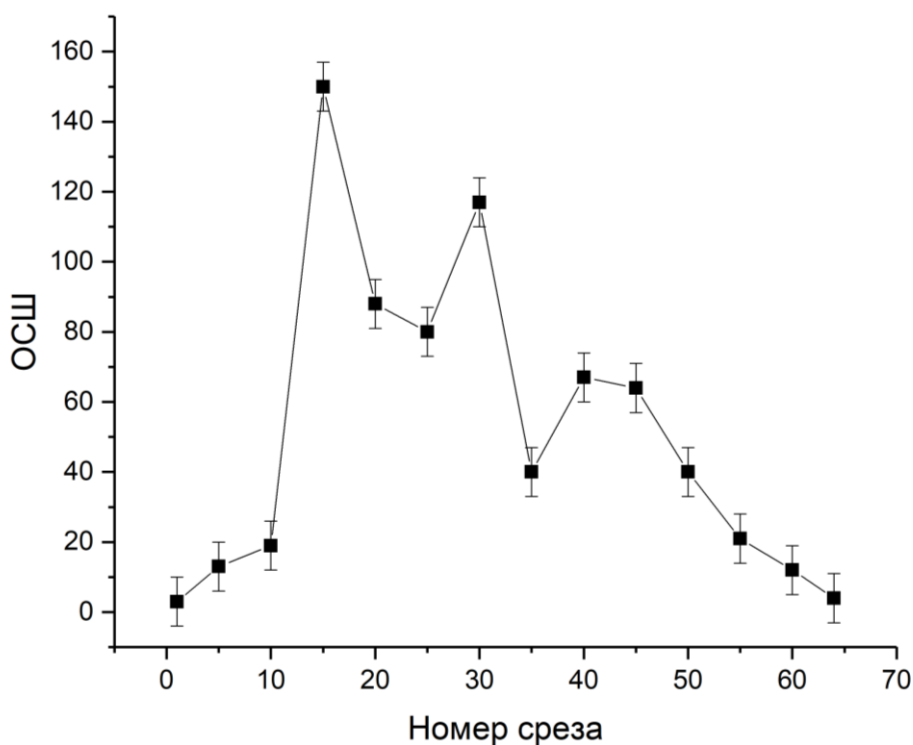


Рисунок 56. Средние значения ОСШ в зависимости от номера среза в плоскости XY. Толщина каждого среза составляла 0.5 мм.

Таким образом, в данном исследовании было проведено сравнение уровней поляризации для обогащенного изотопом ^{15}N фампридина и фампридина с естественным содержанием ядер ^{15}N . Значение поляризации $P(^{15}\text{N})$ в два раза меньше для ^{15}N -фампридина, однако значение молярной поляризации в ~ 140 раз больше. Благодаря большой интенсивности сигнала было возможно провести 2М и 3М МР визуализацию по ядрам ^{15}N . Регистрация 3М МР изображения заняла менее 1 секунды.

Исследование метода SLIC-SABRE для гиперполяризации биологически значимых гетероциклических соединений показало, что метод гиперполяризации на основе параводорода может значительно расширить возможности МРТ. В частности, МР изображения, полученные с использованием гетероядер для регистрации, могут быть использованы в совокупности с протонными изображениями в медицинской диагностике, привносить новую информацию, которая могла быть упущена из-за наличия фонового сигнала при регистрации ^1H МРТ. Также, благодаря разнообразию

гетероциклических соединений, совместимых с живыми организмами, возможно получение контрастных агентов с разным целевым действием: для регистрации МР изображений мозга, печени, простаты и др.

Исследование SLIC-SABRE является необходимым фундаментом для того, чтобы гетероядерная магнитно-резонансная томография получила свое место в биомедицинской диагностике наряду с протонной томографией. Благодаря большим интенсивностям сигнала и короткому времени регистрации МР изображений, использование SLIC-SABRE может в дальнейшем улучшить МР диагностику путем добавления спектроскопических данных в каждом вокселе. Также благодаря тому, что метод SLIC-SABRE позволяет создавать гиперполяризацию на различных соединениях, то в дальнейшем может быть открыт новый ряд контрастных агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования с использованием метода индуцированной параводородом поляризации ядер с гидрированием по боковой цепи для таких соединений, как ^{13}C -этилацетат и ^{13}C -аллилпируват, было проведено сравнение двух методов переноса поляризации на гетероядро и выполнена ^{13}C 2М МРТ. В подходе с переносом поляризации с помощью слабых магнитных полей было оптимизировано магнитное поле для переноса поляризации. Его значение составило 200 нТл для ^{13}C -аллилпирувата и 400 нТл для ^{13}C -этилацетата. В результате были получены значения $R(^{13}\text{C})$ равные $3.95 \pm 0.05\%$ для ^{13}C -аллилпирувата и $0.65 \pm 0.05\%$ для ^{13}C -этилацетата в магнитном поле 7.1 Тл. В подходе с переносом поляризации с помощью импульсных последовательностей были использованы две последовательности – RH-INEPT+ для ^{13}C -этилацетата и RH-ECHO-INEPT+ для ^{13}C -аллилпирувата. Полученные значения $R(^{13}\text{C})$ составили $0.66 \pm 0.04\%$ для ^{13}C -аллилпирувата и $0.19 \pm 0.02\%$ для ^{13}C -этилацетата в магнитном поле 7.1 Тл. В работе были получены 2М МР изображения по ядрам ^{13}C с помощью импульсной последовательности FLASH в магнитном поле 9.4 Тл. Значение ОСШ для ^{13}C -аллилпирувата составило 2200 и 300, для ^{13}C -этилацетата – 300 и 100 в методах с использованием слабых магнитных полей и импульсных последовательностей для переноса поляризации соответственно. Пространственное разрешение равнялось 0.5×1.9 мм²/пиксель. МР изображения по ядрам ^{13}C также были получены на МР томографе для животных с магнитным полем 7.1 Тл; для переноса поляризации использовалось слабое магнитное поле 0.1 мкТл. Значение ОСШ составило 560 для ^{13}C -аллилпирувата и 70 для ^{13}C -этилацетата при пространственном разрешении 1.6×1.6 мм²/пиксель. Таким образом, уровни $R(^{13}\text{C})$ и ОСШ больше в случае с ^{13}C -аллилпируватом, а также при использовании слабых магнитных полей для переноса поляризации.

В исследовании с использованием метода SABRE и слабых магнитных полей для переноса поляризации использовались такие соединения, как $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол, $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол. Значения $R(^{15}\text{N})$ составили

12-18% для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола и 4-5% для $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола в магнитном поле 1.4 Тл и 0.01-0.13% для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола и 0.03-0.07% для $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола в магнитном поле 9.4 Тл. Также были получены МР изображения по ядрам ^{15}N в плоскости XY и XZ в магнитном поле 9.4 Тл. Значение ОСШ составили 500 и 450 для $^{15}\text{N}_3$ -метронидазола и 410 и 340 для $^{15}\text{N}_2$ -метронидазола в плоскостях XY и XZ соответственно при пространственном разрешении $0.9 \times 0.9 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$. В работе с $^{15}\text{N}_3$ -ниморазолом значение $P(^{15}\text{N})$ в магнитном поле 1.4 Тл составило ~ 1.9 -3.2%, в магнитном поле 9.4 Тл – 0.003-0.78%. Также были зарегистрированы шестнадцать последовательных МР изображений по ядрам ^{15}N как в плоскости XY, так и в плоскости XZ с помощью импульсной последовательности TrueFISP в магнитном поле 9.4 Тл. Пространственное разрешение равнялось $0.5 \times 0.5 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$. Максимальное значение ОСШ в плоскости XY ~ 100 , в плоскости XZ ~ 75 .

Основным недостатком исследований с использованием слабых магнитных полей для переноса поляризации является значительное изменение уровня поляризации в зависимости от установки и экспериментальных условий. В связи с этим становится невозможным предсказать уровни поляризации при смене оборудования. Поэтому еще одна часть исследования заключалась в использовании метода SABRE с применением импульсной последовательности SLIC-SABRE для переноса поляризации на гетероядро в сильных магнитных полях.

В результате были гиперполяризованы такие соединения, такие как ^{15}N -пиридин, ^{15}N -никотинамид, фампридин, ^{15}N -фампридин, 4-диметиламинопиридин. Для этого были оптимизированы параметры импульсной последовательности и экспериментальные условия. Значение $P(^{15}\text{N})$ для ^{15}N -пиридина в магнитном поле 7.1 Тл составило 0.3%, для ^{15}N -никотинамида – 0.2%. Было измерено время релаксации T_1 . Для ^{15}N -пиридина оно составило 63 ± 2 секунды, для ^{15}N -никотинамида – 15 ± 2 секунды. Также было проведено сравнение двух импульсных последовательностей для

регистрации МР изображений: SPI и FLASH. МР изображения, полученные с помощью SPI, обладают пространственным разрешением 0.6×0.6 мм²/пиксель, а с помощью FLASH – 0.15×2.4 мм²/пиксель (¹⁵N-пиридин) и 0.3×4.8 мм²/пиксель (¹⁵N-никотинамид). Несмотря на более высокое пространственное разрешение, время записи МР изображения в случае SPI составляло 5.5 минут (¹⁵N-фампридин) и 27 минут (¹⁵N-никотинамид), в то время как с помощью FLASH изображения получались за ~ 1 секунду. Таким образом, было установлено, что импульсная последовательность FLASH является более подходящей для регистрации МР изображений в экспериментах с использованием метода SLIC-SABRE.

Метод SLIC-SABRE был оптимизирован для гиперполяризации таких соединений, как 4-диметиламинопиридин и фампридин с естественным содержанием ядер ¹⁵N. Уровни поляризации составили 7.2% для 4-диметиламинопиридина и 7.8% для фампридина. Время релаксации T₁ в магнитном поле 7.1 Тл составляло 38 ± 2 секунд для 4-диметиламинопиридина и 37 ± 2 секунд для фампридина. МР изображения по ядрам ¹⁵N были получены с помощью импульсной последовательности FLASH в магнитном поле 9.4 Тл. Пространственное разрешение равнялось 0.3×2.4 мм²/пиксель. Значение ОСШ составило 50 для 4-диметиламинопиридина и 110 для фампридина. Значение поляризации P(¹⁵N) для ¹⁵N-фампридина составило 4%, что примерно в 2 раза меньше, чем для фампридина с естественным содержанием ядер ¹⁵N. В работе было представлено объяснение данного различия.

Для ¹⁵N-фампридина также было измерено значение поляризации ¹⁵N и время релаксации T₁ в магнитном поле 9.4 Тл, которые составили P(¹⁵N) = 0.7% и T₁ = 27 ± 3 секунды. Полученное для ¹⁵N-фампридина ¹⁵N 2М МР изображение обладало ОСШ = 70. Также была выполнена трехмерная томография по ядрам ¹⁵N с помощью импульсной последовательности FLASH. Пространственное разрешение составило $0.5 \times 5 \times 5$ мм³/пиксель, наибольшее значение ОСШ ~ 150.

Ранее не было представлено работ, в которых выполнялась бы 2М или 3М томография по ядрам ^{15}N с использованием методов гиперполяризации на основе параводорода. Таким образом, данные исследования существенно расширили известные знания о гетероядерной магнитно-резонансной томографии и могут быть использованы для создания и применения новых контрастных агентов для биомедицинских приложений.

Подводя итог данной диссертационной работы можно констатировать, что методы гиперполяризации на основе параводорода открывают новые возможности для применения магнитно-резонансной томографии, в частности, возможность использовать гетероядра, такие как ^{13}C и ^{15}N . Выбор метода гиперполяризации на основе параводорода (SABRE или ИППЯ) зависит от структуры выбранного в качестве контрастного агента соединения. Однако результаты данной работы доказывают, что помимо выбора метода гиперполяризации необходимо тщательно выбирать и методы по переносу гиперполяризации на гетероядра. Так, на примере ^{13}C -этилацетата и ^{13}C -аллилпирувата было показано, что метод на основе слабых магнитных полей предоставляет более высокие уровни поляризации, чем метод с использованием импульсных последовательностей типа INEPT. Однако при работе со слабыми магнитными полями необходимо уделять большое внимание условиям переноса образца из слабого магнитного поля в магнитное поле прибора, в котором будет происходить регистрация сигнала. Метод с использованием слабых магнитных полей хорошо подойдет для контрастных агентов, для которых неизвестны точные значения КССВ, потому что в таком случае достаточно сложно оптимизировать импульсную последовательность. С другой стороны, когда все КССВ известны и необходимо стандартизировать протокол исследования на различных установках, лучше использовать метод переноса поляризации на основе импульсных последовательностей. Это связано с тем, что проведя оптимизацию параметров импульсной последовательности один раз, полученные данные в дальнейшем можно использовать на различных

приборах; кроме того, эти данные можно использовать для соединений со схожей структурой.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что при использовании слабых магнитных полей для переноса поляризации на гетероядро ^{13}C в методе ИППЯ для таких соединений, как ^{13}C -аллилпируват и ^{13}C -этилацетат, достигаются более высокие уровни поляризации ядер ^{13}C , чем при переносе поляризации с помощью импульсных последовательностей типа INEPT. Для ^{13}C -аллилпирувата и ^{13}C -этилацетата продемонстрирована возможность получения МР изображений по ядрам ^{13}C со значениями ОСШ ≥ 100 с использованием импульсных последовательностей типа INEPT для переноса поляризации.
2. Показано, что метод SABRE с переносом поляризации на гетероядро ^{15}N с помощью слабого магнитного поля позволяет создать гиперполяризацию в таких соединениях, как ^{15}N -изотопологи метронидазола и $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол. Установлено, что полученные таким методом уровни поляризации достаточны для регистрации МР изображений по ядрам ^{15}N таких соединений, как $^{15}\text{N}_2$ -метронидазол, $^{15}\text{N}_3$ -метронидазол и $^{15}\text{N}_3$ -ниморазол.
3. Показано, что метод SLIC-SABRE позволяет эффективно создавать гиперполяризацию в таких соединениях, как ^{15}N -никотинамид, 4-диметиламинопиридин, фампридин и ^{15}N -фампридин. Установлено, что для регистрации МР изображений по ядрам ^{15}N соединений, гиперполяризованных с помощью метода SLIC-SABRE, наиболее оптимальной является импульсная последовательность FLASH. Экспериментально установлено, что для фампридина и ^{15}N -обогащенного фампридина уровни поляризации ядер ^{15}N отличаются в два раза. Данный факт стал основой для построения теории, которая объясняет данные различия.
4. Показана возможность регистрации двумерных МР изображений по ядрам ^{15}N таких соединений, как ^{15}N -пиридин, ^{15}N -никотинамид, фампридин, 4-диметиламинопиридин и ^{15}N -фампридин, которые были

гиперполяризованы с использованием метода SLIC-SABRE. Кроме того, для ^{15}N -фампридина, гиперполяризованного с помощью этого метода, продемонстрирована возможность получения трехмерного МР изображения по ядрам ^{15}N .

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МРТ – магнитно-резонансная томография

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

РЧ – радиочастотный

ССИ – спад свободной индукции

1М – одномерный

2М – двумерный

3М – трехмерный

ОСШ – отношение сигнал/шум

TE – time of echo, время эха

TR – time of repetition, время повторения

BW – bandwidth, диапазон частот

RG – receiver gain, усиление приемника

FOV – field of view, область регистрации изображения

SE – spin echo, спин эхо

TSE – turbo spin echo, турбо спин эхо

SPI – single point imaging, метод регистрации одной точки

EPI – echo planar imaging, эхо-планарная томография

EXSY – exchange spectroscopy, обменная спектроскопия

FLASH – fast low angle shot, быстрая томография с малыми углами

TurboFLASH – сверхбыстрая томография с малыми углами

FISP – fast imaging with steady state precession, быстрая томография со стационарным состоянием прецессии

SEOP – spin exchange optical pumping, спин-обменная накачка благородных газов

ДПЯ – динамическая поляризация ядер

SABRE – signal amplification by reversible exchange, усиление сигнала в процессе обратимого обмена

ИППЯ – индуцированная параводородом поляризация ядер

ГП – гиперполяризованный

п-Н₂ – параводород

о-Н₂ – ортоводород

н-Н₂ – газ Н₂ при нормальных условиях

KCCB – константа спин-спинового взаимодействия

PASADENA – parahydrogen and synthesis allow dramatically enhanced nuclear alignment

ALTADENA – adiabatic longitudinal transport after dissociation engenders nuclear alignment

drpb – бис(дифенилфосфино)бутан

COD – циклооктадиен

RhCl(PPh₃)₃ – катализатор Уилкинсона, трис-(трифенилфосфин)родийхлорид

Cy – циклогексил

HMBC – heteronuclear multiple bond correlation, гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия

COSY – correlated spectroscopy, корреляционная спектроскопия

INEPT – insensitive nuclei enhanced by polarization transfer, нечувствительные ядра, усиленные с помощью переноса поляризации

ESOTHERIC – efficient spin order transfer to heteronuclei via relayed INEPT chains, эффективный перенос спинового порядка к гетероядрам через связанные INEPT цепи

LIGHT-SABRE – low-irradiation generation of high tesla-SABRE, генерация SABRE в высоких магнитных полях с использованием маломощного облучения

SLIC-SABRE – spin lock induced crossing-SABRE, SABRE вызванное спиновым запираанием

ADAPT-SABRE – alternating delays achieve polarization transfer-SABRE, перенос поляризации в SABRE с использованием переменных задержек

CSI – chemical shift imaging

UTE – ultrashort TE, томография с использованием ультракоротких TE

RARE – rapid acquisition with relaxation enhancement

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Bloch, F.** Nuclear Induction / F. Bloch, W.W. Hansen, M. Packard // *Phys. Rev.* – 1946. – V. 69. – № 3–4. – P. 127–127.
2. **Purcell, E.M.** Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid / E.M. Purcell, H.C. Torrey, R. V. Pound // *Phys. Rev.* – 1946. – Vol. 69. – № 1–2. – P. 37–38.
3. **Lauterbur, P.C.** Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance / P.C. Lauterbur // *Nature.* – 1973. – V. 242. – № 5394. – P. 190–191.
4. **Qing, K.** Regional mapping of gas uptake by blood and tissue in the human lung using hyperpolarized xenon-129 MRI / K. Qing, K. Ruppert, Y. Jiang, J. F. Mata, G. W. Miller, Y. M. Shim, C. Wang, I. C. Ruset, F. W. Hersman, T. A. Altes, J. P. Mugler // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2014. – V. 39. – № 2. – P. 346–359.
5. **Thomen, R.P.** Hyperpolarized ^{129}Xe for investigation of mild cystic fibrosis lung disease in pediatric patients / R. P. Thomen, L. L. Walkup, D. J. Roach, Z. I. Cleveland, J. P. Clancy, J. C. Woods // *J. Cyst. Fibros.* – 2017. – V. 16. – № 2. – P. 275–282.
6. **Shammi, U.A.** Comparison of Hyperpolarized ^3He and ^{129}Xe MR Imaging in Cystic Fibrosis Patients / U.A. Shammi, M. F. D'Alessandro, T. Altes, F. W. Hersman, I. C. Ruset, J. Mugler, C. Meyer, J. Mata, K. Qing, // *Acad. Radiol.* – 2022. – V. 29. – № 8. – P. S82–S90.
7. **Mugler, J.P.** Hyperpolarized ^{129}Xe MRI of the human lung / J.P. Mugler, T.A. Altes // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2013. – V. 37. – № 2. – P. 313–331.
8. **Lilburn, D.M.L.** Perspectives of hyperpolarized noble gas MRI beyond ^3He / D.M.L. Lilburn, G.E. Pavlovskaya, T. Meersmann // *J. Magn. Reson.* – 2013. – V. 229. – P. 173–186.
9. **Albert, M.S.** Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized ^{129}Xe / M. S. Albert, G. D. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer Jr, A. Wishnia // *Nature.* – 1994. – V. 370. – № 6486. – P. 199–201.
10. **Middleton, H.** MR Imaging with Hyperpolarized ^3He Gas / H. Middleton, R. D. Black, B. Saam, G. D. Cates, G. P. Cofer, R. Guenther, W. Happer, L. W. Hedlund, G. A. Johnson, K. Juvan, J. Swartz // *Magn. Reson. Med.* – 1995. – V. 33. – № 2. – P. 271–275.
11. **Shea, D.A.** The Helium-3 Shortage : Supply , Demand , and Options for Congress / D.A. Shea, D. Morgan // – 2010.
12. **Cho, A.** Helium-3 Shortage Could Put Freeze On Low-Temperature Research / A. Cho // *Science.* – 2009. – V. 326. – № 5954. – P. 778–779.
13. **Mugler, J.P.** Simultaneous magnetic resonance imaging of ventilation distribution and gas uptake in the human lung using hyperpolarized xenon-129 / J. P. Mugler, T. A. Altes, I. C.

- Ruset, I. M. Dregely, J. F. Mata, G. W. Miller, S. Ketel, J. Ketel, F. W. Hersman, K. Ruppert // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – V. 107. – № 50. – P. 21707–21712.
14. **Qing, K.** Assessment of lung function in asthma and COPD using hyperpolarized ^{129}Xe chemical shift saturation recovery spectroscopy and dissolved-phase MRI / K. Qing, J. P. Mugler, T. A. Altes, Y. Jiang, J. F. Mata, G. W. Miller, I. C. Ruset, F. W. Hersman, K. Ruppert // *NMR Biomed.* – 2014. – V. 27. – № 12. – P. 1490–1501.
 15. **Marshall, H.** Direct visualisation of collateral ventilation in COPD with hyperpolarised gas MRI / H. Marshall, M. H. Deppe, J. Parra-Robles, S. Hillis, C. G. Billings, S. Rajaram, A. Swift, S. R. Miller, J. H. Watson, J. Wolber, D. A. Lipson, R. Lawson, J. M. Wild // *Thorax.* – 2012. – V. 67. – № 7. – P. 613–617.
 16. **Virgincar, R.S.** Quantitative analysis of hyperpolarized ^{129}Xe ventilation imaging in healthy volunteers and subjects with chronic obstructive pulmonary disease / R. S. Virgincar, Z. I. Cleveland, S. S. Kaushik, M. S. Freeman, J. Nouls, G. P. Cofer, S. Martinez-Jimenez, M. He, M. Kraft, J. Wolber, H. P. McAdams, B. Driehuys // *NMR Biomed.* – 2013. – V. 26. – № 4. – P. 424–435.
 17. **Svenningsen, S.** Hyperpolarized ^3He and ^{129}Xe MRI: Differences in asthma before bronchodilation / S. Svenningsen, M. Kirby, D. Starr, D. Leary, A. Wheatley, G. N. Maksym, D. G. McCormack, G. Parraga // *J. Magn. Reson. Imaging.* – 2013. – V. 38. – № 6. – P. 1521–1530.
 18. **Wang, Z.** Quantitative analysis of hyperpolarized ^{129}Xe gas transfer MRI / Z. Wang, S. H. Robertson, J. Wang, M. He, R. S. Virgincar, G. M. Schrank, E. A. Bier, S. Rajagopal, Y. C. Huang, T. G. O'Riordan, C. R. Rackley, H. P. McAdams, B. Driehuys // *Med. Phys.* – 2017. – V. 44. – № 6. – P. 2415–2428.
 19. **Couch, M.J.** Assessing the feasibility of hyperpolarized ^{129}Xe multiple-breath washout MRI in pediatric cystic fibrosis / M. J. Couch, F. Morgado, N. Kanhere, K. Kowalik, J. H. Rayment, F. Ratjen, G. Santyr // *Magn. Reson. Med.* – 2020. – V. 84. – № 1. – P. 304–311.
 20. **Wang, Z.** Diverse cardiopulmonary diseases are associated with distinct xenon magnetic resonance imaging signatures / Z. Wang, E. A. Bier, A. Swaminathan, K. Parikh, J. Nouls, M. He, J. G. Mammarrappallil, S. Luo, B. Driehuys, S. Rajagopal // *Eur. Respir. J.* – 2019. – V. 54. – № 6.
 21. **Niedbalski, P.J.** Mapping cardiopulmonary dynamics within the microvasculature of the lungs using dissolved ^{129}Xe MRI / P. J. Niedbalski, E. A. Bier, Z. Wang, M. M. Willmering, B. Driehuys, Z. I. Cleveland // *J. Appl. Physiol.* – 2020. – V. 129. – № 2. – P. 218–229.
 22. **Shepelytskyi, Y.** Hyperpolarized ^{129}Xe Time-of-Flight MR Imaging of Perfusion and Brain Function / P. J. Niedbalski, E. A. Bier, Z. Wang, M. M. Willmering, B. Driehuys, Z. I.

- Cleveland // *Diagnostics*. – 2020. – V. 10. – № 9. – P. 14–18.
23. **Rao, M.R.** Imaging Human Brain Perfusion with Inhaled Hyperpolarized ^{129}Xe MR Imaging / M. R. Rao, N. J. Stewart, P. D. Griffiths, G. Norquay, J. M. Wild // *Radiology*. – 2018. – V. 286. – № 2. – P. 659–665.
 24. **Ardenkjaer-Larsen, J.H.** Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR / J. H. Ardenkjaer-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2003. – V. 100. – № 18. – P. 10158–10163.
 25. **Wang, Z.J.** Hyperpolarized ^{13}C MRI: State of the Art and Future Directions / Z. J. Wang, M. A. Ohliger, P. E. Z. Larson, J. W. Gordon, R. A. Bok, J. Slater, J. E. Villanueva-Meyer, C. P. Hess, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron // *Radiology*. – 2019. – V. 291. – № 2. – P. 273–284.
 26. **Koukourakis, M.I.** Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma / M. I. Koukourakis, A. Giatromanolaki, E. Sivridis, K. C. Gatter, A. L. Harris, Tumor and Angiogenesis Research Group // *Neoplasia*. – 2005. – V. 7. – № 1. – P. 1–6.
 27. **Woitek, R.** The use of hyperpolarised ^{13}C -MRI in clinical body imaging to probe cancer metabolism / R. Woitek, F.A. Gallagher // *Br. J. Cancer*. – 2021. – V. 124. – № 7. – P. 1187–1198.
 28. **Golman, K.** Metabolic imaging by hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance imaging for in vivo tumor diagnosis / K. Golman, R. Zandt, M. Lerche, R. Pehrson, J. H. Ardenkjaer-Larsen // *Cancer Res.* – 2006. – V. 66. – № 22. – P. 10855–10860.
 29. **Park, J.M.** Measuring mitochondrial metabolism in rat brain in vivo using MR Spectroscopy of hyperpolarized [2- ^{13}C]pyruvate / J. M. Park, S. Josan, T. Grafendorfer, Y.-F. Yen, R. E. Hurd, D. M. Spielman, D. Mayer // *NMR Biomed.* – 2013. – V. 26. – № 10. – P. 1197–1203.
 30. **Lau, A.Z.** Simultaneous assessment of cardiac metabolism and perfusion using copolarized [1- ^{13}C]pyruvate and ^{13}C -urea / A. Z. Lau, J. J. Miller, M. D. Robson, D. J. Tyler // *Magn. Reson. Med.* – 2017. – V. 77. – № 1. – P. 151–158.
 31. **Chen, H.Y.** Assessing prostate cancer aggressiveness with hyperpolarized dual-agent 3D dynamic imaging of metabolism and perfusion / H.-Y. Chen, P.E.Z. Larson, R. A. Bok, C. von Morze, R. Sriram, R. D. Santos, J. D. Santos, J. W. Gordon, N. Bahrami, M. Ferrone, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron // *Cancer Res.* – 2017. – V. 77. – № 12. – P. 3207–3216.
 32. **Fuetterer, M.** Hyperpolarized ^{13}C urea myocardial first-pass perfusion imaging using velocity-selective excitation / M. Fuetterer, J. Busch, S. M. Peereboom, C. von Deuster, L. Wissmann, M. Lipiski, T. Fleischmann, N. Cesarovic, C. T. Stoeck, S. Kozerke // *J.*

- Cardiovasc. Magn. Reson. – 2017. – V. 19. – № 1. – P. 1–12.
33. **Gallagher, F.A.** et al. Production of hyperpolarized [1,4-¹³C₂]malate from [1,4-¹³C₂]fumarate is a marker of cell necrosis and treatment response in tumors / F.A. Gallagher, M.I. Kettunen, D.-E. Hu, P. R. Jensen, R. Zandt, M. Karlsson, A. Gisselsson, S. K. Nelson, T. H. Witney, S. E. Bohndiek, G. Hansson, T. Peitersen, M. H. Lerche, K. M. Brindle // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2009. – V. 106. – № 47. – P. 19801–19806.
 34. **Mignon, L.** Monitoring chemotherapeutic response by hyperpolarized ¹³C-fumarate MRS and diffusion MRI / L. Mignon, P. Dutta, G. V. Martinez, P. Foroutan, R. J. Gillies, B. F. Jordan // Cancer Res. – 2014. – V. 74. – № 3. – P. 686–694.
 35. **Nielsen, P. M.** Fumarase activity: An in vivo & in vitro biomarker for acute kidney injury / P. M. Nielsen, A. Eldirdiri, L. B. Bertelsen, H. S. Jørgensen, J. H. Ardenkjaer-Larsen, C. Laustsen // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – P. 1–10.
 36. **Gallagher, F.A.** Magnetic resonance imaging of pH in vivo using hyperpolarized ¹³C-labelled bicarbonate / F. A. Gallagher, M. I. Kettunen, S. E. Day, D.-E. Hu, J. H. Ardenkjaer-Larsen, R. Zandt, P. R. Jensen, M. Karlsson, K. Golman, M. H. Lerche, K. M. Brindle // Nature. – 2008. – V. 453. – № 7197. – P. 940–943.
 37. **Ghosh, R.K.** Efficient production of hyperpolarized bicarbonate by chemical reaction on a DNP precursor to measure pH / R. K. Ghosh, S. J. Kadlecik, M. Pourfathi, R. R. Rizi // Magn. Reson. Med. – 2015. – V. 74. – № 5. – P. 1406–1413.
 38. **Nelson, S.J.** Metabolic Imaging of Patients with Prostate Cancer Using Hyperpolarized [1-¹³C]Pyruvate / S. J. Nelson, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, P. E. Z. Larson, A. L. Harzstark, M. Ferrone, M. V. Crieking, J. W. Chang, R. Bok, I. Park, G. Reed, L. Carvajal, E. J. Small, P. Munster, V. K. Weinberg, J. H. Ardenkjaer-Larsen, A. P. Chen, R. E. Hurd, L.-I. Odegardstuen, F. J. Robb, J. Tropp, J. A. Murray // Sci. Transl. Med. – 2013. – V. 5. – №198. – P. 198ra108.
 39. **Apps, A.** Proof-of-Principle Demonstration of Direct Metabolic Imaging Following Myocardial Infarction Using Hyperpolarized ¹³C CMR / A. Apps, J. Y.C. Lau, J.J.J.J. Miller, A. Tyler, L.A.J. Young, A.J.M. Lewis, G. Barnes, C. Trumper, S. Neubauer, O. J. Rider, D. J. Tyler // JACC Cardiovasc. Imaging. – 2021. – V. 14. – № 6. – P. 1285–1288.
 40. **Joergensen S.H.** Detection of increased pyruvate dehydrogenase flux in the human heart during adenosine stress test using hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate cardiovascular magnetic resonance imaging / S. H. Joergensen, E. S. S. Hansen, N. Bøgh, L. B. Bertelsen, P. B. Staehr, R. F. Schulte, C. Malloy, H. Wiggers, C. Laustsen // J. Cardiovasc. Magn. Reson. – 2022. – V. 24. – № 1. – P. 1–9.
 41. **Stewart N.J.** Biomedical applications of the dynamic nuclear polarization and parahydrogen

- induced polarization techniques for hyperpolarized ^{13}C mr imaging / N.J. Stewart, S. Matsumoto // *Magn. Reson. Med. Sci.* – 2021. – V. 20. – № 1. – P. 1–17.
42. **Kim J.H.** Ortho-para hydrogen conversion characteristics of amorphous and mesoporous Cr_2O_3 powders at a temperature of 77 K / J. H. Kim, S. W. Karng, I.-H. Oh, I. W. Nah // *Int. J. Hydrogen Energy.* – 2015. – V. 40. – № 41. – P. 14147–14153.
 43. **Bowers, C.R.** Parahydrogen and synthesis allow dramatically enhanced nuclear alignment / C.R. Bowers, D.P. Weitekamp // *J. Am. Chem. Soc.* – 1987. – V. 109. – № 18. – P. 5541–5542.
 44. **Pravica, M.G.** Net NMR alignment by adiabatic transport of parahydrogen addition products to high magnetic field / M.G. Pravica, D.P. Weitekamp // *Chem. Phys. Lett.* – 1988. – V. 145. – № 4. – P. 255–258.
 45. **Duckett S.B.** Improving NMR and MRI Sensitivity with Parahydrogen / S. B. Duckett, R. E. Mewis // *TripleC.* – 2012. – V. 11. – № 1. – P. 75–103.
 46. **Tickner B.J.** Advancing homogeneous catalysis for parahydrogen-derived hyperpolarisation and its NMR applications / B.J. Tickner, V. V. Zhivonitko // *Chem. Sci.* – 2022. – V. 13. – № 17. – P. 4670–4696.
 47. **Duckett S.B.** Parahydrogen-based NMR methods as a mechanistic probe in inorganic chemistry / S.B. Duckett, N.J. Wood // *Coord. Chem. Rev.* – 2008. – V. 252. – № 21–22. – P. 2278–2291.
 48. **Green R.A.** The theory and practice of hyperpolarization in magnetic resonance using parahydrogen / R. A. Green, R. W. Adams, S. B. Duckett, R.E. Mewis, D. C. Williamson, G. G.R. Green // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* – 2012. – V. 67. – P. 1–48.
 49. **Goldman M.** Conversion of a proton pair para order into ^{13}C polarization by rf irradiation, for use in MRI / M. Goldman, H. Jóhannesson // *Comptes Rendus Phys.* – 2005. – V. 6. – № 4–5. – P. 575–581.
 50. **Golman, K.** Parahydrogen-induced polarization in imaging: Subsecond ^{13}C angiography / K. Golman, O. Axelsson, H. Jóhannesson, S. Månsson, C. Olofsson, J.S. Petersson // *Magn. Reson. Med.* – 2001. – V. 46. – № 1. – P. 1–5.
 51. **Jóhannesson H.** Transfer of para-hydrogen spin order into polarization by diabatic field cycling / H. Jóhannesson, O. Axelsson, M. Karlsson // *Comptes Rendus Phys.* – 2004. – V. 5. – № 3. – P. 315–324.
 52. **Skovpin I. V.** Parahydrogen-Induced Polarization in Heterogeneous Hydrogenations over Silica-Immobilized Rh Complexes / I.V. Skovpin, V.V. Zhivonitko, I.V. Koptyug // *Appl. Magn. Reson.* – 2011. – V. 41. – № 2–4. – P. 393–410.
 53. **Balu A.M.** Para-hydrogen induced polarisation effects in liquid phase hydrogenations

- catalysed by supported metal nanoparticles / A.M. Balu, S.B. Duckett, R. Luque // *Dalt. Trans.* – 2009. – № 26. – P. 5074-5076.
54. **Salnikov O.G.** Heterogeneous Parahydrogen-Induced Polarization of Diethyl Ether for Magnetic Resonance Imaging Applications / O.G. Salnikov, A. Svyatova, L. M. Kovtunova, N.V. Chukanov, V. I. Bukhtiyarov, K. V. Kovtunov, E. Y. Chekmenev, I. V. Koptyug // *Chem. – A Eur. J.* – 2021. – V. 27. – P. 1316-1322.
55. **Koptyug I. V.** Para-Hydrogen-Induced Polarization in Heterogeneous Hydrogenation Reactions / I. V. Koptyug, K. V. Kovtunov, S. R. Burt, M. S. Anwar, C. Hilty, S.-I. Han, A. Pines, R. Z. Sagdeev // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. – № 17. – P. 5580–5586.
56. **Abdulhussain S.** Synthesis, solid-state NMR characterization, and application for hydrogenation reactions of a novel wilkinson's-type immobilized catalyst / S. Abdulhussain, H. Breitzke, T. Ratajczyk, A. Grünberg, M. Srour, D. Arnaut, H. Weidler, U. Kunz, H. J. Kleebe, U. Bommerich, J. Bernarding, T. Gutmann, G. Buntkowsky // *Chem. - A Eur. J.* – 2014. – V. 20. – № 4. – P. 1159–1166.
57. **Eichhorn A.** In situ PHIP NMR – A new tool to investigate hydrogenation mediated by colloidal catalysts / A. Eichhorn, A. Koch, J. Bargon // *J. Mol. Catal. A Chem.* – 2001. – V. 174. – № 1–2. – P. 293–295.
58. **Kovtunov K. V.** Observation of Parahydrogen-Induced Polarization in Heterogeneous Hydrogenation on Supported Metal Catalysts / K. V. Kovtunov, I. E. Beck, V. I. Bukhtiyarov, I. V. Koptyug // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2008. – V. 47. – № 8. – P. 1492–1495.
59. **Zhivonitko V. V.** Role of different active sites in heterogeneous alkene hydrogenation on platinum catalysts revealed by means of parahydrogen-induced polarization / V. V. Zhivonitko, K. V. Kovtunov, I. E. Beck, A. B. Ayupov, V. I. Bukhtiyarov, I. V. Koptyug // *J. Phys. Chem. C.* – 2011. – V. 115. – № 27. – P. 13386–13391.
60. **Kovtunov K. V.** High-Resolution 3D Proton MRI of Hyperpolarized Gas Enabled by Parahydrogen and Rh/TiO₂ Heterogeneous Catalyst / K. V. Kovtunov, D. A. Barskiy, A. M. Coffey, M. L. Truong, O. G. Salnikov, A. K. Khudorozhkov, E. A. Inozemtseva, I. P. Prosvirin, V. I. Bukhtiyarov, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev, I. V. Koptyug // *Chem. - A Eur. J.* – 2014. – V. 20. – № 37. – P. 11636–11639.
61. **Kovtunov K. V.** Propane-d₆ Heterogeneously Hyperpolarized by Parahydrogen / K. V. Kovtunov, M. L. Truong, D. A. Barskiy, O. G. Salnikov, V. I. Bukhtiyarov, A. M. Coffey, K. W. Waddell, I. V. Koptyug, E. Y. Chekmenev // *J. Phys. Chem. C.* – 2014. – V. 118. – № 48. – P. 28234–28243.
62. **Salnikov O.G.** The effect of oxidative and reductive treatments of titania-supported metal

- catalysts on the pairwise hydrogen addition to unsaturated hydrocarbons / O. G. Salnikov, D. B. Burueva, E. Yu. Gerasimov, A. V. Bukhtiyarov, A. K. Khudorozhkov, I. P. Prosvirin, L. M. Kovtunova, D. A. Barskiy, V. I. Bukhtiyarov, K. V. Kovtunov, I. V. Koptyug // *Catal. Today*. – 2017. – V. 283. – P. 82–88.
63. **Kovtunov K. V.** Heterogeneous addition of H₂ to double and triple bonds over supported Pd catalysts: a parahydrogen-induced polarization technique study / K. V. Kovtunov, I. E. Beck, V. V. Zhivonitko, D. A. Barskiy, V. I. Bukhtiyarov, I. V. Koptyug // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2012. – V. 14. – № 31. – P. 11008-11014.
64. **Kovtunov K. V.** Strong Metal-Support Interactions for Palladium Supported on TiO₂ Catalysts in the Heterogeneous Hydrogenation with Parahydrogen / K. V. Kovtunov, D. A. Barskiy, O. G. Salnikov, D. B. Burueva, A. K. Khudorozhkov, A. V. Bukhtiyarov, I. P. Prosvirin, E. Y. Gerasimov, V. I. Bukhtiyarov, I. V. Koptyug // *ChemCatChem*. – 2015. – V. 7. – № 17. – P. 2581–2584.
65. **Reineri F.** ParaHydrogen Induced Polarization of ¹³C carboxylate resonance in acetate and pyruvate / F. Reineri, T. Boi, S. Aime // *Nat. Commun.* – 2015. – V. 6. – № 1. – P. 5858.
66. **Kovtunov K. V.** Production of Pure Aqueous ¹³C-Hyperpolarized Acetate by Heterogeneous Parahydrogen-Induced Polarization / K. V. Kovtunov, D. A. Barskiy, R. V. Shchepin, O. G. Salnikov, I. P. Prosvirin, A. V. Bukhtiyarov, L. M. Kovtunova, V. I. Bukhtiyarov, I. V. Koptyug, E. Y. Chekmenev // *Chem. - A Eur. J.* – 2016. – V. 22. – № 46. – P. 16446–16449.
67. **Shchepin R. V.** Efficient Synthesis of Molecular Precursors for Para-Hydrogen-Induced Polarization of Ethyl Acetate-1-¹³C and beyond / R. V. Shchepin, D. A. Barskiy, A. M. Coffey, I. V. M. Esteve, E. Y. Chekmenev // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2016. – V. 55. – № 20. – P. 6071–6074.
68. **Cavallari E.** ¹³C MR Hyperpolarization of Lactate by Using ParaHydrogen and Metabolic Transformation in Vitro / E. Cavallari, C. Carrera, S. Aime, F. Reineri // *Chem. - A Eur. J.* – 2017. – V. 23. – № 5. – P. 1200–1204.
69. **Adams, R.W.** Reversible Interactions with para-Hydrogen Enhance NMR Sensitivity by Polarization Transfer / R. W. Adams, J. A. Aguilar, K. D. Atkinson, M.J. Cowley, P. I. P. Elliott, S. B. Duckett, G. G. R. Green, I. G. Khazal, J. López-Serrano, D.C. Williamson // *Science*. – 2009. – V. 323. – № 5922. – P. 1708–1711.
70. **Atkinson K.D.** Para-hydrogen induced polarization without incorporation of para-hydrogen into the analyte / K. D. Atkinson, M. J. Cowley, S. B. Duckett, P. I. P. Elliott, G. G. R. Green, J. López-Serrano, I. G. Khazal, A. C. Whitwood // *Inorg. Chem.* – 2009. – V. 48. – № 2. – P. 663–670.
71. **Barskiy D.A.** A simple analytical model for signal amplification by reversible exchange

- (SABRE) process / D. A. Barskiy, A. N. Pravdivtsev, K. L. Ivanov, K. V. Kovtunov, I. V. Koptyug // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2016. – V. 18. – № 1. – P. 89–93.
72. **Eshuis N.** Toward nanomolar detection by NMR through SABRE hyperpolarization / N. Eshuis, N. Hermkens, B. J. A. van Weerdenburg, M. C. Feiters, F. P. J. T. Rutjes, S. S. Wijmenga, M. Tessari // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 7. – P. 2695–2698.
73. **Lloyd L.S.** Utilization of SABRE-derived hyperpolarization to detect low-concentration analytes via 1D and 2D NMR methods / L. S. Lloyd, R. W. Adams, M. Bernstein, S. Coombes, S. B. Duckett, G. G. R. Green, R. J. Lewis, R. E. Mewis, C. J. Sleight // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134. – № 31. – P. 12904–12907.
74. **Daniele V.** Single-Scan Multidimensional NMR Analysis of Mixtures at Sub-Millimolar Concentrations by using SABRE Hyperpolarization / V. Daniele, F.-X. Legrand, P. Berthault, J.-N. Dumez, G. Huber // *ChemPhysChem.* – 2015. – V. 16. – № 16. – P. 3413–3417.
75. **Vaneckhaute E.** Long-Term Generation of Longitudinal Spin Order Controlled by Ammonia Ligation Enables Rapid SABRE Hyperpolarized 2D NMR / E. Vaneckhaute, S. D. Ridder, J.-M. Tyburn, J. G. Kempf, F. Taulelle, J. A. Martens, E. Breynaert // *ChemPhysChem.* – 2021. – V. 22. – № 12. – P. 1170–1177.
76. **Shi F.** Heterogeneous Solution NMR Signal Amplification by Reversible Exchange / F. Shi, A. M. Coffey, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev, B. M. Goodson // *Angew. Chemie.* – 2014. – V. 126. – № 29. – P. 7625–7628.
77. **Shi F.** Nanoscale catalysts for NMR signal enhancement by reversible exchange / F. Shi, A. M. Coffey, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev, B. M. Goodson // *J. Phys. Chem. C.* – 2015. – V. 119. – № 13. – P. 7525–7533.
78. **Kovtunov K. V.** Heterogeneous Microtesla SABRE Enhancement of ^{15}N NMR Signals / K. V. Kovtunov, L. M. Kovtunova, M. E. Gemeinhardt, A. V. Bukhtiyarov, J. Gesiorski, V. I. Bukhtiyarov, E. Y. Chekmenev, I. V. Koptyug, B. M. Goodson // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2017. – V. 56. – № 35. – P. 10433–10437.
79. **Salnikov O.G.** Parahydrogen-Induced Polarization of 1- ^{13}C -Acetates and 1- ^{13}C -Pyruvates Using Sidearm Hydrogenation of Vinyl, Allyl, and Propargyl Esters / O. G. Salnikov, N. V. Chukanov, R. V. Shchepin, I. V. M. Esteve, K. V. Kovtunov, I. V. Koptyug, E. Y. Chekmenev // *J. Phys. Chem. C.* – 2019. – V. 123. – № 20. – P. 12827–12840.
80. **Eills J.** Polarization transfer via field sweeping in parahydrogen-enhanced nuclear magnetic resonance / J. Eills, J. W. Blanchard, T. Wu, C. Bengs, J. Hollenbach, D. Budker, M. H. Levitt // *J. Chem. Phys.* – 2019. – V. 150. – № 17. – P. 174202.
81. **Aime S.** Polarization transfer from para-hydrogen to heteronuclei: Effect of H/D substitution.

- the case of AA'X and A₂A₂'X spin systems / S. Aime, R. Gobetto, F. Reineri, D. Canet // *J. Magn. Reson.* – 2006. – V. 178. – № 2. – P. 184–192.
82. **Plaumann M.** Parahydrogen-Induced Polarization Transfer to ¹⁹F in Perfluorocarbons for ¹⁹F NMR Spectroscopy and MRI / M. Plaumann, U. Bommerich, T. Trantschel, D. Lego, S. Dillenberger, G. Sauer, J. Bargon, G. Buntkowsky, J. Bernarding // *Chem. - A Eur. J.* – 2013. – V. 19. – № 20. – P. 6334–6339.
83. **Stephan M.** ¹³C PHIP NMR spectra and polarization transfer during the homogeneous hydrogenation of alkynes with parahydrogen / M. Stephan, O. Kohlmann, H. G. Niessen, A. Eichhorn, J. Bargon // *Magn. Reson. Chem.* – 2002. – V. 40. – № 2. – P. 157–160.
84. **Haake, M.** Efficient NMR Pulse Sequences to Transfer the Parahydrogen-Induced Polarization to Hetero Nuclei / M. Haake, J. Natterer, J. Bargon // *J. Am. Chem. Soc.* – 1996. – V. 118. – № 36. – P. 8688–8691.
85. **Sørensen, O.W.** Elimination of spectral distortion in polarization transfer experiments. Improvements and comparison of techniques / O.W. Sørensen, R.R. Ernst // *J. Magn. Reson.* – 1983. – V. 51. – № 3. – P. 477–489.
86. **Burueva D.B.** Gas-Phase NMR of Hyperpolarized Propane with ¹H-to-¹³C Polarization Transfer by PH-INEPT / D. B. Burueva, V. P. Kozinenko, S. V. Sviyazov, L. M. Kovtunova, V. I. Bukhtiyarov, E. Y. Chekmenev, O. G. Salnikov, K. V. Kovtunov, I. V. Koptyug // *Appl. Magn. Reson.* – 2022. – V. 53. – № 3–5. – P. 653–669.
87. **Korchak, S.** Pulsed Magnetic Resonance to Signal-Enhance Metabolites within Seconds by utilizing para -Hydrogen / S. Korchak, S. Yang, S. Mamone, S. Glöggler // *ChemistryOpen.* – 2018. – V. 7. – № 5. – P. 344–348.
88. **Korchak S.** Over 50 % ¹H and ¹³C Polarization for Generating Hyperpolarized Metabolites- A para-Hydrogen Approach / S. Korchak, S. Mamone, S. Glöggler // *ChemistryOpen.* – 2018. – V. 7. – № 9. – P. 672–676.
89. **Pravdivtsev A.N.** Highly Efficient Polarization of Spin-1/2 Insensitive NMR Nuclei by Adiabatic Passage through Level Anticrossings / A. N. Pravdivtsev, A. V. Yurkovskaya, N. N. Lukzen, K. L. Ivanov, H.-M. Vieth // *J. Phys. Chem. Lett.* – 2014. – V. 5. – № 19. – P. 3421–3426.
90. **Goldman M.** Design and implementation of ¹³C hyperpolarization from para-hydrogen, for new MRI contrast agents / M. Goldman, H. Jóhannesson, O. Axelsson, M. Karlsson // *Comptes Rendus Chim.* – 2006. – V. 9. – № 3–4. – P. 357–363.
91. **Eills J.** Singlet order conversion and parahydrogen-induced hyperpolarization of ¹³C nuclei in near-equivalent spin systems / J. Eills, G. Stevanato, C. Bengs, S. Glöggler, S. J. Elliott, J. Alonso-Valdesueiro, G. Pileio, M. H. Levitt // *J. Magn. Reson.* – 2017. – V. 274. – P. 163–

- 172.
92. **Atkinson K.D.** Spontaneous Transfer of Para hydrogen Derived Spin Order to Pyridine at Low Magnetic Field / K. D. Atkinson, M. J. Cowley, P. I. P. Elliott, S. B. Duckett, G. G. R. Green, J. López-Serrano, A. C. Whitwood // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – № 37. – P. 13362–13368.
93. **Tickner B.J.** Using SABRE Hyperpolarized ^{13}C NMR Spectroscopy to Interrogate Organic Transformations of Pyruvate / B.J. Tickner, P.J. Rayner, S.B. Duckett // *Anal. Chem.* – 2020. – V. 92. – № 13. – P. 9095–9103.
94. **TomHon P.** Temperature Cycling Enables Efficient ^{13}C SABRE-SHEATH Hyperpolarization and Imaging of $[1-^{13}\text{C}]$ -Pyruvate / P. TomHon, M. Abdulmojeed, I. Adelabu, S. Nantogma, M. S. H. Kabir, S. Lehmkuhl, E. Y. Chekmenev, T. Theis // *J. Am. Chem. Soc.* – 2022. – V. 144. – № 1. – P. 282–287.
95. **Kiryutin A.S.** Simultaneous ^{15}N polarization of several biocompatible substrates in ethanol–water mixtures by signal amplification by reversible exchange (SABRE) method / A. S. Kiryutin, A. V. Yurkovskaya, P. A. Petrov, K. L. Ivanov // *Magn. Reson. Chem.* – 2021. – V. 59. – № 12. – P. 1216–1224.
96. **Burns M.J.** Improving the Hyperpolarization of ^{31}P Nuclei by Synthetic Design / M. J. Burns, P. J. Rayner, G. G. R. Green, L. A. R. Highton, R. E. Mewis, S. B. Duckett // *J. Phys. Chem. B.* – 2015. – V. 119. – № 15. – P. 5020–5027.
97. **Zhivonitko, V. V.** Strong ^{31}P nuclear spin hyperpolarization produced via reversible chemical interaction with parahydrogen / V.V. Zhivonitko, I.V. Skovpin, I.V. Koptyug // *Chem. Commun.* – 2015. – V. 51. – № 13. – P. 2506–2509.
98. **Shchepin R. V.** Toward Hyperpolarized ^{19}F Molecular Imaging via Reversible Exchange with Parahydrogen / R. V. Shchepin, B. M. Goodson, T. Theis, W. S. Warren, E. Y. Chekmenev // *ChemPhysChem.* – 2017. – V. 18. – № 15. – P. 1961–1965.
99. **Olaru A.M.** Extending the Scope of ^{19}F Hyperpolarization through Signal Amplification by Reversible Exchange in MRI and NMR Spectroscopy / A. M. Olaru, T. B. R. Robertson, J. S. Lewis, A. Antony, W. Iali, R. E. Mewis, S. B. Duckett // *ChemistryOpen.* – 2018. – V. 7. – № 1. – P. 97–105.
100. **Olaru A.M.** Using signal amplification by reversible exchange (SABRE) to hyperpolarise ^{119}Sn and ^{29}Si NMR nuclei / A. M. Olaru, A. Burt, P. J. Rayner, S. J. Hart, A. C. Whitwood, G. G. R. Green, S. B. Duckett // *Chem. Commun.* – 2016. – V. 52. – № 100. – P. 14482–14485.
101. **Dücker E.B.** Similarity of SABRE field dependence in chemically different substrates / E. B. Dücker, L. T. Kuhn, K. Münnemann, C. Griesinger // *J. Magn. Reson.* – 2012. – V. 214. – P.

- 159–165.
102. **Theis T.** Microtesla SABRE Enables 10% Nitrogen-15 Nuclear Spin Polarization / T. Theis, M. L. Truong, A. M. Coffey, R. V. Shchepin, K. W. Waddell, F. Shi, B. M. Goodson, W. S. Warren, E. Y. Chekmenev // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – V. 137. – № 4. – P. 1404–1407.
 103. **Barskiy D.A.** The Absence of Quadrupolar Nuclei Facilitates Efficient ^{13}C Hyperpolarization via Reversible Exchange with Parahydrogen / D. A. Barskiy, R. V. Shchepin, C. P. N. Tanner, J. F. P. Colell, B. M. Goodson, T. Theis, W. S. Warren, E. Y. Chekmenev // *ChemPhysChem.* – 2017. – V. 18. – № 12. – P. 1493–1498.
 104. **Adams R.W.** A theoretical basis for spontaneous polarization transfer in non-hydrogenative parahydrogen-induced polarization / R. W. Adams, S. B. Duckett, R. A. Green, D. C. Williamson, G. G. R. Green // *J. Chem. Phys.* – 2009. – V. 131. – № 19. – P. 194505.
 105. **Pravdivtsev A.N.** Parahydrogen-Induced Polarization of Amino Acids / A. N. Pravdivtsev, G. Buntkowsky, S. B. Duckett, I. V. Koptyug, J.-B. Hövener // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2021. – V. 60. – № 44. – P. 23496–23507.
 106. **Olaru A.M.** SABRE hyperpolarisation of vitamin B₃ as a function of pH / A. M. Olaru, M. J. Burns, G. G. R. Green, S. B. Duckett // *Chem. Sci.* – 2017. – V. 8. – № 3. – P. 2257–2266.
 107. **Shchepin R. V.** Spin-Lattice Relaxation of Hyperpolarized Metronidazole in Signal Amplification by Reversible Exchange in Micro-Tesla Fields / R. V. Shchepin, L. Jaigirdar, E. Y. Chekmenev // *J. Phys. Chem. C.* – 2018. – V. 122. – № 9. – P. 4984–4996.
 108. **Barskiy D.A.** Over 20% ^{15}N Hyperpolarization in Under One Minute for Metronidazole, an Antibiotic and Hypoxia Probe / D. A. Barskiy, R. V. Shchepin, A. M. Coffey, T. Theis, W. S. Warren, B. M. Goodson, E. Y. Chekmenev // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 26. – P. 8080–8083.
 109. **Iali W.** ^{15}N hyperpolarisation of the antiprotozoal drug ornidazole by Signal Amplification By Reversible Exchange in aqueous medium / W. Iali, G. A. I. Moustafa, L. Dagys, S. S. Roy // *Magn. Reson. Chem.* – 2021. – V. 59. – № 12. – P. 1199–1207.
 110. **MacCulloch K.** Hyperpolarization of common antifungal agents with SABRE / K. MacCulloch, P. Tomhon, A. Browning, E. Akeroyd, S. Lehmkuhl, E. Y. Chekmenev, T. Theis // *Magn. Reson. Chem.* – 2021. – V. 59. – № 12. – P. 1225–1235.
 111. **Barskiy D.A.** The Feasibility of Formation and Kinetics of NMR Signal Amplification by Reversible Exchange (SABRE) at High Magnetic Field (9.4 T) / D. A. Barskiy, K. V. Kovtunov, I. V. Koptyug, P. He, K. A. Groome, Q. A. Best, F. Shi, B. M. Goodson, R. V. Shchepin, A. M. Coffey, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 9. – P. 3322–3325.
 112. **Kovtunov K. V.** Imaging of Biomolecular NMR Signals Amplified by Reversible Exchange

- with Parahydrogen Inside an MRI Scanner / K. V. Kovtunov, B. E. Kidd, O. G. Salnikov, L. B. Bales, M. E. Gemeinhardt, J. Gesiorski, R. V. Shchepin, E. Y. Chekmenev, B. M. Goodson, I. V. Koptug // *J. Phys. Chem. C.* – 2017. – V. 121. – № 46. – P. 25994–25999.
113. **Theis, T.** LIGHT-SABRE enables efficient in-magnet catalytic hyperpolarization / T. Theis, M. Truong, A.M. Coffey, E. Y. Chekmenev, W. S. Warren // *J. Magn. Reson. Elsevier Inc.* – 2014. – V. 248. – P. 23–26.
114. **Knecht, S.** Efficient conversion of anti-phase spin order of protons into ^{15}N magnetisation using SLIC-SABRE / S. Knecht, A. S. Kiryutin, A. V. Yurkovskaya, K. L. Ivanov // *Mol. Phys.* – 2019. – V. 117. – № 19. – P. 2762–2771.
115. **Roy, S.S.** Direct enhancement of nitrogen-15 targets at high-field by fast ADAPT-SABRE / S. S. Roy, G. Stevanato, P. J. Rayner, S. B. Duckett // *J. Magn. Reson.* – 2017. – V. 285. – P. 55–60.
116. **Pravdivtsev A.N.** Enhancing NMR of insensitive nuclei by transfer of SABRE spin hyperpolarization / A. N. Pravdivtsev, A. V. Yurkovskaya, H. Zimmermann, H.-M. Vieth, K. L. Ivanov // *Chem. Phys. Lett.* – 2016. – V. 661. – P. 77–82.
117. **Knecht, S.** Re-polarization of nuclear spins using selective SABRE-INEPT / S. Knecht, A. S. Kiryutin, A. V. Yurkovskaya, K. L. Ivanov // *J. Magn. Reson.* – 2018. – V. 287. – P. 10–14.
118. **Bhattacharya P.** Ultra-fast three dimensional imaging of hyperpolarized ^{13}C in vivo / P. Bhattacharya, K. Harris, A. P. Lin, M. Mansson, V. A. Norton, W. H. Perman, D. P. Weitekamp, B. D. Ross // *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* – 2005. – V. 18. – № 5. – P. 245–256.
119. **Goldman M.** Hyperpolarization of ^{13}C through order transfer from parahydrogen: A new contrast agent for MRI / M. Goldman, H. Jóhannesson, O. Axelsson, M. Karlsson // *Magn. Reson. Imaging.* – 2005. V. 23. – № 2. – P. 153–157.
120. **Schmidt A.B.** In vivo ^{13}C -MRI using SAMBADENA / A. B. Schmidt, S. Berner, M. Braig, M. Zimmermann, J. Hennig, D. von Elverfeldt, J.-B. Hövener // *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – № 7.
121. **Zacharias N.M.** Towards Real-time Metabolic Profiling of Cancer with Hyperpolarized Succinate / N.M. Zacharias, C.R. McCullough // *J. Mol. Imaging Dyn.* – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 1–9.
122. **Bhattacharya P.** Towards hyperpolarized ^{13}C -succinate imaging of brain cancer / P. Bhattacharya, E. Y. Chekmenev, W. H. Perman, K. C. Harris, A. P. Lin, V. A. Norton, C. T. Tan, B. D. Ross, D. P. Weitekamp // *J. Magn. Reson.* – 2007. – V. 186. – № 1. – P. 150–155.
123. **Chekmenev E.Y.** PASADENA Hyperpolarization of Succinic Acid for MRI and NMR

- Spectroscopy / E. Y. Chekmenev, J. Hövener, V. A. Norton, K. Harris, L. S. Batchelder, P. Bhattacharya, B. D. Ross, D. P. Weitekamp // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 130. – № 13. – P. 4212–4213.
124. **Magnusson, P.** Passive catheter tracking during interventional MRI using hyperpolarized ^{13}C / P. Magnusson, E. Johansson, S. Månsson, J. S. Petersson, C.-M. Chai, G. Hansson, O. Axelsson, K. Golman // *Magn. Reson. Med.* – 2007. – V. 57. – № 6. – P. 1140–1147.
125. **Gierse M.** Parahydrogen-Polarized Fumarate for Preclinical in Vivo Metabolic Magnetic Resonance Imaging / M. Gierse, L. Nagel, M. Keim, S. Lucas, T. Speidel, T. Lobmeyer, G. Winter, F. Josten, S. Karaali, M. Fellermann, J. Scheuer, C. Müller, F. van Heijster, J. Skinner, J. Löffler, A. Parker, J. Handwerker, A. Marshall, A. Salhov, B. El-Kassem, C. Vassiliou, J. W. Blanchard, R. Picazo-Frutos, J. Eills, H. Barth, F. Jelezko, V. Rasche, F. Schilling, I. Schwartz, S. Knecht // *J. Am. Chem. Soc.* – 2023. – V. 145. – № 10. – P. 5960–5969.
126. **Bouchard L.-S.** Para-Hydrogen-Enhanced Hyperpolarized Gas-Phase Magnetic Resonance Imaging / L.-S. Bouchard, K. V. Kovtunov, S. R. Burt, M. S. Anwar, I. V. Koptuyug, R. Z. Sagdeev, A. Pines // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2007. – V. 46. – № 22. – P. 4064–4068.
127. **Kovtunov K. V.** Gas Phase UTE MRI of Propane and Propene / K. V. Kovtunov, A. S. Romanov, O. G. Salnikov, D. A. Barskiy, E. Y. Chekmenev, I. V. Koptuyug // *Tomogr.* – 2016. – V. 2. – № 1. – P. 49–55.
128. **Burueva D.B.** Selective Single-Site Pd–In Hydrogenation Catalyst for Production of Enhanced Magnetic Resonance Signals using Parahydrogen / D. B. Burueva, K. V. Kovtunov, A. V. Bukhtiyarov, D. A. Barskiy, I. P. Prosvirin, I. S. Mashkovsky, G. N. Baeva, V. I. Bukhtiyarov, A. Y. Stakheev, I. V. Koptuyug // *Chem. - A Eur. J.* – 2018. – V. 24. – № 11. – P. 2547–2553.
129. **Cavallari E.** The ^{13}C hyperpolarized pyruvate generated by ParaHydrogen detects the response of the heart to altered metabolism in real time / E. Cavallari, C. Carrera, M. Sorge, G. Bonne, A. Muchir, S. Aime, F. Reineri // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 8366.
130. **Truong, M.L.** ^{15}N Hyperpolarization by Reversible Exchange Using SABRE-SHEATH / M. L. Truong, T. Theis, A. M. Coffey, R. V. Shchepin, K. W. Waddell, F. Shi, B. M. Goodson, W. S. Warren, E. Y. Chekmenev // *J. Phys. Chem. C.* – 2015. – V. 119. – № 16. – P. 8786–8797.
131. **Hövener, J.-B.** Toward Biocompatible Nuclear Hyperpolarization Using Signal Amplification by Reversible Exchange: Quantitative in Situ Spectroscopy and High-Field Imaging / J.-B. Hövener, N. Schwaderlapp, R. Borowiak, T. Lickert, S. B. Duckett, R. E. Mewis, R. W. Adams, M. J. Burns, L. A. R. Highton, G. G. R. Green, A. Olaru, J. Hennig, D.

- Elverfeldt // *Anal. Chem.* – 2014. – V. 86. – № 3. – P. 1767–1774.
132. **Burueva D.B.** Extending the Lifetime of Hyperpolarized Propane Gas through Reversible Dissolution / D. B. Burueva, A. S. Romanov, O. G. Salnikov, V. V. Zhivonitko, Y.-W. Chen, D. A. Barskiy, E. Y. Chekmenev, D. W. Hwang, K. V. Kovtunov, I. V. Koptyug // *J. Phys. Chem. C.* – 2017. – V. 121. – № 8. – P. 4481–4487.
133. **Bhattacharya P.** Parahydrogen-induced polarization (PHIP) hyperpolarized MR receptor imaging in vivo: a pilot study of ^{13}C imaging of atheroma in mice / P. Bhattacharya, E. Y. Chekmenev, W. F. Reynolds, S. Wagner, N. Zacharias, H. R. Chan, R. Bünger, B. D. Ross // *NMR Biomed.* – 2011. – V. 24. – № 8. – P. 1023–1028.
134. **Pravdivtsev A.N.** New pulse sequence for robust filtering of hyperpolarized multiplet spin order / A. N. Pravdivtsev, K. L. Ivanov, A. V. Yurkovskaya, H.-M. Vieth, R. Z. Sagdeev // *Dokl. Phys. Chem.* – 2015. – V. 465. – № 1. – P. 267–269.
135. **Reineri F.** Creation and evolution of net proton hyperpolarization arising from parahydrogenation / F. Reineri, S. Bouguet-Bonnet, D. Canet // *J. Magn. Reson.* – 2011. – V. 210. – № 1. – P. 107–112.
136. **Manoharan A.** Achieving Biocompatible SABRE: An in vitro Cytotoxicity Study / A. Manoharan, P. J. Rayner, W. Iali, M. J. Burns, V. H. Perry, S. B. Duckett // *ChemMedChem.* – 2018. – V. 13. – № 4. – P. 352–359.
137. **Reineri F.** How to design ^{13}C para-hydrogen-induced polarization experiments for MRI applications / F. Reineri, A. Viale, W. Dastrù, R. Gobetto, S. Aime // *Contrast Media Mol. Imaging.* – 2011. – V. 6. – № 2. – P. 77–84.
138. **Reineri F.** Use of Labile Precursors for the Generation of Hyperpolarized Molecules from Hydrogenation with Parahydrogen and Aqueous-Phase Extraction / F. Reineri, A. Viale, S. Ellena, T. Boi, V. Daniele, R. Gobetto, S. Aime // *Angew. Chemie.* – 2011. – V. 123. – № 32. – P. 7488–7491.
139. **Iali W.** Achieving High Levels of NMR-Hyperpolarization in Aqueous Media With Minimal Catalyst Contamination Using SABRE / W. Iali, A. M. Oлару, G. G. R. Green, S. B. Duckett // *Chem. - A Eur. J.* – 2017. – V. 23. – № 44. – P. 10491–10495.
140. **Eills J.** Preservation of Nuclear Spin Order by Precipitation / J. Eills, J. Alonso-Valdesueiro, D. E. S. Marcano, J. F. Silva, S. Alom, G. J. Rees, J. V. Hanna, M. Carravetta, M. H. Levitt // *ChemPhysChem.* – 2018. – V. 19. – № 1. – P. 40–44.
141. **Knecht S.** Rapid hyperpolarization and purification of the metabolite fumarate in aqueous solution / S. Knecht, J. W. Blanchard, D. Barskiy, E. Cavallari, L. Dagys, E. V. Dyke, M. Tsukanov, B. Bliemel, K. Münnemann, S. Aime, F. Reineri, M. H. Levitt, G. Buntkowsky, A. Pines, P. Blümler, D. Budker, J. Eills // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2021. – V. 118. –

- № 13. – P. 1–6.
142. **Colell J.F.P.** Direct Hyperpolarization of Nitrogen-15 in Aqueous Media with Parahydrogen in Reversible Exchange / J. F. P. Colell, M. Emondts, A. W. J. Logan, K. Shen, J. Bae, R. V. Shchepin, G. X. Ortiz, P. Spannring, Q. Wang, S. J. Malcolmson, E. Y. Chekmenev, M. C. Feiters, F. P. J. T. Rutjes, B. Blümich, T. Theis, W. S. Warren // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – V. 139. – № 23. – P. 7761–7767.
143. **Truong M.L.** Irreversible catalyst activation enables hyperpolarization and water solubility for NMR signal amplification by reversible exchange / M. L. Truong, F. Shi, P. He, B. Yuan, K. N. Plunkett, A. M. Coffey, R. V. Shchepin, D. A. Barskiy, K. V. Kovtunov, I. V. Koptuyug, K. W. Waddell, B. M. Goodson, E. Y. Chekmenev // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – V. 118. – № 48. – P. 13882–13889.
144. **Shi F.** Aqueous NMR Signal Enhancement by Reversible Exchange in a Single Step Using Water-Soluble Catalysts / F. Shi, P. He, Q. A. Best, K. Groome, M. L. Truong, A. M. Coffey, G. Zimay, R. V. Shchepin, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev, B. M. Goodson // *J. Phys. Chem. C.* – 2016. – V. 120. – № 22. – P. 12149–12156.
145. **Truong M.L.** Sub-second proton imaging of ^{13}C hyperpolarized contrast agents in water / M. L. Truong, A. M. Coffey, R. V. Shchepin, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev // *Contrast Media Mol. Imaging.* – 2014. – V. 9. – № 5. – P. 333–341.
146. **Ripka B.** Hyperpolarized fumarate via parahydrogen / B. Ripka, J. Eills, H. Kouřilová, M. Leutzsch, M. H. Levitt, K. Münnemann // *Chem. Commun.* – 2018. – V. 54. – № 86. – P. 12246–12249.
147. **Hermkens N.K.J.** Trace analysis in water-alcohol mixtures by continuous p-H₂ hyperpolarization at high magnetic field / N.K.J. Hermkens, R.L.E.G. Aspers, M.C. Feiters, F.P.J.T. Rutjes, M. Tessari // *Magn. Reson. Chem.* – 2018. – V. 56. – № 7. – P. 633–640.
148. **Cohen R.M.** The balance of acid, base and charge in health and disease / R.M. Cohen, G.M. Feldman, P.C. Fernandez // *Kidney Int.* – 1997. – V. 52. – № 2. – P. 287–293.
149. **Nagami G.T.** Regulation of Acid-Base Balance in Chronic Kidney Disease / G.T. Nagami, L.L. Hamm // *Adv. Chronic Kidney Dis.* Elsevier Ltd, – 2017. – V. 24. – № 5. – P. 274–279.
150. **Adrogué H.J.** Management of Life-Threatening Acid–Base Disorders / H.J. Adrogué, N.E. Madias // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – V. 338. – № 1. – P. 26–34.
151. **Kohler S.J.** In vivo 13carbon metabolic imaging at 3T with hyperpolarized ^{13}C -1-pyruvate / S.J. Kohler, Y. Yen, J. Wolber, A.P. Chen, M.J. Albers, R. Bok, V. Zhang, J. Tropp, S. Nelson, D.B. Vigneron, J. Kurhanewicz, R.E. Hurd // *Magn. Reson. Med.* – 2007. – V. 58. – № 1. – P. 65–69.
152. **Kurhanewicz J.** Analysis of cancer metabolism by imaging hyperpolarized nuclei: Prospects

- for translation to clinical research / J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, K. Brindle, E. Y. Chekmenev, A. Comment, C. H. Cunningham, R. J. DeBerardinis, G. G. Green, M. O. Leach, S. S. Rajan, R. R. Rizi, B. D. Ross, W. S. Warren, C. R. Malloy // *Neoplasia*. – 2011. – V. 13. – № 2. – P. 81–97.
153. **Deelchand D.K.** Acetate transport and utilization in the rat brain / D. K. Deelchand, A. A. Shestov, D. M. Koski, K. Uğurbil, P.-G. Henry // *J. Neurochem.* – 2009. – V. 109. – № SUPPL. 1. – P. 46–54.
154. **Patel A.B.** Evaluation of Cerebral Acetate Transport and Metabolic Rates in the Rat Brain in vivo Using ^1H - ^{13}C -NMR / A. B. Patel, R. A. de Graaf, D. L. Rothman, K. L. Behar, G. F. Mason // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* – 2010. – V. 30. – № 6. – P. 1200–1213.
155. **Blüml S.** Tricarboxylic acid cycle of glia in the in vivo human brain / S. Blüml, A. Moreno-Torres, F. Shic, C.-H. Nguy, B. D. Ross // *NMR Biomed.* – 2002. – V. 15. – № 1. – P. 1–5.
156. **Lebon V.** Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: Elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism / V. Lebon, K. F. Petersen, G. W. Cline, J. Shen, G. F. Mason, S. Dufour, K. L. Behar, G. I. Shulman, D. L. Rothman // *J. Neurosci.* – 2002. – V. 22. – № 5. – P. 1523–1531.
157. **Lebon V.** Effect of triiodothyronine on mitochondrial energy coupling in human skeletal muscle / V. Lebon, S. Dufour, K. F. Petersen, J. Ren, B. M. Jucker, L. A. Slezak, G. W. Cline, D. L. Rothman, G. I. Shulman // *J. Clin. Invest.* – 2001. – V. 108. – № 5. – P. 733–737.
158. **Jucker B.M.** Assessment of mitochondrial energy coupling in vivo by $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ NMR / B. M. Jucker, S. Dufour, J. Ren, X. Cao, S. F. Previs, B. Underhill, K. S. Cadman, G. I. Shulman // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – V. 97. – № 12. – P. 6880–6884.
159. **Jiang W.** Hyperpolarized ^{15}N -pyridine Derivatives as pH-Sensitive MRI Agents / W. Jiang, L. Lumata, W. Chen, S. Zhang, Z. Kovacs, A. D. Sherry, C. Khemtong // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – № 1. – P. 9104.
160. **Hendrickson K.** Hypoxia imaging with [F-18] FMISO-PET in head and neck cancer: Potential for guiding intensity modulated radiation therapy in overcoming hypoxia-induced treatment resistance / K. Hendrickson, M. Phillips, W. Smith, L. Peterson, K. Krohn, J. Rajendran // *Radiother. Oncol.* – 2011. – V. 101. – № 3. – P. 369–375.
161. **Henk J.M.** Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: Phase II study / J.M. Henk, K. Bishop, S.F. Shepherd // *Radiother. Oncol.* – 2003. – V. 66. – № 1. – P. 65–70.
162. **Barskiy D.A.** Over 20% ^{15}N Hyperpolarization in Under One Minute for Metronidazole, an

- Antibiotic and Hypoxia Probe / D. A. Barskiy, R. V. Shchepin, A. M. Coffey, T. Theis, W. S. Warren, B. M. Goodson, E. Y. Chekmenev // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 26. – P. 8080–8083.
163. **Shchepin R. V.** Hyperpolarizing Concentrated Metronidazole $^{15}\text{NO}_2$ Group over Six Chemical Bonds with More than 15% Polarization and a 20 Minute Lifetime / R. V. Shchepin, J. R. Birchall, N. V. Chukanov, K. V. Kovtunov, I. V. Koptuyug, T. Theis, W. S. Warren, J. G. Gelovani, B. M. Goodson, S. Shokouhi, M. S. Rosen, Y.-F. Yen, W. Pham, E. Y. Chekmenev // *Chem. - A Eur. J.* – 2019. – V. 25. – № 37. – P. 8829–8836.
164. **Knip M.** Safety of high-dose nicotinamide: A review / M. Knip, I. F. Douek, W. P. T. Moore, H. A. Gillmor, A. E. M. McLean, P. J. Bingley, E. A. M. Gale // *Diabetologia.* – 2000. – V. 43. – № 11. – P. 1337–1345.
165. **Shchepin R. V.** Efficient Synthesis of Nicotinamide-1- ^{15}N for Ultrafast NMR Hyperpolarization Using Parahydrogen / R. V. Shchepin, D. A. Barskiy, D. M. Mikhaylov, E. Y. Chekmenev // *Bioconjug. Chem.* – 2016. – V. 27. – № 4. – P. 878–882.
166. **Goodman A.D.** Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial / A. D Goodman, T. R. Brown, L. B. Krupp, R. T. Schapiro, S. R. Schwid, R. Cohen, L. N. Marinucci, A. R. Blight // *Lancet.* – 2009. – V. 373. – № 9665. – P. 732–738.
167. **Chukanov N. V.** Synthesis and ^{15}N NMR Signal Amplification by Reversible Exchange of [^{15}N]Dalfampridine at Microtesla Magnetic Fields / N. V. Chukanov, O. G. Salnikov, I. A. Trofimov, M. S. H. Kabir, K. V. Kovtunov, I. V. Koptuyug, E. Y. Chekmenev // *ChemPhysChem.* – 2021. – V. 22. – № 10. – P. 960–967.
168. **Hassner A.** 4-Dimethylaminopyridine / A. Hassner // *Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2001. – V. 2. – № 4. – P. 3–4.
169. **Feng B.** A pulsed injection parahydrogen generator and techniques for quantifying enrichment / B. Feng, A. M. Coffey, R. D. Colon, E. Y. Chekmenev, K. W. Waddell // *J. Magn. Reson. Elsevier Inc.*, 2012. Vol. 214. P. 258–262.
170. **Cavallari E.** Studies to enhance the hyperpolarization level in PHIP-SAH-produced C13-pyruvate / E. Cavallari, C. Carrera, S. Aime, F. Reineri // *J. Magn. Reson.* – 2018. – V. 289. – P. 12–17.
171. **Shaka A.J.** An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ-16 / A.J Shaka, J. Keeler, T. Frenkiel, R. Freeman // *J. Magn. Reson.* – 1983. – V. 52. – № 2. – P. 335–338.
172. **Emid S.** High resolution NMR imaging in solids / S. Emid, J.H.N. Creyghton // *Phys. B+C.* – 1985. – V. 128. – № 1. – P. 81–83.

ПРИЛОЖЕНИЕ

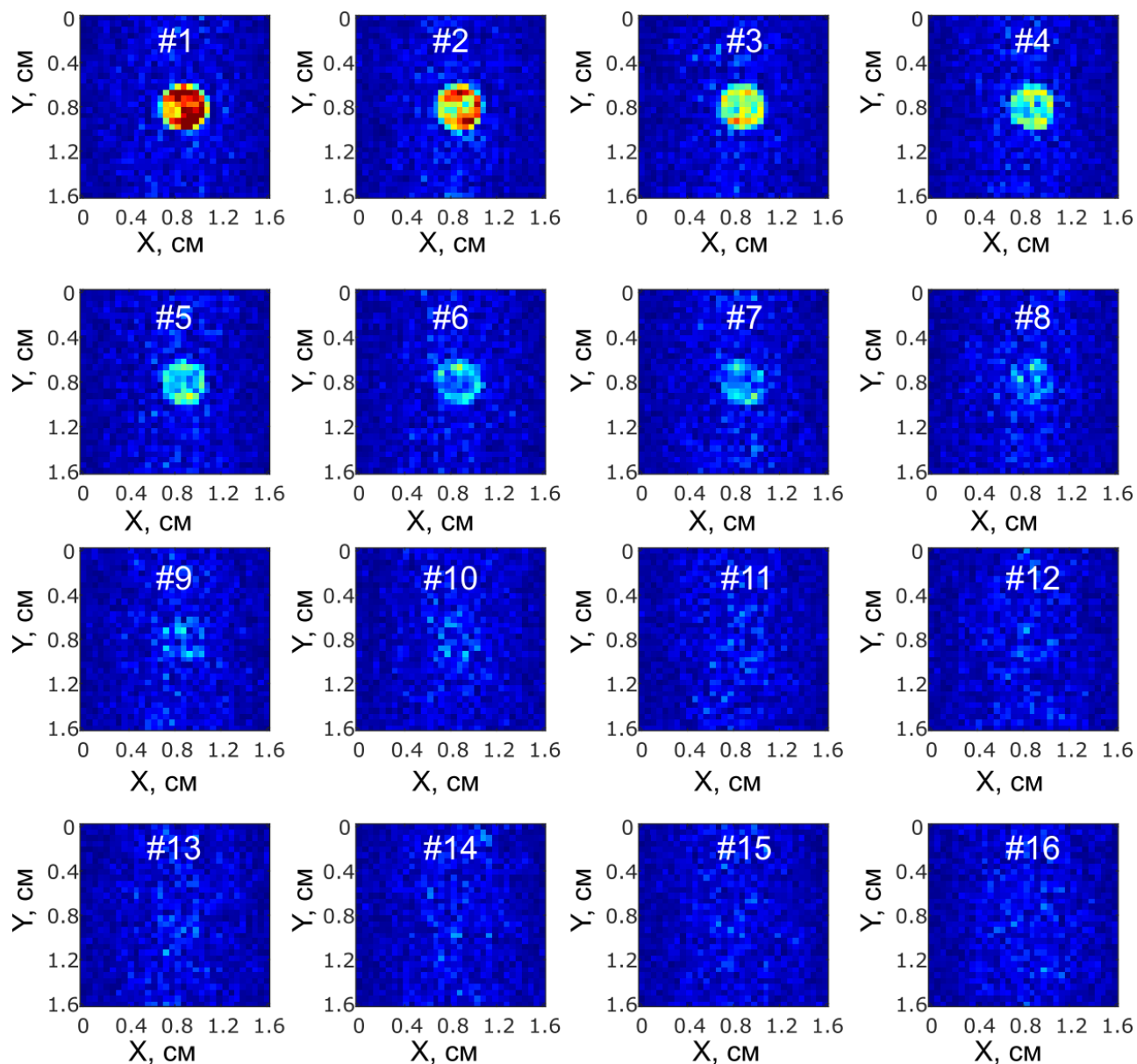


Рисунок П1. ^{15}N МР изображения из серии 16 последовательно-записанных изображений в плоскости XY от гиперполяризованного с помощью метода SABRE $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола. МР изображения были получены от сигнала $^{15}\text{NO}_2$ группы. SW = 5 кГц, TR = 14 мс, TE = 7 мс, угол поворота = 30° . Время записи одного изображения = 356 мс, размер матрицы = 32×32 (заполнена нулями до 512×512), FOV = $1.6 \text{ см} \times 1.6 \text{ см}$, пространственное разрешение = $0.5 \times 0.5 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$.

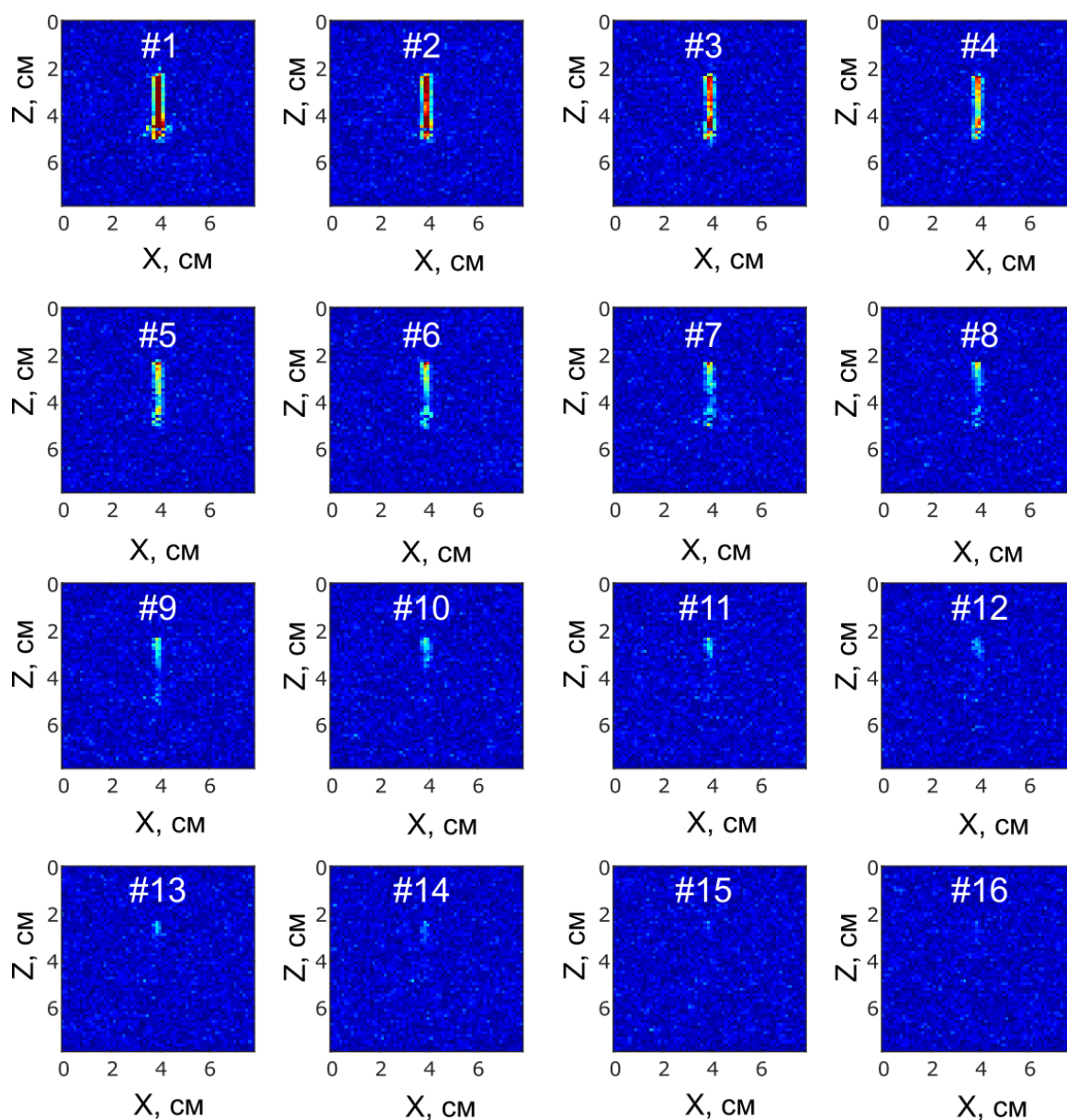


Рисунок П2. ^{15}N МР изображения из серии 16 последовательно-записанных изображений в плоскости XY от гиперполяризованного с помощью метода SABRE $^{15}\text{N}_3$ -ниморазола. МР изображения были получены от сигнала $^{15}\text{NO}_2$ группы. SW = 5 кГц, TR = 14 мс, TE = 7 мс, угол поворота = 30° . Время записи одного изображения = 684 мс, размер матрицы = 64×64 (заполнена нулями до 512×512), FOV = $7.8 \text{ см} \times 7.8 \text{ см}$, пространственное разрешение = $1.2 \times 1.2 \text{ мм}^2/\text{пиксель}$.