

УДК 537.635

**ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОЙ ФТОРУГЛЕРОДНОЙ ЭМУЛЬСИИ
МЕТОДАМИ ^{19}F МРТ И ^{19}F ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ
В СРАВНЕНИИ С ПРЕПАРАТОМ ПЕРФТОРАН®
В СИЛЬНОМ МАГНИТНОМ ПОЛЕ 7 ТЛ**

М. В. Гуляев¹, А. В. Кузнецова¹, Л. Л. Гервиц², Ю. А. Пирогов¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

²Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН

Статья поступила в редакцию 1 декабря 2016 г.

Аннотация. В работе методами ^{19}F ЯМР спектроскопии и ^{19}F МРТ в экспериментах *in vivo* исследована новая фторуглеродная эмульсия, состоящая из смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров и перфтордекалина. В отличие от ^{19}F спектра ЯМР препарата Перфторан® на спектре нового вещества наблюдается интенсивный одиночный пик, образованный 9 и 12 магнитно-эквивалентными ядрами фтора-19 смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров, что создает благоприятные условия для проведения ^{19}F МРТ сканирования. Показано, что для получения ^{19}F МРТ изображений новой эмульсии с таким же отношением сигнал/шум, как и для препарата Перфторан®, с помощью импульсной последовательности 3D RARE, требуется в 2,5 раза меньше времени при одних и тех же параметрах сканирования. С помощью ^{19}F ЯМР спектроскопии *in vivo* на лабораторных животных (крысах Wistar) проведены исследования по определению динамики выведения перфторуглеродов новой эмульсии: время полувыведения перфтордекалина составляет порядка семи дней, в то время как количество ядер фтора-19 в смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров за 14 дней наблюдения практически не изменилось.

Ключевые слова: ^{19}F ЯМР спектроскопия, ^{19}F МРТ, фторуглеродная эмульсия, Перфторан®.

Abstract. The first fluorocarbon emulsion synthesized from perfluorocarbons (PFCs) and used in clinical medicine in Russia was the drug Perftoranum® - blood substitute with an effective gas transportation function. Despite of the fact that its composition contains a large number of fluorine-19 nuclei, the contribution to the resultant ^{19}F NMR signal in a strong magnetic field is given by only small part of the summery amount of fluorine nuclei – because chemical shifts are increased in a high magnetic field, it is necessary to use the selective excitation method. In addition, most of these nuclei are magnetically nonequivalent, so it is also problematically to obtain ^{19}F MR images – chemical shift artifacts may appear. As a result, it requires quite a lot of time – at least 20 minutes for obtaining acceptable quality ^{19}F MR images of the drug Perftoranum®. The presence of magnetically equivalent nuclei of fluorine-19 in a substance greatly simplifies obtaining its ^{19}F MR images. In this case, on the ^{19}F spectrum NMR will be observed a single intense peak that creates favorable conditions for an MRI scanning – the signal/noise ratio that allows obtaining ^{19}F MR images with higher contrast in less time will be significantly increased. The presence of 9 and 12 magnetically equivalent fluorine-19 nuclei at the mixture of two oligomeric monobromide perfluorinated ethers forms such singlet spectral peak. With help of ^{19}F NMR and ^{19}F MRI experiments *in vivo*, this paper studies a new fluorocarbon emulsion that has been synthesized on the base of mixing mentioned substance and perfluorodecalin. The presence of a single intense singlet on its ^{19}F NMR spectrum allows obtaining ^{19}F MR images of the quality comparable with the drug Perftoranum® one but in 2.5 times faster than for the Perftoranum® with the same scanning parameters. By NMR spectroscopy *in vivo* with laboratory animals (rats Wistar), studies on determining dynamics of the PFCs removal from animal organism in the case of the new emulsion were carried out. It was shown that the half-life time of perfluorodecalin removal is approximately 7 days, while during the significantly longer observation time (14 days), the amount of fluorine-19 nuclei in the mixture of two oligomeric monobromide perfluorinated ethers virtually unchanged.

Keywords: ^{19}F NMR spectroscopy, ^{19}F MRI, perfluorocarbon emulsion, Perftoranum®.

Введение

В последнее время активно развиваются методики проведения МРТ исследований на ядрах, отличных от протонов, причем наиболее перспективным для этой цели является ядро фтора-19 – прежде всего благодаря своему высокому магнитному моменту и 100%-ному природному содержанию. Ядра фтора-19 практически отсутствуют в живом организме, однако это не является препятствием для проведения ^{19}F МРТ *in vivo*. Например, можно ввести в организм фторуглеродные эмульсии (ФУЭС), основу которых составляют перфторуглеродные вещества (ПФУ) – класс органических соединений, в которых все атомы водорода в скелете замещены атомами фтора-19. Такие соединения используются в качестве контрастных МРТ агентов, биоконтейнеров лекарственных средств, носителей маркеров целевой доставки фармпрепаратов, индикаторов молекулярной визуализации и т.п. Благодаря наличию ядер фтора-19 в ФУЭС их можно обнаружить в живом организме и неинвазивно исследовать методами ^{19}F ЯМР спектроскопии и ^{19}F МРТ [1].

Одной из первых эмульсий, синтезированных на основе ПФУ, является препарат Перфторан® – плазмозаменяющее вещество с высокой газотранспортной функцией. Его основу составляют два ПФУ: перфтордекалин (ПФД) и перфторметилциклогексилпиперидин (ПФМЦП). Основное назначение препарата Перфторан® – газотранспортная функция (перенос кислорода к живым органам), которая реализуется путем введения препарата в кровеносную систему [2]. Перфторан® является весьма эффективным кровезаменителем, в России он разрешен для клинических применений и демонстрирует уникальные характеристики – он индифферентен к группе крови пациента, обладает в полтора раза более эффективной, чем обычная кровь, функцией доставки кислорода к органам, не менее двух лет сохраняет свои газотранспортные свойства, может применяться при реальных внеклинических обстоятельствах значительной кровопотери, например, в случае ДТП, в условиях поля боя и т.п. Однако до последнего времени было неясно, как циркулирует этот препарат в кровеносной системе, в каких органах

локализуется с течением времени, с какой скоростью выводится из организма. Причина была в том, что все медицинские магнитно-резонансные томографы были настроены на ларморову частоту протонов и не могли обнаружить фторсодержащий лекарственный препарат.

Но даже после перестройки МРТ сканеров на частоту ядер фтора оказалось, что успех при попытках регистрации фторсодержащего препарата обеспечивается далеко не всегда. Так, в *in vivo* экспериментах, проведенных с использованием препарата Перфторан® в сильном магнитном поле 7 Тл, было показано, что получение его ^{19}F МРТ изображений затруднено, несмотря на то, что в его составе содержится большое количество ядер фтора-19 [3]. Главным образом это связано с тем, что ^{19}F спектр ЯМР у Перфторана® является весьма широким и сложным, поэтому, исходя из аппаратных ограничений по полосе приема-передающего тракта, в сильном магнитном поле приходится использовать метод селективного возбуждения. В итоге, вклад в регистрируемый сигнал ЯМР дает лишь небольшая часть ядер фтора-19. Кроме того, большинство ядер является магнитно-неэквивалентными, что также затрудняет получение ^{19}F МРТ изображений – при возбуждении ядер фтора-19 могут появиться артефакты химического сдвига. Все это приводит к тому, что для получения ^{19}F МРТ изображений препарата Перфторан® приемлемого качества требуется довольно много времени – не менее 20 минут.

Наличие магнитно-эквивалентных ядер фтора-19 в веществе существенно упрощает получение ^{19}F МРТ изображений [4]. В этом случае на ^{19}F спектре ЯМР будет наблюдаться одиночный интенсивный пик, что создает благоприятные условия для проведения МРТ сканирования – существенно повышается отношение сигнал/шум, что позволяет получать ^{19}F МРТ изображения с более высокой контрастностью за меньшее время.

Цель работы

Цель настоящей работы состояла в анализе новой фторуглеродной эмульсии, основу которой составляли ПФУ, имеющие большое количество

магнитно-эквивалентных ядер фтора-19 и дающие на ^{19}F спектре ЯМР одиночный интенсивный сигнал. В качестве конкретной задачи было задание получить в экспериментах на лабораторных животных *in vivo* отчетливые ^{19}F МРТ изображения новой фторуглеродной эмульсии и сопоставить их по отношению сигнал/шум с изображениями, полученными от препарата Перфторан®. Также была задача провести серию ^{19}F ЯМР исследований *in vivo* для определения динамики выведения ПФУ, составляющих основу новой ФУЭС, из организма лабораторных животных.

Материалы и методы

Для решения поставленной цели при синтезе новой ФУЭС было важно, чтобы ПФУ, составляющие ее основу, помимо содержания большого количества магнитно-эквивалентных атомов фтора-19 в молекуле, обладали следующими свойствами: способностью образовывать стабильную эмульсию, биологической инертностью и достаточной скоростью выведения из организма.

Таковыми свойствами обладает смесь двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров, общая формула которой представлена на рис. 1.

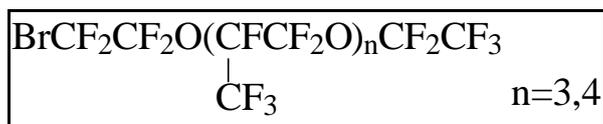


Рис. 1. Структурная формула смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров 1-бромперфтор-3,6,9,12-тетраокси-4,7,10-тритрифторметил тетрадекан и 1-бромперфтор-3,6,9,12,15-пентаокси-4,7,10,13-тетратрифторметил гексадекан с соотношением олигомеров в смеси 3:4 и 6:3 соответственно.

На базе смеси этих двух соединений (олигомерные монобромиды перфторированных простых эфиров брались в соотношении 7:3) и

перфтордеалина готовилась эмульсия, содержащая 10 объемных % перфторуглеродных соединений, с использованием Проксанола-268 в качестве стабилизатора как поверхностно-активного вещества (ПАВ). Эмульсия демонстрировала очень хорошую стабильность – сохраняла средний размер частиц в районе 90-100 нм при хранении в бытовом холодильнике (без замораживания) в течение двух и более месяцев. Кроме того, введение брома в перфторированную молекулу увеличивало липофильность ПФУ, что подтверждалось низким уровнем верхней критической температуры смешения $18,5^{\circ}\text{C}$ для смеси монобромперфторполиэфиров с гексаном. Известно, что именно этот параметр в значительной степени ответственен за скорость выведения ПФУ из организма.

Спектроскопические и МРТ исследования на ядрах фтора-19 проводились на МР-томографе Bruker BioSpec 70/30 USR с постоянным магнитным полем 7 Тл. Данное оборудование является уникальной научной установкой и входит в центр коллективного пользования «Биоспектротомография», принадлежащий МГУ имени М.В. Ломоносова. Томограф расположен в лаборатории магнитной томографии и спектроскопии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

В качестве датчика использовалась фирменная приемо-передающая катушка, модифицированная на работу не только на ядрах водорода, но и на ядрах фтора-19 [5].

Объектами *in vivo* исследований являлись лабораторные крысы – самцы Wistar весом 250-300 г. Животных содержали в виварии при температуре воздуха $20-22^{\circ}\text{C}$ в пластиковых клетках при свободном доступе к пище и воде и естественном чередовании суточной освещенности. Для анестезии применялась газовая смесь изофлурана и кислорода. Исследуемые вещества (новая ФУЭС и препарат Перфторан®) вводились внутривенно в объеме 2 мл.

МРТ изображения на частотах протонов и ядер фтора-19 получались с помощью импульсной последовательности (ИП) 3D RARE со следующими параметрами сканирования: TR = 500 мс; TE = 5,6 мс; RARE-фактор = 8; полоса

частот $BW = 61728,4$ Гц; область сканирования $15 \times 15 \times 2,5$ см; матрица сканирования $48 \times 48 \times 8$; пространственное разрешение – 3 мм [6]. Спектры ^{19}F ЯМР регистрировались путем подачи 90° возбуждающего импульса длительностью 13 мкс с паузой между импульсами 1 с. Получение изображений и спектров производилось в рамках фирменных программ ParaVision 5.0 и TopSpin 2.0, составляющих основу программного обеспечения МР-томографа. При работе с полученными изображениями проводилась их обработка с помощью программы ImageJ 1.49v, предназначенной для работы с МРТ данными и свободно распространяемой в сети Интернет [7].

Результаты

В наших предшествующих работах с препаратом Перфторан® было показано, что для получения приемлемого качества его ^{19}F МРТ изображений необходимо возбуждать ядра фтора-19, образующие на ^{19}F спектре ЯМР три рядом расположенных пика в области от -130 ppm до -135 ppm (на правом фрагменте рис. 2 они показаны стрелкой) [3]. Кроме того, время сканирования должно было составлять около 20 минут.

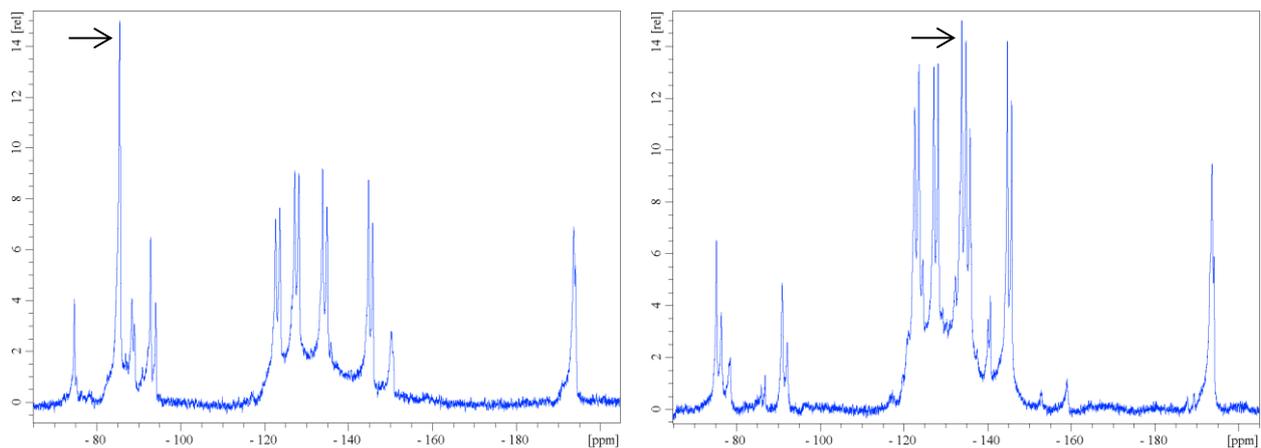


Рис. 2. ^{19}F спектры ЯМР новой ФУЭС (слева) и Перфторана® (справа) в магнитном поле 7 Тл. Стрелками показаны основные пики возбуждаемых и считываемых сигналов ЯМР.

В настоящей работе проведены ^{19}F ЯМР спектроскопические и ^{19}F МРТ исследования новой ФУЭС, главным отличием которой от препарата Перфторан® является наличие на ее ^{19}F спектре ЯМР интенсивного одиночного пика в области -85 ppm, образованного 9-ю и 12-ю магнитно-эквивалентными ядрами фтора-19 от трех и четырех трифторметильных групп двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров – на левом фрагменте рис. 2 он показан стрелкой (химический сдвиг отсчитан относительно хим. сдвига трифторуксусной кислоты -76.55 ppm). Кроме того, на ^{19}F спектре ЯМР новой ФУЭС можно выделить группу пиков в области от -70 ppm до -95 ppm и одиночный пик в районе -150 ppm, также образованные ядрами фтора-19 смеси монобромидов. Сигналам ПФД на ^{19}F спектре ЯМР соответствует группа пиков в области от -115 ppm до -145 ppm и одиночный пик в районе -195 ppm.

Как уже упоминалось выше, наличие одиночного интенсивного пика на ^{19}F спектре ЯМР существенно упрощает получение ^{19}F МРТ изображений. Этот факт был успешно подтвержден в данной работе.

Крысам внутривенно в количестве 2 мл вводили новую ФУЭС, затем на следующий день регистрировали ^{19}F МРТ изображения. Как и в случае с препаратом Перфторан®, новая ФУЭС преимущественно концентрировалась в печени и селезенке. Было показано, что для получения ^{19}F МРТ изображений новой ФУЭС с таким же отношением сигнал/шум, как и для препарата Перфторан®, с помощью импульсной последовательности 3D RARE, требуется в 2,5 раза меньше времени при одних и тех же параметрах сканирования, если возбуждать ядра фтора-19, образующие интенсивный одиночный пик в области -85 ppm. На рис. 3 представлены ^1H и ^{19}F МРТ-изображения крысы, полученные на следующий день после внутривенного введения 2 мл препарата Перфторан® (сверху) и 2 мл новой ФУЭС (снизу) за 20 минут и 8 минут соответственно.

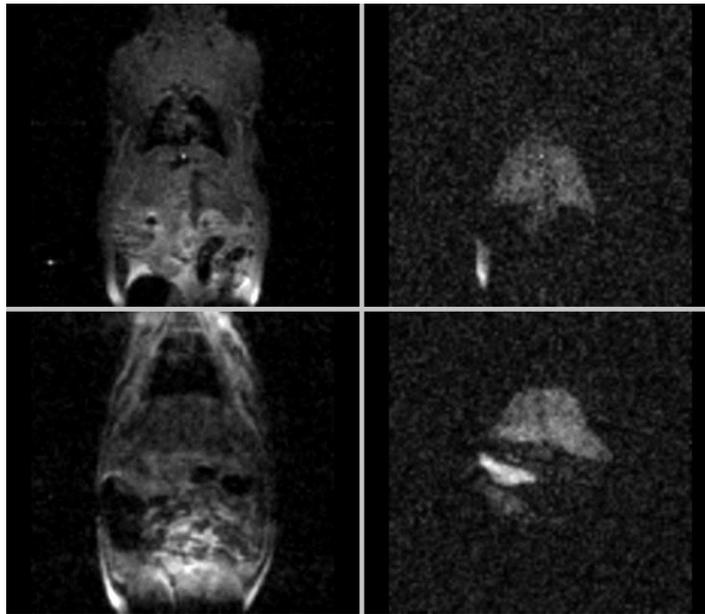


Рис. 3. ^1H МРТ изображения и ^{19}F МРТ изображения тела крысы, полученные на следующий день после внутривенного введения 2 мл препарата Перфторан® (сверху) и 2 мл новой ФУЭС (снизу) за 20 минут и 8 минут соответственно.

При разработке новых веществ важно получить детальную информацию об их интеграции в живой организм, динамике выведения, последствиях их применения. Такую информацию можно получить неинвазивно *in vivo* методом ЯМР спектроскопии.

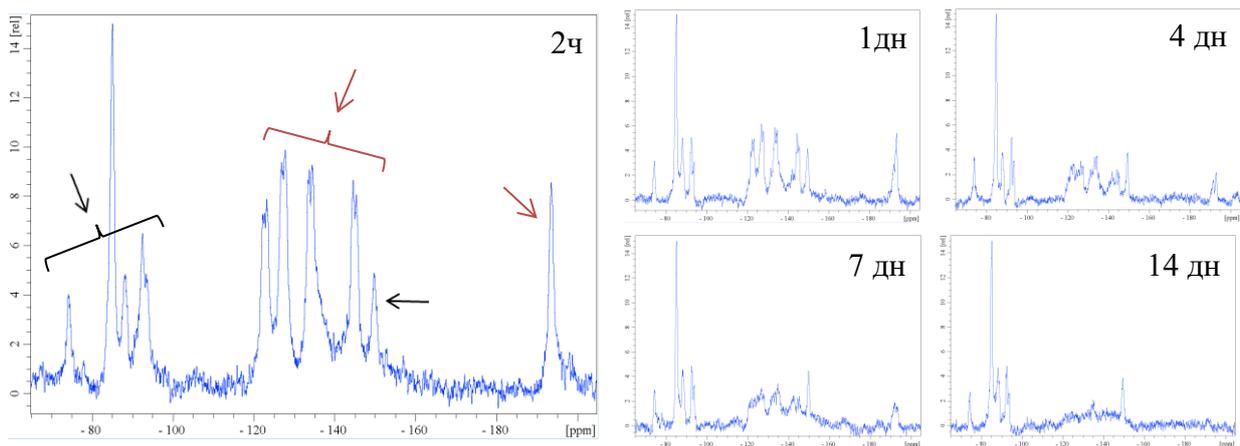


Рис. 4. Динамика изменения ^{19}F спектра ЯМР новой ФУЭС в организме лабораторной крысы. Черными и красными стрелками отмечены пики, образованные ядрами фтора-19 смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров и ПФД соответственно.

С этой целью были проведены эксперименты, в которых крысам внутривенно вводили 2 мл новой ФУЭС и наблюдали в динамике изменение ее ^{19}F спектра ЯМР от всего тела крыс спустя 2 часа, 1 день, 4 дня, 7 дней и 14 дней – рис. 4.

С помощью программы TopSpin 2.0 на ^{19}F спектрах ЯМР измерялись площади под основными пиками ПФД и смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров. В результате было определено, что ПФД наполовину выводится из организма крыс примерно за 7 дней, что хорошо коррелирует с данными биохимического анализа и нашими данными, полученными в экспериментах по МРТ в поле 0.5 Тл, в то время как концентрация смеси монобромидов перфторированных простых эфиров в течение всего периода наблюдения (14 дней) остается неизменной [8]. По-видимому, это связано с их высокой температурой кипения и, как следствие, с низкой упругостью пара смеси этих соединений.

Выводы

Исследование новой фторуглеродной эмульсии, состоящей из смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров и перфтордекалина, проведенное методами ^{19}F ЯМР спектроскопии и ^{19}F МРТ в сильном магнитном поле 7 Тл в экспериментах *in vivo* на лабораторных животных, показало следующее.

Наличие одиночного интенсивного синглета в спектре новой ФУЭС позволяет получать ее ^{19}F МРТ изображения с таким же отношением сигнал/шум, как и для препарата Перфторан®, но в 2,5 раза быстрее при одних и тех же параметрах сканирования.

С помощью ЯМР спектроскопии *in vivo* проведены исследования по определению динамики выведения ПФУ, составляющих основу новой ФУЭС. Было показано, что время полувыведения перфтордекалина составляет порядка 7 дней, в то время как время полувыведения смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров является существенно

большим – за время наблюдения (14 дней) количество ядер фтора-19 в смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров практически не изменилось.

Несмотря на долгое время полувыведения смеси двух олигомерных монобромидов перфторированных простых эфиров из организма, использование новой ФУЭС позволяет существенно сократить время накопления ^{19}F сигнала ЯМР, которое является определяющим фактором в МРТ диагностике.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП и комплекса УНУ «Биоспектротомография» при поддержке гранта РФФИ №14-02-00287_a.

Литература

1. Sotak C.H., Hees P.S., Huang H.N., Hung M.H., Krespan C.G., Raynolds S. A new perfluorocarbon for use in fluorine-19 magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Magn. Reson. Med.*, 1993, Vol.29, pp. 188-195. DOI: 10.1002/mrm.1910290206
2. Воробьев С.И. Перфторан — плазмозаменитель с газотранспортной функцией. ОНТИ ПНЦ РАН, Пушино, 1996, 48 с.
3. Волков Д.В., Гуляев М.В., Павлова О.С., Анисимов Н.В., Пирогов Ю.А. Особенности ^{19}F -МРТ исследований препарата Перфторан в магнитных полях 0.5, 7 и 11.7 Тл. *Ученые записки физического факультета МГУ*, 2016, Т.58, с. 165403-1 – 165403-3.
4. Grapentin C., Mayenfels F., Barnert S., Süß R., Schubert R., Temme S., Jacoby C., Schrader J., Flögel U. Optimization of perfluorocarbon nanoemulsions for molecular imaging by ^{19}F MRI. Seifalian A, de Mel A, Kalaskar D, editors. *Nanomedicine: One Central Press*, 2014, pp. 268-286. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.268. pmid:25696866
5. Гуляев М.В., Гервиц Л.Л., Устынюк Ю.А., Анисимов Н.В., Пирогов Ю.А., Хохлов А.Р. Получение изображений в магнитно-резонансной томографии

на ядрах ^{19}F с помощью препарата Перфторан®. *Журнал радиоэлектроники: электронный журнал*, 2013, N8. URL: <http://jre.cplire.ru/alt/aug13/11/text.html>

6. Ramskill N.P., Bush I., Sederman A.J., Mantle M.D., Benning M., Anger B.C., Appel M., Gladden L.F. Fast imaging of laboratory core floods using 3D compressed sensing RARE MRI. *J. Magn. Reson.*, 2016, V.270, pp. 187-197. DOI: 10.1016/j.jmr.2016.07.017
7. ImageJ 1.49v. <https://imagej.nih.gov/ij/>
8. Анисимов Н.В., Гервиц Л.Л., Гуляев М.В., Силачев Д.Н., Волков Д.В., Павлова О.С., Юсубалиева Г.М., Шаламова Е.А., Пирогов Ю.А., Хохлов А.Р. Методы ^{19}F ЯМР и МРТ в изучении поведения препарата Перфторан в организме лабораторных животных. *Электромагнитные волны и электронные системы*, 2015, Т.20, N8, с. 66–71.