

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н.Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ГОРОДЕЦКИЙ Артем Александрович

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

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д. ф.-м. н., профессор

Багрянская Елена Григорьевна

Новосибирск – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	14
1.1 Развитие методов ЭПР для исследований <i>in vivo</i>	14
1.1.1 Спектроскопия ЭПР	14
1.1.2 Томография ЭПР	22
1.1.3 ОМРТ для исследований <i>in vivo</i>	28
1.2 Методы реконструкции томографического изображения.....	32
1.2.1 Общий принцип получения проекций	33
1.2.2 Алгоритмы реконструкции изображения	35
1.3 Теоретические основы описания сигнала ОМРТ	41
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	46
2.1 Спектроскопия и томография ЭПР	46
2.1.1 Спиновые зонды	46
2.1.2 Экспериментальная установка.....	47
2.1.3 Выделение сердца и модель региональной ишемии.....	47
2.1.4 Проведение томографических измерений изолированных сердец	49
2.1.5 Аппроксимация спектров ЭПР	50
2.1.6 Калибровка pO_2 -чувствительного спинового зонда	51
2.1.7 Определение pH методом ЭПР	51
2.1.8 Приготовление бескислородных образцов	51
2.1.9 Исследование влияния концентрационного обмена на ширину линии ЭПР	52
2.1.10 Определение коэффициента распределения октанол-вода.	52
2.1.11 Восстановление спиновых зондов в изолированном сердце	52
2.1.12 Алгоритм реконструкции изображений.....	53
2.2 Томография ОМРТ	53

2.2.1	Спиновые зонды	53
2.2.2	Экспериментальная установка	54
2.2.3	Приготовление калибровочных образцов	54
2.2.4	Проведение томографических измерений <i>in vivo</i>	55
2.2.5	Калибровочные параметры и процедуры их извлечения	56
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		60
Глава 3. Визуализация оксигенации и pH ишемического сердца крысы		60
3.1	Изучение свойств pO_2 -чувствительного спинового зонда	60
3.2	Изучение свойств pH-чувствительного спинового зонда	63
3.3	Алгоритм реконструкции изображений	64
3.4	Визуализация оксигенации и pH фантомных образцов	66
3.5	Визуализация pO_2 и pH изолированного сердца крысы	67
Глава 4. Визуализация концентрации контрастного агента, pO_2 , pH и P_i в здоровой и опухолевой ткани мышей		73
4.1	Теоретические основы для определения концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и P_i методом ОМРТ	73
4.1.1	Утечка спиновой поляризации	73
4.1.2	Усиление сигнала для депротонированной и протонированной формы радикала .	74
4.1.3	Описание кривой титрования pH	76
4.1.4	Теоретические основы для вычисления P_i	77
4.1.5	Системы уравнений для визуализации функциональных параметров	79
4.2	Роль кислорода в эффекте утечки спиновой поляризации в экспериментах ОМРТ	81
4.2.1	Утечка спиновой поляризации, вызванная дополнительным парамагнитным агентом	82
4.2.2	Визуализация фантомных образцов	86
4.2.3	Визуализация оксигенации опухолей <i>in vivo</i>	87
4.2.4	Выбор времени релаксации протонов воды для измерений <i>in vivo</i>	88
4.3	Одновременная визуализация концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и P_i	91
4.3.1	Одновременное определение концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и P_i	91

4.3.2	Томография фантомных образцов.....	96
4.3.3	Томография здоровых и опухолевых тканей in vivo	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		104
РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ		106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		107
БЛАГОДАРНОСТИ		119

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
MPT	Магнитно-резонансная томография
OMPT	Оверхаузер-усиленная магнитно-резонансная томография
ДПЯ	Динамическая поляризация ядер
pO_2	Парциальное давление кислорода
Pi	Концентрация неорганического фосфата
ДКП	Дикарбокси проксил
RSG	Радикал ковалентно-связанный с молекулой глутатиона
dRSG	Пердеутерированный радикал ковалентно-связанный с молекулой глутатиона
TAM	Триарилметильный радикал
dTAM	Дейтерированный триарилметильный радикал
dpTAM	Дейтерированный фосфорилированный триарилметильный радикал
СТВ	Сверхтонкое взаимодействие

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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

Важными примерами таких патологий, сопровождающихся значительными изменениями в микроокружении биологической ткани, являются миокардиальная ишемия и раковая опухоль. В каждом из этих случаев концентрация кислорода и pH являются одними из наиболее важных показателей прогрессии развития патологии. Рост злокачественной опухоли происходит в условиях гипоксии из-за нарушения развития системы кровеносных сосудов. Низкая концентрация кислорода и чрезвычайно активный анаэробный гликолиз в быстро растущей опухоли являются причиной ее ацидоза. Кроме того, глубокая гипоксия стимулирует развитие опухоли в более патологические формы и повышает риск метастазирования. При миокардиальной ишемии в результате закупорки коронарной артерии ишемическая область миокарда так же испытывает дефицит кислорода. В условиях гипоксии энергетические

функции кардиомиоцитов во многом зависят от анаэробного гликолиза, в результате чего происходит закисление миокардиальной ткани. Это, в свою очередь, ведет к нарушению ионного транспорта, деполяризации клеточной мембраны и нарушению сократительной функции сердца. В конечном счете, такие процессы приводят к некрозу миокардиальной ткани (инфаркт миокарда). Возобновление потока крови (реперфузия) необходимо для прекращения действия патогенных факторов ишемии. Однако реперфузия ишемической области может приводить к образованию активных форм кислорода, что ведет к дополнительному повреждению миокардиальной ткани. Неинвазивное исследование оксигенации и рН микроокружения тканей способно предоставить новую информацию о природе патологии, ее механизмах и динамике, и стать основой для разработки новых терапевтических методов лечения заболевания. Оба вида патологий представляют собой объекты исследования в данной диссертационной работе.

Степень разработанности темы исследования

К настоящему времени в большинстве научных работ, направленных на применение томографии ЭПР для визуализации pO_2 *in vivo*, основным объектом исследования являлись опухоли животных [1-4]. В то время как оксигенация миокардиальной ткани изучалась только с помощью спектроскопического подхода без получения пространственной информации о характере распределения концентрации кислорода [5-11]. Таким образом, применение метода томографии ЭПР для визуализации оксигенации миокардиальной ткани при региональной ишемии и реперфузии поможет восполнить пробел в этой области. Что касается важности развития метода ЭПР для измерения рН живых биологических тканей, то до 2016 года применение метода осуществлялось только в рамках спектроскопического подхода [6, 12]. Часть исследований представленных в данной диссертации, посвященных визуализации ацидоза миокардиальной ткани при региональной ишемии, являются первым применением метода томографии ЭПР для визуализации рН живого биологического объекта.

Метод ОМРТ неоднократно применялся для визуализации pO_2 и рН опухолей животных с использованием экзогенных зондов, чувствительных только к одному из параметров [12-17]. Однако в этой диссертационной работе предлагается применить метод ОМРТ для одновременной визуализации оксигенации и ацидоза здоровых и опухолевых тканей мышей с использованием одного контрастного агента, обладающего чувствительностью к обоим параметрам pO_2 и рН. Следует отметить, что ранее эта идея была осуществлена только с помощью метода спектроскопии ЭПР, не позволяющей получение карт распределения искомых параметров [18].

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

Постановка цели и задач исследования

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

Для достижения цели было решено осуществить визуализацию функциональных параметров для миокардиальной ткани крыс, а так же для здоровой и опухолевой ткани молочной железы мышей. Для исследований миокардиальной ткани была выбрана модель изолированного и перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии. В качестве метода для проведения томографических измерений была выбрана томография ЭПР в сочетании с нитроксильными радикалами, спектры которых обладают чувствительностью к pO_2 и рН. Однако значительный практический интерес представляет измерение параметров pO_2 и рН в биологической ткани одновременно с помощью одного спинового зонда. Такую идею можно реализовать с помощью монофосфорилированного триарилметильного радикала, спектр ЭПР которого, помимо чувствительности к pO_2 и рН, обладает чувствительностью к концентрации неорганического фосфата (Pi) [19]. К тому же этот радикал уже зарекомендовал себя как перспективный спиновый зонд для измерения параметров микроокружения злокачественных образований с помощью спектроскопии ЭПР L-диапазона [18]. Так же было показано, что параметр Pi является новым важным показателем прогрессии развития патологии. В данной диссертационной работе предлагается расширить этот спектроскопический подход до пространственно разрешенных измерений с помощью метода ОМРТ и применить его для изучения здоровой и опухолевой ткани молочной железы мышей. Для изучения оксигенации опухолей в качестве контрастного агента для ОМРТ так же планировалось использовать триарилметильный радикал, спектр которого чувствителен только к значениям pO_2 .

По мере выполнения исследования стало понятно, что для достижения цели необходимо решить несколько дополнительных задач, таких как: разработка алгоритма реконструкции томограмм ЭПР; изучение влияния концентрации кислорода на фактор утечки в экспериментах ОМРТ; получение выражений для связи сигнала ОМРТ с параметрами pO_2 , рН и Pi. Так же необходимо отметить, что для всех рассматриваемых задач нужно продемонстрировать возможность проведения пространственно разрешенных измерений с помощью фантомных образцов.

Таким образом, для достижения цели в совокупности было запланировано решение следующих **задач**:

1. Разработать алгоритм реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР, не искажающий спектральную информацию. С использованием разработанного алгоритма продемонстрировать возможность визуализации pO_2 и pH в экспериментах с фантомными образцами.
2. С использованием pO_2 -чувствительного нитроксильного радикала визуализировать оксигенацию миокарда при перфузии, региональной ишемии и реперфузии. С использованием pH-чувствительного нитроксильного радикала визуализировать pH миокарда при региональной ишемии.
3. Исследовать влияние концентрации кислорода на фактор утечки в экспериментах ОМРТ. Продemonстрировать значимость вызванного кислородом эффекта утечки спиновой поляризации с помощью томографии фантомных образцов и мышинных опухолей *in vivo*.
4. Получить выражения, позволяющие описать зависимость значений сигнала ОМРТ от мощности накачки ЭПР, концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и P_i для экспериментов с применением монофосфорилированного триарилметильного радикала. На основе полученных выражений разработать программные алгоритмы и продемонстрировать возможность одновременной визуализации концентрации контрастного агента и параметров pH, pO_2 и P_i в экспериментах с фантомными образцами.
5. Визуализировать распределение концентрации контрастного агента и параметров pH, pO_2 и P_i в молочной железе и опухолевой ткани мыши *in vivo*.

Научная новизна работы

1. Впервые были получены карты оксигенации и pH изолированного перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии.
2. Впервые были одновременно получены карты оксигенации, pH, и распределения концентрации неорганического фосфата в здоровой и опухолевой ткани молочной железы мыши.

Практическая значимость работы

Проведенные исследования в данной диссертации являются интересными и важными с точки зрения потенциального применения в биологии и медицине. Неинвазивное изучение миокардиальной оксигенации и pH при ишемии и реперфузии может обеспечить важный вклад в понимание механизмов ишемического и реперфузионного повреждения, а также помочь в разработке новых терапевтических препаратов. Разработанный метод для одновременной визуализации pH, pO_2 и P_i является важным в исследовании онкогенеза и может внести вклад не только в понимание механизмов образования злокачественных образований, но и для

изучения других патологий. Кроме того, на данный момент не существует других методов, способных одновременно визуализировать pH , pO_2 и P_i , что делает разработанный метод томографии в своем роде уникальным. Метод позволяет получать карты искомых параметров одновременно, используя один контрастный агент, что в свою очередь, помимо удобства использования, предоставляет потенциальную возможность для наблюдения пространственных корреляций функциональных параметров.

Методология и методы диссертационного исследования

В диссертационной работе в качестве основных экспериментальных методов исследования использовались методы ЭПР и ОМРТ в сочетании с разработанными программными алгоритмами для обработки данных и решения обратных задач.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты по визуализации оксигенации и pH изолированного перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии.
2. Результаты по одновременной визуализации оксигенации, pH и распределения неорганического фосфата в здоровой и опухолевой ткани молочной железы мыши.

Личный вклад автора

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

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены и обсуждались на следующих научных школах и конференциях:

1. А.А. Городецкий, Функциональная спектроскопия и томография ЭПР изолированного сердца крысы // 52-ая Международная научная студенческая конференция “МНСК-2014”, Новосибирск, 2014 (устный доклад);

2. A.A. Gorodetsky, D.A. Komarov, Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue pH and oxygenation // III School for young scientists “Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics”, Novosibirsk, 2014 (стендовый доклад);
3. A.A. Gorodetsky, D.A. Komarov, Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue pH and oxygenation // VII International conference on nitroxide radicals “SPIN-2014”, Zelenogradsk, 2014 (устный доклад);
4. А.А. Городецкий, Д.А. Комаров, И.А. Кирилюк, Визуализация оксигенации и pH ишемического сердца крысы методом томографии ЭПР // Молодежная конференция НИОХ СО РАН, Новосибирск, 2014 (устный доклад);
5. А.А. Городецкий, Визуализация оксигенации и pH ишемического сердца крысы методом томографии ЭПР // 53-ая Международная научная студенческая конференция “МНСК-2015”, Новосибирск, 2015 (устный доклад);
6. A.A. Gorodetsky et al. Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue oxygenation and pH // Joint Conference of 9th Asia-Pacific EPR/ESR Society Symposium 1st International EPR (ESR) Society Symposium 53rd SEST Annual Meeting “APES-IES-SEST 2014”, Nara, Japan, 2014 (стендовый доклад);
7. A.A. Gorodetskii et al. Functional EPR imaging of isolated and perfused rat hearts: monitoring of tissue oxygenation and pH // 7th EFEPR summer school Advanced Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy, Berlin, Germany, August 24-31, 2015 (стендовый доклад);
8. A.A. Gorodetskii et al. Functional EPR imaging of isolated and perfused rat heart: monitoring of tissue oxygenation and pH // The 49th Annual International Meeting of the ESR Spectroscopy Group of the Royal Society of Chemistry, Colchester, UK, 2016 (устный доклад);
9. A.A. Gorodetskii et al. Dynamic Nuclear Polarization Properties of phosphonated trityl radical: imaging of pH, oxygen and inorganic phosphate // Book of Abstracts of EPR 2017, p. 84, July 16-22, 2017, Morgantown, USA (стендовый доклад);
10. A.A. Bobko, B. Driesschaert, M. Poncelet, A. Gorodetskii, U. Sanzhaeva, M. Tseytlin, O. Tseytlin, M. Dikov, T.D. Eubank, V.V. Khramtsov. Novel EPR probes and instrumentation to profile tumor microenvironment // APES-IES 2018, Brisbane, Australia, 23 - 27 September 2018, P. 33. (устный доклад);
11. A.A. Gorodetskii et al. Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging: simultaneous visualization of oxygen, pH and inorganic phosphate concentration // III International conference “Spin physics, spin chemistry and spin technology” (SPCT-2018), September 10-15, 2018, Novosibirsk, Russia (устный доклад).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 научных статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Gorodetsky A. A. et al. Functional electron paramagnetic resonance imaging of ischemic rat heart: Monitoring of tissue oxygenation and pH //Magnetic resonance in medicine. – 2016. – Т. 76. – №. 1. – С. 350-358. DOI: 10.1002/mrm.25867;
2. Gorodetskii A. A. et al. Oxygen-induced leakage of spin polarization in Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging: Application for oximetry in tumors //Journal of Magnetic Resonance. – 2018. – Т. 297. – С. 42-50. DOI: 10.1016/j.jmr.2018.10.005.
3. Gorodetskii A. A. et al. Development of multifunctional Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging and *in vivo* application to concurrent mapping of tumor interstitial oxygen, acidosis and inorganic phosphate //Scientific Reports (статья принята в печать).

Степень достоверности результатов исследований

Достоверность представленных выводов и результатов в диссертационной работе обусловлена использованием современного экспериментального оборудования. Признание значимости выводов работы мировым научным сообществом основано на публикациях в рецензируемых зарубежных журналах и высокими оценками на российских и международных конференциях.

Объем и структура работы

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

Материал диссертации изложен по главам следующим образом.

Первая глава представляет литературный обзор, описывающий состояние научных публикаций, посвященных применению ОМРТ и спектроскопии и томографии ЭПР для исследований живых биологических объектов *in vivo*. Представлен обзор ключевых публикаций, сыгравших важную роль в развитии данных методов исследования. Так как одной из поставленных задач исследования является разработка алгоритма реконструкции спектрально-пространственного изображения, в главе “Литературный Обзор” представлен обзор методов реконструкции и изложены общие математические принципы решения обратной задачи томографии. Кроме того, так как одной из поставленных задач является разработка

математического аппарата для мультипараметрической томографии, в этой главе приведены представленные в литературе теоретические основы описания сигнала ОМРТ, используемые для визуализации pO_2 и pH .

Во второй главе приведены методики приготовления образцов, описаны экспериментальные установки и указаны условия проведения экспериментов, также описаны методы обработки данных и извлечения калибровочных параметров.

В третьей и четвертой главе производится описание и обсуждение полученных результатов по темам: визуализация оксигенации и pH ишемического сердца крысы; визуализация концентрации контрастного агента, pO_2 , pH и P_i в здоровой и опухолевой ткани мышей.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Развитие методов ЭПР для исследований *in vivo*

1.1.1 Спектроскопия ЭПР

Явление ЭПР было открыто Е.К. Завойским в 1944 году [20]. С тех пор метод спектроскопии ЭПР стал незаменимым инструментом для изучения различных явлений в широком спектре научных задач. Однако применение метода ЭПР для изучения биологических объектов долгое время было затруднено, по причине того, что в традиционных спектрометрах ЭПР используется излучение с частотой 10 ГГц (X-диапазон). В связи с этим применение метода ЭПР в X-диапазоне для биологических исследований ограничивается образцами размером около 1 мм. Активное применение спектроскопии ЭПР для изучения биологических объектов стало возможным с развитием техники ЭПР в L-диапазоне (1 ГГц) и более низких частотах. Глубина проникновения микроволнового излучения L-диапазона внутрь водного образца составляет около 3 см, что уже позволяет исследовать небольшие биологические объекты, небольших животных, отдельные органы и биологические ткани. Использование более низких частот дает возможность исследовать более крупные объекты.

Первое применение метода ЭПР для исследований *in vivo* было осуществлено в 1975 году [21]. В этой работе исследователи ввели спиральный резонатор X-диапазона в печень крысы для наблюдения восстановления введенного нитроксильного радикала. Таким образом, удалось продемонстрировать возможность измерений *in vivo*, однако такой подход дальнейшего распространения не получил, что, несомненно, связано с его инвазивностью. Впервые, применение метода ЭПР в L-диапазоне для исследований *in vivo* было осуществлено в 1983 году [22]. Исследователями наблюдалось восстановление нитроксильного радикала, введенного в опухоль мыши.

Однако наибольший интерес представляет собой возможность измерения с помощью метода ЭПР функциональных параметров микроокружения биологических тканей. С появлением парамагнитных зондов с большими временами электронной релаксации стали возможны измерения концентрации кислорода. Метод ЭПР оксиметрии основан на обменном взаимодействии между используемым спиновым зондом и парамагнитной молекулой кислорода. Такое взаимодействие уменьшает время релаксации спинового зонда и, следовательно, приводит к уширению спектральной линии. Таким образом, концентрация кислорода в исследуемом образце может быть определена путем измерения ширины линии спектра ЭПР введенного в образец спинового зонда. Первая работа по измерению оксигенации *in vivo* была опубликована в 1986 году [23]. В этой работе в качестве спинового зонда был

использован изотопзамещенный нитроксильный радикал, 2,2,6,6-тетра($^2\text{H}_3$)метил-4-пиперидон-($1\text{-}^{15}\text{N}$)-(3,5- $^2\text{H}_2$)-1-оксил (ТЕМПОН). Для защиты от восстановителей исследователи поместили радикал в капсулу из проницаемого для кислорода пластика. С помощью такой капсулы, наполненной радикалом, были проведены локализованные измерения концентрации кислорода в теле мыши. Одно из первых и наиболее значимых исследований в данной области было проведено на изолированном перфузируемом сердце крысы [5]. В этой работе авторы в качестве спинового зонда использовали пиперидиновый нитроксильный радикал для наблюдения кинетики оксигенации сердца крысы при глобальной ишемии.

Помимо нитроксильных радикалов существует другой класс спиновых зондов – триарилметильные радикалы, также широко используемые для ЭПР оксиметрии. В сравнении с нитроксильными радикалами триарилметильные радикалы имеют более длинные времена электронной релаксации, вследствие чего являются более чувствительными к концентрации кислорода, а также обладают другим несомненным преимуществом – устойчивостью к восстановлению. Финский триарилметильный радикал (dTAM, структура радикала приведена на рисунке 1a) применялся для изучения кинетики оксигенации изолированного сердца крысы при ишемии и реперфузии [6]. Было показано, что парциальное давление кислорода уменьшается значительно при ишемии и восстанавливается не полностью при реперфузии по сравнению с предышемическим уровнем (см. рис. 1b).

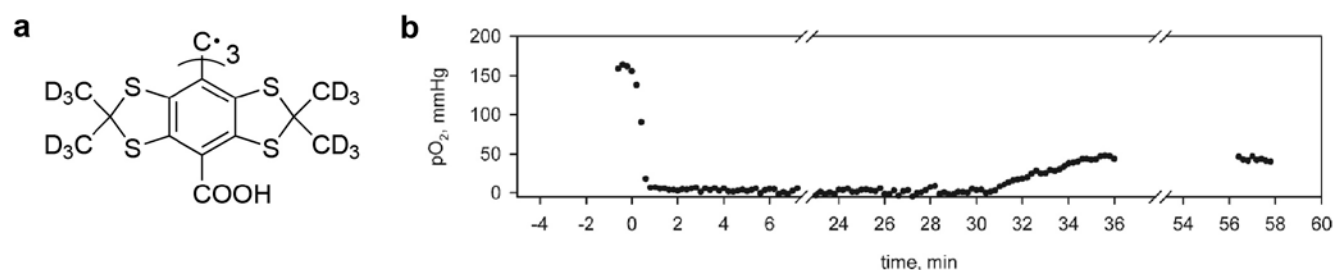


Рис. 1. (a) Химическая структура пердеутерированного триарилметильного радикала (dTAM). **(b)** Оксигенация изолированного перфузируемого сердца крысы, измеренная с помощью спектроскопии ЭПР L-диапазона. В течение эксперимента сердце было подвержено тридцатиминутному периоду ишемии и последующей реперфузии [6].

Вместо водорастворимых спиновых зондов для ЭПР оксиметрии можно использовать твердотельные парамагнитные зонды, например кристаллы фталоцианина лития [24, 25] и производные угля [26, 27]. Несмотря на то, что такие парамагнитные зонды подходят только для локализованных измерений, данный подход имеет явное преимущество – возможность вживлять кристаллы в исследуемый биологический объект и наблюдать сигнал ЭПР от одной и той же парамагнитной пробы даже в течение нескольких недель. Например, кристаллы фталоцианина лития применялись для изучения оксигенации изолированного перфузируемого

сердца крысы [7], а также для исследования оксигенации сердца мыши *in vivo* при моделировании локальной ишемии, путем перевязки коронарной артерии [8-10, 28]. В этих экспериментах животному через разрез в груди в сердце вводили кристаллы фталоцианина лития, после чего разрез зашивали и проводили измерения ЭПР.

С развитием химии синтеза нитроксильных радикалов стало возможным использовать метод ЭПР для измерения рН в биологических объектах. Прежде чем появилась такая возможность, исследователями была проделана большая работа по поиску подходящей структуры рН-чувствительных нитроксильных радикалов, подходящей для проведения измерений в физиологическом диапазоне значений рН. Впервые влияние рН на спектр ЭПР наблюдалось для нитронилнитроксильных радикалов [29], однако они не нашли дальнейшего применения для данных целей, потому что имеют сложный спектр ЭПР и легко восстанавливаются в гидроксилламины [30, 31]. Также не зарекомендовали себя как рН-чувствительные зонды пирролидиновые и пиридиновые нитроксильные радикалы, в связи с тем, что влияние рН на их спектр ЭПР является несущественным [32-34]. Самыми удачными рН-чувствительными нитроксильными радикалами являются радикалы имидазолинового и имидазолидинового типов (см. рис. 2) [35]. Атом азота в третьем положении гетероцикла таких радикалов имеет способность обратимо протонироваться, что является причиной перераспределения спиновой плотности в молекуле, следовательно, является причиной изменения константы сверхтонкого взаимодействия на азоте нитроксильной группы, которое проявляется как изменение расстояния между линиями в спектре ЭПР. К настоящему времени синтезировано большое количество разнообразных рН-чувствительных нитроксильных радикалов, обладающих чувствительностью к рН в различных диапазонах, благодаря наличию различных заместителей в разных положениях гетероцикла [36, 37]. С помощью рН-чувствительных спиновых зондов проводились исследования на изолированных органах [6], а также мышцах и крысах *in vivo* [12, 38, 39]. Имидазолиновые нитроксильные радикалы использовались для измерения рН в желудке мыши. Для того чтобы увеличить диапазон чувствительности к рН, исследователи использовали два спиновых зонда с разными константами рК [38]. Позже были синтезированы рН-чувствительные радикалы с двумя значениями рК, обладающие чувствительностью в диапазоне 2-6 единиц рН [37]. Такие зонды хорошо проявили себя для измерения рН в желудке крысы [39]. Однако наибольший интерес представляет возможность изучения различных патологий *in vivo*. Для этого необходимо, чтобы радикал был устойчив к восстановлению, не проникал через клеточную мембрану и обладал функциональной чувствительностью в физиологическом диапазоне рН 6,4-7,4. Всеми этими свойствами обладает нитроксильный радикал имидазолинового типа (RSG, данная аббревиатура расшифровывается как радикал, R, ковалентно связанный с молекулой глутатиона, GSH, через

атом серы, S) (см. рис. 3а). Благодаря пирролидиновому фрагменту, введенному в структуру молекулы, радикал RSG имеет константу pK равную 6,6. Высокая стабильность радикала обусловлена наличием этильных групп, защищающих радикальный центр молекулы. Молекула глутатиона, введенная в структуру радикала, обеспечивает его высокую водорастворимость, а также препятствует его прохождению внутрь клетки. Впервые похожая структура радикала использовалась для изучения закисления гомогената миокардиальной ткани сердца крысы при ишемии [40]. Радикал RSG применялся для изучения ацидоза перфузируемого сердца крысы при ишемии [6] и ацидоза мышечных опухолей *in vivo* [12] (см. рис. 3б и 4а).

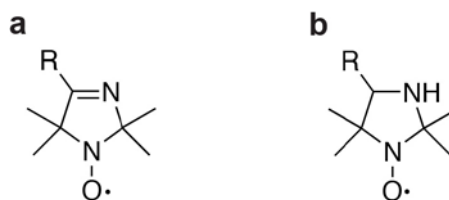


Рис. 2. Структуры pH-чувствительных радикалов имидазолинового (а) и имидазолидинового типов (б).

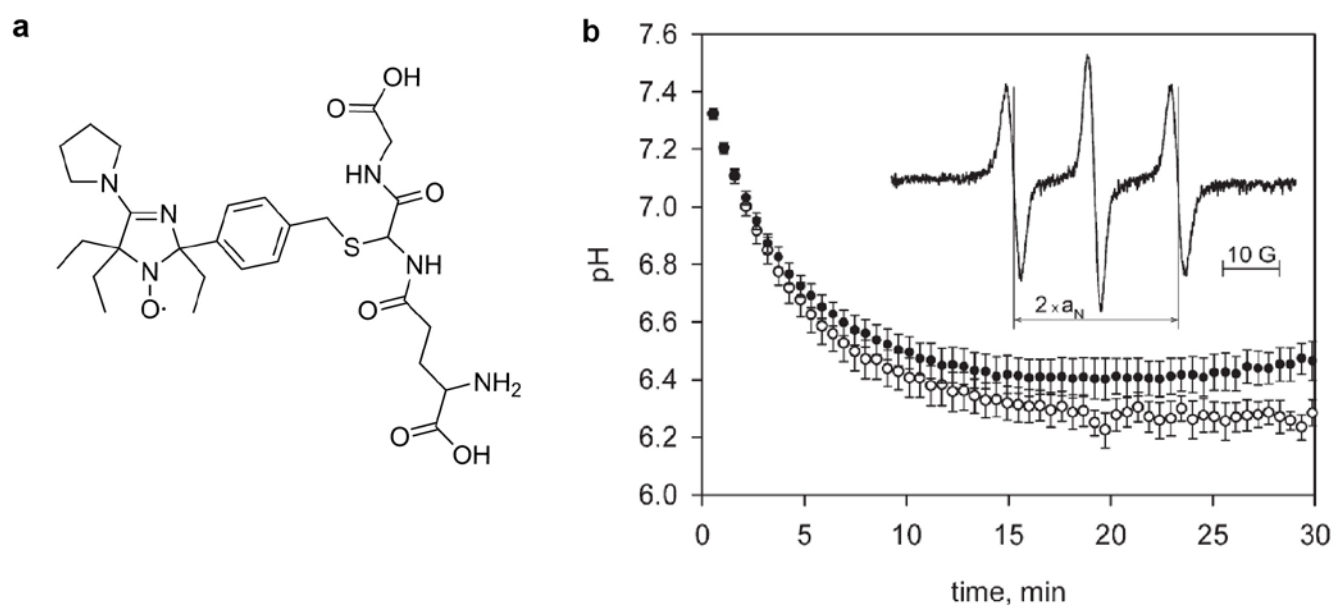


Рис. 3. (а) Структура pH-чувствительного нитроксильного радикала RSG. (б) Кинетика pH изолированного перфузируемого сердца крысы при глобальной ишемии (○) и при предварительном ишемическим preconditionированием (несколько коротких периодов ишемии перед продолжительной ишемией) (●). На рисунке так же представлен спектр ЭПР радикала RSG [6].

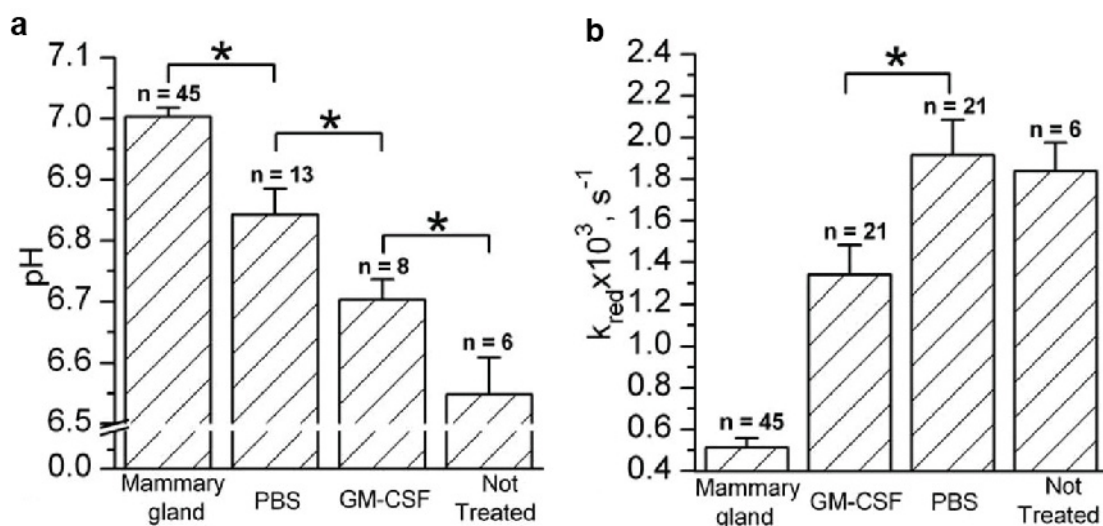


Рис. 4. (а) Значения межклеточного рН нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей, измеренные с помощью спектроскопии ЭПР *in vivo*. В качестве спинового зонда использовался рН-чувствительный радикал RSG. (б) Значения константы скорости, k_{red} , восстановления радикала RSG в нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей. Так же на рисунке представлены результаты исследования опухолей, которым вводился фосфатный буфер (PBS) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) [12].

Оксигенация и рН являются важнейшими параметрами, которые характеризуют степень развития таких патологий как ишемия и канцерогенез, поэтому спиновой зонд, обладающий одновременно чувствительностью к обоим функциональным параметрам, мог бы стать очень полезным инструментом для изучения этих заболеваний. Относительно недавно появилась возможность измерять одновременно концентрацию кислорода и рН, используя только один спиновый зонд на основе триарилметильного радикала (см. рис. 1а). Ранее было установлено, что наличие карбоксильных групп в структуре молекулы делает её ЭПР спектр чувствительным к рН, однако в диапазоне далеком от физиологического, так как константа рК карбоксильной группы слишком мала [41]. Замена карбоксильной группы на аминогруппу обеспечивает диапазон чувствительности к рН 6,8-9,0, однако из-за того, что спектр ЭПР такой пробы слишком сложен, практическое применение такого радикала для измерения рН затруднено [42]. На данный момент наиболее удачным вариантом multifunctionальной спиновой пробы является триарилметильный радикал, в котором одна из карбоксильных групп заменена на фосфатную кислоту [43] (см. рис. 5). Из-за наличия сверхтонкого расщепления на ядре атома фосфора спектр ЭПР такого радикала обладает двумя линиями. В водных растворах радикал находится в протонированной и депротонированной формах, константы СТВ которых отличаются, вследствие чего наблюдаются четыре линии в спектре ЭПР. Отношение интенсивностей спектральных линий двух форм определяется значением рН. Значение константы рК такого радикала равно 6,9, благодаря чему спиновая проба идеально подходит

для измерения рН в здоровых и опухолевых тканях. Кроме того, помимо чувствительности к кислороду и рН, спектр монофосфорилированного триарильного радикала оказался чувствительным к концентрации неорганического фосфата [19]. Данный спиновый зонд применялся для одновременного измерения рН, концентрации кислорода и неорганического фосфата в здоровых и опухолевых тканях мышей, было показано, что концентрация внеклеточного неорганического фосфата является параметром, определяющим развитие опухоли [18].

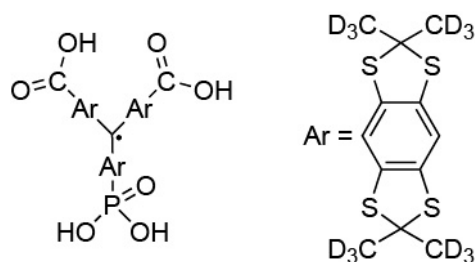


Рис. 5. Химическая структура perdeuterированного монофосфорилированного триарилметильного радикала (dpTAM).

Другим приложением функциональной ЭПР спектроскопии является измерение концентрации оксида азота (II). Молекула NO является эндогенным регулятором многих метаболических и физиологических процессов, в том числе играет важную роль в реализации микробицидной и противоопухолевой активности макрофагов и процессах реперфузионного повреждения и ишемического preconditionирования миокардиальной ткани [9, 11]. Интерес к биологической роли NO появился в 80-е годы после открытия эндотелиального расслабляющего фактора – вещества, выделяемого эндотелиальными клетками кровеносных сосудов и вызывающего расслабление гладкой мускулатуры [44]. В течение длительного времени механизм передачи сигнала от эндотелия к гладкой мускулатуре оставался неизвестным, однако позже было показано, что передача сигнала осуществляется посредством молекулы оксида азота (II) [45]. Концентрация NO в живых системах находится в субмикромольном диапазоне, поэтому для регистрации NO необходим высокочувствительный, специфический метод. По этой причине обнаружение NO в биологических системах долгое время было затруднено. Метод ЭПР для детектирования NO был разработан А. Ф. Ваниным в 80-е годы [46, 47]. Идея метода заключается в том, чтобы использовать спиновые ловушки на основе комплексов двухвалентного железа с производными дитиокарбамата. Данные комплексы, связываясь с молекулами NO, образуют стабильные мононитрозильные комплексы железа, которые являются парамагнитными и могут быть зарегистрированы методом ЭПР. В зависимости от используемых лигандов комплексы железа могут быть гидрофильными или гидрофобными, в биологических образцах такие комплексы

локализуются, соответственно, либо в межклеточном пространстве, либо в клеточной мембране.

Другой подход измерения концентрации NO с помощью ЭПР заключается в использовании нитронилнитроксильных радикалов в качестве спиновых ловушек. Взаимодействие нитронилнитроксильного радикала с молекулой NO приводит к образованию иминонитроксильного радикала. Такая реакция сопровождается изменениями в спектре ЭПР: структура из пяти линий с соотношением интенсивностей 1:2:3:2:1 переходит в структуру из семи линий с соотношением 1:1:2:1:2:1:1 [48]. Благодаря таким изменениям спектра ЭПР возможно детектирование оксида азота в биологических системах [49]. Существенным недостатком такого метода является быстрое восстановление нитронилнитроксильных радикалов в биологической среде в диамагнитные продукты. Одним из способов защиты радикала от восстановителей является их помещение в липосомы. Липидная мембрана позволяет защитить радикал от восстановителей и не препятствует прохождению NO внутрь липосом, позволяя проводить измерения NO в биологических образцах [30, 50]. Было показано, что механизм реакции нитронилнитроксильных радикалов с молекулами NO в среде с восстановителями имеет сложный характер [31]. Данная реакция изучалась в работе [31] методами ЭПР и ЯМР с использованием фторсодержащих нитронилнитроксильных радикалов. Метод спектроскопии ^{19}F -ЯМР использовался для детектирования восстановленных форм таких радикалов. Применение метода ЯМР позволило доказать, что в восстановительной среде гидроксиламины нитронилнитроксильных радикалов напрямую не взаимодействуют с оксидом азота (II), а образование гидроксиламина иминонитроксильного радикала в этой реакции происходит в результате реакции исходного нитронилнитроксильного радикала с NO и последующим восстановлением продукта. В своей дальнейшей работе авторы с использованием такого подхода показали наличие обратной корреляции между уровнем NO и артериальным давлением у крыс с врожденной гипертонией [51]. К недостаткам данного метода детектирования NO можно отнести относительно невысокую чувствительность.

Еще одним интересным направлением функциональной ЭПР спектроскопии является измерение концентрации глутатиона. Глутатион является ключевой молекулой, ответственной за поддержание окислительно-восстановительного статуса (далее будет обозначаться как REDOX статус, от reduction–oxidation reaction) внутриклеточной среды. Содержание глутатиона в клетках может достигать примерно 5 мМ. Такая высокая концентрация необходима для поддержания в восстановленной форме поверхностных SH-групп глобулярных белков. Метод ЭПР для детектирования глутатиона основан на использовании нитроксильных бирадикалов, ковалентно связанных дисульфидной связью. Такие бирадикалы являются липофильными, и поэтому могут легко проходить через клеточную мембрану. В клеточном

цитозоле бирадикал вступает в реакцию тиол-дисульфидного обмена с молекулой глутатиона, что приводит к образованию двух монарадикалов. Спектр ЭПР исходного бирадикала существенно отличается от спектров монарадикалов, что делает возможным определение концентрации глутатиона в образце [52, 53]. Впервые такой подход был предложен В. В. Храмцовым в 1997 году [52] и был применен для измерения концентрации глутатиона в крови мышей и крыс. Чувствительность метода к концентрации SH-групп составляет 10^{-6} - 10^{-7} М. Необходимо отметить, что данный метод является инвазивным, так как подразумевает использование избытка бирадикала и полное поглощение глутатиона в образце. Для измерений *in vivo* был предложен кинетический метод с использованием бирадикала имидазолидинового типа [53]. Скорость наблюдаемой реакции тиол-дисульфидного обмена пропорциональна концентрации SH-групп, что позволяет определять концентрацию глутатиона в образце, анализируя кинетику изменения спектра ЭПР. Такой подход был использован для измерения концентрации глутатиона в опухолевых тканях мышей [12, 53]. Существенным недостатком кинетического метода регистрации внутриклеточных тиолов является восстановление нитроксильных радикалов, а также зависимость скорости реакции от pH и температуры, что сильно затрудняет анализ кинетики реакции бирадикала с глутатионом.

Существенный недостаток нитроксильных радикалов для исследований *in vivo* – это способность восстанавливаться до диамагнитных гидроксиламинов. Восстановление нитроксильных радикалов можно использовать для определения REDOX статуса биологической среды. Значение REDOX статуса среды очень важно для поддержания нормальных физиологических условий, и его изменение может привести к окислительному стрессу, имеющего ряд негативных последствий. Для количественной характеристики REDOX статуса необходимо измерять кинетику восстановления спинового зонда и рассчитывать соответствующую константу скорости реакции псевдопервого порядка. Первые эксперименты по наблюдению кинетики восстановления радикалов *in vivo* были проведены на мышах [54, 55]. В роли спиновых зондов авторы использовали несколько нитроксильных радикалов пиперидинового и пирролидинового типов. Интересный результат был получен в работах [8, 9], где был измерен REDOX статус миокардиальной ткани сердца мыши в нормальных условиях, при региональной ишемии и последующей реперфузии (см. рис. 6). В качестве парамагнитного зонда был использован пирролидиновый нитроксильный радикал (3-карбоксихпроксил). Полученные данные указывают на несколько интересных фактов: REDOX статус при ишемии увеличивается примерно в два раза; после реперфузии статус устанавливается ниже доишемического уровня; несколько коротких периодов ишемии перед продолжительной ишемией (так называемое ишемическое preconditioning) способствует нормализации REDOX статуса и оксигенации миокарда при реперфузии. Последний факт указывает на то, что

прекондиционирование повышает устойчивость миокарда к реперфузионному повреждению, связанному с образованием активных форм кислорода. Метод так же применялся для измерения REDOX статуса опухолевых тканей. Например, в работе [12], упомянутый выше радикал RSG, использовался для одновременного измерения pH и REDOX статуса опухоли мышцы. Было показано, что REDOX статус исследуемой опухоли примерно в четыре раза выше, чем для здоровой ткани (см. рис. 4b).

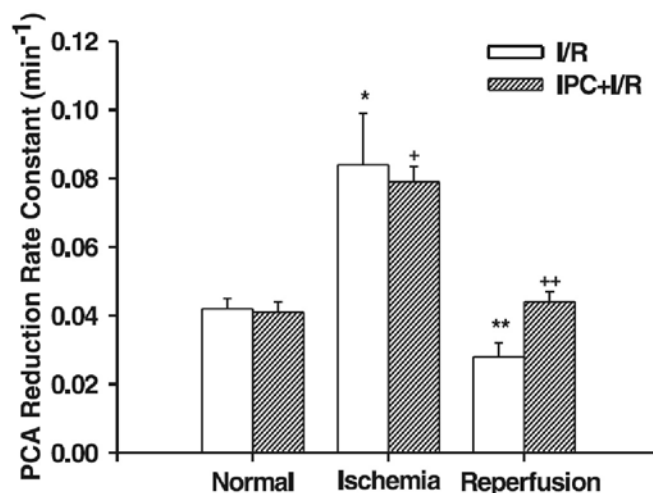


Рис. 6. Измеренные значения REDOX статуса сердца мыши при нормальных условиях, локальной ишемии и реперфузии. Изображены результаты для сердец, подверженных только процедуре ишемии и реперфузии (I/R), а также для сердец, перенесших процедуру ишемического preconditionирования (IPC+I/R) [9].

1.1.2 Томография ЭПР

Техника магнитного резонанса с использованием градиентов магнитного поля позволяет проводить пространственно разрешенные спектроскопические исследования. Этот подход был предложен и осуществлен Полом Лаутербуром для ЯМР спектроскопии в 1973 году [56]. Градиенты магнитного поля позволяют разделять сигналы магнитного резонанса от разных областей исследуемого объекта. Осуществляя сканирование данных при разных ориентациях градиента магнитного поля, получается набор проекций, с помощью которых можно восстановить распределение интенсивности сигнала в образце. Использование такого подхода в ЭПР спектроскопии позволяет получать информацию о распределении интенсивности сигнала ЭПР в исследуемых объектах. Однако такой метод предполагает инвариантность спектра ЭПР исследуемого парамагнитного зонда в образце, так как прежде чем производить реконструкцию изображения, необходимо осуществить деконволюцию исходных экспериментальных проекций со спектром ЭПР используемого зонда. Впервые эксперимент по пространственной ЭПР томографии в X-диапазоне был опубликован в 1979 году, исследователи использовали этот

метод для получения распределения парамагнитных центров в кристаллах алмаза, вызванных наличием атомов азота в кристаллической решетке [57].

Первый эксперимент по ЭПР томографии в L-диапазоне на живом объекте был опубликован в 1985 году [58]. Исследователи использовали нитроксильный радикал для получения одномерной проекции кусочка сельдерея. Позже этой же группой исследователей было получено двумерное изображение распределения нитроксильного радикала в опухоли, локализованной в хвосте мыши (см. рис. 7) [59]. Эта работа является первым применением томографии ЭПР для исследований *in vivo*.

Огромный интерес представляет визуализация функциональных параметров микроокружения биологической ткани. Метод томографии ЭПР в сочетании со специальными парамагнитными пробами предоставляет такую возможность. Для определения таких параметров необходимо обладать информацией, как меняется спектр ЭПР спиновой пробы в пространстве. Использование градиентов магнитного поля различной силы позволяет разделить спектральную и пространственную информацию. Таким образом, для получения спектра в каждой точке образца необходимо проводить сканирование данных при различных ориентациях и величинах градиента магнитного поля. Такой подход может быть использован для проведения двух-, трех- и четырехмерных спектрально-пространственных измерений. Метод был независимо разработан несколькими группами ученых из России [60], США [61] и Германии [62].

Впервые функциональная томограмма ЭПР животного, отражающая информацию о распределении функциональных параметров, была получена Ховардом Халперном с коллегами в 1994 году [63]. Было получено двумерное спектрально-пространственное изображение нитроксильного радикала (частично дейтерированный 3-карбомоил-2,2,5,5-тетраметил-3-пирролин-1-оксил) в опухоли мыши (см. рис. 8). Измерения были проведены на частоте 250 МГц, что позволило обеспечить глубину проникновения излучения вглубь биологических тканей до 7 см. Несмотря на низкое пространственное разрешение томограммы, равное 5 мм, и лишь одну пространственную координату, направленную вдоль лапы мыши, на полученном спектрально-пространственном изображении хорошо видно область гипоксии, соответствующую опухолевой ткани. Позже первая двумерная карта оксигенации живого объекта была получена в работе [64], в которой авторы визуализировали концентрацию кислорода в хвосте крысы (см. рис. 9). В качестве спинового зонда исследователи использовали нитроксильный радикал, 3-карбоксипроксил. На карте распределения концентрации кислорода отчетливо было видно различие между артериями и венами, кроме того, по картам распределения спинового зонда можно отличить кровеносные сосуды и мышечные волокна, разделенные костной тканью.

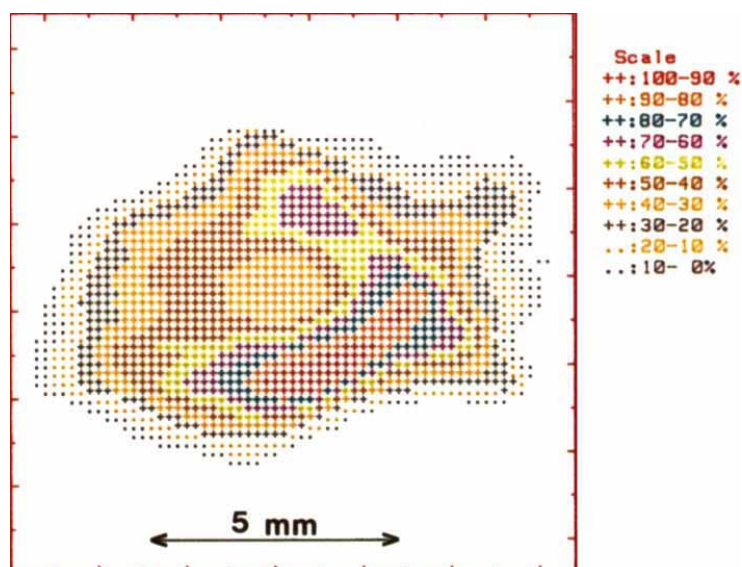


Рис. 7. Карта распределения нитроксильного радикала в опухоли, локализованной в хвосте мыши [59].

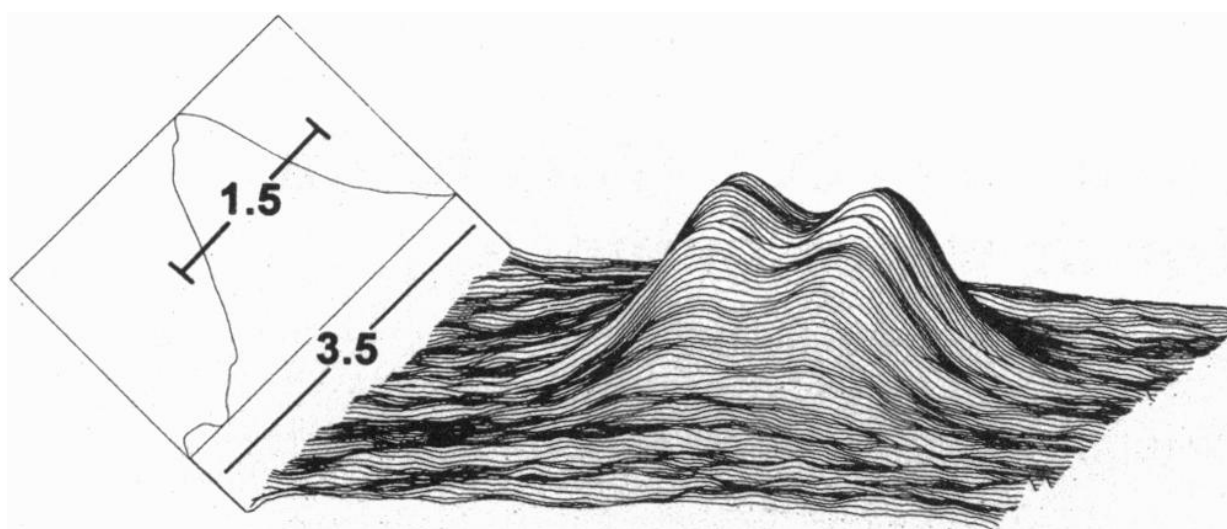


Рис. 8. Двумерное спектрально-пространственное изображение бедра мыши. Падение интенсивности и уширение спектра ЭПР в центре рисунка соответствует области гипоксии в опухоли [63].

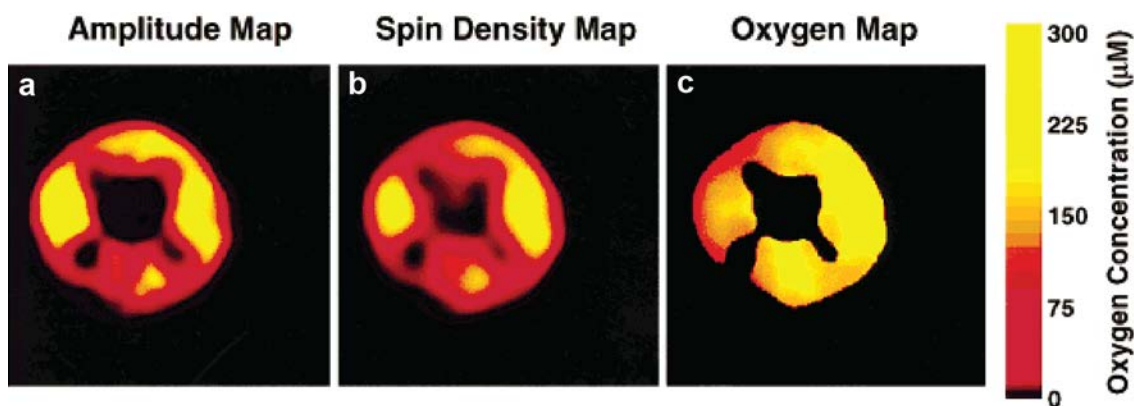


Рис. 9. Применение метода томографии ЭПР для визуализации концентрации кислорода в хвосте крысы *in vivo*. На рисунке показаны карты интенсивности спектра ЭПР (a), интегральной интенсивности

спектра ЭПР (**b**) и оксигенации (**c**) [64].

Получение полной спектрально-пространственной информации об объекте представляет большой интерес для изучения биологических объектов. Для этого нужно получить данные в четырех измерениях: в трех пространственных и одной спектральной координате. В первой работе, продемонстрировавшей применение ЭПР томографии в трех пространственных и одной спектральной координате на биологическом объекте, было получено распределение спиновой плотности и формы сигнала ЭПР в изолированном перфузируемом сердце крысы при глобальной ишемии [65]. Исследователи в качестве спинового зонда применили суспензию частиц углерода. Первая функциональная четырехмерная спектрально-пространственная томография ЭПР *in vivo* была осуществлена в работе [1], где были получены карты оксигенации опухоли мышцы. В качестве спиновой пробы использовался триарилметильный радикал OX031. Спектр данного радикала представляет собой очень узкую линию (ширина от пика до пика около 90 мГц), чувствительную к концентрации кислорода в растворе, позволяя измерять парциальное давление кислорода вплоть до 3 мм рт. ст. Результаты полученных измерений были сравнены с данными, полученными с помощью функциональной томографии ядерного магнитного резонанса, МРТ, с использованием контрастного агента на гемоглобине крови (в английской литературе для данного метода используется сокращение BOLD contrast– blood oxygen level dependent contrast). Метод функциональной МРТ томографии с использованием BOLD-контраста позволяет визуализировать оксигенацию ткани и широко применяется в клинических исследованиях. Однако существенным недостатком данного метода является то, что он не позволяет напрямую измерять концентрацию кислорода и требует применения статистических подходов анализа данных для того, чтобы пересчитать данные BOLD-MPT в единицы концентрации [66]. Сравнительный анализ полученных двумя методами изображений показал, что метод спектрально-пространственной ЭПР томографии позволяет получать более точный количественный результат [1].

Сканирование проекций спектрально-пространственных ЭПР томограмм требует значительного количества времени, что является недостатком для исследований *in vivo*. Использование импульсных методов позволяет значительно сократить время измерения, необходимое для получения томограмм. Применение импульсных методов ЭПР ограничено использованием спиновых зондов с большими временами релаксации, превышающими период Ларморовской прецессии и мертвого времени спектрометра. Идеальными спиновыми зондами для импульсной ЭПР спектроскопии и томографии являются триарилметильные радикалы. На данный момент опубликовано множество исследований, в которых были использованы радикалы данного класса для визуализации оксигенации опухолевых тканей *in vivo* [2-4]. По

сравнению с триарилметильными нитроксильные радикалы обладают более короткими временами релаксации, вследствие чего возникают проблемы с их детектированием импульсными методами. Тем не менее, существует работа, в которой с использованием изотопзамещенного нитроксильного радикала (2,2,6,6-тетра($^2\text{H}_3$)метил-4-пиперидон-(1- ^{15}N)-(3,5- $^2\text{H}_2$)-1-оксил, ТЕМПОН), авторам удалось получить карту оксигенации опухоли мыши, на которой виден значительный уровень гипоксии и неоднородности опухолевой ткани (см. рис. 10) [67]. Кроме того, эта работа является первой демонстрацией использования нитроксильного радикала, способного проходить через клеточную мембрану, в качестве спинного зонда для визуализации концентрации кислорода.

Другим направлением функциональной томографии ЭПР является визуализация концентрации оксида азота (II). Впервые образование молекул NO *in vivo* удалось визуализировать в работе [68]. Были получены трехмерные карты распределения NO в мозгу крысы при гипоксии. В качестве спинных ловушек для детектирования NO были использованы комплексы железа с диэтилдитиокарбонатом. В последующей работе исследователи визуализировали распределение NO в изолированном сердце крысы при глобальной ишемии [69]. Была получена серия изображений в зависимости от продолжительности ишемии, которые показали, что основная генерация NO происходит в середине сердца и со временем распределяется от эндокарда к эпикарду левого желудочка ткани (см. рис. 11). Спинные ловушки на основе комплексов двухвалентного железа использовались также в ряде других работ для визуализации образования NO в теле мыши [70, 71]. Кроме того, предпринимались попытки зарегистрировать образование NO *in vivo* с помощью нитронилнитроксильных радикалов [72].

Спектроскопический подход для определения REDOX статуса легко может быть расширен до томографического метода. Впервые процесс восстановления нитроксильного радикала *in vivo* был визуализирован в работе [73]. Авторы получили изображения интенсивности сигнала в животе и грудной клетке крысы после 7 и 17 минут с момента введения спинного зонда. В работе [74] было визуализировано восстановление спинного зонда в опухолевой ткани мыши с помощью серии изображений. Было установлено, что по сравнению со здоровой тканью, в опухоли спинной зонд практически полностью восстанавливается за 10 минут, что свидетельствует о высоком REDOX статусе ткани, находящейся в условиях гипоксии. В последующей работе исследователями было получено двумерное изображение константы скорости восстановления нитроксильного радикала (3-карбомоилпроксила) в мышечной опухоли (см. рис. 12) [75]. Из представленных данных видно, что окислительно-восстановительные свойства опухолевой ткани неоднородны, также было установлено, что ингибирование синтеза глутатиона уменьшает скорость восстановления

спиновой пробы, указывая на то, что глутатион играет важную роль в формировании REDOX статуса опухолевой ткани.

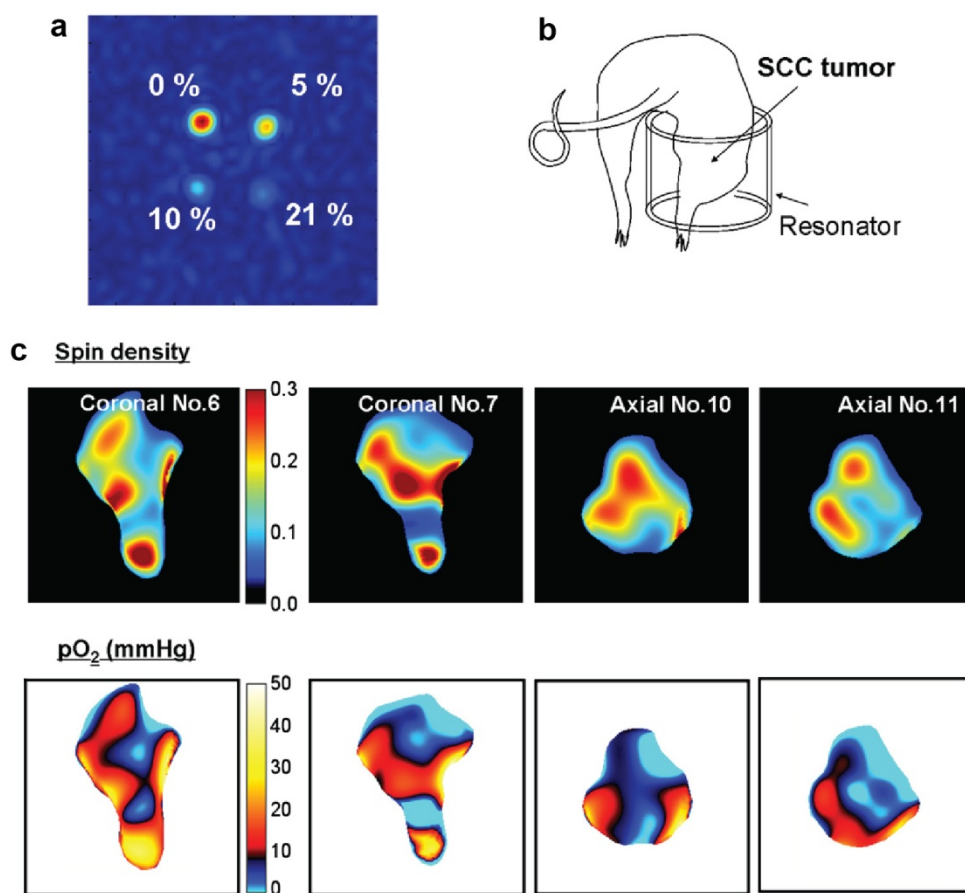


Рис. 10. Демонстрация возможности применения нитроксильного радикала для визуализации концентрации кислорода с помощью импульсной томографии ЭПР. (а) Карта интенсивности сигнала ЭПР фантомного образца, состоящего из четырех пробирок. Пробирки содержат раствор нитроксильного радикала с разным содержанием кислорода. (б) Схематичная иллюстрация мыши с опухолью, помещенной в резонатор томографа. (с) Двумерные карты интенсивности сигнала и концентрации кислорода в бедре мыши, представленные данные соответствуют коронарным и аксиальным срезам трехмерной томограммы [67].

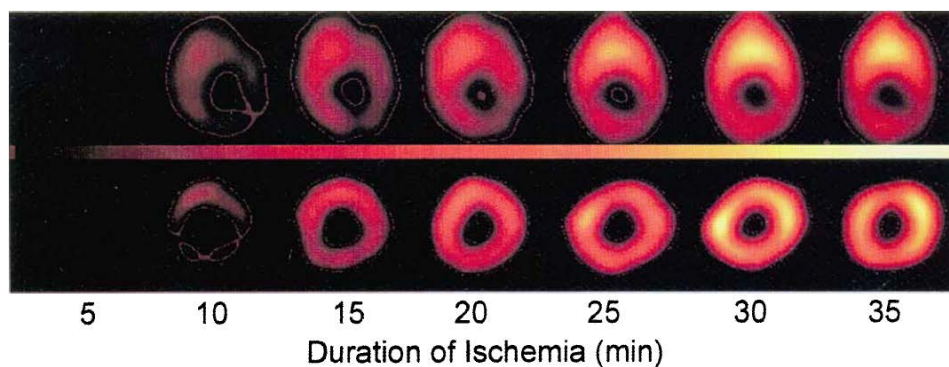


Рис. 11. Серия продольных и поперечных срезов трехмерной карты интенсивности сигнала спиновых ловушек NO ($Fe(MGD)_2NO$) в сердце крысы в зависимости от продолжительности ишемии [69].

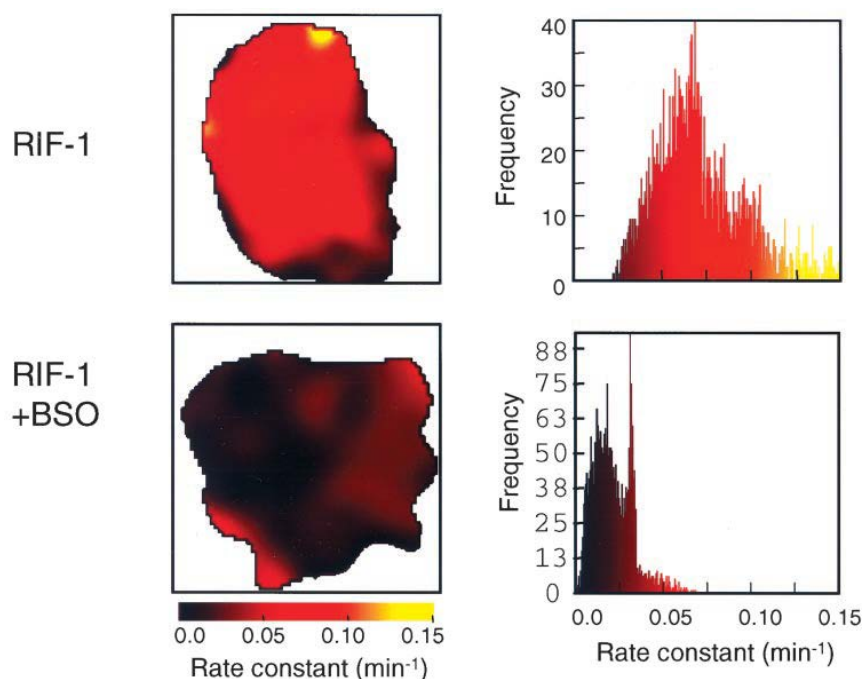


Рис. 12. Визуализация REDOX статуса опухоли мыши. Слева изображены карты константы скорости восстановления радикала, справа представлены соответствующие гистограммы. Для исследований использовались мыши с опухолями типа RIF-1 (radiation-induced fibrosarcoma – радиационно-индуцированная фибросаркома). Снизу изображены результаты исследования, полученные для мышей, которым вводился ингибитор синтеза глутатиона BSO (buthionine sulfoximine – бутионин сульфоксимин) [75].

1.1.3 *OMPT* для исследований *in vivo*

Альтернативным методом ЭПР для визуализации спиновых проб и функциональных параметров является OMPT (в англ. яз. литературе Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging, OMRI, также называемая как proton-electron double-resonance imaging, PEDRI). OMPT является уникальным методом, который комбинирует в себе функциональную чувствительность ЭПР и пространственное разрешение томографии ЯМР. В основе данного метода лежит эффект Оверхаузера – перенос электронной поляризации спиновых зондов на ядерные спины растворителя [76]. Для этого исследуемый образец подвергается насыщению микроволновым излучением на частоте ЭПР спинового зонда, после чего происходит сканирование данных ^1H -ЯМР. Перенос поляризации приводит к значительному увеличению интенсивности сигнала МРТ, при этом усиление сигнала зависит от мощности микроволнового излучения, концентрации спинового зонда, скоростей кросс-релаксационных процессов, продольной скорости релаксации протонов воды, скоростей релаксации электронов спинового зонда и ряда других важных спектральных характеристик. Впервые этот метод был разработан Д. Дж. Лурье и его коллегами в конце 80-х годов [77]. В своей первой работе авторам удалось качественно визуализировать концентрацию кислорода в фантомном образце, таким образом,

была продемонстрирована потенциальная возможность использования данного метода для визуализации кислорода *in vivo*. Долгое время данный метод применялся только для визуализации распределения спиновых зондов в исследуемых объектах [39, 78-80]. Существенное развитие ОМРТ получила с появлением триарилметильных радикалов с большими электронными временами релаксации T_1 и T_2 [81]. Взаимодействие парамагнитных молекул кислорода со спиновыми зондами приводит к существенному уменьшению сигнала МРТ, позволяя измерять концентрацию кислорода в растворе. С использованием в качестве спинового зонда гидрофильного триарилметильного радикала - ОХ063 (см. рис. 13а) методом ОМРТ были получены карты оксигенации тела крысы с хорошей функциональной чувствительностью и высоким пространственным разрешением (см. рис. 13b) [13, 14]. В последующих исследованиях метод ОМРТ так же применялся для изучения оксигенации опухолей, одновременного картирования pO_2 , времени релаксации протонов воды [15] и визуализации микрососудистой проницаемости опухоли [16].

Метод ОМРТ в сочетании со специально разработанными спиновыми пробами может быть применен для визуализации pH. Впервые такая возможность была продемонстрирована с использованием pH-чувствительного нитроксильного имидазолинового радикала [82]. Радикалы такого типа в водных растворах, имеют разные константы СТВ (см. рис. 14). Отношение интенсивностей этих спектров определяется значением pH. Таким образом, для картирования pH необходимо получение двух изображений ОМРТ, которое сопровождается варьированием постоянного поля или частоты микроволнового излучения. Из отношения интенсивностей полученных изображений рассчитывается карта значений pH. Такой подход был успешно применен для визуализации внеклеточного pH опухолей молочной железы мышей с использованием нитроксильного радикала RSG в качестве контрастного агента (см. рис. 15) [12, 17]. Также предпринимались попытки визуализации pH методом ОМРТ с использованием мультифункционального триарилметильного радикала dpTAM [83]. С помощью фантомных образцов было показано, что отношение интенсивностей изображений, полученных при частотах накачки ЭПР, соответствующих депротонированной и протонированной форме радикала, определяется значением pH.

Метод ОМРТ с использованием нитроксильных радикалов в качестве контрастных агентов является хорошим инструментом для визуализации REDOX статуса биологических тканей благодаря тому, что МРТ позволяет получать последовательный набор изображений за небольшой промежуток времени. В работе [84] была продемонстрирована возможность одновременной визуализации pO_2 и REDOX статуса мышечной опухоли с использованием одновременно двух контрастных агентов – триарилметильного радикала Ох063 (см. рис. 13а) для картирования pO_2 и нитроксильного радикала для визуализации REDOX статуса (см.

рис. 16). Кроме того, метод ОМРТ применялся для картирования REDOX статуса крысиного мозга поврежденного болезнью Паркинсона и печени мышей, страдающих фиброзом и жировым гепатозом. Важнейшим результатом является то, что во всех исследованиях значения REDOX статуса больных животных значительно отличались от значений животных из контрольной группы [85-87]. Помимо того, интересные результаты были получены при изучении REDOX статуса скелетных мышц мышей при их локальном воспалении, вызванным введением бупивакаина [88].

Перспективным направлением развития ОМРТ является визуализация протеолитической активности ферментов [89]. Протеолиз это процесс гидролиза белков ферментами и протеазами. В качестве контрастного агента в данном подходе используется нитроксильный радикал, ковалентно связанный с молекулой белка. Из-за большого размера молекулы белка значительно увеличивается вращательное время корреляции нитроксильного радикала, и как следствие укорачивается время его электронной спиновой релаксации, что приводит к подавлению усиления сигнала, вызванного эффектом Оверхаузера. После реакции протеолиза размер белка, связанного со спиновым зондом, уменьшается, что приводит к уменьшению времени корреляции и усилению сигнала МРТ. Данный подход был продемонстрирован на мышах *in vivo* с использованием в качестве контрастного агента, меченного нитроксильным радикалом эластина. В этом исследовании протеолитическая активность наблюдалась в двенадцатиперстной кишке и желудке в зависимости от способа введения агента [90].

Подводя итог данному обзору, посвященному ключевым публикациям и событиям, сыгравших важную роль в развитии методов спектроскопии и томографии ЭПР, а также ОМРТ, можно сказать, что данные методы за последнее десятилетия стали широко применяться в биомедицинских исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Эти методы позволяют неинвазивно наблюдать не только радикалы в живых органах и тканях, но и некоторые функциональные параметры, такие как оксигенация, pH, REDOX статус, концентрации глутатиона, оксида азота, неорганического фосфата и протеолитическая активность ферментов. Разработка новых спиновых зондов и развитие техники и методов парамагнитного резонанса являются ключевыми факторами расширения области применения методов томографии ЭПР и ОМРТ.

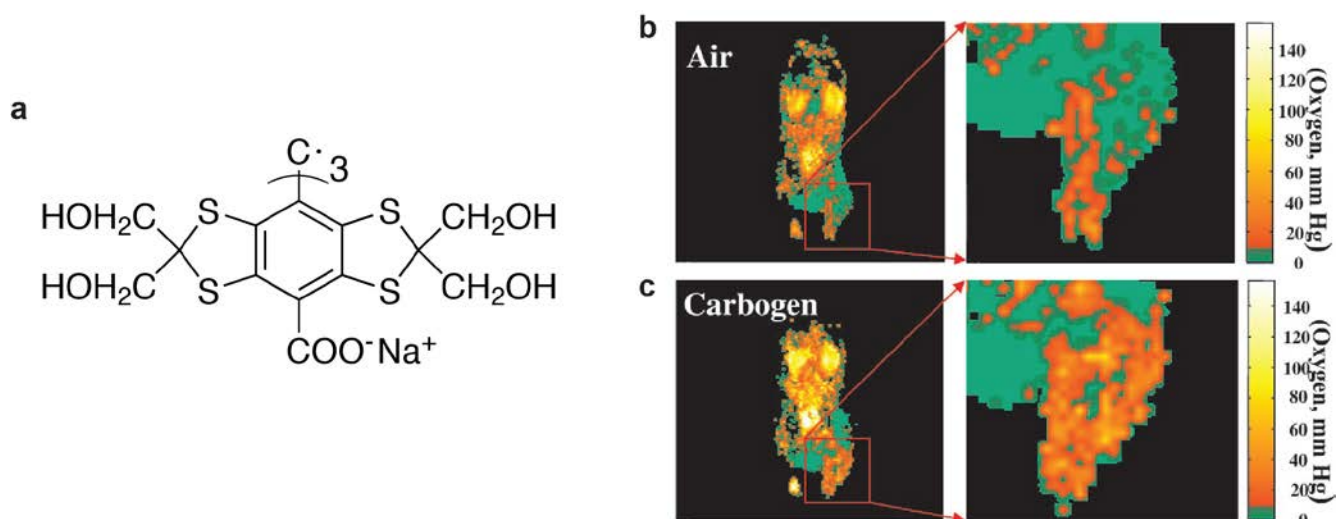


Рис. 13. (a) Химическая структура триарилметильного радикала OX063. (b, c) Карты распределения парциального давления кислорода в теле мыши, полученные методом OMPT [14]. В качестве контрастного агента использовался радикал OX063. Увеличенная область соответствует области с опухолью. Сверху и снизу изображены карты pO_2 для животных, которые дышали воздухом и карбогеном.

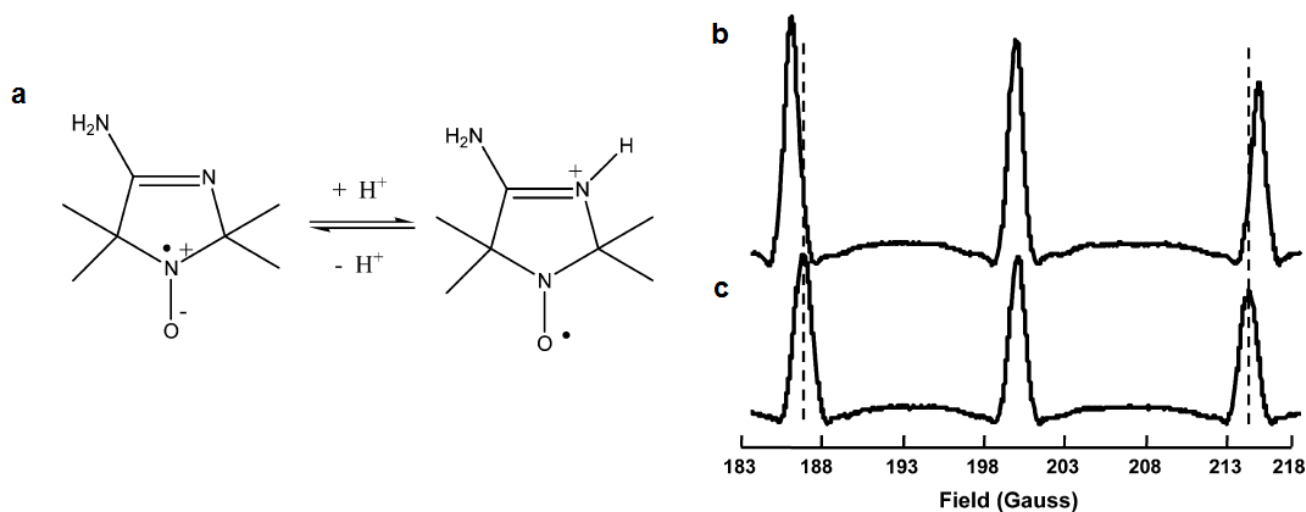


Рис. 14. (a) Реакция протонирования pH-чувствительного нитроксильного радикала R1. Изображены резонансные структуры для депротонированной и протонированной формы радикала. Спектры ДПЯ раствора нитроксильного радикала R1 при pH 7,62 (b) и 4,98 (c) [82].

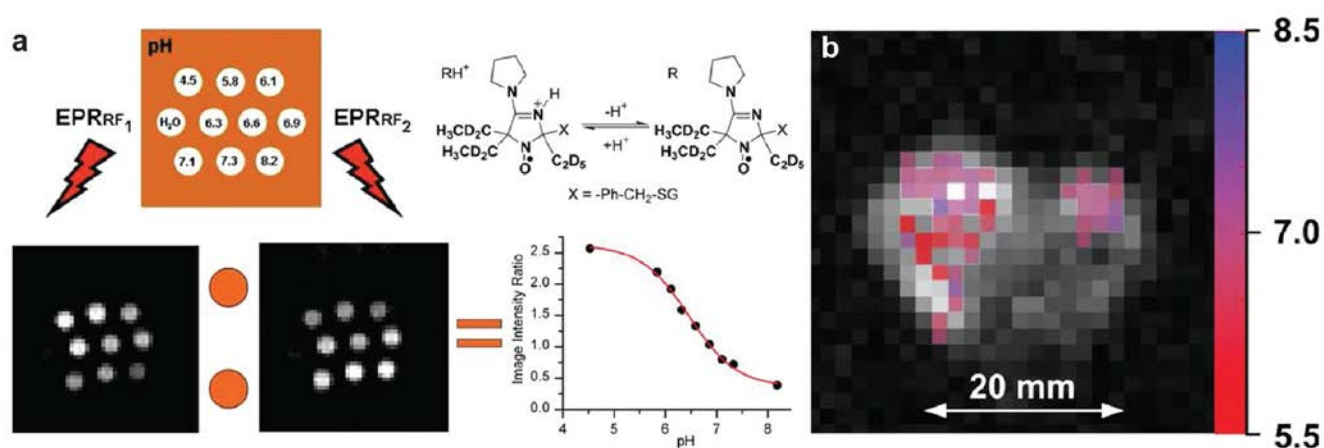


Рис. 15. (а) Иллюстрация применения метода OMPT для визуализации pH. Изображены структуры протонированной и депротонированной формы радикала dRSG. Показаны два изображения фантомного образца, полученные на двух частотах накачки ЭПР, соответствующих протонированной и депротонированной форме радикала. Фантомный образец состоит из пробирок, заполненных раствором радикала dRSG с разными значениями pH. Из отношений интенсивностей двух изображений получена калибровочная кривая для определения pH. (b) Визуализация pH в опухолевой (область слева) и здоровой (область справа) ткани молочной железы мыши. Карта pH совмещена с изображением OMPT [12].

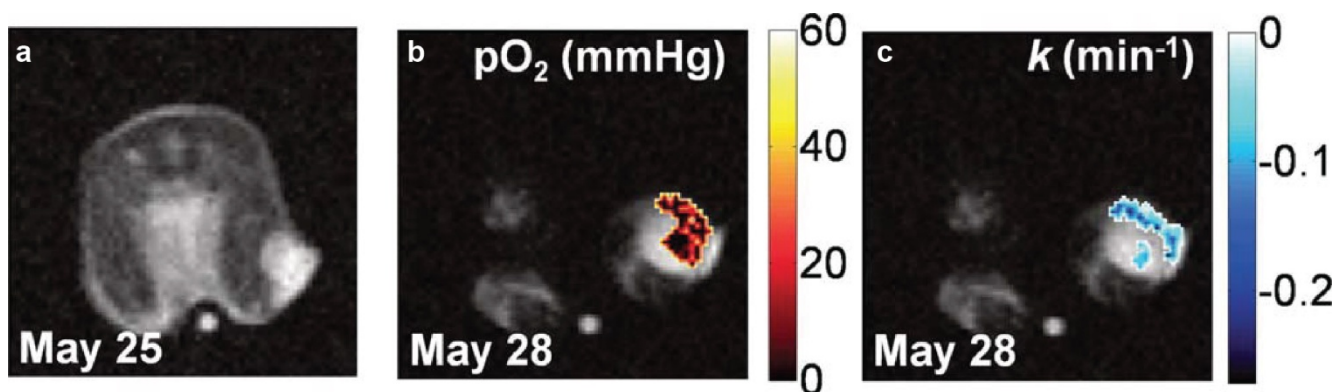


Рис. 16. Демонстрация одновременной визуализации парциального давления кислорода и REDOX статуса мышинной опухоли помощью двух контрастных агентов – триарилметильного и нитроксильного радикала. (а) Изображение MPT. (а) На рисунке представлены изображение MPT (а), карты распределения pO_2 (b) и REDOX статуса (c) [84].

1.2 Методы реконструкции томографического изображения

При проведении экспериментов в магнитно-резонансной томографии снимаются данные в присутствии градиентов магнитного поля. Данные, записанные в присутствии градиента, называют проекцией. Для получения пространственного или спектрально-пространственного изображения нужно решить обратную задачу – реконструировать исследуемый объект с помощью полученных проекций. Проблема реконструкции томографического изображения

возникла достаточно давно и уже сформировала целую область математической физики. Существует множество алгоритмов реконструкции, в основе которых, лежат общие математические принципы, но каждый из них обладает своими достоинствами, недостатками и особенностями, и в соответствии с этим являются наиболее подходящими для конкретной задачи. В этом разделе будут рассмотрены общие принципы получения проекций и основные методы реконструкции изображения. Будут рассмотрены только двумерные случаи для упрощения математических выкладок, так как двумерные алгоритмы могут быть легко расширены до трех- и четырехмерных случаев. Кроме того, любая многомерная задача может быть сведена к последовательному выполнению двумерных реконструкций.

1.2.1 Общий принцип получения проекций

Общий принцип получения проекций можно наглядно продемонстрировать на примере двумерной пространственной томографии. Пусть функция $f(x, y)$ задает распределение некоторой измеряемой величины в пространстве. Для того чтобы получить проекцию $p_\theta(s)$ под углом θ , необходимо произвести поворот системы координат и проинтегрировать функцию $f(x, y)$ вдоль направления заданного углом поворота θ (см. рис. 17):

$$\begin{aligned} \begin{pmatrix} s \\ v \end{pmatrix} &= A_\theta^{-1} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix}, \\ A_\theta &= \begin{pmatrix} \cos\theta & -\sin\theta \\ \sin\theta & \cos\theta \end{pmatrix}, \\ p_\theta(s) &= \int_{-\infty}^{\infty} f(A_\theta \cdot \begin{pmatrix} s \\ v \end{pmatrix}) dv. \end{aligned} \tag{1}$$

Заданное таким образом преобразование функции $f(x, y)$ называется преобразованием Радона. В литературе принято записывать преобразование Радона в следующем компактном виде [91]:

$$\begin{aligned} p_\theta(s) &= \iint_{-\infty}^{\infty} f(\bar{x}) \delta((\bar{x} \cdot \bar{\alpha}) - s) d\bar{x}, \\ \bar{x} &= (x, y), \bar{\alpha} = (\cos\theta, \sin\theta), \end{aligned} \tag{2}$$

где $\delta(x)$ – одномерная дельта-функция Дирака, а $(\bar{x} \cdot \bar{\alpha})$ – скалярное произведение векторов $\bar{x}$ и $\bar{\alpha}$.

Рассмотрим принцип получения проекций в спектрально-пространственной томографии на примере двумерного случая. Формально можно представить, что мы имеем дело с псевдообъектом в псевдопространстве, задаваемым пространственной и перпендикулярной ей спектральной осью координат (см. рис. 18). Для демонстрации расположим вдоль пространственной оси три образца с радикалами R_1 , R_2 и R_3 , имеющими по одной линии в спектре ЭПР, совпадающие по максимальному значению по спектральной координате, но

имеющие разные формы линии и интенсивности. При сканировании данных ЭПР в отсутствии градиента магнитного поля мы получим спектр, представляющий собой суперпозицию спектров трех радикалов. Если же при записи данных ЭПР включить градиент магнитного поля, направленный вдоль пространственной координаты, то получится сигнал с разрешенной спектральной структурой (см. рис. 18). Таким образом, с помощью градиента магнитного поля в спектр ЭПР можно вносить информацию о пространственной структуре исследуемого объекта.

Для того чтобы свести задачу получения проекций в спектрально-пространственной томографии к преобразованию Радона и уже разработанному математическому аппарату вводится понятие псевдоугла φ , определяемого из следующего соотношения [92]:

$$\tan \varphi = \frac{\text{пространственное окно}}{\text{спектральное окно}} \times \text{градиент магнитного поля.} \quad (3)$$

Такое рассмотрение позволяет при получении проекций в спектрально пространственных координатах использовать формулу (2), в которой угол θ определяется соотношением (3).

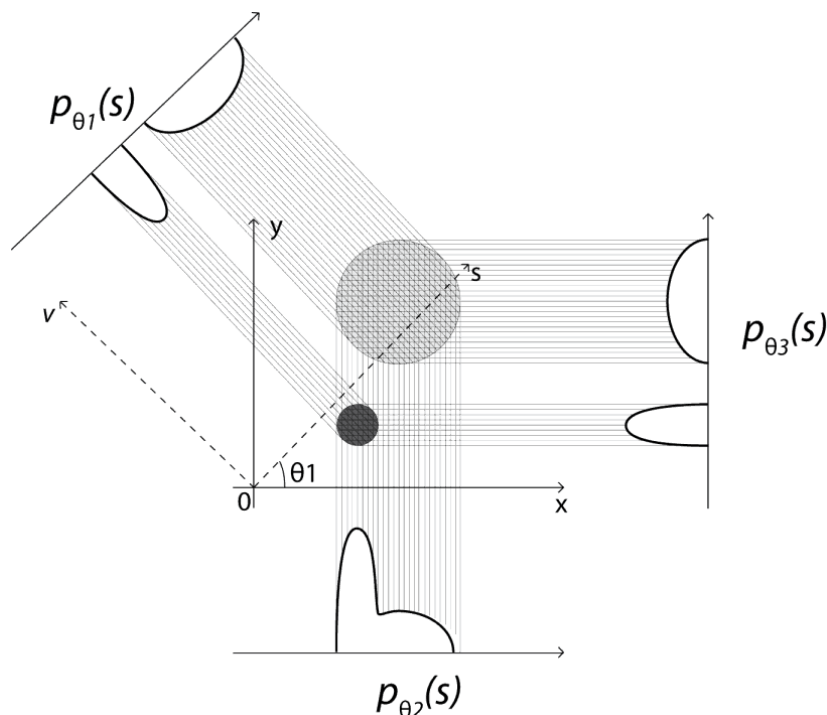


Рис. 17. Иллюстрация общего принципа получения проекций в пространственной томографии. Два круглых объекта проинтегрированы вдоль направлений, заданными углами θ_1 , θ_2 и θ_3 , в результате чего получены три проекции $p_{\theta_1}(s)$, $p_{\theta_2}(s)$ и $p_{\theta_3}(s)$.

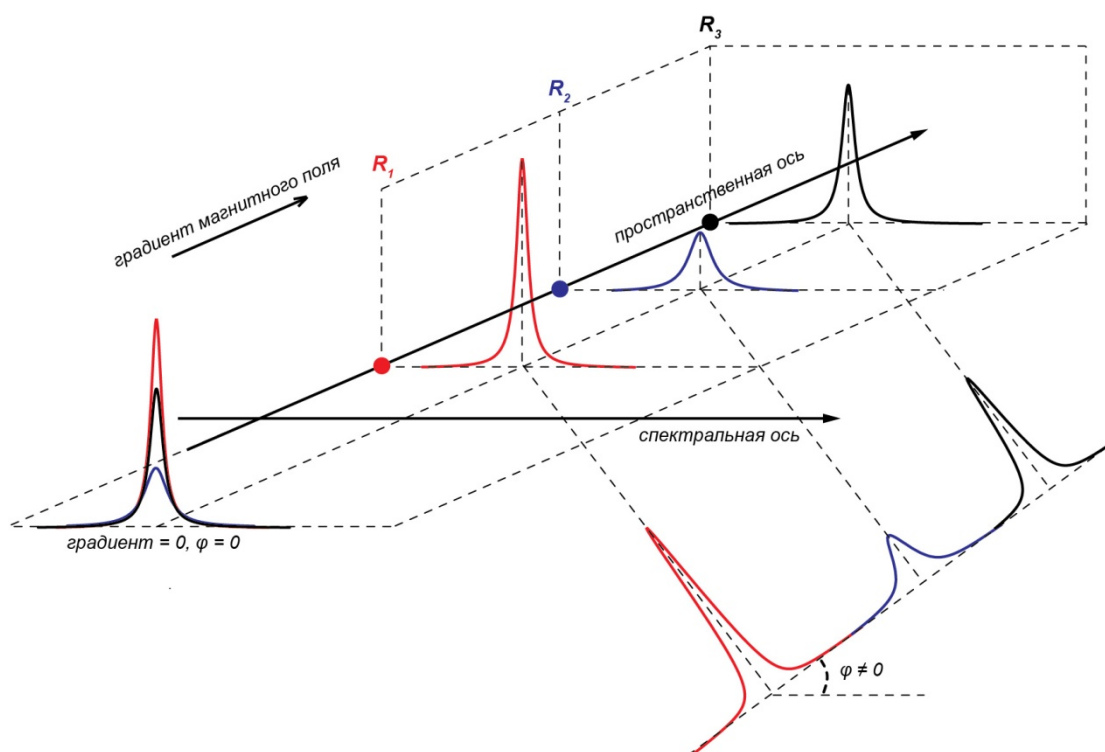


Рис. 18. Иллюстрация принципа получения проекций в спектрально-пространственной томографии. Три образца с радикалами R_1 , R_2 и R_3 расположены вдоль пространственной оси. В отсутствии градиента магнитного поля наблюдаемый спектр ЭПР такой системы представляет собой суперпозицию спектров трех радикалов. При включенном градиенте образцы радикалов оказываются в разном магнитном поле, что приводит к наблюдению разрешенной структуры в спектре ЭПР.

1.2.2 Алгоритмы реконструкции изображения

Все методы, получившие распространение в различных приложениях вычислительной томографии, можно разделить на два класса: аналитические и итерационные. Аналитические методы представляют собой численное приближение точного математического решения обратной задачи. Такие методы являются теоретически эквивалентными, но отличаются процедурой реализации. В некоторых случаях, например при малом числе проекций, точное решение обратной задачи аналитическим методом оказывается невозможным, так как оно приводит к появлению искажений в изображении. В таких случаях используют итерационные методы, которые позволяют скорректировать изображение методом последовательных приближений, приводя к более качественному решению, но с большими затратами расчетного времени.

Теорема о центральном сечении

В основе аналитических методов реконструкции лежит теорема о центральном сечении. Данная теорема дает необходимые фундаментальные соотношения для решения обратной

задачи. Согласно этой теореме в двумерном случае преобразование Фурье от проекции, $p_\theta(s)$, равно двумерному преобразованию Фурье от объекта, $f(x, y)$, в полярных координатах:

$$\begin{aligned} P_\theta(\omega) &= FT_1[p_\theta(s)], \\ \bar{\xi} &= (\xi_x, \xi_y) = \omega \bar{\alpha}, \\ F(\bar{\xi}) &= FT_2[f(\bar{x})], \\ P_\theta(\omega) &= F(\omega \bar{\alpha}), \end{aligned} \tag{4}$$

где FT_1 и FT_2 – операторы одномерного и двумерного преобразования Фурье, P_θ – фурье-образ проекции, p_θ . Доказательство теоремы о центральном сечении можно найти в источнике [91]. Очевидно, что теорема обобщается на трех- и четырехмерные случаи.

Метод фильтрованных обратных проекций

Представим функцию $f(\bar{x})$ через обратное преобразование Фурье:

$$f(\bar{x}) = \iint_{-\infty}^{\infty} F(\bar{\xi}) e^{2\pi i(\bar{x} \cdot \bar{\xi})} d\bar{\xi}. \tag{5}$$

Сделаем переход к полярной системе координат и применим теорему о центральном сечении (4):

$$f(\bar{x}) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} P_\theta(\omega) e^{2\pi i \omega(\bar{x} \cdot \bar{\alpha})} \omega d\omega d\theta. \tag{6}$$

Заменим предел интегрирования на $0 \leq \theta \leq \pi$, и позволив переменной ω быть отрицательной, уравнение (6) можно переписать следующим образом:

$$\begin{aligned} \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} P_\theta(\omega) e^{2\pi i \omega(\bar{x} \cdot \bar{\alpha})} |\omega| d\omega d\theta &= \int_0^{\pi} \tilde{p}_\theta(\bar{x} \cdot \bar{\alpha}) d\theta, \\ \tilde{p}_\theta(\bar{x} \cdot \bar{\alpha}) &= FT_1^{-1}[|\omega| P_\theta(\omega)]. \end{aligned} \tag{7}$$

Подынтегральное выражение в формуле (7) можно представить как конволюцию двух функций:

$$\begin{aligned} \tilde{p}_\theta(\bar{x} \cdot \bar{\alpha}) &= \{p_\theta * h\}(\bar{x} \cdot \bar{\alpha}), \\ h(t) &= FT_1^{-1}[|\omega|]. \end{aligned} \tag{8}$$

Подынтегральная функция $\tilde{p}_\theta$ называется псевдопроекцией, и представляет собой исходные проекции, p_θ , свернутые с весовой функцией, $h(t)$, обладающей частотным ответом $|\omega|$.

Таким образом, теоретически можно реконструировать исходное изображение методом фильтрованных обратных проекций (в английской литературе для такого метода реконструкции используется название "filter back-projection algorithm"). Однако в эксперименте регистрируется только некоторое конечное число проекций, поэтому выражение для реконструкции изображения нужно представить в виде ряда (где n – число проекций):

$$f(x, y) \approx \sum_{i=1}^n \tilde{p}_{\theta_i} (x \sin \theta_i + y \cos \theta_i). \quad (9)$$

Существенным недостатком данного метода реконструкции является чувствительность к шуму, так как конволюция проекций с весовой функцией ведет к увеличению высокочастотной составляющей исходных проекций. Для подавления высокочастотного шума к весовой функции можно применить фильтр низких частот, $W(\omega)$. Тогда выражение для весовой функции в (8) будет выглядеть следующим образом:

$$h'(t) = FT_1^{-1}[|\omega| \cdot W(\omega)] \quad (10)$$

Таким образом, реконструкция изображения осуществляется суммированием псевдопроекции, прошедших процедуру конволюции с функцией $h'(t)$. Данный метод широко применяется в магнитно-резонансной томографии и томографии ЭПР. Наиболее часто при реконструкции изображений используются фильтры Шепа-Логана, Хэмминга, Ханна и косинусный фильтр [91]. Среди недостатков данного метода реконструкции необходимо отметить, что приближение (9) приводит к хорошему результату только при достаточно большом количестве проекций. Кроме того, применение фильтра низких частот, в случае спектрально-пространственной томографии ЭПР может приводить к искажению формы линии ЭПР.

Метод Фурье реконструкции

Метод Фурье реконструкции является прямым следствием теоремы о центральном сечении (4):

$$f(\bar{x}) = FT_2^{-1}[FT_1(p_\theta)] \quad (11)$$

Реконструкцию изображения этим методом можно разделить на следующие стадии. Сначала фурье-образы исходных проекций размещают на плоскости под соответствующими им углами, θ_i . Так как фурье-образы проекций представляют собой дискретный вектор значений, далее необходимо выполнить переход от полярной к декартовой сетке координат. Такой переход осуществляется путем интерполяции данных. Искомое изображение получают путем обратного двумерного преобразования Фурье от полученного в декартовой сетке координат образа. Несмотря на кажущуюся простоту такого метода реконструкции, интерполяционный переход между полярной и декартовой сеткой координат является нетривиальной задачей, к тому же в случае трех- и четырехмерных томограмм интерполяция данных существенно усложняется. Данный метод реконструкции широко применяется в компьютерной томографии [93], а также использовался некоторыми научными группами для реконструкции спектрально-пространственных изображений в ЭПР томографии [94].

Приближения, допущенные при решении обратной задачи аналитическими методами, приводят к тому, что при недостаточном количестве проекций, проекции от полученного изображения могут значительно отличаться от исходных экспериментальных данных. В методе фильтрованных обратных проекций причиной данной неоднозначности является то, что на практике интеграл (7) заменяется суммой (9). В методе Фурье реконструкции неоднозначность может возникнуть при малом количестве проекций из-за недостаточного количества данных для выполнения корректной интерполяции. Итерационные методы реконструкции позволяют устранить неоднозначности и искажения в конечном изображении. Однако главным недостатком таких методов является необходимость выполнения громоздких вычислений. Самым простым в исполнении итерационным методом реконструкции является метод алгебраического восстановления.

Основной процесс всех итерационных алгоритмов – это дискретизация объекта $f(x, y)$ на пиксели (f_j – значение в j -ом пикселе, m – общее число пикселей). В алгоритме алгебраического восстановления каждый пиксель исходного объекта находится с помощью решения системы линейных уравнений:

$$p_i = \sum_{j=1}^m w_{ij} f_j, \quad (12)$$

где p_i – i -ая точка проекции, w_{ij} – весовые коэффициенты, которые определяются как доля j -го пикселя исходного объекта, попавшего в сумму для i -ой точки проекции p_i . Для решения системы линейных уравнений применяют метод последовательных приближений [95].

Метод алгебраического восстановления можно применить, не решая систему уравнений (12) непосредственно, а применив следующие соображения [96]. При реконструкции сначала вводится исходное распределение f_j , оно может быть любым, например нулевой матрицей. Кроме того, в качестве исходного распределения можно использовать изображение, полученное другими методами реконструкции. Далее с помощью преобразования Радона вычисляется проекция $p_{\theta_i}(s)$. Полученная проекция сравнивается с соответствующей ей экспериментальной проекцией, $p_{\theta_i}^{exp}(s)$, и их разница проецируется на исходное распределение f_j . Процедура повторяется с остальными проекциями, таким образом, вносится поправка во все точки реконструируемого изображения. Дополнительно по истечению каждой такой итерации в реконструируемое изображение может вноситься априорная информация о реконструированном объекте. Итерационный цикл повторяется до тех пор, пока не будет

достигнута требуемая сходимость проекций от реконструированного объекта с экспериментальными проекциями.

Несмотря на простую математическую основу метод алгебраического восстановления является одним из самых точных методов реконструкции, имеет простую математическую основу и позволяет получать качественное изображение даже в том случае, когда экспериментальные проекции имеют невысокое отношение сигнала к шуму, потому что высокочастотный шум усредняется в итерационном цикле. Значительным недостатком такой реконструкции изображения является большой объем вычислений, требуемый значительного количества расчетного времени. Впервые метод алгебраического восстановления был применен в работе [97] и сейчас широко используется для реконструкции изображения в различных приложениях, в том числе и томографии ЭПР [57, 98-100].

Итерационный алгоритм Гершберга-Папулиса

Алгоритм Гершберга–Папулиса является итерационным модифицированным методом Фурье реконструкции. Необходимым требованием для его применения является то, что исследуемый объект должен быть ограничен в пределах пространственного окна томограммы. То есть значения функции $f(x, y)$, задаваемой распределение некоторой измеряемой величины в пространстве, вне определенной области должны равняться нулю. Тогда фурье-образ объекта является аналитической функцией и его можно реконструировать, используя фурье-образы экспериментальных проекций [101, 102].

Процесс реконструкции изображения этим методом можно разделить на следующие стадии. На первой стадии из проекционных данных с применением интерполяции создается первичный фурье-образ объекта. Далее выполняется обратное двумерное преобразование Фурье. В полученное изображение вносится априорная информация о нулевых точках объекта, после чего снова выполняется двумерное преобразование Фурье. Полученный образ корректируется с использованием экспериментальных проекций, и далее итерационный цикл повторяется.

Несмотря на то, что метод Гершберга-Папулиса сложен в реализации, и на каждом итерационном цикле необходимо прибегать к интерполяции данных, он нашел применение для реконструкции изображений в доплеровской, компьютерной и магнитно-резонансной томографии [103-105].

Метод максимума энтропии

В том случае, если число экспериментальных проекций невелико, возникает проблема неоднозначности реконструкции томографического изображения, так как разные объекты могут

удовлетворять исходным экспериментальным проекциям. В таких случаях, так называемой малоракурсной томографии, для реконструкции изображения можно использовать метод максимума энтропии.

Вводится функционал энтропии [106]:

$$\Psi(f) = - \iint f(x, y) \ln[f(x, y)] dx dy, \quad (13)$$

где интеграл (13) берется по всему объекту. Максимум энтропии находят методом множителей Лагранжа, с условием, определяемым выражением (2):

$$\Psi(f, \lambda) = \Psi(f) - \sum_{\theta} \int \lambda_{\theta}(s) \left[p_{\theta}(s) - \iint f(x, y) \delta(x \sin \theta + y \cos \theta - s) dx dy \right] ds, \quad (14)$$

где λ_{θ} - множители Ланранжа. После взятия частной производной по переменной f и приравнивания её к нулю можно получить следующее выражение:

$$f(x, y) = \prod_{\theta} H_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta), \quad (15)$$

$$H_{\theta}(s) = \exp(\lambda_{\theta}(s) - 1/K),$$

где K – это количество углов. Функции $H_{\theta}(s)$ находятся путем подстановки выражения (15) в (2), для решения полученной системы уравнений используется метод Гаусса-Зейделя. Таким образом, функции $H_{\theta}(s)$ находятся из следующей итерационной схемы:

$$H_j^{i+1} = \frac{p_j(s)}{\int dp \prod_{k \neq j} H_k^i(s \cos \theta_{jk} - p \sin \theta_{jk})}, \quad (16)$$

где $\theta_{jk} = \theta_j - \theta_k$. После окончания итераций искомое изображение можно получить с помощью формулы (15).

Необходимо отметить, что введенная в этом методе энтропия (13) является функцией интенсивности пикселей изображения и не содержит напрямую пространственной и спектральной информации, данная информация учитывается благодаря использованию условия (2) при составлении функционала Лагранжа (14).

Метод максимума энтропии также применяется в сочетании с другими методами, например в сочетании с методом алгебраического восстановления. Такая комбинация называется мультипликативным методом алгебраического восстановления. Идея метода заключается в решении системы уравнений (12) с выполнением условия максимума энтропии (13).

Метод максимума энтропии целесообразно использовать при очень малом числе проекции (около десяти в двумерной задаче). Тогда метод дает качественный результат, быстро сходиться и требует меньше времени на расчет. Из других достоинств можно отметить то, что метод максимума энтропии не чувствителен к высокочастотному шуму [106]. Существуют

работы, в которых проводили сравнительный анализ между различными методами реконструкции изображения. На примере ЭПР томографии было показано, что метод максимума энтропии и его комбинация с методом алгебраического восстановления по сравнению с аналитическими методами реконструкции, такими как метод фильтрованных обратных проекций, дают наиболее качественный результат при малом числе проекций [107-109].

Выше были рассмотрены основные методы реконструкции изображения, для двумерных объектов. Данные методы легко обобщаются на трех- и четырехмерные случаи путем введения пространственного азимутального угла и спектрального псевдоугла (3).

1.3 Теоретические основы описания сигнала ОМРТ

В данном параграфе будут рассмотрены теоретические выражения, используемые в литературе для визуализации параметров pO_2 и pH с помощью метода ОМРТ.

Усиление сигнала ЯМР, вызванное эффектом Оверхаузера, для системы из двух спинов $\frac{1}{2}$, где S электронный спин, а I спин протонов воды, описывается следующим выражением [76]:

$$E = |I_z/I_0| = |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f \cdot S|, \quad (17)$$

где I_z и I_0 – поляризация ядерных спинов в присутствии и отсутствии накачки ЭПР; γ_S и γ_I – значения гиромагнитных отношений для электрона и протона, соответственно; ε – фактор связи, который характеризует эффективность переноса поляризации с электронных на ядерные спины; f – фактор утечки, который характеризует эффективность релаксации протонов в присутствии контрастного агента; S – фактор насыщения, определяющий степень насыщения электронного энергетического уровня. Выражение (17) может быть использовано для описания усиления сигнала для контрастных агентов, содержащих одну линию в спектрах ЭПР и ДПЯ (например, для триарилметильных радикалов ТАМ и ОХ063 [13, 81]).

Энергетическая диаграмма для системы контрастного агента с электронным спином $\frac{1}{2}$ и протонов воды имеет четыре энергетических уровня, связанных между собой переходами, как показано на рисунке 19. Фактор утечки определяется через скорости этих переходов, а также может быть записан как функция от концентрации контрастного агента:

$$f(C) = \frac{2w_I + w_0 + w_2}{2w_I + w_0 + w_2 + w^0} = 1 - T_1/T_{10} = \frac{r \cdot C \cdot T_{10}}{1 + r \cdot C \cdot T_{10}}, \quad (18)$$

где w_I и w^0 – 1H скорости переходов в присутствии и отсутствии радикала; w_0 и w_2 – скорости переходов, вызванных диполь-дипольным и контактным взаимодействиями; T_1 и T_{10} – времена

релаксации протонов воды в присутствии и отсутствии спинового зонда; r – константа скорости релаксации; C – концентрация контрастного агента.

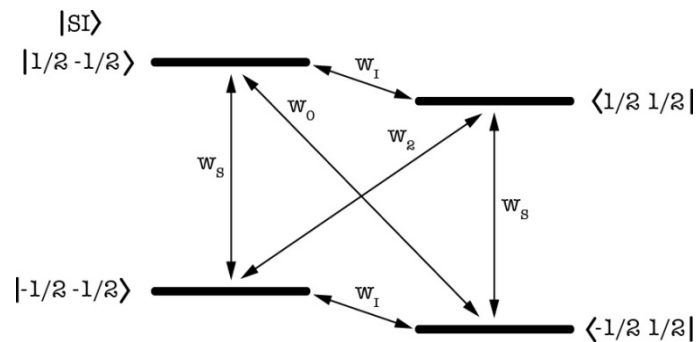


Рис. 19. Диаграмма энергетических уровней для системы двух спинов $1/2$, где S есть электронный спин, а I спин протонов воды. Скорости переходов обозначены следующими символами: w_I – ядерный переход; w_S – электронный переход; w_0 и w_2 – скорости переходов, вызванных диполь-дипольным и контактным взаимодействиями.

Фактор насыщения может быть записан как функция от мощности накачки ЭПР (P) [76]:

$$S(P, C, C_{O_2}) = \frac{\alpha \cdot P}{1/(\gamma_S^2 T_{1e} T_{2e}) + \alpha \cdot P}, \quad (19)$$

где α – фактор эффективности резонатора, определяемый для каждого образца в калибровочном эксперименте, как коэффициент пропорциональности между мощностью накачки ЭПР и квадратом переменного магнитного поля, $B_1^2 = \alpha \cdot P$; T_{1e} и T_{2e} – продольное и поперечное время релаксации электронных спинов парамагнитного зонда. Влияние концентрации контрастного агента и концентрации кислорода на эти времена релаксации может быть описано следующим полуэмпирическим выражением [13]:

$$1/(\gamma_S^2 T_{1e} T_{2e}) = (a_0 + a_1 \cdot C + a_2 \cdot C_{O_2})^2, \quad (20)$$

где a_0 , a_1 , и a_2 являются экспериментально определяемыми параметрами; C_{O_2} – концентрация кислорода в растворе.

Таким образом, усиление сигнала МРТ может быть выражено как функция мощности СВЧ поля и концентраций контрастного агента и кислорода:

$$E = |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f(C) \cdot S(P, C, C_{O_2})|. \quad (21)$$

Максимальное усиление сигнала при бесконечной мощности будет выражаться следующим образом:

$$E_{max} = E(P \rightarrow \infty) = |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f(C)|. \quad (22)$$

Из формулы (21) следует, что для того чтобы визуализировать концентрации кислорода и контрастного агента, необходимо получить два изображения ОМРТ при двух различных

мощностях накачки ЭПР, P_1 и P_2 [13, 14]. В работах [13, 14, 16] использовалось приближение $r \cdot C \cdot T_{10} \ll 1$, оправданное тем, что для тритильных радикалов в крови $r \cdot T_{10} \approx 0,1$ [81]. Данное приближение позволяет упростить выражение для фактора утечки следующим образом:

$$f(C) = r \cdot C \cdot T_{10}. \quad (23)$$

Тогда система уравнений для усиления сигнала E_1 и E_2 при двух мощностях P_1 и P_2 может быть решена аналитически относительно переменных C и C_{O_2} :

$$C = \frac{1}{(\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot r \cdot T_{10}} \cdot \frac{(E_1 + 1)(E_2 + 1)(P_2 - P_1)}{P_2(E_1 + 1) - P_1(E_2 + 1)},$$

$$C_{O_2} = \frac{1}{a_2} \cdot \left(\sqrt{\frac{\alpha P_1 P_2 (E_2 - E_1)}{P_2(E_1 + 1) - P_1(E_2 + 1)}} - a_0 - \frac{a_1}{(\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot r \cdot T_{10}} \cdot \frac{(E_1 + 1)(E_2 + 1)(P_2 - P_1)}{P_2(E_1 + 1) - P_1(E_2 + 1)} \right). \quad (24)$$

Таким образом, с помощью выражений (24) концентрации кислорода и контрастного агента могут быть визуализированы с использованием двух изображений ОМРТ, полученных при разной мощности накачки ЭПР и одного изображения МРТ (без накачки ЭПР) [13, 14, 16]. Напомним, что приведенные выражения применимы для описания усиления сигнала МРТ с помощью контрастного агента, имеющего одну линию в спектрах ЭПР и ДПЯ.

При наличии сверхтонкого взаимодействия, например, обусловленного ядрами ^{14}N или ^{15}N , как в нитроксильных радикалах, или ядром ^{15}P в фосфорилированном триарилметильном радикале [43] в спектрах ЭПР и ДПЯ наблюдается несколько линий. При этом обменное взаимодействие приводит к искажению спектральных линий. Усиление сигнала МРТ с такими контрастными агентами описывается тем же уравнением (17), где фактор насыщения выражается следующим образом [110]:

$$S(P, C, C_{O_2}) = \frac{1}{n} \cdot \frac{\alpha \cdot P}{1/(\gamma_S^2 T_{1e} T_{2e}) + \alpha \cdot f_{exc}(C) \cdot P}, f_{exc}(C) = \frac{1 + C \cdot w_{exc} \cdot T_{1e}}{1 + n \cdot C \cdot w_{exc} \cdot T_{1e}}, \quad (25)$$

где n – число линий в спектре ЭПР, $f_{exc}(C)$ – параметр, описывающий влияние концентрационного обмена на фактор насыщения, w_{exc} – константа скорости концентрационного обмена. Выражение (25) справедливо при условии, что расстояние между линиями спектра ДПЯ много больше их ширины. Энергетическая диаграмма уровней для системы протонов воды и таких контрастных агентов представляет собой рассмотренную ранее на рисунке 19 диаграмму четырех спиновых состояний, дублированную n раз, что соответствует различным проекциям спина ядра. В таком рассмотрении группы уровней,

соответствующих определенной проекции спина ядра, связаны между собой только переходами, вызванными процессом концентрационного обмена [110].

Явление концентрационного обмена приводит к увеличению усиления сигнала МРТ. Действительно, как можно заметить, в данном случае максимальное усиление сигнала выражается следующим образом:

$$E_{max} = E(P \rightarrow \infty) = \left| 1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f(C) \cdot \frac{1}{n} \cdot \frac{1 + n \cdot C \cdot w_{exc} \cdot T_{1e}}{1 + C \cdot w_{exc} \cdot T_{1e}} \right|. \quad (26)$$

В параграфе 1.1 упоминалось, что существует возможность визуализации рН методом ОМРТ с помощью рН-чувствительных радикалов. Данные радикалы имеют в структуре центр, способный находиться как в протонированном, так и в депротонированном состоянии в зависимости от рН раствора. Такое обратимое протонирование приводит к изменению константы СТВ, что проявляется соответствующим образом в спектрах ЭПР и ДПЯ, обеспечивая основу для рН измерений. Этот процесс описывается простым стехиометрическим уравнением с сохранением массового баланса:



Тогда концентрации протонированной и депротонированной формы выражаются следующим образом:

$$\begin{aligned} C_R &= C / (1 + 10^{pK-pH}), \\ C_{RH} &= C \cdot 10^{pK-pH} / (1 + 10^{pK-pH}), \end{aligned} \quad (28)$$

где pK – константа диссоциации радикала, определяющая центр диапазона чувствительности к рН.

Было показано, на примере фосфорилированного триарилметильного радикала, что относительное отношение усилений сигнала депротонированной, E_R , и протонированной, E_{RH} , формы описывается стандартной кривой титрования рН [83]:

$$\frac{E_R}{E_R + E_{RH}} = \frac{R_{max} + R_{min} \cdot 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}}. \quad (29)$$

где R_{max} и R_{min} – максимальное и минимальное значения кривой титрования. Таким образом, используя калибровочную кривую (29), можно визуализировать рН при помощи всего двух изображений ОМРТ, полученных на частотах накачки ЭПР протонированной и депротонированной формы.

Выше были рассмотрены теоретические выражения, используемые в литературе для визуализации оксигенации и ацидоза с помощью метода ОМРТ с использованием pO_2 и pH-чувствительных радикалов. В рамках данной диссертационной работы будут получены выражения для описания сигнала ОМРТ в случае, когда контрастный агент обладает одновременной чувствительностью к pO_2 , pH и Pi . Будет показано, что параметры кривой титрования pH (29) зависят от мощности радиочастотного излучения, а также, что для корректного измерения концентрации кислорода в факторе утечки (17) необходимо учитывать дополнительный механизм релаксации. Для измерения параметра Pi в этой работе нами предложено полуэмпирическое описание, позволяющее определять параметры pO_2 и pH, не зависимо.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Спектроскопия и томография ЭПР

2.1.1 Спиновые зонды

^2H и ^{15}N изотопнозамещенный нитроксильный радикал (3R(S),4R(S))-3,4-дикарбокси-2,2,5,5-тетра($^2\text{H}_3$)метилпирролидин-(3,4- $^2\text{H}_2$)-(1- ^{15}N)-1-оксил (^2H , ^{15}N -дикарбоксипроксил, ^2H , ^{15}N -ДКП, рис. 20а) был применен в качестве $p\text{O}_2$ -чувствительного зонда для визуализации оксигенации миокардиальной ткани. рН-чувствительный имидазолиновый нитроксильный радикал, ковалентно связанный с молекулой глутатиона, был использован для визуализации миокардиального рН (RSG, рис. 20b). Дополнительно, для визуализации рН были использованы изотопзамещенный ^2H -дикарбоксипроксил (^2H -ДКП, рис. 20c) и perdeuterированный радикал RSG (dRSG, рис. 20d). Радикалы были синтезированы и любезно предоставлены к. х. н. И. А. Кирилюком (НИОХ СО РАН, Новосибирск).

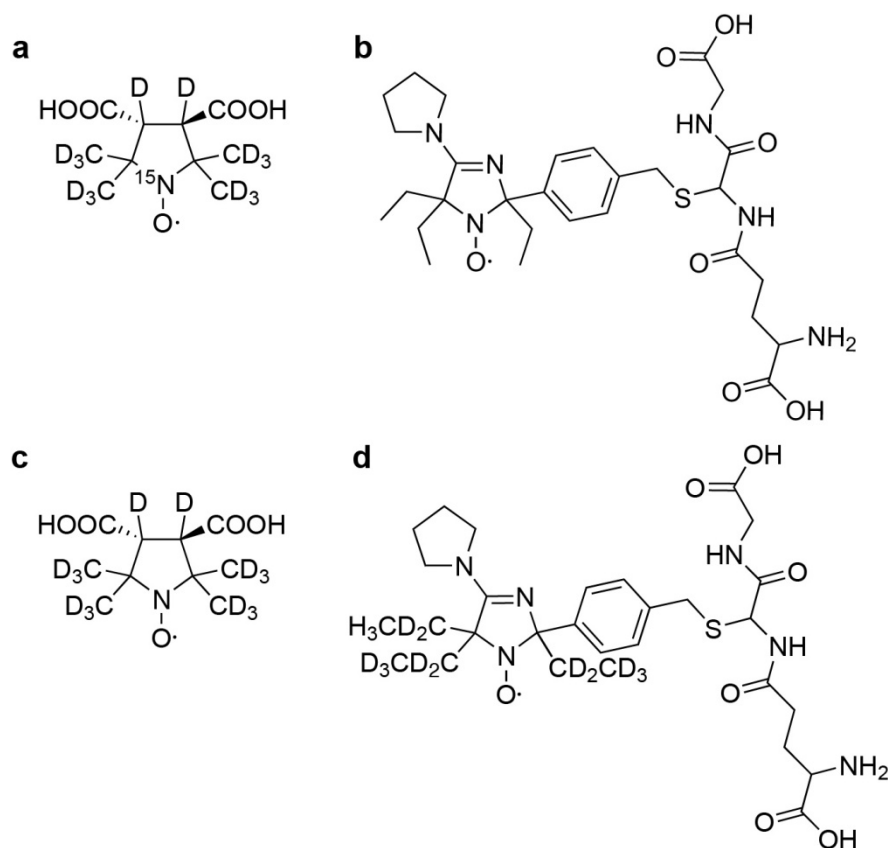


Рис. 20. Химические структуры радикалов, использованные в качестве спиновых зондов для томографии ЭПР. (а) ^2H , ^{15}N -дикарбоксипроксил (^2H , ^{15}N -ДКП), примененный в качестве спинового зонда для измерения кислорода. (b) рН-чувствительный нитроксильный радикал, связанный с молекулой

глутатиона (RSG). (c) ^2H -дикарбоксипроксил (^2H -ДКП). (d) Пердейтерированный радикал RSG (dRSG).

2.1.2 Экспериментальная установка

Эксперименты на изолированных крысиных сердцах проводились с использованием спектрометра/томографа ЭПР Eleksys E540 (Bruker, Германия). Изолированные крысиные сердца перфузировали в резонаторе ЭПР L-диапазона с внутренним диаметром 23 мм (E 540R23, Bruker). Схематическое изображение экспериментальной установки для перфузии сердец показано на рисунке 21а. Изолированные сердца перфузировали буфером при 37 °C через термостатируемую систему. Перфузия происходила в режиме постоянного потока с использованием перистальтического насоса (BT100-2J, LongerPump). Давление перфузируемого буфера в течение эксперимента измерялось с помощью датчика давления MPVZ5050GW (Freescale Semiconductor). Для наблюдения сократительной функции использовался зонд, вставленный в левый желудочек сердца. В качестве зонда использовали наполненный водой латексный шарик, соединенный по гидравлической линии с датчиком давления. Аналоговый сигнал с датчиков оцифровывали с использованием микроконтроллера Olimexino STM32 и записывали на компьютере. В начале эксперимента объем зонда в левом желудочке был отрегулирован таким образом, чтобы конечное диастолическое давление составляло ~10 мм рт. ст. Для того, чтобы поддерживать внешнюю температуру для сердца 37 °C в резонаторе расположена двустенная камера, термостатируемая перфтороктаном. Перфтороктан был выбран как теплоноситель, так как он химически инертен, обладает относительно высокой теплоемкостью и малым тангенсом угла диэлектрических потерь, и таким образом, не препятствует проведению ЭПР измерений. Циркулирование перфтороктана в системе осуществлялось с помощью небольшого центробежного насоса (NJ 1200, Aquarium systems).

2.1.3 Выделение сердца и модель региональной ишемии

Для экспериментов с изолированными сердцами использовались крысы линии Вистар (250 – 300 г). Эксперименты на животных выполняли в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Животных анестезировали внутрибрюшинной инъекцией тиопентала натрия, 50 мг/кг. После наступления полной анестезии трахея была канюлирована для проведения искусственной вентиляции легких комнатным воздухом. В яремную вену вводили раствор гепарина, 1000 Е/кг. Для изъятия сердца проводили среднегрудинную торакотомию, после чего восходящую аорту канюлировали, и сердце переносили на установку для ретроградной перфузии. Перфузия проводилась модифицированным буфером Кребса: 11 мМ

глюкоза, 125 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,2 мМ MgCl₂, 1,2 мМ NaH₂PO₄, 15 мМ NaHCO₃, 1,25 мМ CaCl₂. Перфузируемый буфер непрерывно продували газовой смесью 95% O₂ и 5% CO₂. Перед экспериментом буфер был профильтрован через 0,2 мкм полистироловый мембранный фильтр. Ретроградная перфузия происходила при постоянном потоке 12 мл/мин, что соответствовало давлению перфузии 40 – 70 мм рт. ст. После предварительной перфузии в течение 15 минут сердце останавливали путем введения 1 мл кардиоплегического раствора (120 мМ NaCl, 30 мМ KCl). Далее под левую коронарную артерию сердца подводили шелковую нить (размер 7/0). С целью защиты артерии и миокардиальной ткани от механического повреждения нить завязывали (но не затягивали) на поверхности небольшой пластинки из мягкого пластика. После наложения лигатуры сердце переносилось на установку для дальнейшей перфузии (см. рис. 21b). На рисунке 22 изображена схема наложения лигатуры на левую коронарную артерию.

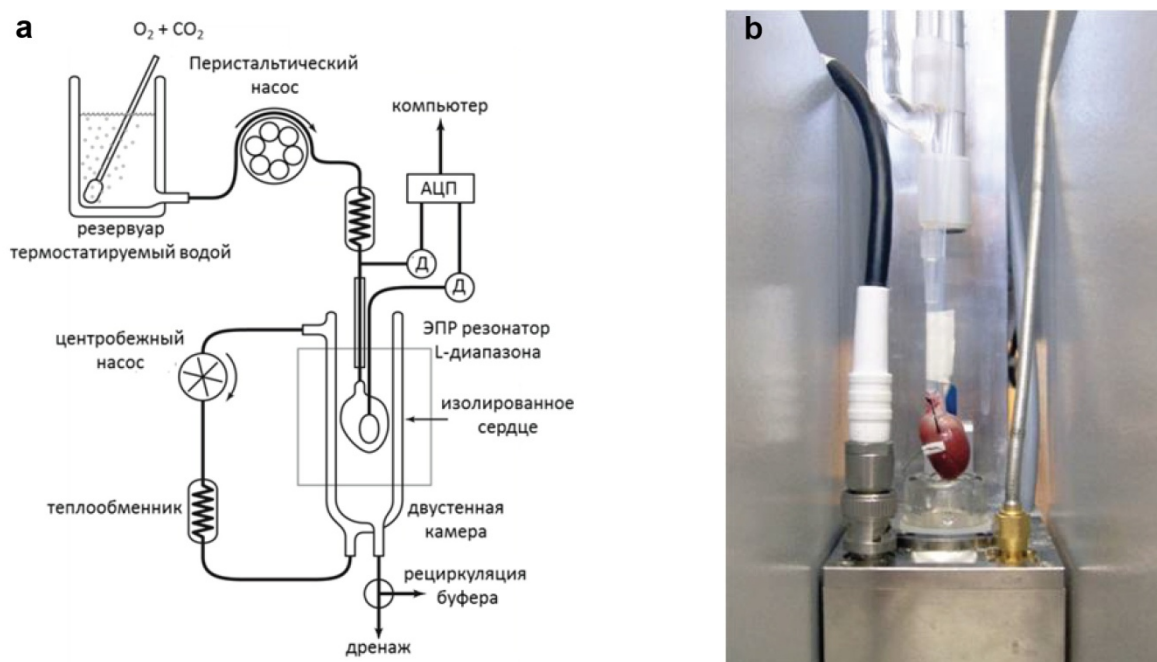


Рис. 21. (а) Схема экспериментальной установки для перфузии изолированных сердец. Используемые сокращения: Д – датчик давления, АЦП – аналого-цифровой преобразователь. **(б)** Фотография изолированного и перфузируемого сердца крысы в магните ЭПР спектрометра. На левую коронарную артерию сердца наложена лигатура.

Изолированные крысиные сердца перфузировали 20 минут до стабилизации сократительной функции, после чего в перфузируемый буфер добавляли спиновый зонд (0,5 мМ ²H, ¹⁵N-ДКП или 1 мМ RSG). Чтобы минимизировать расход спинового зонда дальнейшая перфузия осуществлялась в режиме рециркуляции.

В экспериментах по визуализации оксигенации после 10 минут перфузии с радикалом запускали сканирование данных ЭПР. По окончании сканирования данных лигатуру, наложенную на левую коронарную артерию, затягивали, обеспечивая плотное прижатие сосуда

нитью к нижней поверхности пластиковой пластинки. После этого записывали томограмму ЭПР при региональной ишемии. Для реперфузии после ишемии лигатуру срезали, и через 10 минут реперфузии снова запускали сканирование данных ЭПР. В экспериментах по визуализации рН региональную ишемию вызывали, затягивая лигатуру, наложенную на левую коронарную артерию, после 10 минут перфузии со спиновой пробой. Сканирование данных ЭПР запускали через 15 минут после начала ишемии.

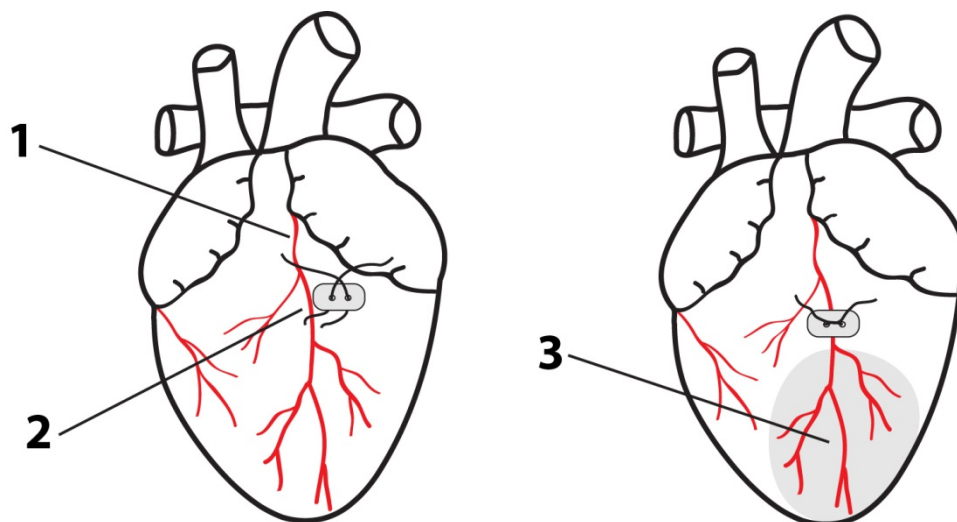


Рис. 22. Схема наложения лигатуры на левую коронарную артерию: 1 – левая коронарная артерия; 2 – лигатура; 3 – ожидаемая область ишемии.

2.1.4 Проведение томографических измерений изолированных сердец

Сканирование проекций ЭПР проводили в двух пространственных и одной спектральной координате с пространственным окном $20 \times 20 \text{ мм}^2$. В экспериментах по визуализации оксигенации при сканировании данных записывалась только низкочастотная компонента спектра ^2H , ^{15}N -ДКП со спектральным окном 5 Гс. Проекция были записаны при 15 полярных и 12 псевдо углах, максимальный градиент магнитного поля составлял 4,33 Гс/см (что соответствует максимальному псевдо углу 60°). Сканирование проекций происходило при следующих настройках спектрометра: мощность микроволнового излучения, 1,8 мВт, амплитуда модуляции, 0,2 Гс, частота модуляции, 100 кГц, время записи одной проекции, 5,12 секунд. Полное время сканирования одной томограммы составляло 19 минут.

В экспериментах по визуализации рН при сканировании данных записывался весь спектр радикала RSG со спектральным окном 50 Гс. Проекция были записаны при 31 полярных и 12 псевдо углах, максимальный градиент магнитного поля составлял 17,4 Гс/см (максимальный псевдо угол $34,84^\circ$). Сканирование проекций происходило при следующих настройках спектрометра: мощность микроволнового излучения, 3,6 мВт, амплитуда модуляции, 2,5 Гс,

частота модуляции, 100 кГц, время записи одной проекции, 5,12 секунд. Полное время сканирования томограммы составляло 39 минут.

2.1.5 Аппроксимация спектров ЭПР

Экспериментальные спектры ЭПР аппроксимировали конволюцией функции Лоренца и Гаусса (профиль Войта):

$$L(x, x_0, \gamma) = \frac{\gamma}{\pi(\gamma^2 + (x - x_0)^2)}, G(x, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp(-x^2/2\sigma^2),$$

$$Voigt(x, x_0, \sigma, \gamma) = \int_{-\infty}^{\infty} G(t, \sigma) L(x - t, x_0, \gamma) dt =$$

$$= \frac{\gamma/\sigma\sqrt{2}}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-t^2}}{(\gamma/\sigma\sqrt{2})^2 + ((x - x_0)/\sigma\sqrt{2} - t)^2} dt,$$
(30)

где σ и γ – параметры ширины гауссовской и лоренцевой компонент линии.

Профиль Войта рассчитывали, используя функцию Фадеевой (функция ошибок комплексного переменного):

$$Voigt(x, x_0, \sigma, \gamma) = Re(w(z)), z = (x - x_0 + i\gamma)/\sigma\sqrt{2},$$
(31)

где $w(z) = \frac{i}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{e^{-t^2}}{z - t} dt$ – функция Фадеевой.

Так как экспериментальные спектры представляют собой первую производную сигнала ЭПР, для аппроксимации использовали производную от функции ошибок комплексного переменного, которая может быть выражена аналитически следующим образом:

$$\frac{\partial}{\partial x} Voigt(x, x_0, \sigma, \gamma) = Re\left(\frac{\partial}{\partial z} w(z)\right) = 2 \cdot Re\left\{\frac{i}{\sqrt{\pi}} - z \cdot w(z)\right\}.$$
(32)

Для расчета функции ошибок комплексного переменного использовали рациональное приближение, предложенное в работе [101]:

$$w(z) = \frac{((((((a_6 z + a_5)z + a_4)z + a_3)z + a_2)z + a_1)z + a_0)}{((((((z + b_6)z + b_5)z + b_4)z + b_3)z + b_2)z + b_1)z + b_0)}.$$
(33)

Коэффициенты разложения a_i и b_i и доказательство корректности применения данного разложения можно найти в работе [111]. Таким образом, для аппроксимации экспериментальных линий в спектрах ЭПР использовали следующую приближенную формулу:

$$dVoigt(x, x_0, \sigma, \gamma) = 2 \cdot Re\left\{\frac{i}{\sqrt{\pi}} - z \frac{((((((a_6 z + a_5)z + a_4)z + a_3)z + a_2)z + a_1)z + a_0)}{((((((z + b_6)z + b_5)z + b_4)z + b_3)z + b_2)z + b_1)z + b_0)}\right\}.$$
(34)

Подгонку экспериментальных спектров формулой (34) осуществляли методом наименьших квадратов Левенберга-Марквардта с использованием специально разработанного в среде программирования MATLAB алгоритма.

2.1.6 Калибровка pO_2 -чувствительного спинового зонда

Раствор радикала $^2H, ^{15}N$ -ДКП (0,2 мМ, 3 мл) в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) непрерывно продували смесью газов аргона и кислорода в необходимой пропорции непосредственно в резонаторе ЭПР спектрометра L-диапазона. Смесью газов была приготовлена в воздушном шарике, используя необходимые объемы чистых газов. Калибровку спинового зонда проводили при комнатной температуре. Спектры ЭПР записывали при следующих настройках спектрометра: амплитуда модуляции, 0,08 Гс, частота модуляции, 100 кГц, мощность микроволнового излучения, 3,6 мВт, константа времени, 10,24 мс, время сканирования спектра, 41 с. Для расчета лоренцевой составляющей ширины линии спектров ЭПР использовали рациональное приближение функции Войта (см. раздел “Аппроксимация спектров ЭПР”).

2.1.7 Определение рН методом ЭПР

Значение рН рассчитывали, исходя из наблюдаемой константы сверхтонкого расщепления радикала RSG. Константу СТВ определяли как половину расстояния между низкопольной и высокопольной компонентой спектра ЭПР. Значения рН рассчитывали, используя следующую формулу:

$$pH = pK - \log_{10} \frac{a_N(R) - a_N}{a_N - a_N(RH^+)}, \quad (35)$$

где a_N – наблюдаемая константа СТВ, $a_N(RH^+) = 14,24$ Гс и $a_N(R) = 15,27$ Гс – константы СТВ протонированной и депротонированной форм радикала, $pK = 6,6$ – отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации радикала RSG. Для расчета использовали значения констант приведенные в работе [6].

2.1.8 Приготовление бескислородных образцов

Для приготовления бескислородных образцов использовали глюкозооксидазную систему. Для этого к исследуемому образцу добавляли 5 мМ глюкозы и 10 Ед/мл глюкозооксидазы. Ферментативное окисление глюкозы сопровождается потреблением кислорода, приводя к быстрому (< 1 мин) и полному поглощению кислорода в растворе.

2.1.9 *Исследование влияния концентрационного обмена на ширину линии ЭПР*

Растворы радикала $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП готовили в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7,4. Для того чтобы очистить раствор от кислорода использовалась ферментативная реакция глюкозы с глюкозооксидазой (см. раздел 2.1.8). Эксперименты проводили при комнатной температуре. После добавления глюкозооксидазы образец помещали в 50 мкл стеклянные капилляры для проведения ЭПР измерений. Спектры ЭПР записывали на спектрометре X-диапазона при следующих настройках: мощность микроволнового излучения, 0,63 мВт, амплитуда модуляции 0,08 Гс, частота модуляции, 100 кГц, константа времени 10,24 мс, время сканирования спектра, 164 с.

2.1.10 *Определение коэффициента распределения октанол-вода.*

К растворам спиновых зондов, 1 мМ RSG и 0,2 мМ $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП, в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7,4 был добавлен равный объем октанола-1. Растворы интенсивно перемешивали в течение 5 минут, после чего позволили им отстояться до полного разделения фаз. Аликвоты водной и октанольной фаз были отобраны и помещены в 50 мкл стеклянные капилляры для записи спектров ЭПР. Концентрация радикалов в образцах определяли из интегральных интенсивностей полученных спектров ЭПР. Растворы 3-карбоксипроксила в буфере и октанол-1, соответственно, использовали в качестве стандартов для расчета концентрации. Коэффициент распределения октанол-вода рассчитывали как отношение концентраций радикала в октанольной и водной фазах. Полученные значения коэффициентов распределения равны $(5,0 \pm 0,3) \times 10^{-2}$ для RSG и $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ для $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП. Спектры ЭПР записывали на спектрометре X-диапазона при следующих настройках: мощность микроволнового излучения, 1 мВт, амплитуда модуляции, 0,1 Гс для $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП и 0,5 Гс для RSG, частота модуляции, 100 кГц, константа времени, 10,24 мс, время сканирования спектра, 164 с.

2.1.11 *Восстановление спиновых зондов в изолированном сердце*

Изолированные крысиные сердца перфузировали в режиме постоянного потока при 37°C в течение 20 минут до стабилизации сократительной функции. После этого поток перфузируемого буфера останавливали и в сердце вводили 1 мл раствора спиновой пробы (0,5 мМ $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП или 1,5 мМ RSG). Спектры ЭПР регистрировали в течение 30 минут после введения радикала, используя следующие настройки спектрометра: мощность микроволнового излучения, 1,8 мВт, амплитуда модуляции, 0,1 Гс для $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП и 2 Гс для RSG, частота

модуляции, 100 кГц, константа времени, 2,56 мс, время сканирования спектра, 20,48 с для ^2H , ^{15}N -ДКП и 10,24 с для RSG.

2.1.12 Алгоритм реконструкции изображений

Реконструкцию спектрально-пространственной томограмм ЭПР осуществляли с использованием собственного алгоритма, написанного в среде программирования MATLAB. Экспериментальные проекции были отмасштабированы (разделены на косинус соответствующего им псевдоугла) и дискретизированы до 256 точек. Чтобы избежать появления искажений на краях изображения проекции были дополнены нулями с двух сторон (по 64 точки). В качестве первоначального изображения в итерационном цикле использовалась нулевая матрица $384 \times 384 \times 384$. Экспериментальную проекцию $p_{\theta_i}^{exp}(s)$, снятую под углом θ_i , проецировали на реконструируемое изображение, после чего с помощью преобразования Радона (смотрите выражение (1)) рассчитывали проекцию для следующего угла, $p_{\theta_{i+1}}(s)$. Разницу между рассчитанной и экспериментальной проекцией, $\Delta = p_{\theta_{i+1}}^{exp}(s) - p_{\theta_{i+1}}(s)$, проецировали на реконструируемое изображение. Процедуру повторяли для всех остальных проекций. Спектральную информацию полученного изображения аппроксимировали функцией Войта (см. раздел 2.1.5). Итерационный цикл повторяли ~ 12 раз до достижения устойчивого результата и хорошей сходимости с экспериментальными проекциями. По окончании реконструкции изображения полученную трехмерную матрицу обрезали до размера $256 \times 256 \times 256$, что соответствует пространственному окну $20 \times 20 \text{ мм}^2$.

2.2 Томография ОМРТ

2.2.1 Спиновые зонды

Пердейтерированный Финский триарилметильный радикал (dTAM, структура изображена на рис. 23a) использовался в качестве $p\text{O}_2$ -чувствительного контрастного агента. Пердейтерированный монофосфорилированный триарилметильный радикал (dpTAM, структура изображена на рис. 23b) использовался как мультифункциональный спиновый зонд для одновременной визуализации $p\text{O}_2$, pH и Pi. Данные радикалы были синтезированы и предоставлены профессором Бенуа Дрессчаерт (Университет Западной Виргинии, Моргантаун, США).

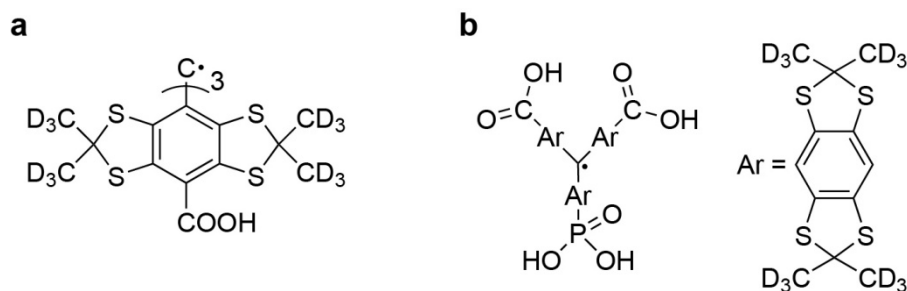


Рис. 23. Химические структуры радикалов, использованных в качестве спиновых зондов в ОМРТ. **(а)** Пердегтерированный Финский триарилметильный радикал (dTAM), использованный в качестве pO_2 -чувствительной спиновой пробы. **(б)** Пердегтерированный монофосфорилированный триарилметильный радикал (dpTAM), использованный для одновременного измерения pO_2 , pH и Pi.

2.2.2 Экспериментальная установка

Эксперименты ОМРТ проводились с использованием настольного ОМРТ томографа (Keller JXI-KC02, Japan Redox Ltd.), с применением стандартной импульсной последовательности спинового эха. Томограф оснащен постоянным магнитом с величиной магнитного поля B_0 16 мТл. Накачка переходов ЭПР осуществлялась в течение 500 мс (T_{EPR}) на частотах: 451,9 МГц для контрастного агента dTAM и 456,6, 456,8 и 457 МГц для мультифункционального контрастного агента dpTAM. Другие параметры импульсной последовательности, такие как время повторения, T_R , и время эха, T_E , составляли 700 мс и 37 мс для 2D измерений и 1200 мс and 37 мс для 3D экспериментов. Настройка резонатора томографа на частоту накачки ЭПР происходила в ручном режиме при помощи осциллографа-анализатора (8752C, Hewlett Packard). Для контроля температуры и исключения перегрева фантомных образцов и животных использовался оптоволоконный оптический термометр (Nomad, Neoptic). Анестезия животных происходила путем ингаляции смеси воздух-изофлуран с использованием анестезирующей машины (DRE VP3 ,DRE veterinary, USA). Трубка с газовой смесью была присоединена к обратной стороне резонатора, обеспечивая постоянный поток в течение всего эксперимента. Фактор эффективности резонатора α измерялся перед каждым экспериментом с помощью специального датчика (Time Domain Sensor, SPEAG), подключенному к сетевому анализатору (MDO3104, Tektronix).

2.2.3 Приготовление калибровочных образцов

Для приготовления образцов контрастный агент (dTAM или dpTAM) был растворен в 150 мМ растворе NaCl. Растворы продувались в течение 15 минут газовой смесью азота и кислорода в различных пропорциях для достижения желаемой концентрации кислорода. Все измерения были выполнены при 33 ± 1 °C. Все калибровочные образцы были сконструированы

из 8 мл ампул, заполненных 5 мл раствора контрастного агента и 8 мл ампулы, полностью заполненной 150 мМ раствором NaCl. Данные ОМРТ были получены при мощностях накачки ЭПР 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 и 8 Вт для калибровочных и фантомный образцов. Необходимо отметить, что не для всех калибровочных экспериментов использовалась мощность 8 Вт. Средние по пикселям значения из зон интереса для калибровочных образцов использовались для дальнейшей обработки и анализа данных. Фантомные образцы, служащие для демонстрации возможности визуализации функциональных параметров, были сконструированы из 2 мл стеклянных флаконов заполненных раствором с необходимыми значениями концентрации спинового зонда и кислорода для пробы dTAM, а так же pH и концентрации фосфатного буфера для спинового зонда dpTAM.

2.2.4 Проведение томографических измерений *in vivo*

Все эксперименты с животными были проведены в соответствии с принятыми протоколами (WVU IACUC). Для экспериментов *in vivo* использовались трансгенные мыши MMTV-ПуМТ (polyoma virus middle T antigen) со спонтанно развивающимся раком молочной железы. В качестве контрольной группы для сравнения параметров микроокружения опухоли с нормальной тканью молочной железы использовались самки мышей той же линии с отсутствием онкогена ПуМТ. Для инъекций был приготовлен 5-15 мМ исходный раствор контрастного агента (dTAM или dpTAM) в 150 мМ растворе NaCl. Исходный раствор медленно продувался в течение 30 минут газовой смесью азота и кислорода в пропорции 93%/7% для обеспечения более быстрого наступления равновесия между микроокружением ткани и раствором после его введения. Животное помещалось в резонатор томографа ОМРТ и анестезировалось путем ингаляции газовой смесью воздух-изофлуран. После наступления анестезии измерялся фактор эффективности резонатора α , и 50-100 мкл исходного раствора вводилось в здоровую ткань молочной железы или опухоль. В случае 3D эксперимента с использованием контрастного агента dTAM было введено 300 мкл раствора. Такой объем оправдан большими размерами исследуемой опухоли. На рисунке 24 приведены фотографии установки и мыши с опухолью до и после локальной инъекции контрастного агента. Видно, что после введения, ткань окрашивается в соответствующий раствору цвет. Через 15 минут после инъекции было получено одно изображение МРТ и несколько изображений ОМРТ в зависимости от используемого контрастного агента. В случае спинового зонда dTAM снималось два изображения ОМРТ при частоте 451,9 МГц мощностях облучения ЭПР 1 и 8 Вт в эксперименте с 2D модальностью и 1 и 16 Вт для 3D модальности. В случае контрастного агента dpTAM в экспериментах с мышинными опухолями и здоровыми молочными железами снимались шесть изображений ОМРТ на частотах 456,6, 456,8 и 457 МГц и мощностях 0,25/0,5

и 8 Вт. Для всех 2D экспериментов толщина среза выбиралась равной 3–4 мм так, чтобы только область с явным усилением сигнала входила в срез томограммы. Остальные параметры получения изображений были такие же как для фантомных образцов, область томограммы составляла 40×40 мм², размер матрицы был равен 64×64 и 32×32 пикселей, для 2D и 3D экспериментов соответственно. Описанный эксперимент не влиял на жизненные функции мышей, и после проведения описанных процедур мыши возвращались в клетку. Эксперименты с использованием одной и той же мыши проводились не больше чем два раза в неделю для того, чтобы дать животным отдохнуть и снизить риск смерти от анестезирующего препарата.

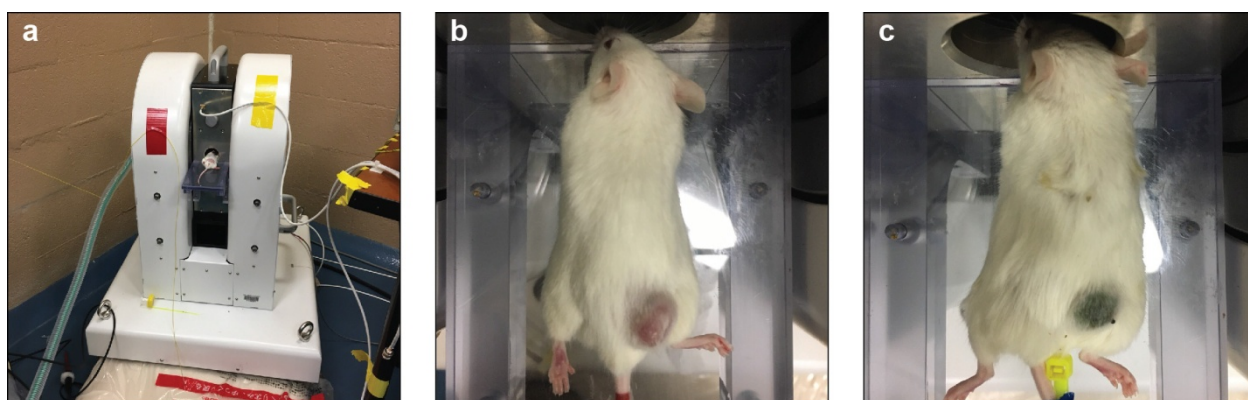


Рис. 24. (а) Фотография ОМРТ-томографа в процессе проведения эксперимента на животном. (б) Мышь с опухолью до введения контрастного агента. (с) Мышь с опухолью после введения контрастного агента. Опухоль, изображенная на рисунках (б) и (с), была получена путем введения линии опухолевых клеток MDA-MB-231.

2.2.5 Калибровочные параметры и процедуры их извлечения

Время релаксации протонов воды и константы скорости релаксации

Параметры T_{10} и r (см. уравнение (18)) определялись с помощью методики насыщения-восстановления для образцов с разной концентрацией контрастных агентов (0, 0,5, 1, 2 мМ) в анаэробных условиях при рН 10,0. Было определено, что для 150 мМ водного раствора NaCl время релаксации T_{10} равно $3,9 \pm 0,1$ с, а константы скорости релаксации, r , для радикалов dTAM и dpTAM равны $0,12 \pm 0,01$ (мМ·с)⁻¹ и $0,15 \pm 0,01$ (мМ·с)⁻¹. Полученные значения находятся в согласии с опубликованными данными [81, 112].

Факторы Связи

Факторы связи (см. параграф 1.3) были получены с помощью следующей процедуры. Были исследованы зависимости факторов усиления сигнала (E) от мощности накачки ЭПР при разных концентрациях спиновых проб dTAM и dpTAM в анаэробных условиях (см. рис. 36 и

43). Для спиновой пробы dpTAM данные зависимости были получены для протонированной и депротонированной формы при значениях pH равных 5 и 10, соответственно. Данные были аппроксимированы следующим выражением, для извлечения максимального усиления сигнала E_{max} [110]:

$$\begin{aligned} E &= -1 + A \cdot P / (1 + B \cdot P), \\ E_{max} &= -1 + A/B. \end{aligned} \quad (36)$$

Зависимости параметров E_{max} от концентрации контрастного агента были аппроксимированы выражениями (22) или (26) в случаях использования спиновых зондов dTAM или dpTAM, соответственно. Полученные таким образом факторы связи и усиления сигналов при бесконечной мощности равны: $\varepsilon_{dTAM} = 0,357 \pm 0,003$ и $E_{dTAM}^{inf} = 236 \pm 2$ для радикала dTAM; $\varepsilon_R = 0,40 \pm 0,02$, $E_R^{inf} = 270 \pm 4$ и $\varepsilon_{RH} = 0,33 \pm 0,01$, $E_R^{inf} = 221 \pm 5$ для форм радикала dpTAM. Полученные значения находятся в согласии с литературными данными для Финского триарилметильного радикала [81].

Параметр эффективности резонатора

Фактор эффективности α определялся как коэффициент пропорциональности между квадратом магнитного поля B_1 и мощностью накачки ЭПР с помощью датчика для измерения амплитуды магнитного поля (Time Domain Sensor, SPEAG). Резонатор ЭПР, которым оснащен томограф, позволяет изменять свою частоту в ручном режиме. В силу того, что при разных частотах ЭПР резонатор имеет разную добротность, значения α для частот 451,9 МГц и набора частот 456,6, 456,8 и 457,0 МГц отличаются. Для экспериментов с использованием частоты накачки 451,9 МГц значения α составляли 6,1 мкТл²/Вт для калибровочных образцов, 5,7 мкТл²/Вт для фантомных образцов, 3,5 и 2,0 мкТл²/Вт для экспериментов с животными в 2D и 3D модальностях, соответственно. Для экспериментов с использованием частот накачки 456,6, 456,8 и 457,0 МГц измеренный фактор эффективности резонатора лежал в диапазоне значений 7,7-14,2 мкТл²/Вт и 6,3-7,3 мкТл²/Вт для экспериментов с калибровочными-фантомными образцами и животными, соответственно.

Калибровочные параметры для описания времен электронной релаксации и эффекта утечки спиновой поляризации

Параметры w_i^0 , a_i и a_{ij} в выражениях (20), (37), (43a), (43b), (44) и (45) находились с помощью процедуры глобальной аппроксимации с использованием специально разработанного алгоритма в среде программирования MATLAB.

В случае контрастного агента dTAM был измерен набор факторов усиления сигнала при мощностях накачки ЭПР 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 Вт и разных концентрациях спинового зонда и кислорода. Набор зависимостей был проанализирован выражениями (21) и (38) с факторами утечки f и f^* – без и с учетом кислород-индуцированной утечки поляризации. Параметры a_0 , a_1 , a_2 (см. выражение (20)) равны 0,45 мкТл, 0,42 мкТл/мМ, 48×10^{-3} мкТл/(мм рт. ст.) для вычислений с фактором f и 0,48 мкТл, 0,41 мкТл/мМ, 34×10^{-3} мкТл/(мм рт. ст.) для вычислений с фактором f^* . Полученная в экспериментах с контрастным агентом dTAM константа скорости утечки w_l^0 равна $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ (мм рт. ст.·с)⁻¹.

В случае контрастного агента dpTAM набор факторов усиления сигнала при мощностях накачки ЭПР 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 Вт, разных концентрациях спинового зонда (0,2, 0,4, 1, 2 мМ), парциального давления кислорода (0, 7,6, 15,2, 38, 76 мм рт. ст.) и pH (6,4 – 7,4) анализировался с помощью выражений (40a) и (40b). Для того чтобы осуществить многопараметрическую процедуру глобальной аппроксимации и найти параметры a_{ij} и w_l^0 , было собрано по 36 зависимостей $E(P)$ для протонированной и депротонированной формы радикала при различных значениях pH, pO_2 и C. Для того чтобы минимизировать число неизвестных параметров модели, следующие параметры, описывающие влияние кислорода на скорости электронной релаксации, были приравнены друг другу: a_{12} и a_{32} ; a_{22} и a_{42} . В результате процедуры аппроксимации, следующие значения параметров были получены: a_{10} , 1,0 мкТл; a_{11} , -0,55 мкТл/мМ; a_{12} , $29,5 \times 10^{-3}$ мкТл/(мм рт. ст.); a_{13} , 2,15 мкТл/мМ; a_{14} , 0,37 мкТл/мМ²; a_{20} , 1,25 мкТл; a_{21} , -0,55 мкТл/мМ; a_{22} , $29,5 \times 10^{-3}$ мкТл/(мм рт. ст.); a_{23} , 0,85 мкТл/мМ; a_{24} , 0,5 мкТл/мМ²; a_{30} , - 0,85 мкТл; a_{31} , 18 мкТл/мМ; a_{40} , 0,25 мкТл; a_{41} , 3,0 мкТл/мМ; a_5 , 18,5 мМ⁻¹; a_6 , 4,9 мМ⁻¹; w_l^0 , $(3,0 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ (мм рт. ст.·с)⁻¹.

Калибровочные параметры кривой титрования pH

Отношение факторов усиления сигнала $(E_R^{456,6} + 1)/(E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2)$ было посчитано для экспериментальных данных, полученных при разных мощностях (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 Вт), pH (в диапазоне 6,4-7,4 и точках 5,0 и 10,0), концентрациях спинового зонда (0,2, 0,4, 1 мМ) и парциального давления кислорода (0, 7,6, 15,2, 38, 76 мм рт. ст.). Данные были проанализированы выражением (47), используя процедуру глобальной аппроксимации, где константа pK являлась глобальным параметром (полученное значение $pK=6,88 \pm 0,01$), в то же время параметры R_{max} и R_{min} находились для каждого набора независимо. В силу сделанных приближений, зависимость R_{max} и R_{min} от мощности накачки ЭПР была аппроксимирована выражением (49) (см. рис. 42b), полученные таким образом значения s_1 , s_2 , s_3 , s_4 равны 30,7 мкТл², 32,7 мкТл², 4,7 мкТл², 38 мкТл².

Калибровочные параметры для измерения P_i

Зависимости нормированного отношения $R_m = E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ от мощности накачки ЭПР (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 Вт) были получены для растворов с концентрацией фосфатного буфера 0, 1, 2, 4 мМ при значениях pH от 6,4 до 7,4, значениях pO_2 0, 15,2, 38, 76 мм рт. ст. и концентрациях радикала $dpTAM$ от 0,5 до 1,7 мМ. Перед получением отношений R_m зависимости факторов усиления были сглажены с помощью выражения (36), чтобы минимизировать влияние экспериментальных ошибок. Значения при мощности 8 Вт использовались для оценки параметра $R_m^{max} = R_m(P \rightarrow \infty)$. Параметры b_0, b_1, b_2, b_3, b_4 были получены при анализе данных от образцов, не содержащих фосфатный буфер (всего было получено 36 таких наборов $R_m(P)$) выражениями (50), (53) и (56). Параметры b_0, b_1, b_2, b_3, b_4 равны 1,2 мкТл, 0,95 мкТл/мМ, -0,62 мкТл/мМ, -0,0015 мкТл/(мм рт. ст.) и 2,5. Для того чтобы вычислить параметры $b_5, b_6, b_7, b_8, b_9, b_{10}$ наборы данных, полученных с использованием образцов с фосфатным буфером (всего 52 таких наборов $R_m(P)$), был проанализирован выражениями (50), (53), (56), (57а), и параметры g_{Pi}^0 были получены для каждого набора. Зависимость g_{Pi}^0 от pH была аппроксимирована выражением (57b) (см. рис. 47а), таким образом, был определен параметр $b_{10}=7,47$. Зависимость функции $h(C, pO_2, P_i)$ от pO_2 (см. рис. 47b) и концентрации контрастного агента была аппроксимирована выражением (57с) (см. рис. 47с), полученные параметры b_5, b_6, b_7, b_8, b_9 равны $0,975 \text{ мкТл}^2 \cdot \text{мМ}^{-1}$, $0,075 \text{ мкТл}^2 \cdot (\text{мм рт. ст.})^{-1} \text{мМ}^{-1}$, $0,012 \text{ мкТл}^2 \cdot (\text{мм рт. ст.})^{-1} \cdot \text{мМ}^{-2}$, $5,75 \text{ мкТл}^2 \cdot \text{мМ}^{-2}$, $0,975 \text{ мкТл}^2 \cdot \text{мМ}^{-3}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Глава 3. Визуализация оксигенации и рН ишемического сердца крысы

3.1 Изучение свойств pO_2 -чувствительного спинового зонда

Применение метода ЭПР для измерения концентрации кислорода требует использования парамагнитных проб с узкой линией сигнала ЭПР. Среди парамагнитных соединений в ЭПР томографии нашли применение триарилметильные и нитроксильные радикалы. Для исследований *in vivo* необходимы нетоксичные и гидрофильные зонды. Триарилметильные радикалы являются наиболее чувствительными спиновыми зондами для ЭПР оксиметрии, поскольку имеют наименьшую ширину линии ЭПР. Однако получение гидрофильных триарилметильных радикалов является сложной синтетической задачей, в связи с чем, доступны лишь несколько таких радикалов [42, 43, 113]. В отличие от тритильных радикалов методы синтеза нитроксильных радикалов хорошо развиты и позволяют синтезировать спиновые зонды с заданными свойствами. Известно также, что нитроксильные радикалы обладают низкой токсичностью, однако их главным недостатком для применения *in vivo* является способность восстанавливаться до диамагнитных гидроксиламинов. Из литературы известно, что пирролидиновые нитроксильные радикалы обладают хорошей стабильностью в биологической среде [114]. Изотопное замещение атомов водорода на атомы дейтерия из-за отличия магнитных моментов, приводит к уменьшению константы сверхтонкого расщепления неразрешенной структуры, уменьшая ширину линии в спектре ЭПР радикала. Дейтерированные радикалы имеют более интенсивный спектр ЭПР и обладают большей функциональной чувствительностью к концентрации кислорода по сравнению с обычными нитроксильными радикалами [115].

В этом исследовании нами был применен изотопно-замещенный нитроксильный радикал, дикарбоксипроксил $^2H, ^{15}N$ -ДКП (структура приведена на рис. 20а). ЭПР спектр данного радикала представляет собой две узкие линии с расщеплением на атоме азота равным 21,3 Гс (рис. 25а). Малоинтенсивные линии в спектре ЭПР вызваны примесью радикалов 2H -ДКП (см. рис. 20с). Обменное взаимодействие между радикалом и парамагнитной молекулой кислорода приводит к уменьшению времени релаксации T_2 и соответствующему уширению спектральных линий ЭПР. На рис. 25b представлена низкочастотная компонента спектра ЭПР радикала $^2H, ^{15}N$ -ДКП в бескислородном и содержащем 21 % кислорода водном растворе. Как видно из рисунка присутствие кислорода в растворе приводит к значительному уширению спектральной линии. Зависимость лоренцевой составляющей ширины линии низкочастотной компоненты спектра ЭПР от концентрации кислорода в растворе приведена на рисунке 26.

Наблюдаемое уширение составляет 0,53 мГс/мм рт. ст., что позволяет измерять концентрации кислорода вплоть до 5 мкМ (3 мм рт. ст.).

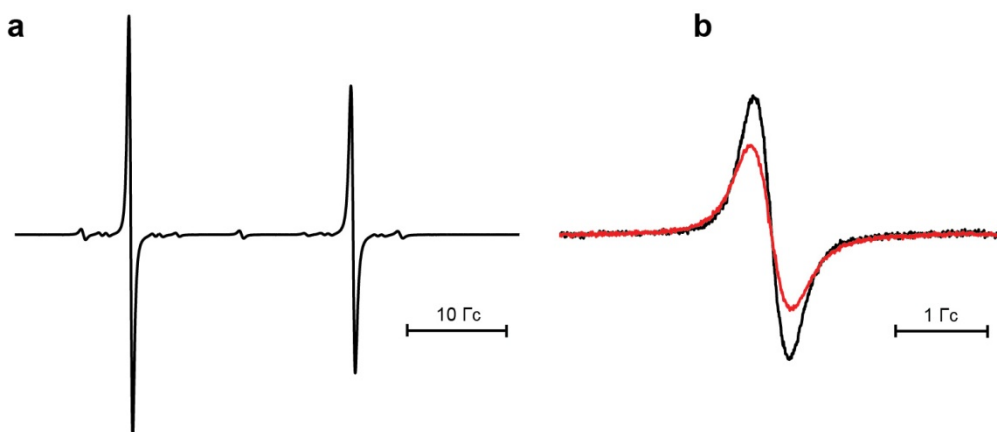


Рис. 25. (а) Спектр ЭПР парамагнитной пробы $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП (0,2 мМ в водном растворе насыщенном воздухом, рН 7,4). Спектр записан в X-диапазоне при следующих настройках: мощность микроволнового излучения 1 мВт, амплитуда модуляции 0,1 Гс, константа времени, 10,24 мс, время сканирования спектра, 164 с. (б) Низкопольная компонента спектра ЭПР пробы $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП (0.2 мМ, рН 7.4) в бескислородном растворе (черный) и в растворе, содержащем 21 % кислорода (красный). Спектр записан в L-диапазоне (1,1 ГГц) используя следующие настройки: мощность микроволнового излучения, 3,6 мВт, амплитуда модуляции, 0,08 Гс, константа времени, 10,24 мс, время сканирования спектра, 41 с.

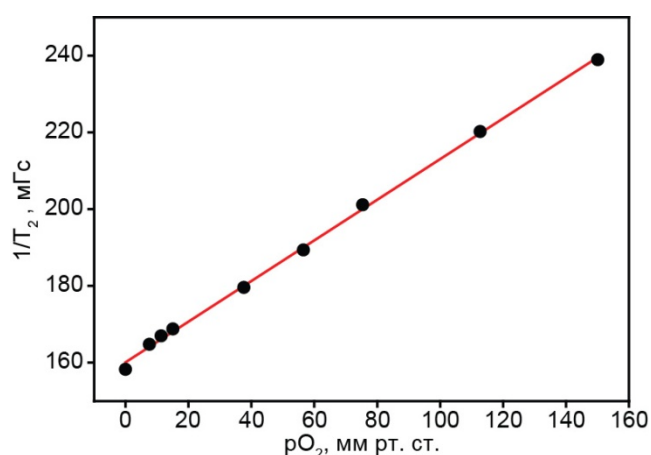


Рис. 26. Зависимость лоренцевой ширины низкопольной линии спектра радикала от парциального давления кислорода. Раствор радикала $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП 0,2 мМ в фосфатном буфере (50 мМ, рН 7,4) непрерывно продували смесью аргона и кислорода (см. раздел 2.1.6). Измерения ЭПР проводили в L-диапазоне используя следующие настройки: мощность микроволнового излучения, 3,6 мВт, амплитуда модуляции, 0,08 Гс, константа времени, 10,24 мс, время сканирования спектра, 41 с.

Необходимо отметить, что обменное взаимодействие между молекулами радикала также способно приводить к уширению спектральных линий. При больших концентрациях радикала это уширение может препятствовать измерению концентрации кислорода. Радикал $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП имеет две карбоксильные группы, которые в водных растворах при нейтральных рН находятся

в депротонированном состоянии. Электростатическое отталкивание между анионами радикалов препятствует обменному взаимодействию, позволяя использовать более высокие концентрации пробы для увеличения чувствительности, не препятствуя измерению концентрации кислорода. Чтобы продемонстрировать этот эффект, нами была изучена концентрационная зависимость обменного уширения для радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП и изотопзамещенного пиридинового нитроксильного радикала с одной карбоксильной группой (рис. 27). Как видно из рисунка 27 спектр радикала с одной карбоксильной группой существенно уширяется уже при концентрации 1 мМ, в то время как для $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП концентрационное уширение начинает проявлять себя только при концентрациях выше 2 мМ.

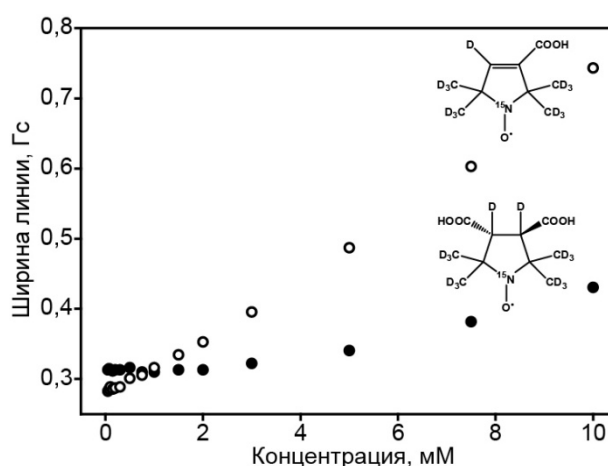


Рис. 27. Зависимость ширины линии левой компоненты спектра ЭПР радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП (●) и пиридинового нитроксильного радикала с одной карбоксильной группой (○) от концентрации. Настройки спектрометра ЭПР: мощность микроволнового излучения, 0,63 мВт, амплитуда модуляции 0,08 Гс, частота модуляции, 100 кГц, константа времени 10,23 мс, время сканирования спектра, 164 с. На рисунке приведены химические структуры радикалов.

Как известно, нитроксильные радикалы могут восстанавливаться в биологической среде до диамагнитных соединений. Такое восстановление существенно препятствует их использованию в качестве спиновых зондов для функциональных измерений *in vivo*. Поэтому нами была измерена кинетика восстановления радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП в изолированном сердце крысы при глобальной ишемии (см. рис. 28, детали эксперимента изложены в разделе 2.1.11). Из кинетики, приведенной на рисунке 28, видно, что за 30 минут глобальной ишемии в миокардиальной ткани восстанавливается лишь около 20 % радикала.

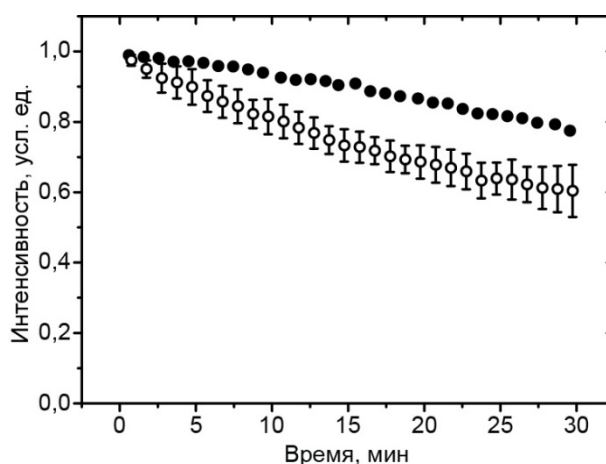


Рис. 28. Кинетики восстановления спиновых проб $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП (●) и RSG (○) в сердце во время глобальной ишемии. Начальные концентрации радикалов составляли 0,1 мМ и 1,5 мМ для $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП и RSG, соответственно. Для радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП эксперимент был проведен на двух разных сердцах, на рисунке приведена одна из кинетик восстановления. Для радикала RSG эксперимент был проведен на трех разных сердцах, на рисунке приведена усредненная кинетика восстановления с учетом стандартного отклонения.

Анализируя результаты проведенных исследований свойств радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП, можно сделать соответствующие выводы. Замена атома ^{14}N на его изотоп ^{15}N позволила уменьшить число линий в спектре ЭПР до двух, что способствовало увеличению их интенсивности на 50 %, а также дополнительно уменьшила ширину линий за счет исключения диполь-квадрупольного механизма релаксации [116]. Карбоксильные группы радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП в водном растворе при нейтральных pH диссоциируют, благодаря чему молекулы радикала присутствуют в растворе в виде дианионов. Электростатическое отталкивание между дианионами позволяет использовать концентрации радикала, вплоть до 2 мМ. Кроме того, благодаря наличию двух карбоксильных групп в структуре, радикал $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП является гидрофильным с распределением вода-октанол $(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ при pH 7,4 (см. раздел 2.1.10). Опираясь на эти результаты, можно сделать вывод, что данный радикал практически не проходит сквозь липидную мембрану во внутриклеточное пространство, где мог бы восстановиться до диамагнитного соединения. Действительно, как это будет видно далее, радикал демонстрирует хорошую стабильность в миокардиальной ткани.

3.2 Изучение свойств pH-чувствительного спинового зонда

Для ЭПР измерений pH был использован имидазолиновый нитроксильный радикал RSG (структура приведена на рис. 20b). Спектр ЭПР данного радикала представляет собой триплет с расщеплением на атоме азота нитроксильной группы, зависящим от pH раствора (рис. 29). Свойства этого радикала подробно изучались в работах [6, 12, 17, 117], где он зарекомендовал

себя как хорошая спиновая проба для измерения рН в тканях живых объектов. Радикал RSG имеет константу ионизации pK равную 6,6, что позволяет определять рН с точностью до 0,05 единиц в диапазоне 5,6-7,6. Спиновый зонд RSG ковалентно связан с молекулой глутатиона, что обеспечивает его высокую водорастворимость и препятствует его диффузии во внутриклеточное пространство. Отношение вода-октанол для радикала RSG составляет $0,050 \pm 0,003$ (см. раздел 2.1.10). Нитроксильный фрагмент данного радикала окружен этильными группами, что защищает радикал от восстановления в биологических системах [36]. Внеклеточная локализация и стерическая защита нитроксильного фрагмента обуславливает высокую стабильность радикала RSG в миокардиальной ткани.



Рис. 29. Спектр ЭПР парамагнитной пробы RSG (0,2 мМ, рН 7,4). Спектр записан в X-диапазоне при следующих настройках: мощность микроволнового излучения 1 мВт, амплитуда модуляции 0,1 Гс, константа времени, 10,24 мс, время сканирования спектра, 164 с.

Для радикала RSG была исследована кинетика восстановления в изолированном сердце при глобальной ишемии (см. раздел 2.1.11). Эксперимент был проведен на трех разных сердцах, на рисунке 28 приведена усредненная кинетика восстановления радикала с учетом стандартного отклонения. Из полученных данных видно, что за 30 минут глобальной ишемии в сердце восстанавливается около 30 % радикала.

3.3 Алгоритм реконструкции изображений

Алгоритм реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР, встроенный в программное обеспечение спектрометра Eleksys E540 фирмы Bruker, основывается на методе фильтрованных обратных проекций. По мере выполнения работы стало понятным, что недостатки данного метода реконструкции, приводят к существенным искажениям спектральной информации, не позволяющим корректно извлекать функциональные параметры. Эти причины побудили нас к созданию собственного программного алгоритма для реконструкции спектрально-пространственных томограмм. В главе “Литературный Обзор” в разделе 1.2 были рассмотрены основные методы реконструкции изображения, рассмотрим

соображения, подтолкнувшие нас выбрать именно метод алгебраического восстановления в качестве основы для алгоритма реконструкции томограмм ЭПР (см. раздел 2.1.12).

Томографические исследования на живых объектах должны быть проведены за разумный промежуток времени. Однако сканирование проекций с использованием метода стационарного ЭПР требует большое количество времени. Кроме того, переключение градиентов магнитного поля также является времязатратным. Такие технические ограничения приводят к тому, что спектрально-пространственные томограммы ЭПР, как правило, являются малоракурсными по отношению к пространственным углам и спектральному псевдоуглу. В таких случаях аналитические методы реконструкции приводят к шумному изображению и значительным искажениям в спектральной информации, что, в свою очередь, приводит к ошибке определения функциональных параметров. Это связано с тем, что аналитические методы основываются на точном математическом решении обратной задачи. На практике количество проекций является ограниченным, поэтому непрерывное точное решение дискретизируется. Очевидно, что данное приближение хорошо работает только при достаточно большом количестве проекций. Наиболее часто для реконструкции томографических изображений используется метод фильтрованных обратных проекций. Кроме того, что применение этого метода в случае малого числа проекций может приводить к существенным искажениям в изображении, еще одним недостатком является то, что данный метод требует конволюцию исходных проекций с весовой функцией, которая значительно увеличивает высокочастотный шум, из-за чего необходимо применять дополнительные низкочастотные фильтры (например, Шепа-Логана, Хэмминга или Ханна). Использование низкочастотных фильтров может вносить искажения в спектральную информацию и мешать правильному определению функциональных параметров. Это является особенно важным при измерении концентрации кислорода, так как для этого необходимо корректно аппроксимировать экспериментальные спектры, чтобы извлечь лоренцеву составляющую ширины линии ЭПР.

Когда количество проекций не столь велико, целесообразно использовать итерационные методы реконструкции. Метод Гершберга-Папулиса является перспективным методом, однако сложность интреполяционного переноса дискретных данных из полярной в декартовую сетку координат сильно ограничивает использование данного метода научными группами, работающими в области томографии ЭПР. Метод максимума энтропии популярный в малоракурсной томографии является достаточно сложным в реализации, и по качеству получаемого изображения конкурирует с другими итерационными методами. Для реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР, пожалуй, наиболее привлекательным итерационным методом, благодаря простоте реализации и качеству получаемого изображения, является метод алгебраического восстановления.

Основываясь на приведенных выше соображениях, для реконструкции данных спектрально-пространственных томограмм ЭПР в настоящей работе было решено разработать итерационный алгоритм, основанный на методе алгебраического восстановления. Итерационный подход требует значительных затрат компьютерного времени, однако позволяет полностью использовать информацию, содержащуюся в исходных проекциях, и получать качественные изображения. Так же нами был выбран метод алгебраической реконструкции, так как он имеет простую математическую основу, не требует интерполяции данных и введения дополнительных функционалов для их регуляризации. Разработанный алгоритм позволяет получать качественные изображения даже при относительно малом числе проекций, при этом не искажая спектральную информацию. Кроме того, предложенный метод реконструкции не обладает чувствительностью к высокочастотному шуму, так как он усредняется в итерационном цикле. Детали разработанного алгоритма реконструкции изображений изложены в разделе “Экспериментальная часть” пункт 2.1.12.

3.4 Визуализация оксигенации и pH фантомных образцов

Для того чтобы продемонстрировать возможность пространственно разрешенных функциональных измерений концентрации кислорода, был проведен эксперимент с использованием фантомного образца. Образец состоял из пробирки, наполненной насыщенным воздухом 0,5 мМ раствором радикала $^2\text{H},^{15}\text{N}$ -ДКП и вставленной внутрь неё ампулы с бескислородным раствором радикала такой же концентрации (см. раздел 2.1.8). После реконструкции томограммы спектральная информация была аппроксимирована рациональным приближением функции Войта (см. раздел 2.1.5). На рисунке 30 приведена карта лоренцевой составляющей ширины линии спектра ЭПР в образце. Как видно из рисунка 30, трубки с бескислородным и насыщенным воздухом растворами хорошо различимы. Ширина линии ЭПР в центральной трубке составляет 170 ± 15 мГц, в то время как во внешней трубке равна 250 ± 25 мГц, что соответствует значениям калибровочной кривой, приведенной на рисунке 26.

Для демонстрации возможности пространственно разрешенных функциональных измерений pH методом ЭПР томографии нами был проведен эксперимент с использованием фантомного образца. Образец состоял из трех ампул, наполненных 1 мМ раствором радикала RSG при различных pH равных 5,6, 6,6 и 7,6 (рис. 31). Как видно из рисунка, наблюдаемые значения хорошо отражают реальные значения pH растворов. Полученные в эксперименте значения pH в ампулах составляют $5,57 \pm 0,17$, $6,57 \pm 0,05$, $7,66 \pm 0,14$, соответственно.

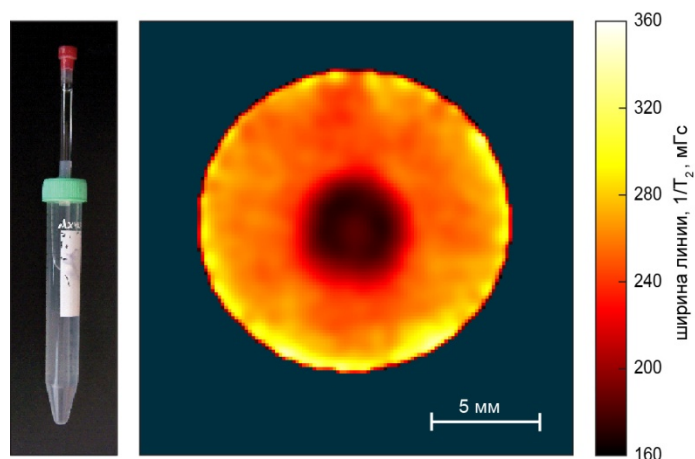


Рис. 30. Карта распределения лоренцевой ширины линии, $1/T_2$, в фантомном образце. Образец представляет собой две трубки с бескислородным и насыщенным воздухом раствором радикала $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП (0,5 мМ) в фосфатном буфере (50 мМ, pH = 7,4) Условия записи томограммы: 12 градиентов магнитного поля при 15 полярных углах, максимальный градиент 7,69 Гс/см, общее время записи томограммы 22,5 мин.

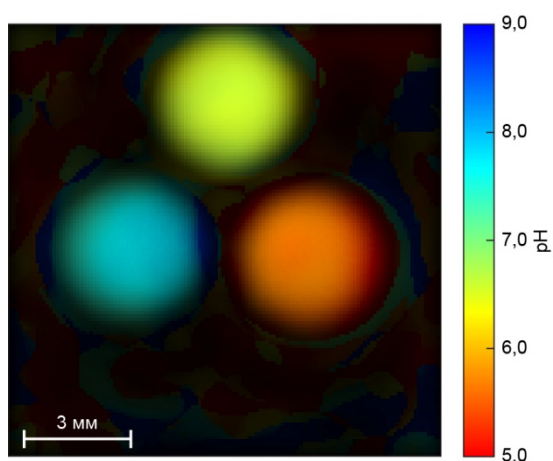


Рис. 31. Карта распределения pH в фантомном образце. Образец состоял из трех ампул, наполненных 1 мМ раствором радикала RSG при разных pH: 5,6, 6,6 и 7,6. Наблюдаемое значение константы сверхтонкого расщепления использовалось для расчета pH в каждой точке томограммы (см. раздел 2.1.7). Условия записи томограммы: 14 градиентов магнитного поля при 18 полярных углах, максимальный градиент 30 Гс/см, общее время записи томограммы 48,5 мин.

3.5 Визуализация $p\text{O}_2$ и pH изолированного сердца крысы

Радикал $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП был применен в качестве парамагнитной пробы для визуализации оксигенации миокардиальной ткани методом томографии ЭПР. На рисунке 32 приведены двумерные карты интегральной интенсивности сигнала ЭПР спинного зонда в сердце крысы и карты оксигенации во время перфузии, ишемии и реперфузии. Сердце ориентировано в коронарной плоскости так, что на полученных изображениях в правой нижней части сердца можно увидеть расположенный в левом желудочке зонд для регистрации сократительной

функции. Наблюдаемая концентрация кислорода в здоровой ткани при нормальной перфузии составляет 0,24-0,37 мМ. После наложения лигатуры на нисходящую ветвь левой коронарной артерии концентрация кислорода в ишемической области снижалась до 0,03-0,08 мМ. При реперфузии, когда лигатура была снята, и в ишемическую область снова поступал перфузируемый буфер, оксигенация миокардиальной ткани восстановилась не полностью и составляла примерно 0,12 мМ. Эксперимент был воспроизведен с тремя сердцами, приводя к схожим результатам. Необходимо отметить, что присутствие спиновой пробы, ^2H , ^{15}N -ДКП, в перфузируемом буфере не оказывало влияния на сократительную функцию сердца, указывая на отсутствие кардиотоксичности данного радикала.

Полученные данные по миокардиальной оксигенации при перевязанной коронарной артерии продемонстрировали выраженную гипоксию ткани в области региональной ишемии (рис. 32). В то же время оксигенация вне ишемической области значительно выросла. Этот результат можно объяснить, учитывая, что перфузия проводилась при постоянном потоке, и наложение лигатуры на левую коронарную артерию приводило к увеличению потока перфузируемого буфера через другие области сердечной мышцы. Так же интересным результатом является то, что при реперфузии, когда лигатура была снята, оксигенация миокардиальной ткани восстановилась не полностью по сравнению с предышемическим уровнем. Низкая оксигенация ткани при реперфузии, вероятно, связана с ослабленным потоком перфузируемого буфера через поврежденную сеть сосудов в ишемической области миокарда [118]. Этот результат находится в хорошем согласии с данными, полученными с помощью спектроскопии ЭПР, при глобальной ишемии [6]. Пониженную оксигенацию миокардиальной ткани после глобальной ишемии также наблюдали в работе [7]. В этой работе авторы изучали оксигенацию изолированного сердца крысы во время повторяющихся циклов глобальной ишемии и реперфузии в зависимости от длительности предышемической перфузии. Было показано, что при предварительной перфузии в течение одного часа оксигенация миокарда при реперфузии после 30 минут ишемии восстанавливалась почти до предышемического уровня. Однако при более длительной изначальной перфузии во время реперфузии наблюдается низкая оксигенация миокардиальной ткани. В настоящей работе мы использовали модель региональной ишемии, и промежуток времени между началом перфузии и снятием лигатуры составлял около двух часов, поэтому пониженный уровень оксигенации миокардиальной ткани при реперфузии хорошо согласуется с данными, приведенными в работе [7]. Однако существует ряд исследований, в которых методом ЭПР спектроскопии в экспериментах *in vivo* наблюдали переоксигенацию миокардиальной ткани при реперфузии [8, 9, 11, 119, 120]. В этих

работах было показано, что причиной переоксигенации при реперфузии является повышенное образование оксида азота (II).

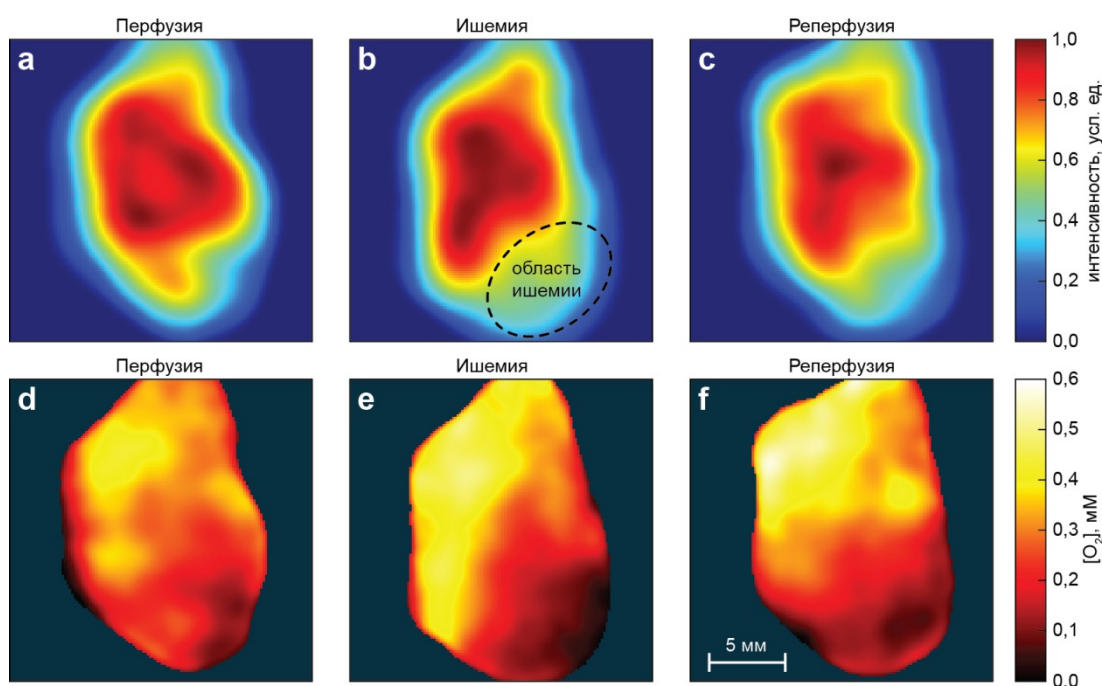


Рис. 32. Спектрально-пространственная томограмма ЭПР изолированного сердца крысы, перфузируемого в присутствии 0,5 мМ $^2\text{H}, ^{15}\text{N}$ -ДКП во время нормальной перфузии (слева), региональной ишемии (в центре) и реперфузии (справа). (a, b, c) Двумерное распределение интегральной интенсивности сигнала спинного зонда, ожидаемая область ишемии отмечена пунктирной линией. (d, e, f) Карты оксигенации миокардиальной ткани, рассчитанные из наблюдаемой ширины линии сигнала ЭПР (см. раздел 2.1.5) Условия записи томограмм: 10 градиентов магнитного поля при 15-ти полярных углах; максимальный градиент магнитного поля, 5 Гс/см; общее время сканирования одной томограммы 19 минут.

Радикал RSG был применен нами в качестве парамагнитной пробы для визуализации рН в изолированном перфузируемом сердце при региональной ишемии. На рисунке 33 слева приведена интегральная интенсивность наблюдаемого спектра ЭПР и ожидаемая область ишемии, справа приведена рассчитанная карта рН. Как видно из рисунка, рН здоровой ткани составляет около 7,4, что соответствует рН перфузируемого буфера. В то же время в ишемической области наблюдается закисление ткани (миокардиальной ацидоз) до значений рН 6,7-6,9. Эксперимент воспроизводили с тремя различными сердцами, в результате чего были получены похожие изображения.

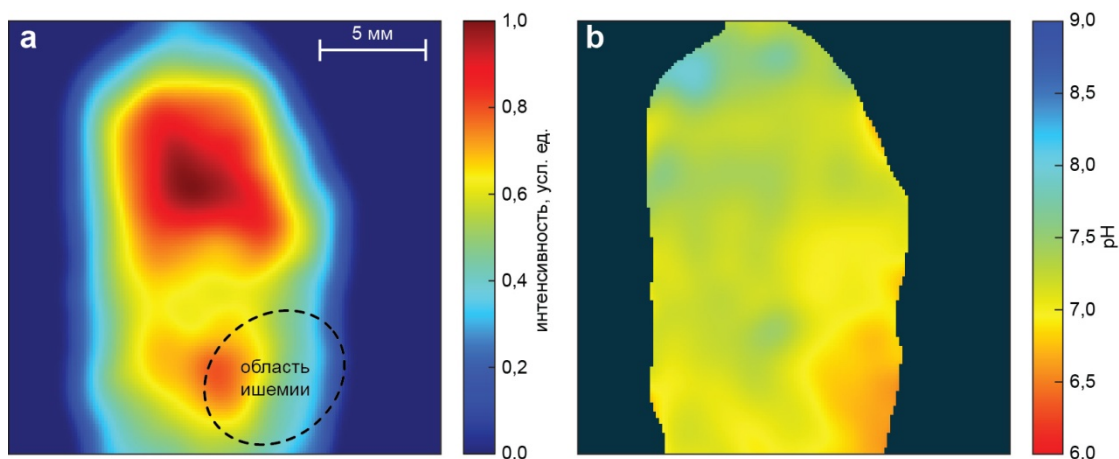


Рис. 33. Спектрально-пространственная томограмма ЭПР изолированного сердца крысы, перфузируемого в присутствии 1 mM RSG во время региональной ишемии. **(а)** Распределение спинного зонда в миокардиальной ткани, ожидаемая область ишемии отмечена пунктирной линией. **(б)** Рассчитанная карта значений pH. Условия записи томограммы: 12 градиентов магнитного поля при 31-ом полярном угле; максимальный градиент магнитного поля, 17,4 Гс/см; общее время сканирования томограммы 39 минут.

Время необходимое для записи данных томограммы, представленной на рисунке 33, составляло 39 минут, что почти в два раза превышает время сканирования проекций для визуализации оксигенации (см. рис. 32). Однако можно показать, что существует возможность уменьшения времени сканирования и увеличения пространственного разрешения получаемых карт pH. В основе принципа спектрально-пространственной томографии лежит снятие проекций при разной силе и ориентации градиента магнитного поля, и для получения спектрально-пространственных томограмм с хорошим пространственным разрешением необходимо увеличивать градиент магнитного поля. Максимальный градиент магнитного поля ограничен возможностями прибора (40 Гс/см). Другим вариантом улучшения разрешения является уменьшение спектрального окна. Для определения pH с помощью нитроксильных радикалов нужно измерить константу СТВ на атоме азота, для чего необходимо сканировать спектры ЭПР разверткой магнитного поля 50 Гс (см. рис. 29). Уменьшение развертки магнитного поля способствовало бы существенному уменьшению времени сканирования ЭПР томограммы и увеличению разрешения. Для этой цели было предложено сканировать только высокопольную компоненту спектра pH-чувствительного радикала с использованием дополнительного радикала-стандарта, относительно линии которого будет определяться изменение константы СТВ. Этот подход был продемонстрирован на экспериментах по визуализации pH ишемического сердца крысы. В качестве pH-чувствительного радикала был использован пердейтерированный радикал dRSG (структура приведена на рис. 20d), а в качестве радикала стандарта дейтерированный дикарбоксипроксил (^2H -ДКП) (структура

приведена на рис. 20с). Константы СТВ pH-чувствительного радикала dRSG составляют 14,24 Гс и 15,25 Гс для протонированной и депротонированной формы, соответственно. Константа СТВ радикала ^2H -ДКП равняется 16 Гс, и таким образом, высокопольные компоненты спектров радикалов dRSG и ^2H -ДКП не перекрываются. Эксперимент проводился согласно описанным методикам (см. раздел 2.1.4), концентрации радикалов dRSG и ^2H -ДКП в перфузионном растворе составляли 1 и 0,13 мМ.

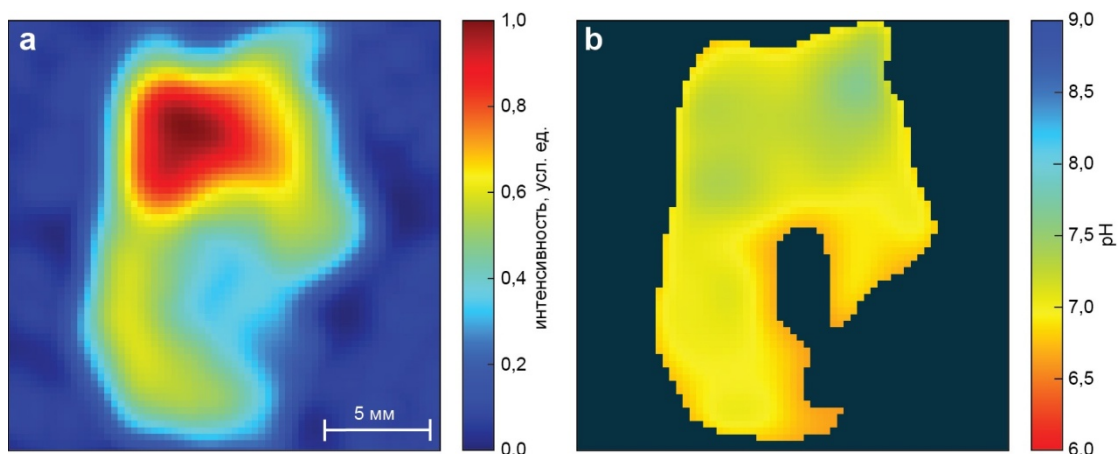


Рис. 34. Спектрально-пространственная томограмма ЭПР изолированного сердца крысы, перфузируемого в присутствии 1 мМ dRSG и 0,13 мМ ^2H -ДКП во время региональной ишемии. (а) Распределение спинного зонда в миокардиальной ткани. (б) Рассчитанная карта значений pH. Условия записи томограммы: 12 градиентов магнитного поля при 15-ти полярных углах; максимальный градиент магнитного поля, 15,38 Гс/см; общее время сканирования томограммы 22,5 минут.

На рисунке 34 изображена карта pH перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии с использованием радикала стандарта. На полученной карте видно, что pH здоровой миокардиальной ткани составляет 7,2-7,4, в то время как в ишемической области опускается до 6,7. Данный подход позволил уменьшить время записи томограммы до 22,5 минут, а также увеличить пространственное разрешение до 0,6 мм. Для сравнения, как упоминалось выше, для томограммы изображенной на рисунке 33 время записи составляло 39 минут, а разрешение 1,4 мм. На карте интенсивности сигнала ЭПР видно зонд для регистрации сократительной функции сердца, вставленный в левый желудочек. Необходимо отметить, что в области зонда наблюдается существенный спад интенсивности сигнала, из-за чего затруднительно корректно определить pH этой области. Возможно, для устранения этой проблемы необходимо было увеличить концентрации спинных зондов.

Таким образом, применение метода ЭПР томографии и парамагнитной пробы RSG позволило нам визуализировать региональный ацидоз миокардиальной ткани во время ишемии (рис. 33 и 34). Наблюдаемые значения pH ишемической области составили 6,7-6,9, что

находится в хорошем согласии с данными, полученными с использованием рН-электродов [121, 122] или с помощью спектроскопии ^{31}P -ЯМР [123-125]. Отметим, что радикал RSG является внеклеточным зондом и позволяет измерять внеклеточное значение рН. Метаболическая активность кардиомиоцитов в условия гипоксии приводит к закислению внутриклеточного пространства. Однако при ишемии, в условиях отсутствия потока перфузируемого буфера, трансмембранный перенос протонов натриевым насосом обеспечивает быстрое установление равновесия между внутри- и внеклеточным рН [126].

Необходимо отметить, что данные о концентрации кислорода и рН миокардиальной ткани, приведенные на рисунках 32, 33 и 34, являются усредненными значениями оксигенации и рН за время записи томограммы (19 минут для карт распределения кислорода и 39 и 22,5 для карт рН). Кроме того, томографические измерения проводились в двух пространственных и одной спектральной координате, поэтому полученные нами значения не являются значениями концентрации кислорода и рН в конкретной точке пространства, а представляют собой значения, усредненные вдоль третьей, неразрешенной, пространственной оси координат.

Для получения полной спектрально-пространственной информации об объекте необходимо проводить измерения в трех пространственных и одной спектральной координате. Это требует получения проекций под разными полярными и азимутальными углами с различной силой градиента магнитного поля, что требует большого количества времени, от одного часа и более. В настоящее время проведение четырехмерных спектрально-пространственных измерений с использованием коммерчески доступных ЭПР томографов затруднено, из-за большого времени, требуемого на сканирование проекций. Однако мы надеемся, что четырехмерная томография ЭПР станет доступной с развитием методов быстрой развертки, быстрого переключения градиентов магнитного поля, а также импульсных методов ЭПР.

Глава 4. Визуализация концентрации контрастного агента, pO_2 , pH и Pi в здоровой и опухолевой ткани мышей

4.1 Теоретические основы для определения концентрации контрастного агента, pH , pO_2 и Pi методом ОМРТ

Третья глава диссертации была посвящена визуализации параметров pO_2 и pH миокардиальной ткани с помощью двух pO_2 - и pH -чувствительных нитроксильных радикалов. Такие эксперименты могут быть проведены только на двух разных объектах и не позволяют получить полную картину о том, как связаны между собой эти параметры. Значительный интерес представляет измерение этих параметров одновременно с помощью одного экзогенного зонда. Эту идею можно осуществить с помощью метода ОМРТ в сочетании с радикалом $dpTAM$ [18]. Именно этому методу и развитию такого подхода посвящена последняя глава диссертации. В начале главы будут приведены полученные нами выражения для связи усиления сигнала, вызванного эффектом Оверхаузера, с искомыми параметрами. В последующих параграфах эти выражения будут использованы для решения обратной задачи.

4.1.1 Утечка спиновой поляризации

В рамках теоретического описания, приведенного в главе “Литературный Обзор” в параграфе 1.3, максимальное усиление сигнала МРТ при бесконечной мощности, E_{max} , выражаемое формулой (22), не зависит от концентрации кислорода, что противоречит экспериментальным данным (см. рис. 37). Несмотря на это, приведенные выражения ранее использовались для пересчета данных изображений ОМРТ в карты распределения концентрации кислорода [13-16]. Молекула кислорода является парамагнитной и ее взаимодействие с исследуемой системой спинов должно способствовать разрушению спиновой поляризации при любой мощности накачки ЭПР. Для учета данного эффекта необходимо ввести дополнительный механизм утечки поляризации в представленную на рисунке 19 систему спиновых состояний и соответствующую скорость релаксации, w_l , пропорциональную концентрации кислорода в фактор утечки (18) [127, 128]:

$$\begin{aligned} w_l &= w_l^0 \cdot pO_2, \\ f^*(C, pO_2) &= \frac{2w_l + w_0 + w_2}{2w_l + w_0 + w_2 + w^0 + w_l} = f_0(C) \cdot f_l(C, pO_2), \\ f_l(C, pO_2) &= \frac{1}{1 + T_1 \cdot w_l} = \frac{1}{1 + w_l^0 \cdot pO_2 \cdot T_{10} / (1 + r \cdot C \cdot T_{10})}, \end{aligned} \quad (37)$$

где w_l^0 – константа скорости утечки, f_0 – фактор утечки, введенный ранее уравнением (18), f_l – часть фактора утечки, учитывающая влияние кислорода.

С учетом данной утечки поляризации выражение для описания значений усиления сигнала в случае с контрастным агентом, имеющим одну линию в спектре ЭПР, имеет вид:

$$E = |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f^*(C, pO_2) \cdot S(P, C, pO_2)|, \quad (38)$$

где факторы насыщения и утечки описываются выражениями (19) и (37), соответственно. Тогда максимальное усиление сигнала, E_{max} , зависит от концентрации кислорода и может быть выражено следующим образом:

$$E_{max} = |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f^*(C, pO_2)| = \left| 1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot \frac{r \cdot C \cdot T_{10}}{1 + r \cdot C \cdot T_{10}} \cdot \frac{1}{1 + T_1 \cdot w_l^0 \cdot pO_2} \right| \quad (39)$$

4.1.2 Усиление сигнала для депротонированной и протонированной формы радикала

Усиление сигнала ОМРТ в случае использования контрастного агента дрТАМ (структура приведена на рис. 23b) описывается уравнением (38) с фактором насыщения (25). Фактор насыщения (25) учитывает наличие двух линий в спектре ДПЯ и влияние спинового обмена. Такое описание справедливо для кислых ($pH \approx 5$) и щелочных растворов ($pH \approx 10$). При промежуточных значениях pH в водных растворах присутствуют протонированная и депротонированная формы радикала, имеющие разные константы СТВ, вследствие чего наблюдаются четыре линии в спектрах ЭПР (см. рис. 35a) и ДПЯ. Рассмотрим высокочастотную компоненту спектра ДПЯ, представленную на рисунке 35b, где левая компонента соответствует депротонированной, а правая протонированной форме дрТАМ. Расстояние между этими двумя спектральными линиями меньше, чем их ширины, что приводит к эффекту смешивания, то есть, возбуждая конкретную форму на ее резонансной частоте, частично в процесс переноса поляризации вовлекается вторая форма (см. рис. 35c). Нами было разработано полуэмпирическое описание, позволяющее учесть данный эффект. В случае, когда в растворе присутствуют обе формы радикала, усиления сигнала ОМРТ могут быть описаны следующими выражениями:

$$E_R^{456,6} = |1 - E_R^{inf} \cdot f^* \cdot S_R| + E_{RH}^{456,6}, \quad (40a)$$

$$E_{RH}^{457} = |1 - E_{RH}^{inf} \cdot f^* \cdot S_{RH}| + E_R^{457}, \quad (40b)$$

где индексы R и RH соответствуют депротонированной и протонированной форме радикала дрТАМ, $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} – факторы усиления для депротонированной и протонированной формы, измеренные на их резонансных частотах 456,6 и 457 МГц (см. рис. 34c), E_R^{inf} и E_{RH}^{inf} – факторы

усиления сигнала при бесконечной мощности и бесконечной концентрации контрастного агента ($E_{R,RH}^{inf} = (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon_{R,RH}$, где ε_R и ε_{RH} есть факторы связи), f^* – фактор утечки, определяемый выражением (37), $S_{R,RH}$ – фактор насыщения, $E_R^{456,6}$ и E_R^{457} – факторы перекрывания, описываемые эффект смешивания спектральных компонент двух форм (см. рис. 35с).

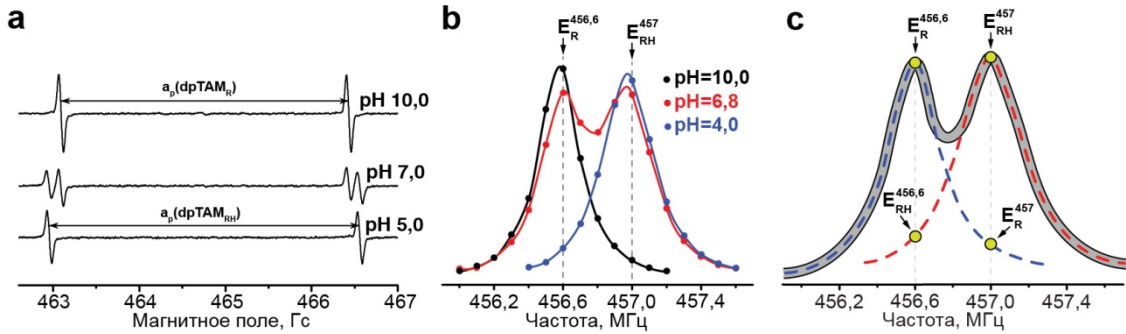


Рис. 35. (а) Спектр ЭПР радикала dpTAM, $a_p(dpTAM_R)$ и $a_p(dpTAM_{RH})$ константы СТВ депротонированной и протонированной формы радикала. (б) Высоочастотная компонента спектра ДПЯ 1 мМ раствора dpTAM при значениях pH 4,0, 6,8, 10,0. (с) Иллюстрация эффекта перекрывания двух спектральных компонент, соответствующих депротонированной и протонированной форме радикала. $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} – факторы усиления сигнала для депротонированной и протонированной формы, измеренные на их резонансных частотах ЭПР 456,6 и 457 МГц. $E_{RH}^{456,6}$ и E_R^{457} – факторы перекрывания (см. выражения (40а) и (40б)).

Факторы насыщения в выражениях (40а) и (40б) описываются формулами (25) при $n = 2$:

$$S_R = \frac{1}{2} \cdot \frac{\alpha \cdot P}{g_R^{456,6} + \alpha \cdot P \cdot f_{exc}^{R,RH}}, S_{RH} = \frac{1}{2} \cdot \frac{\alpha \cdot P}{g_{RH}^{457} + \alpha \cdot P \cdot f_{exc}^{R,RH}}, \quad (41)$$

$$f_{exc}^{R,RH} = \frac{1 + C \cdot (w_{exc} \cdot T_{1e})_{R,RH}}{1 + 2 \cdot C \cdot (w_{exc} \cdot T_{1e})_{R,RH}}, g_{R,RH} = \left(\frac{1}{\gamma_S^2 T_{1e} T_{2e}} \right)_{R,RH}.$$

Скорость спинового обмена выражается следующим образом:

$$w_{exc}(pH) = \frac{k_1 \cdot 10^{-2pK} + k_2 \cdot 10^{-2pH} + k_{12} \cdot 10^{-pH-pK}}{(10^{-pK} + 10^{-pH})^2}, \quad (42)$$

где k_1, k_2 and k_{12} есть константы скорости спинового обмена для депротонированных, протонированных форм радикала и обмена между ними, соответственно. Концентрации протонированной и депротонированной формы в зависимости от pH задаются выражением (28). Параметры $g_R^{456,6}$ и g_{RH}^{457} могут быть выражены с использованием формул (20 и 28):

$$g_R^{456,6} = (a_{10} + a_{11} \cdot C / (1 + 10^{pK-pH}) + a_{12} \cdot pO_2)^2, \quad (43a)$$

$$g_{RH}^{457} = (a_{20} + a_{21} \cdot C \cdot 10^{pK-pH} / (1 + 10^{pK-pH}) + a_{22} \cdot pO_2)^2. \quad (43b)$$

Факторы перекрывания $E_{RH}^{456,6}$ и E_R^{457} было предложено описать так же, как и усиления сигнала без эффекта смешивания:

$$\begin{aligned} E_{RH}^{456,6} &= (a_5 \cdot C / (1 + 10^{pK-pH})) \cdot f_l \cdot \frac{\alpha \cdot P}{g_{RH}^{456,6} + \alpha \cdot P}, \\ E_R^{457} &= (a_6 \cdot C \cdot 10^{pK-pH} / (1 + 10^{pK-pH})) \cdot f_l \cdot \frac{\alpha \cdot P}{g_R^{457} + \alpha \cdot P}, \end{aligned} \quad (44)$$

где первый множитель в скобках описывает первый член разложения фактора утечки (18) в ряд Тейлора с зависимостью от pH, второй множитель есть зависящая от концентрации кислорода часть фактора утечки, и третий множитель имеет такую же структуру, как и фактор насыщения (41) (для упрощения параметр $f_{exc}^{R,RH} \lesssim 1$ был опущен). Параметры $g_{RH}^{456,6}$ и g_R^{457} описываются уравнениями (43a) и (43b) с коэффициентами a_{30} , a_{31} , a_{32} и a_{40} , a_{41} , a_{42} , соответственно.

Для того чтобы улучшить результат аппроксимации экспериментальных данных, несколько эмпирических зависимостей было внедрено в предложенную математическую модель. Следующее выражение использовалось для описания зависимой от концентрации кислорода части фактора утечки, f_l :

$$f_l = (1 + T_{10} \cdot w_l^0 \cdot pO_2) / (1 + 2 \cdot T_{10} \cdot w_l^0 \cdot pO_2). \quad (45)$$

Следующие дополнительные члены были введены в выражения (43a) и (43b) под действие операции квадратной степени: $(a_{13}C + a_{14}C^2)10^{pK-pH} / (1 + 10^{pK-pH})$ и $(a_{23}C + a_{24}C^2) / (1 + 10^{pK-pH})$, соответственно. Все параметры a_{ij} , используемые в этом описании, являются экспериментально определяемыми.

Значение максимального усиления сигнала для протонированной и депротонированной формы при бесконечной мощности при сильных кислотных или щелочных условиях описывается следующим выражением:

$$E_{R,RH}^{max} = E_{R,RH}(P \rightarrow \infty) = \left| 1 - \frac{1}{2} \cdot E_{RH}^{inf} \cdot f^* \cdot \frac{1 + 2 \cdot C \cdot k_{1,2} \cdot (T_{1e})_{R,RH}}{1 + C \cdot k_{1,2} \cdot (T_{1e})_{R,RH}} \right| \quad (46)$$

4.1.3 Описание кривой титрования pH

Отношение усиления сигнала протонированной и депротонированной формы радикала dpTAM описывается стандартной кривой титрования pH (29). Можно записать такое же выражения для отношений усиления сигнала увеличенных на единицу:

$$\frac{E_R^{456,6} + 1}{E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2} = \frac{R_{max} + R_{min} \cdot 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}}. \quad (47)$$

Как показывают выражения (40a) и (40b), усиления сигнала $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} зависят от мощности накачки ЭПР, pH, концентрации кислорода и контрастного агента. Следовательно, параметры R_{max} и R_{min} также являются функциями переменных P , C , pO_2 . Для того чтобы получить аналитические выражения для R_{max} и R_{min} , подставим выражения (40a) и (40b) в (47) и попробуем сохранить структуру формулы кривой титрования pH, перегруппировывая переменные P , C , pO_2 и все неизвестные параметры в функции R_{max} и R_{min} . Для этого сделаем следующие существенные упрощения: опустим факторы перекрывания; будем считать, что $E_{inf}^R = E_{inf}^{RH}$, $a_{10} = a_{20}$, $a_{11} = a_{21}$ и $a_{12} = a_{22}$; пренебрежем членами пропорциональными C^2 и $C \cdot pO_2$. Принимая во внимание перечисленные упрощения, были получены следующие выражения для параметров R_{max} и R_{min} :

$$R_{max} = \frac{(a_0 + a_2 \cdot pO_2)^2 + \alpha P}{2(a_0 + a_2 \cdot pO_2)^2 + 2a_0 a_1 C + 2\alpha P},$$

$$R_{min} = \frac{(a_0 + a_2 \cdot pO_2)^2 + 2a_0 a_1 C + \alpha P}{2(a_0 + a_2 \cdot pO_2)^2 + 2a_0 a_1 C + 2\alpha P}. \quad (48)$$

Однако экспериментально может быть показано, что влияние концентраций контрастного агента и кислорода на форму кривой титрования pH в диапазоне значений 6,4-7,4 значительно слабее, чем влияние мощности накачки (см. рис. 42a и 42c). Для того чтобы значительно упростить процедуру извлечения параметров, можно пренебречь влиянием pO_2 , C и Pi на кривую титрования для интересующего диапазона значений pH:

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

$$R_{min}(P) = \frac{s_3 + \alpha P}{s_4 + 2\alpha P}, \quad (49)$$

где параметры s_1 , s_2 , s_3 , s_4 являются экспериментально определяемыми.

4.1.4 Теоретические основы для вычисления Pi

Вследствие протонного обмена между радикалом дрТАМ и фосфатным буфером значение усиления сигнала $E_m^{456,8}$ при частоте накачки ЭПР, соответствующей положению между двумя формами радикала, зависит от концентрации фосфатного буфера. Данное явление продемонстрировано на рисунке 45a. Нами было разработано полуэмпирическое описание, позволяющее использовать этот эффект для определения значений Pi . Проведенные эксперименты показали, что отношение $R_m(P) = E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$, нормализованное на

его значение при бесконечной мощности ($R_m^{max} = R_m(P \rightarrow \infty)$), зависит от мощности накачки ЭПР и концентрации фосфатного буфера (см. рис. 45b). Отношение $R_m(P)/R_m^{max}$ может быть аппроксимировано рациональной функцией следующего вида:

$$R_m(P)/R_m^{max} = \frac{g_+ + \alpha \cdot P}{g_m + \alpha \cdot P}, \quad (50)$$

где g_+ и g_m параметры аппроксимации.

Для того чтобы получить выражения для параметров g_+ и g_m , были сделаны следующие упрощения: в выражениях для усиления сигнала (40a) и (40b) опускались факторы перекрывания и единицы; предполагалось, что $E_{inf}^R \approx E_{inf}^{RH}$. А также считалось, что фактор усиления сигнала $E_m^{456,8}$ можно описать аналогичным образом, как факторы для протонированной и депротонированной форм радикала dpTAM:

$$E_m^{456,8} = |1 - E_{inf}^m \cdot f \cdot S_m|, \quad (51)$$

$$S_m = \frac{\alpha \cdot P}{g_m + \alpha \cdot P}.$$

Тогда отношение $E_m^{456,8}/(E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ может быть выражено как:

$$\frac{E_m^{456,8}}{E_R^{456,6} + E_{RH}^{457}} = \frac{E_{inf}^m}{E_{inf}^R} \cdot \frac{g_R g_{RH} + \alpha P (g_R + g_{RH}) + \alpha^2 P^2}{g_m (g_R + g_{RH}) + \alpha P (g_R + g_{RH} + 2g_m) + 2\alpha^2 P^2}. \quad (52)$$

Аналогично тому, как это было сделано для упрощенного описания кривой титрования (47), для качественного описания эффекта будем считать, что вкладом членов пропорциональных C^2 можно пренебречь и $a_{10} = a_{20}$, $a_{12} = a_{22}$, но $a_{11} \sim a_{21}$. При таких условиях можно получить следующее оценочное выражение:

$$g_+ = (g_R + g_{RH})/2 \approx (b_0 + C \cdot (b_1 + b_2 \cdot 10^{pK-pH})/(1 + 10^{pK-pH}) + b_3 \cdot pO_2)^2, \quad (53)$$

Так же в качестве оценки справедливо следующее: $g_R \cdot g_{RH} \sim g_+^2$. Используя полученные приближения, рациональная функция (52) сводится к выражению (50), которое является более удобным для анализа экспериментальных данных.

Полуэмпирическое описание параметра g_m было построено следующим образом. Рисунок 45b изображает зависимость $R_m(P)/R_m^{max}$ от мощности накачки ЭПР при разных концентрациях фосфатного буфера. Видно, что отношение является возрастающей функцией мощности при низкой концентрации буфера и убывающей функцией при высокой концентрации, отражая значительное влияние концентрации неорганического фосфата на форму спектра ДПЯ спиновой пробы dpTAM. Очевидно, что поведение функции $R_m(P)/R_m^{max}$ определяется знаком ее производной:

$$\frac{\partial R_m(P)/R_m^{max}}{\partial P} = \frac{\alpha \cdot \Delta g}{(g_m + \alpha \cdot P)^2}, \quad (54)$$

$$\Delta g = g_m - g_+.$$

Таким образом, вследствие того, что при увеличении концентрации фосфатного буфера увеличивается усиление сигнала $E_m^{456,8}$ (см. рис. 45а), в то же время значения $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} остаются примерно постоянными в диапазоне значений P_i равном 0–4 мМ (см. рис. 46), можно составить два следующих условия:

$$\begin{aligned} \Delta g &> 0, & \text{медленный обмен,} \\ \Delta g &< 0, & \text{промежуточный обмен.} \end{aligned} \quad (55)$$

Для того чтобы удовлетворить первому условию (55) ($\Delta g > 0$ при $P_i \leq 1$ мМ), функция $g_m(P_i = 0)$ в отсутствие фосфатного буфера должна иметь такую же структуру как и функция g_+ . В используемой модели задействовано большое количество параметров, поэтому для существенного упрощения и качественного решения задачи будем считать, что $g_m(P_i = 0) = b_3 \cdot g_+$, где $b_3 > 1$. Высокие значения концентрации буфера приводят к тому, что знак производной (54) становится отрицательным, тогда справедливо следующее выражение:

$$g_m = b_4 \cdot g_+ - g_{Pi}(C, pO_2, pH, P_i), \quad (56)$$

где g_{Pi} представим как $P_i \cdot g_{Pi}^0$ (для выполнения условия $g_{Pi} = 0$ при $P_i = 0$ мМ). Следующее выражение для параметра g_{Pi} было получено эмпирическим путем при анализе экспериментальных данных (см. рис. 47):

$$g_{Pi}(C, pO_2, pH, P_i) = P_i \cdot g_{Pi}^0(C, pO_2, pH, P_i), \quad (57a)$$

$$g_{Pi}^0(C, pO_2, pH, P_i) = \frac{h(C, pO_2, P_i)}{1 + 10^{b_{10} - pH}}, \quad (57b)$$

$$h(C, pO_2, P_i) = |b_5 - (b_6 - b_7 \cdot P_i) \cdot pO_2 + (b_8 - b_9 \cdot P_i) \cdot C|, \quad (57c)$$

где b_i являются экспериментально определяемыми параметрами.

4.1.5 Системы уравнений для визуализации функциональных параметров

В текущем разделе будет рассмотрено, как разработанное теоретическое описание можно применить для решения обратной задачи с использованием только двух мощностей накачки ЭПР.

Определение концентрации кислорода с помощью контрастного агента dTAM

Усиление сигнала МРТ зависит от концентрации спиновой пробы и кислорода, поэтому двух изображений ОМРТ, полученных при двух разных мощностях накачки ЭПР достаточно

для того, чтобы определить эти два параметра. Значения pO_2 и C могут быть получены путем решения следующей системы уравнений:

$$\begin{aligned} E_1 &= |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f(C) \cdot S(P_1, C, pO_2)|, \\ E_2 &= |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f(C) \cdot S(P_2, C, pO_2)|. \end{aligned} \quad (58)$$

Необходимо отметить, что для решения уравнений так же необходимо получение третьего изображения МРТ без накачки ЭПР для того, чтобы вычислить факторы усиления сигнала. Похожая система уравнений может быть записана для случая с фактором утечки f^* , учитывающего влияние кислорода:

$$\begin{aligned} E_1 &= |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f^*(C, pO_2) \cdot S^*(P_1, C, pO_2)|, \\ E_2 &= |1 - (\gamma_S/\gamma_I) \cdot \varepsilon \cdot f^*(C, pO_2) \cdot S^*(P_2, C, pO_2)|. \end{aligned} \quad (59)$$

Для того чтобы вычислить концентрацию кислорода и спинового зонда, системы уравнений (58) или (59) решались численно методом наименьших квадратов Левенберга-Марквардта с помощью алгоритма, разработанного в среде программирования MATLAB. Все необходимые калибровочные коэффициенты перечислены в разделе 2.2.5.

Необходимо отметить, что уравнения (58) или (59) нельзя свести к линейным и получить решение вида (24), как это было сделано в главе “Литературный Обзор” в параграфе 1.3. Во-первых, потому что не всегда можно пренебречь произведением $r \cdot C \cdot T_{10}$ по сравнению с единицей в знаменателях факторов утечки (18) и f_0 в формуле (30). Так как, например, для радикала dTAM в физиологическом растворе произведение $r \cdot T_{10}$ равно $0,48 \text{ мМ}^{-1}$ [81]. Во-вторых, нелинейность уравнений возникает из-за введения фактора f_I .

В данном разделе две системы уравнений (58) и (59) были рассмотрены для того, чтобы в следующем параграфе с использованием фантомных образцов провести сравнительный анализ, и показать, к каким ошибкам может привести игнорирование влияния кислорода на фактор утечки.

Одновременное определение параметров pH, pO_2 и P_i

Факторы усиления сигнала $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} зависят от pH, концентраций спинового зонда и кислорода. Эти параметры могут быть получены решением системы уравнений (40) при двух мощностях накачки ЭПР:

$$\begin{aligned}
E_R^{456,6}(P_1) &= |1 - E_R^{inf} \cdot f \cdot S_R(P_1)| + E_{RH}^{456,6}(P_1), \\
E_{RH}^{457}(P_1) &= |1 - E_{RH}^{inf} \cdot f \cdot S_{RH}(P_1)| + E_R^{457}(P_1), \\
E_R^{456,6}(P_2) &= |1 - E_R^{inf} \cdot f \cdot S_R(P_2)| + E_{RH}^{456,6}(P_2), \\
E_{RH}^{457}(P_2) &= |1 - E_{RH}^{inf} \cdot f \cdot S_{RH}(P_2)| + E_R^{457}(P_2).
\end{aligned} \tag{60}$$

Система уравнений (60) решалась численно. Для решения системы (60) параметр pH определялся из следующей системы уравнений и использовался как параметр:

$$\begin{aligned}
\frac{E_R^{456,6}(P_1) + 1}{E_R^{456,6}(P_1) + E_{RH}^{457}(P_1) + 2} &= \frac{R_{max}(P_1) + R_{min}(P_1) \cdot 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}}, \\
\frac{E_R^{456,6}(P_2) + 1}{E_R^{456,6}(P_2) + E_{RH}^{457}(P_2) + 2} &= \frac{R_{max}(P_2) + R_{min}(P_2) \cdot 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}}.
\end{aligned} \tag{61}$$

Концентрация фосфатного буфера Pi определялась из решения системы двух уравнений для отношения $E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$, полученном при двух разных мощностях накачки ЭПР:

$$\begin{aligned}
\frac{E_m^{456,8}(P_1)}{E_R^{456,6}(P_1) + E_{RH}^{457}(P_1)} \cdot \frac{E_R^{456,6}(P_2 = 8) + E_{RH}^{457}(P_2 = 8)}{E_m^{456,8}(P_2 = 8)} &= \frac{R_m(P_1)}{R_m^{max}}, \\
\frac{R_m(P_2 = 8)}{R_m^{max}} &= 1.
\end{aligned} \tag{62}$$

Необходимым условием для применения этого подхода является то, чтобы наибольшая мощность (P_2) была больше либо равна 8 Вт. Так как данная мощность использовалась для оценки параметров R_m^{max} в калибровочных процедурах, описанных в разделе 2.2.5. Использование большей мощности оправданно тем, что уже при 8 Вт функция $R_m(P)/R_m^{max}$ (см. уравнение (50)) достигает примерно постоянного значения, равного единице (см. рис. 45b). Параметры C , pO_2 and pH определялись решением систем уравнений (60) и (61) и использовались как параметры при расчете Pi . Все процедуры решения систем уравнений, обработки данных, получения изображений были выполнены с помощью алгоритмов, разработанных в среде программирования MATLAB. Системы уравнений решались методом наименьших квадратов Левенберга-Марквардта.

4.2 Роль кислорода в эффекте утечки спиновой поляризации в экспериментах ОМРТ

Как было показано в начале прошлого параграфа, наличие дополнительных парамагнитных агентов, в том числе и кислорода, приводит к утечке спиновой поляризации в эксперименте ОМРТ. Так как ранее этот эффект не учитывался должным образом в представленных в литературе работах [13-16, 129], то ему следует уделить особое внимание. Кроме того, ошибки определения концентрации кислорода могут вносить вклад в точность

определения других функциональных параметров в задаче мультипараметрической томографии. Данный параграф посвящен изучению эффекта утечки поляризации, вызванной дополнительным парамагнитным агентом, в эксперименте ОМРТ и применению данного метода для визуализации концентрации кислорода в фантомных образцах и опухолей мышей *in vivo*.

4.2.1 Утечка спиновой поляризации, вызванная дополнительным парамагнитным агентом

Как отмечалось ранее, применение метода ОМРТ для измерения концентрации кислорода требует использования парамагнитных проб с большими временами электронной релаксации. Триарилметильные радикалы в этом плане являются самым удачным выбором, поэтому в качестве контрастного агента в этой части исследования использовался радикал dTAM (структура приведена на рис. 23а). Усиление сигнала в эксперименте ОМРТ строго зависит от мощности накачки ЭПР и концентрации спинового зонда, как показано на рисунке 36а. Как и следовало ожидать, усиление сигнала увеличивается с ростом концентрации и мощности. С помощью аппроксимации экспериментальных данных выражением (36), были получены значения максимального усиления сигнала (E_{max}) при разных значениях концентрации контрастного агента (см. рис. 36b). Полученная зависимость была аппроксимирована выражением (39), что позволило определить значения фактора связи ($\varepsilon_{dTAM} = 0,357 \pm 0,003$) и усиление сигнала при бесконечной мощности и концентрации радикала ($E_{dTAM}^{inf} = 236 \pm 2$). Полученные значения ε_{dTAM} и E_{dTAM}^{inf} находятся в согласии с опубликованными данными [13, 81].

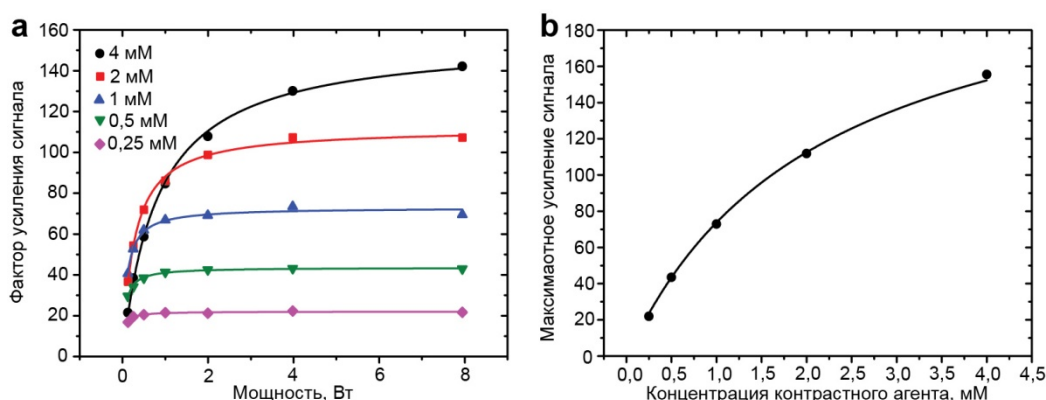


Рис. 36. (а) Зависимость усиления сигнала МРТ от мощности накачки ЭПР при разных концентрациях контрастного агента dTAM в анаэробных условиях; сплошные линии являются аппроксимацией выражением (36), позволяющей вычислить значения максимального усиления сигнала. (б) Зависимость максимального усиления сигнала от концентрации радикала dTAM; сплошная линия есть аппроксимация данных выражением (39). Полученные значения фактора связи, ε_{dTAM} , и усиления

сигнала при бесконечной мощности и концентрации dTAM, E_{dTAM}^{inf} , равны $0,357 \pm 0,003$ и 236 ± 2 .

Парамагнитные молекулы кислорода взаимодействуют со спиновыми зондами и с протонами воды, приводя к изменению сигнала ОМРТ. Рисунок 37а показывает зависимости усиления сигнала от мощности накачки ЭПР для образцов с концентрацией спинового зонда 1 мМ, но с разной концентрацией кислорода. Так же как и на рисунке 36а, усиление сигнала растет при увеличении мощности. Аппроксимация этих данных выражением (36) позволила извлечь значения E_{max} , показанные на рисунке 37б. Видно, что значения E_{max} уменьшаются с ростом содержания кислорода в растворе.

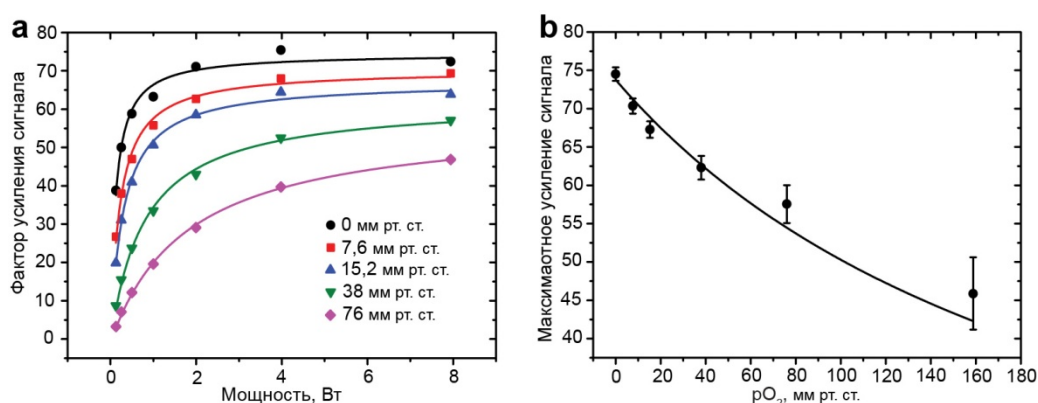


Рис. 37. (а) Зависимость усиления сигнала МРТ от мощности накачки ЭПР при постоянной концентрации dTAM (1 мМ), но разных значениях pO_2 . Сплошные линии являются результатом аппроксимации данных выражением (36), позволяющим извлечь значения максимального усиления сигнала E_{max} . (б) Зависимость E_{max} от pO_2 ; сплошная линия является аппроксимацией выражением (39). Полученное значение константы скорости утечки, w_l^0 , равно $(1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ (мм рт. ст.·с)⁻¹.

Усиление сигнала МРТ раствора с контрастным агентом уменьшается в присутствии парамагнитных примесей, таких как кислород [15]. Выражения (38) и (39) позволяет корректно описать зависимость усиления сигнала от концентрации кислорода при высоких мощностях, когда фактор насыщения близок к единице. Аппроксимация зависимости E_{max} от парциального давления кислорода выражением (39) позволила определить константу скорости утечки, w_l^0 , равную $1,3 \pm 0,2$ (мМ·с)⁻¹ ($w_l^0 = (1,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ (мм рт. ст.·с)⁻¹ считая, что растворимость кислорода составляет 1,0 мМ при 1 атм [130])

Для того чтобы продемонстрировать то, что наличие любой дополнительной парамагнитной примеси в растворе со спиновой пробой приводит к утечке поляризации, мы провели измерения сигнала ОМРТ для агента dTAM в присутствии нитроксильного радикала (3-карбамоил-проксил) и комплекса гадолиния, Gd-DTPA (см. рис. 38а и 38б). Полученные

константы скорости утечки равны $0,11 \pm 0,02$ и $5,0 \pm 0,3$ (мМ·с)⁻¹ для нитроксильного радикала и комплекса гадолиния, соответственно.

Эффективное время релаксации протонов воды в присутствии основного контрастного агента и дополнительной парамагнитной примеси может быть описано следующим образом:

$$\frac{1}{T_{10}^{eff}} = \frac{1}{T_{10}^0} + r_{par} \cdot C_{par}, \quad (63)$$

где T_{10}^0 – время релаксации протонов воды в отсутствии парамагнитной примеси, r_{par} и C_{par} – константа скорости релаксации и концентрация парамагнитной примеси, соответственно. Очевидно, что подставляя эффективное время релаксации (63) в фактор утечки (18) получится выражение (37). Таким образом, константа скорости утечки $w_l = w_l^0 \cdot C_{par} = r_{par} \cdot C_{par}$. Чтобы измерить соответствующие константы скорости релаксации, был проведен эксперимент насыщения-восстановления для разных концентраций кислорода и комплекса гадолиния. Экспериментальные данные для определяемой кислородом константы скорости релаксации дали значение $(4,5 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ (мм рт. ст.·с)⁻¹, которое достаточно близко к значениям из литературных данных равных $(5,0-6,6) \times 10^{-4}$ (мм рт. ст.·с)⁻¹ [131]. Отметим, что полученная константа скорости релаксации для кислорода в два-три раза меньше константы скорости утечки, полученной в ОМРТ эксперименте. В противоречие результатам эксперимента с кислородом, полученная константа скорости релаксации для комплекса гадолиния равна $6,7 \pm 0,3$ (мМ·с)⁻¹ (литературные данные дают значения $6,5-7,0$ (мМ·с)⁻¹ [132, 133]), что достаточно близко к значению константы скорости утечки полученной в эксперименте ОМРТ. Для нитроксильного радикала значение константы r_{par} составляет $0,4$ (мМ·с)⁻¹ [134], что в несколько раз больше полученного в эксперименте ОМРТ значения w_l^0 .

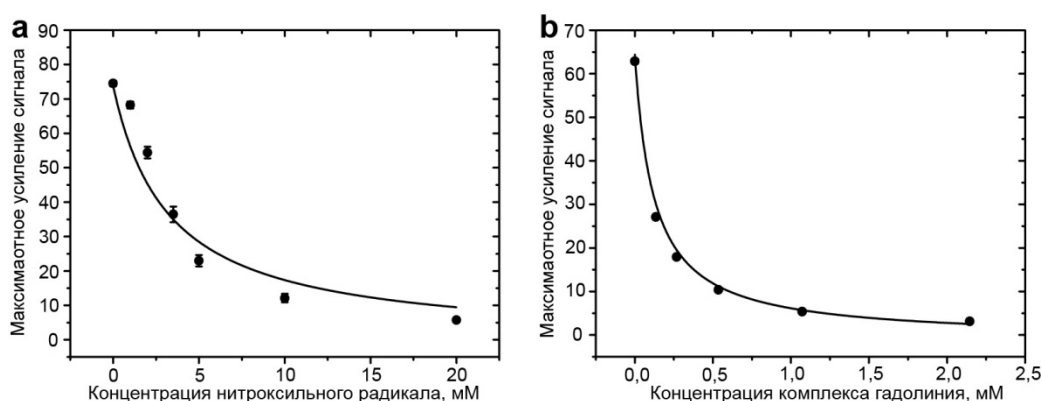


Рис. 38. (а) Зависимость максимального усиления сигнала МРТ от концентрации нитроксильного радикала в 1 мМ растворе дpТАМ. Константа скорости утечки, w_l^0 , равная $0,11 \pm 0,02$ (мМ·с)⁻¹ была получена путем аппроксимации данных выражением (39). (б) Зависимость максимального усиления

сигнала МРТ от концентрации комплекса гадолиния при концентрации радикала dpTAM 0,83 мМ. Константа скорости утечки, w_l^0 , равная $5,0 \pm 0,3$ (мМ·с)⁻¹, была получена путем аппроксимации данных выражением (39). В данных двух экспериментах радикал dpTAM использовался в качестве основного контрастного агента.

Причинами различия значений констант r_{par} и w_l^0 для нитроксильного радикала могут являться следующие эффекты: частичное перекрывание ДПЯ спектров парамагнитной примеси и контрастного агента; влияние спинового обмена Гейзенберга между примесью и парамагнитной пробой. Однако причина значительного отличия значений r_{par} и w_l^0 для кислорода не понятна и должна быть изучена далее как экспериментально, так и теоретически.

Экспериментальные данные, показанные на рисунке 37а могут быть аппроксимированы как выражением (17), так и выражением (38), т.е. моделями без и с учетом утечки поляризации, определяемой скоростью w_l . Значения концентрации контрастного агента и кислорода как экспериментальные, так и рассчитанные приведены в Таблице 1. Как было показано, максимальное значение усиления (E_{max}) уменьшается с увеличением концентрации кислорода (см. рис. 37b). Соответственно, использование выражения (17) приводит к занижению вычисляемой концентрации спинового зонда, чтобы скомпенсировать эффект утечки поляризации, вызванной кислородом, что в свою очередь приводит к неправильному определению pO_2 , так как значение функции усиления сигнала однозначно определяется парой переменных C и pO_2 . В случае расчета с использованием выражения (38) зависимость E_{max} от концентрации кислорода определяется зависящем от кислорода фактором утечки f^* , что не приводит к вычислительным ошибкам. Действительно, расчетные значения C и pO_2 находятся в согласии с экспериментальными (см. Таблицу 1). Значения и процедуры получения калибровочных постоянных использованных для вычислений доступны в разделе 2.2.5.

Таблица 1. Экспериментальные и вычисленные концентрации контрастного агента (C) и парциальные давления кислорода (pO_2) и их стандартные ошибки. Вычисления были сделаны с использованием данных зависимости усиления сигнала ОМРТ от мощности накачки ЭПР показанных на рисунке 37а.

Образец №	Экспериментальные значения		Вычисленные значения (модель с фактором утечки f)		Вычисленные значения (модель с фактором утечки f^*)	
	C , мМ	pO_2 , мм рт. ст.	C , мМ	pO_2 , мм рт. ст.	C , мМ	pO_2 , мм рт. ст.
1	1	0	$0,97 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,8$	$1,01 \pm 0,03$	0 ± 1
2	1	7,6	$0,90 \pm 0,02$	$7,6 \pm 0,8$	$0,98 \pm 0,02$	9 ± 1
3	1	15,2	$0,84 \pm 0,02$	12 ± 1	$0,96 \pm 0,02$	15 ± 1
4	1	38	$0,76 \pm 0,02$	31 ± 1	$0,99 \pm 0,03$	41 ± 2
5	1	76	$0,68 \pm 0,02$	56 ± 2	$1,04 \pm 0,03$	75 ± 2

4.2.2 Визуализация фантомных образцов

Для того чтобы продемонстрировать возможность пространственно разрешенных измерений, были получены двумерные карты распределения концентраций контрастного агента и pO_2 в фантомном образце. Фантомный образец состоял из четырех ампул, заполненных растворами с разными концентрациями спинного зонда и кислорода. Использование минимального количества изображений, полученных только при двух мощностях накачки ЭПР, оправдано тем, что в случае измерений *in vivo* время для получения данных ограничено. Карты распределения контрастного агента и pO_2 были вычислены с использованием двух систем уравнений (58) и (59) с факторами утечки f и f^* , соответственно. Карты представлены на рисунке 39, соответствующие экспериментальные и средние вычисленные значения C и pO_2 и их стандартные отклонения представлены в Таблице 2. Методология приготовления фантомных образцов доступна в разделе 2.2.3, значения использованных калибровочных параметров приведены в разделе 2.2.5.

Из данных Таблицы 2 видно, что значения параметров, полученных с помощью вычислений с фактором f^* , находятся в хорошем согласии с приготовленными значениями. Тогда как вычисления с фактором f приводят к занижению как pO_2 , так и концентрации контрастного агента, особенно при их высоких значениях.

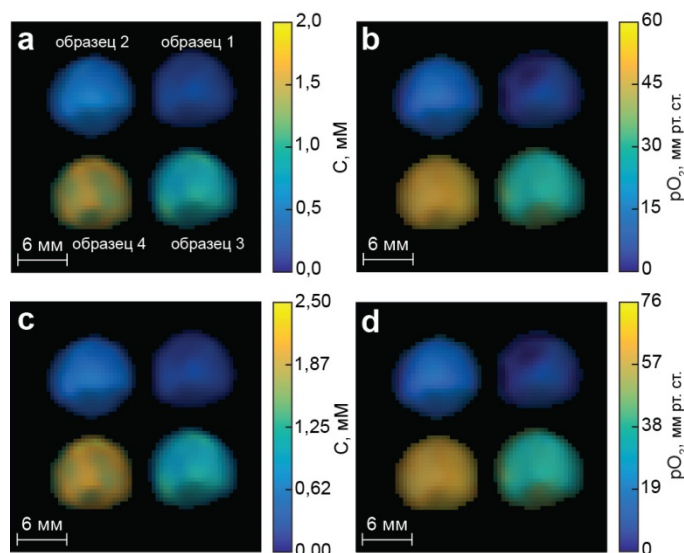


Рис. 39. 2D карты распределения контрастного агента (C) и pO_2 в фантомных образцах. Фантомный образец состоит из четырех ампул, заполненных раствором с концентрацией спинного зонда 0,25, 0,5, 1 и 2 мМ и значениями pO_2 0, 15, 2, 38 и 76 мм рт. ст. для флаконов 1, 2, 3, и 4, соответственно. (a, b) Вычисления с фактором утечки f . (c, d) Вычисления с фактором утечки f^* . Фактор эффективности резонатора α составляет 5,7 мкТл²/Вт. Параметры получения данных: T_{EPR} , 500 мс; T_R , 700 мс; T_E , 37 мс; размер матрицы, 64×64; область томограммы, 30×30 мм²; толщина среза, 100 мм; полное время записи,

3 мин; частота ЭПР 451,9 МГц; мощности накачки ЭПР, 0,5 и 8 Вт; частота ЯМР, 686,3 кГц.

Таблица 2. Экспериментальные и средние вычисленные значения концентрации контрастного агента (С) и pO_2 и их стандартные отклонения. Значения соответствуют фантомным образцам, изображенным на рис. 39. Вычисления сделаны с использованием двух изображений ОМРТ полученных при мощностях накачки ЭПР 0,5 и 8,0 Вт.

Образец №	Экспериментальные значения		Вычисленные значения (модель с фактором утечки f)		Вычисленные значения (модель с фактором утечки f^*)	
	С, мМ	pO_2 , мм рт. ст.	С, мМ	pO_2 , мм рт. ст.	С, мМ	pO_2 , мм рт. ст.
1	0,25	0	$0,23 \pm 0,03$	5 ± 3	$0,25 \pm 0,03$	6 ± 3
2	0,5	15,2	$0,40 \pm 0,06$	10 ± 3	$0,44 \pm 0,06$	13 ± 4
3	1	38	$0,80 \pm 0,12$	30 ± 3	$1,0 \pm 0,15$	39 ± 4
4	2	76	$1,40 \pm 0,15$	52 ± 3	$2,0 \pm 0,2$	66 ± 4

4.2.3 Визуализация оксигенации опухолей *in vivo*

После успешных томографических экспериментов с фантомными образцами были проведены эксперименты на животных. На рисунке 40 изображены двумерные карты распределения pO_2 и контрастного агента в опухоли мыши. Размер опухоли, измеренный с помощью каверномера, составляет 5×8 мм². Для получения параметров pO_2 и С системы уравнений решались в каждом пикселе набора изображений для двух моделей (58) и (59) с факторами утечки f и f^* . Значения усиления сигнала находились в диапазоне 5-20 для высокой мощности и 2-14 для более низкой мощности накачки ЭПР. Функциональные карты совмещены вместе с изображением МРТ, полученном без накачки ЭПР. Карты pO_2 показывают наличие двух областей, соответствующих гипоксичному и нормоксичному микроокружению. Средние парциальные давления кислорода и стандартные отклонения равны 17 ± 7 и 23 ± 9 мм рт. ст. в области гипоксии для вычислений с факторами утечки f и f^* . Средние значения pO_2 для нормоксичной области в 2-3 раза выше и составляет 43 ± 5 мм рт. ст. (вычислено с фактором f) и 60 ± 8 мм рт. ст. (вычислено с фактором f^*). Средние значения pO_2 для целой опухоли составляют 24 мм рт. ст. и 34 мм рт. ст. для вычислений с факторами утечки f и f^* , соответственно. Необходимо отметить, что более низкое значение концентрации спиновой пробы было вычислено в нормоксичной области для модели с фактором f по сравнению с моделью, учитывающей влияние кислорода на фактор утечки. Заниженные значения pO_2 и концентрации спиновой пробы, вычисленные с помощью модели с фактором f , являются следствием корректировки асимптотики усиления сигнала при высоких мощностях, как это было показано на фантомных образцах.

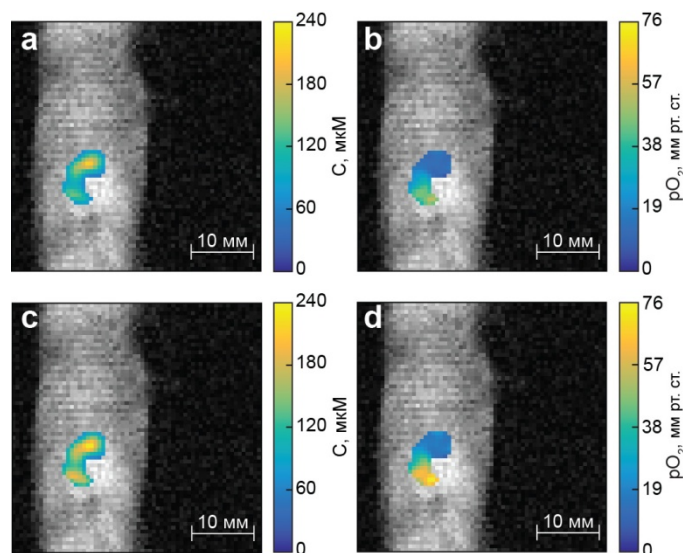


Рис. 40. 2D карты распределения контрастного агента и парциального давления кислорода в мышинной опухоли. Карты совмещены с изображением МРТ. (a, b) Вычисления с фактором утечки f . (c, d) Вычисления с фактором утечки f^* . Фактор эффективности резонатора α составлял 3,5 мкТл²/Вт. Параметры получения данных: T_{EPR} , 500 мс; T_R , 700 мс; T_E , 37 мс; размер матрицы, 64×64; область томограммы, 40×40 мм²; толщина среза, 5 мм; полное время записи, 3 мин; частота ЭПР 451,9 МГц; мощности накачки ЭПР, 1 и 8 Вт; частота ЯМР, 686,3 кГц.

На рисунке 41a-41h изображены 3D карты pO_2 и спинового зонда в опухоли мыши (размер опухоли был измерен каверномером и равен 15×20 мм²), 2D проекции карт в коронарной плоскости и гистограммы распределения искомых параметров. Средние значения и их стандартные отклонения для моделей с факторами утечки f и f^* равны 27 ± 7 мм рт. ст. и 38 ± 9 мм рт. ст. Измеренные значения pO_2 находятся в согласии со значениями, полученными с помощью спектроскопии ЭПР L-диапазона [18]. Детали проведения экспериментов с животными изложены в главе “Экспериментальная Часть” в разделе 2.2.4, значения использованных калибровочных параметров приведены в разделе 2.2.5.

4.2.4 Выбор времени релаксации протонов воды для измерений *in vivo*

Вычисления значений pO_2 и концентрации контрастного агента в опухоли были проведены, используя такое же значение T_{10} как для фантомных образцов ($T_{10} = 3,9$ с). Ранее было установлено, что время релаксации протонов воды, T_{10} , в опухоли меняется в широком диапазоне от 0,2 до 1,6 с из-за ее гетерогенных свойств [15]. Таким образом, использование постоянного значения T_{10} для вычисления параметров в опухоли имеет оценочный характер. Тем не менее, рисунок 41i показывает, что вычисленные значения pO_2 примерно одинаковы в диапазоне значений T_{10} от 1 до 4 с. Дальнейшее уменьшение T_{10} с 1 до 0,2 с существенно влияет на вычисленные значения pO_2 (см. рис. 41i). Но стоит отметить, что уменьшение

времени T_{10} в исследуемых биологических средах для тритильных радикалов сопровождается увеличением константы скорости релаксации, r [81]. На рисунке 41k изображена зависимость среднего расчетного pO_2 опухоли от константы r при фиксированных значениях T_{10} равных 0,2 с (кровь) и 0,5 с (плазма) [135]. Увеличение параметра r приводит к увеличению расчетного pO_2 , таким образом компенсируя эффект коротких времен релаксации T_{10} (см рис. 41i и 41k).

Влияние компенсирующего эффекта изменения параметров T_{10} и r на расчетные значения pO_2 может быть продемонстрировано для используемого в этом исследовании Финского тритильного радикала. Константа r для этой спиновой пробы в разных средах равна 0,15 (вода, физиологический раствор), 0,5 (плазма) и 0,6 (цельная кровь) $mM^{-1}s^{-1}$ [81], соответствующие времена релаксации равны 4 с (измеренное в этой работе значение равно $3,9 \pm 0,1$), 0,5 с и 0,2 с [81, 135]. Соответствующий расчет дал похожие значения для pO_2 ($\pm$ стандартное отклонение): 38 ± 9 мм рт. ст. для $T_{10} = 3,9$ с и $r = 0,12 mM^{-1}s^{-1}$; 37 ± 9 мм рт. ст. для $T_{10} = 0,5$ с и $r = 0,5 mM^{-1}s^{-1}$; 35 ± 8 мм рт. ст. для $T_{10} = 0,2$ с и $r = 0,6 mM^{-1}s^{-1}$. Во всех перечисленных случаях влияние изменения параметров T_{10} и r на максимальное усиления сигнала полностью компенсируется увеличением расчетной концентрации спинового зонда (см. рис. 41j и 41l). Таким образом, рассмотренный компенсирующий эффект оправдывает использование однородного распределения параметров T_{10} и r для расчета pO_2 в таких гетерогенных биологических тканях как опухоли. Использование для расчетов значений $T_{10} = 3.9$ с и $r = 0.12 mM^{-1}s^{-1}$, таких же как для фантомных образцов, обоснованно тем, что в наших экспериментах раствор спиновой пробы вводился в опухоль локально.

Подводя итог данному параграфу, можно сказать, что пренебрежение влиянием кислорода на фактор утечки при больших концентрациях кислорода в диапазоне 30-80 мм рт. ст. может привести к существенным вычислительным ошибкам равным 10-20 мм рт. ст. Теперь после демонстрации важности этого явления и получения необходимых теоретических выражений, представленных в параграфе 3.2, можно приступить к задаче одновременной визуализации параметров pH , pO_2 и Pi .

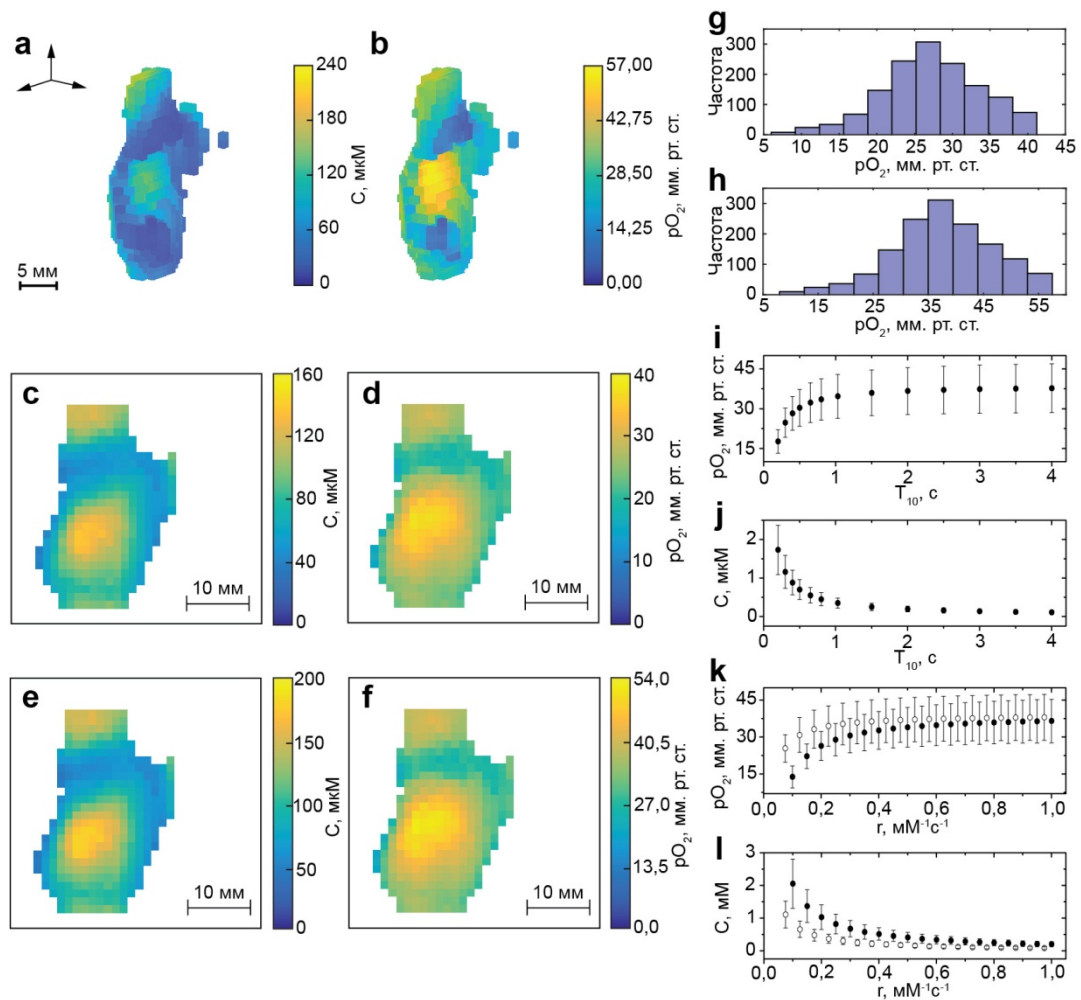


Рис. 41. (a, b) 3D карты распределения концентрации контрастного агента и pO_2 в опухоли мыши. Параметры были рассчитаны путем решения системы уравнений с фактором утечки f^* . Фактор эффективности резонатора α составлял $2 \text{ мкТл}^2/\text{Вт}$. Параметры получения данных: T_{EPR} , 500 мс; T_R , 1200 мс; T_E , 37 мс; размер матрицы пикселей, 32×32 ; размер области изображения, $40 \times 40 \text{ мм}^2$; полное время записи изображения, 16 мин; частота ЭПР 451,9 МГц; примененные мощности накачки ЭПР, 1 и 16 Вт; частота ЯМР, 686,3 кГц. (c, d, e, f) 2D проекции в коронарной плоскости полученных 3D карт распределения концентрации кислорода и парциального давления. (c, d) Расчет с фактором утечки f . (e, f) Расчет с фактором утечки f^* . (g, h) Гистограммы распределения pO_2 в опухоли мыши для расчетов с факторами утечки f и f^* . Полученные для двух расчетов средние значения и стандартные отклонения равны: 27 ± 7 и $38 \pm 9 \text{ мм. рт. ст.}$, соответственно. (i, j) Зависимости средних расчетных pO_2 и концентрации контрастного агента от времени релаксации T_{10} при константе скорости релаксации равной $0,12 \text{ mM}^{-1}\text{c}^{-1}$. Изображенные чертами ошибки отображают значения стандартных отклонений для соответствующих распределений. (k, l) Зависимости средних расчетных pO_2 и концентрации контрастного агента от значения константы скорости релаксации γ при времени релаксации T_{10} равном 0,2 с (черные кружочки) и 0,5 с (пустые кружочки). Изображенные чертами ошибки отображают значения стандартных отклонений для соответствующих распределений.

4.3 Одновременная визуализация концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и Pi

4.3.1 Одновременное определение концентрации контрастного агента, pH, pO_2 и Pi

Высокочастотная компонента спектра ДПЯ радикала $dpTAM$ при кислом ($pH = 4$), нейтральном ($pH \sim 7$) и щелочном ($pH = 10$) pH изображена на рисунке 35b. Так же как и в случае спектра ЭПР, высокочастотная компонента спектра ДПЯ пробы $dpTAM$ представляет собой одиночную линию при кислых и щелочных pH и характеризуется двумя линиями при нейтральных значениях pH . Отношение факторов усиления депротонированной, $E_R^{456,6}$, и протонированной формы, E_{RH}^{457} , в виде $(E_R^{456,6} + 1)/(E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2)$, зависит от значения pH и описывается стандартной кривой титрования pH со значением pK равным 6,88, что находится в согласии с литературными данными [19]. Титрование pH спинового зонда $dpTAM$ было осуществлено при различных условиях (см. рис 42а и 42с) и было обнаружено, что форма кривой титрования значительно зависит только от мощности накачки ЭПР, а влияние параметров pO_2 , Pi и концентрации спинового зонда пренебрежимо мало в диапазоне 6,4-7,4 единиц pH . Эти соображения позволяют осуществить визуализацию pH независимо от определения параметров pO_2 , Pi и C . Благодаря этим приближениям максимальные и минимальные R_{max} и R_{min} значения кривой титрования (47) описываются выражениями (49), которые зависят только от мощности накачки ЭПР и фактора эффективности резонатора. На рисунке 42b изображена зависимость параметров R_{max} и R_{min} от мощности накачки, данные аппроксимированы выражением (49).

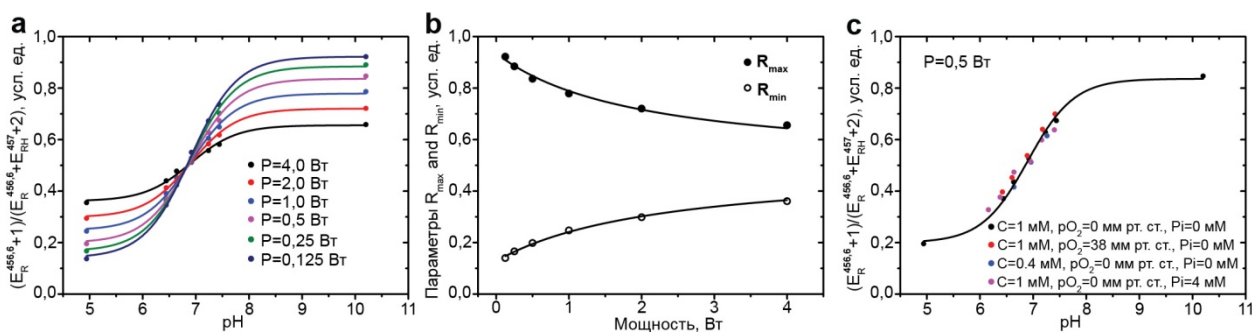


Рис. 42. (а) Зависимость отношения факторов усиления $(E_R^{456,6} + 1)/(E_R^{456,6} + E_{RH}^{457} + 2)$ от pH при разных мощностях накачки ЭПР ($C = 1$ мМ, $pO_2 = 0$ мм рт. ст.). Сплошные линии являются аппроксимацией выражением (41), полученное значение pK равно $6,88 \pm 0,01$. (б) Зависимость максимальных и минимальных значений кривой титрования (47) R_{max} и R_{min} от мощности накачки ЭПР. Сплошные линии являются аппроксимацией выражением (49), полученные параметры s_1, s_2, s_3, s_4 равны $30,7 \pm 2,7$ мкТл²; $32,7 \pm 3,2$ мкТл²; $4,7 \pm 0,5$ мкТл²; 38 ± 2 мкТл². (с) Влияние концентрации контрастного агента, pO_2 и Pi на форму кривой титрования pH при мощности накачки ЭПР 0,5 Вт.

Метод ОМРТ неоднократно применялся для визуализации pO_2 и концентрации контрастного агента [13-16, 84, 129]. Однако примененные в этих публикациях теоретические выражения не позволяют корректно описать зависимость факторов усиления $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} для спиновой пробы дрТАМ. Дело в том, что высокочастотная компонента спектра ДПЯ данного радикала состоит из двух линий, расстояние между которыми меньше, чем их ширины, то есть происходит перекрывание двух спектральных компонент, соответствующих протонированной и депротонированной форме радикала (см. рис 35с). Для того чтобы корректно описать факторы усиления было разработано полуэмпирическое математическое описание, представленное в параграфе 3.2. Традиционные уравнения для эффекта Оверхаузера были модифицированы путем введения факторов перекрывания $E_{RH}^{456,6}$ и E_R^{457} , описывающих эффект смешивания двух спектральных линий (см. рис 35с). Так же было учтено влияние спинового концентрационного обмена и индуцированной кислородом утечки спиновой поляризации. Полученные выражения (40а) и (40b) позволяют описать зависимость факторов усиления для депротонированной, $E_R^{456,6}$, и протонированной, E_{RH}^{457} , формы радикала от мощности накачки ЭПР, pH, pO_2 и концентрации радикала. Процедура определения калибровочных параметров изложена в разделе 2.2.5. На рисунке 43 изображены зависимости сигнала ОМРТ депротонированной и протонированной формы от мощности накачки ЭПР в анаэробных условиях. Эти зависимости использовались для определения факторов связи и усиления сигналов при бесконечной мощности (см. раздел 2.2.5). Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что две формы радикала дрТАМ участвуют в процессе переноса спиновой поляризации с разной эффективностью.

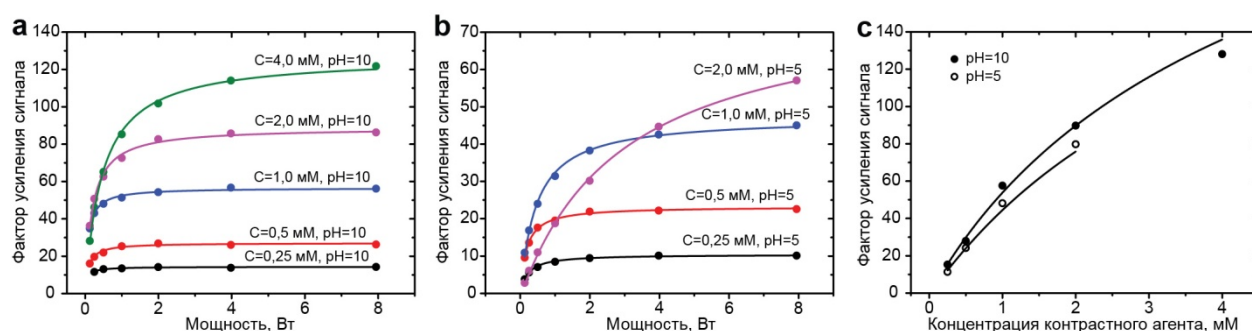


Рис. 43. (а-б) Зависимость усиления сигнала МРТ от мощности накачки ЭПР при различных концентрациях контрастного агента дрТАМ в анаэробных условиях при значениях pH 10 (а) и 5 (б). Сплошные линии являются аппроксимацией выражением (36), позволяющим вычислить значения максимального усиления сигнала. (с) Зависимость максимального усиления сигнала от концентрации радикала дрТАМ при значениях pH 10 и 5, сплошная линия есть аппроксимация данных выражением (46). Полученные таким образом факторы связи и усиления сигналов при бесконечной мощности равны:

ε_R , $0,40 \pm 0,02$; E_R^{inf} , 270 ± 4 ; ε_{RH} , $0,33 \pm 0,01$; E_{RH}^{inf} , 221 ± 5 , соответственно.

Разработанный подход для одновременного определения pH, pO_2 и C был продемонстрирован на фантомных образцах. На рисунке 44 изображены зависимости факторов усиления $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} от мощности при различных значениях C, pO_2 и pH. Зависимости были аппроксимированы выражениями (40a) и (40b). Полученные таким образом значения концентрации радикала, pO_2 и pH приведены в Таблице 3. Рассчитанные значения для двух форм радикала находятся в согласии с экспериментальными значениями pO_2 , pH и C.

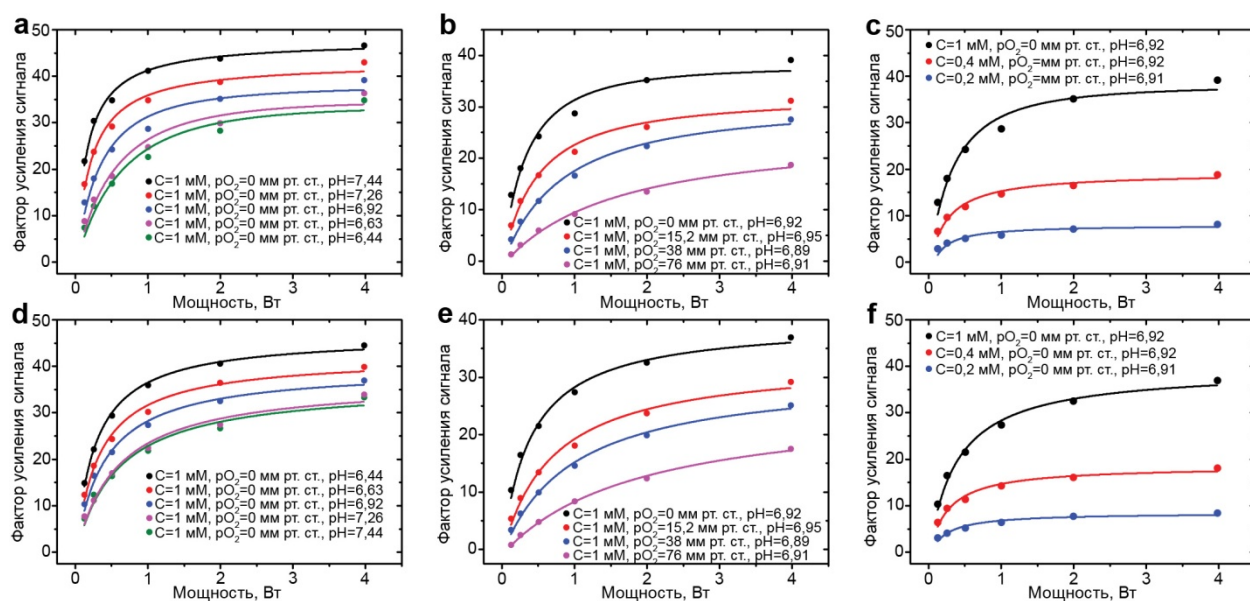


Рис. 44. Зависимость факторов усиления $E_R^{456,6}$ и E_{RH}^{457} при различных значениях C, pO_2 и pH. (a, b, c) Зависимость фактора усиления для депротонированной формы, $E_R^{456,6}$. (d, e, f) Зависимость фактора усиления для протонированной формы радикала, E_{RH}^{457} . Сплошные линии являются аппроксимацией выражениями (40a) и (40b), полученные таким образом значения концентрации контрастного агента и pO_2 представлены в Таблице 3. Значения pH были определены с помощью выражения (47) как среднее для данных, полученных при мощностях 0,125, 0,25, 0,5 Вт.

Таблица 3. Набор экспериментальных и вычисленных параметров C , pO_2 и pH для данных, представленных на рисунке 44.

Экспериментальные значения			Вычисления для депротонированной формы		Вычисления для протонированной формы		Вычисленное значение pH
C , мМ	pO_2 , мм рт. ст.	pH	C , мМ	pO_2 , мм рт. ст.	C , мМ	pO_2 , мм рт. ст.	
1	0	7,44	$1,10 \pm 0,03$	0 ± 0	$0,99 \pm 0,06$	0 ± 0	$7,36 \pm 0,05$
1	0	7,26	$1,04 \pm 0,08$	1 ± 3	$1,03 \pm 0,08$	2 ± 2	$7,22 \pm 0,04$
1	0	6,92	$1,04 \pm 0,04$	0 ± 0	$1,02 \pm 0,04$	0 ± 0	$6,92 \pm 0,03$
1	0	6,63	$1,07 \pm 0,08$	2 ± 2	$1,06 \pm 0,07$	2 ± 2	$6,66 \pm 0,01$
1	0	6,44	$1,05 \pm 0,08$	1 ± 2	$1,17 \pm 0,07$	3 ± 2	$6,47 \pm 0,02$
1	0	6,92	$1,04 \pm 0,03$	0 ± 0	$1,02 \pm 0,03$	0 ± 0	$6,92 \pm 0,03$
1	15,2	6,95	$0,96 \pm 0,08$	17 ± 4	$1,02 \pm 0,08$	17 ± 2	$6,97 \pm 0,01$
1	38	6,89	$1,08 \pm 0,12$	36 ± 5	$1,03 \pm 0,09$	32 ± 4	$6,93 \pm 0,01$
1	76	6,91	$0,95 \pm 0,21$	75 ± 15	$0,97 \pm 0,18$	68 ± 9	$6,95 \pm 0,02$
1	0	6,92	$1,00 \pm 0,02$	0 ± 0	$1,05 \pm 0,03$	0 ± 0	$6,90 \pm 0,02$
0,4	0	6,92	$0,39 \pm 0,01$	0 ± 0	$0,42 \pm 0,02$	0 ± 0	$6,89 \pm 0,02$
0,2	0	6,91	$0,17 \pm 0,01$	0 ± 0	$0,17 \pm 0,02$	0 ± 0	$6,83 \pm 0,01$

Химическая реакция протонного обмена радикала дрТАМ с неорганическим фосфатом приводит к слиянию двух резонансных линий. Как уже было показано в параграфе 4.1.4, этот эффект составляет основу для измерений P_i . Интенсивность спектра ДПЯ в точке, находящейся между пиками спектральных линий двух форм ($E_m^{456,8}$), строго зависит от концентрации фосфатного буфера (см. рис. 45а). С другой стороны, факторы усиления сигнала для протонированной (E_{RH}^{457}) и депротонированной ($E_R^{456,6}$) форм незначительно зависят от концентрации фосфатного буфера в диапазоне 0-4 мМ (см. рис. 46). Этот экспериментальный факт позволил разработать полуэмпирическое теоретическое описание для определения P_i независимо от параметров pH , C и pO_2 (см. раздел 3.2.4).

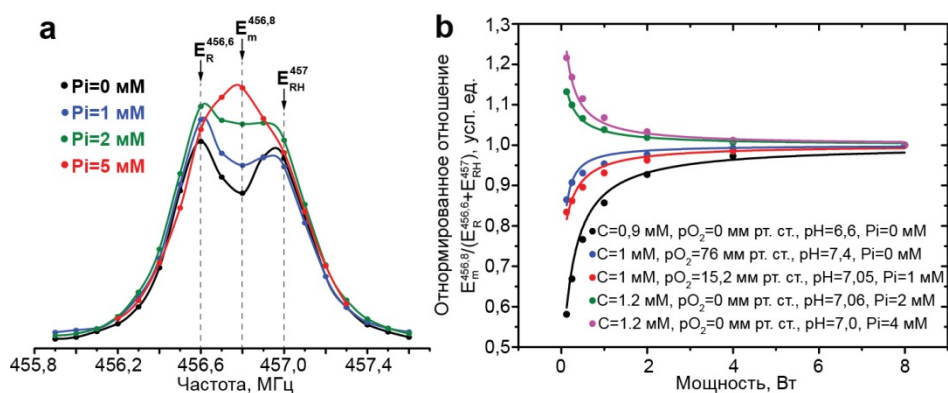


Рис. 45. (а) Высоочастотная компонента спектра ДПЯ 1 мМ раствора дрТАМ в присутствии 0, 1, 2, 5 мМ фосфатного буфера при pH 6,9. Спектры масштабированы таким образом, чтобы можно было наглядно продемонстрировать эффект влияния фосфатного буфера. (б) Зависимость отношения

$E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ от мощности, при разных значениях концентраций контрастного агента, кислорода и фосфатного буфера. Отношение нормализовано на максимальное значение при бесконечной мощности накачки ЭПР. Экспериментальные значения C , pO_2 , pH и Pi перечислены на рисунке. Сплошные линии являются аппроксимацией выражением (50), полученные значения Pi равны: $0,0 \pm 0,1$ мМ; $0,30 \pm 0,03$ мМ; $1,16 \pm 0,04$ мМ; $2,18 \pm 0,01$ мМ; $4,62 \pm 0,04$ мМ.

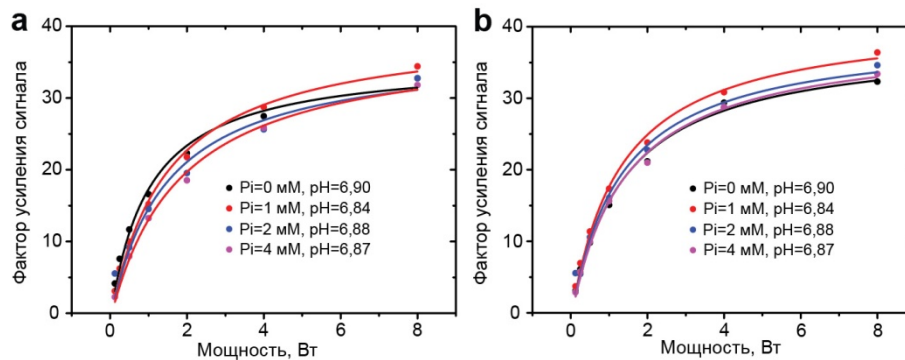


Рис. 46. (а) Зависимость фактора усиления сигнала МРТ для депротонированной формы, $E_R^{456,6}$ от мощности накачки ЭПР при $pH \approx 6,9$ и $pO_2 = 38$ мм рт. ст. и значениях Pi равных 0, 1, 2, 4 мМ. (б) Зависимость фактора усиления сигнала МРТ для протонированной формы, E_{RH}^{457} от мощности накачки ЭПР при таких же условиях. Сплошные линии являются аппроксимациями выражением (36), полученные значения максимально усиления сигнала, E_{max} , лежат в диапазоне 39 ± 2 и 40 ± 2 для депротонированной и протонированной формы.

Идея метода для расчета Pi продемонстрирована на рисунке 45b. На рисунке изображена зависимость отношения $E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ от мощности при разных значениях Pi . Отношение $E_m^{456,8} / (E_R^{456,6} + E_{RH}^{457})$ было нормировано на свое максимальное значение при бесконечной мощности. Данная нормировка была осуществлена для того, чтобы уменьшить влияние ошибок измерения факторов усиления. Нормированные зависимости были аппроксимированы выражением (50) для определения значений Pi . Полученные значения Pi находятся в соответствии с экспериментальными. Экспериментальные значения pH , C , pO_2 использовались для определения Pi , все значения приведены на рисунке 45b и его подписи. Процедура определения калибровочных параметров изложена в разделе 2.2.5, на рисунке 47 изображены зависимости параметров g_{Pi}^0 от pH , h от pO_2 и C (см. выражения (57)), которые использовались для определения неизвестных параметров математической модели, приведенной в разделе 3.2.4.

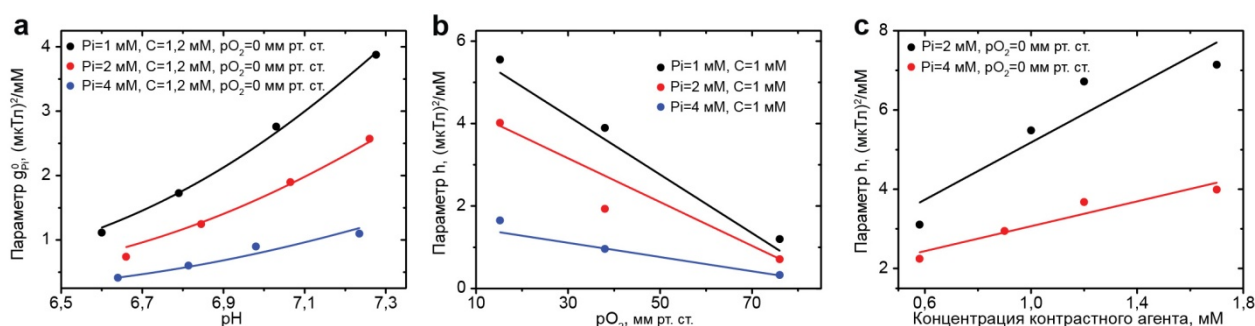


Рис. 47. (а) Зависимость параметра g_i^0 от pH при различных концентрациях фосфатного буфера (см. выражения (57)), $C = 1,2 \text{ mM}$, и $pO_2 = 0 \text{ мм рт. ст.}$. Сплошная линия является аппроксимацией выражением (57b). (б) Зависимость параметра h (см. выражения (57)) от pO_2 при фиксированных значениях P_i и C , сплошная линия является аппроксимацией выражением (57c). (с) Зависимость параметра h от C при анаэробных условиях и концентрации фосфатного буфера равной 2 и 4 mM, сплошная линия является аппроксимацией выражением (57c). Полученные значения калибровочных параметров представлены в разделе 2.2.5.

4.3.2 Томография фантомных образцов

Разработанный ранее подход для измерения pO_2 , pH и P_i с помощью спектроскопии ЭПР требует симуляции спектров для того, чтобы извлечь данные функциональные параметры [18, 19, 43]. Однако получение спектра ДПЯ в каждом пикселе или вокселе изображения ОМРТ не представляется возможным, так как процедура получения данных является времязатратной. Для того чтобы уменьшить время измерений, эксперимент может быть осуществлен путем получения изображений при разных мощностях и частотах накачки ЭПР. Использование минимального набора изображений оправдано тем, что процедура получения данных в исследовании *in vivo* должна быть проведена за разумный промежуток времени. Карты функциональных параметров могут быть получены с помощью полуэмпирического математического описания экспериментальных данных.

Разработанный в данном исследовании подход позволяет осуществить мультипараметрическую томографию с помощью шести изображений ОМРТ. Так же для получения карт параметров необходимо получение изображения МРТ без использования накачки ЭПР, для того чтобы получить информацию о структуре объекта без влияния эффекта Оверхаузера и определить основной уровень интенсивности (I_0 , смотрите выражение (17)) для определения факторов усиления сигнала. Ранее было осуществлено несколько попыток использования метода ОМРТ для визуализации pH с помощью нитроксильных [12] и тритильных [83] радикалов. Было показано, что визуализация pH может быть осуществлена с помощью двух изображений ОМРТ, полученных с использованием двух частот накачки ЭПР,

соответствующих протонированной и депротонированной форме контрастного агента. Титрование pH раствора радикала dpTAM было осуществлено при разных значениях функциональных параметров (см. рис. 42), а также были получены выражения для описания кривой титрования pH (47) и (49) в диапазоне 6,4-7,4. В этом диапазоне наблюдалось минимальное влияние других функциональных параметров на расчетное значение pH. Практически значения pH в растворах и тканях могут быть определены с помощью двух изображений OMPT при диапазоне функциональных параметров: pH от 6,4 до 7,4 единиц, pO_2 от 0 до 80 мм рт. ст., P_i от 0 до 4 мМ. Отметим, что эти диапазоны совпадают с физиологическими диапазонами для нормальной и опухолевой ткани. Максимальная ошибка определения pH, вызванная упрощенным описанием параметров кривой титрования (см. формулу (49)) составляет 0,1 единиц pH.

Ранее только тритильные радикалы с одной линией в спектре ДПЯ использовались для визуализации pO_2 методом OMPT [13-16, 129]. Теоретическое описание для этих измерений показывает, что получения двух OMPT изображений при разных мощностях накачки ЭПР достаточно для определения концентрации контрастного агента и кислорода (см. выражения (58)). В случае спинового зонда dpTAM измерения pO_2 могут быть осуществлены с использованием как депротонированной, так и протонированной формы радикала, что потенциально увеличивает точность определения pO_2 . Таким образом, концентрация контрастного агента и pO_2 могут быть визуализированы с помощью четырех изображений OMPT, полученных при двух мощностях и двух частотах накачки ЭПР, соответствующих протонированной и депротонированной форме радикала. Параметры получают путем решения системы уравнений (60). Нужно отметить, что также необходимо получение изображения MPT без использования накачки ЭПР.

Разработанный подход для измерения P_i требует измерения факторов усиления на частотах депротонированной (456,6 МГц), протонированной формы (457 МГц) и на частоте между ними (456,8 МГц), используя минимум две мощности накачки ЭПР. Таким образом, можно сделать вывод, что для одновременной визуализации pH, C, pO_2 , и P_i необходимо получение шести изображений OMPT и одного изображения MPT, после чего карты функциональных параметров можно получить решением систем уравнений (60-62).

Для того чтобы продемонстрировать возможность одновременной визуализации нескольких параметров, были проведены эксперименты с фантомными образцами. Были получены двухмерные карты распределений C, pO_2 , pH и P_i с использованием только двух мощностей и трех частот накачки ЭПР. На рисунке 48 изображены полученные 2D карты и

гистограммы параметров для трех фантомных образцов. Каждый образец состоит из четырех ампул, заполненных раствором радикала dpTAM при различных значениях C , $p\text{O}_2$, pH и P_i . Фантомные образцы демонстрируют возможность одновременной визуализации следующих параметров: $p\text{O}_2$ и pH (образец 1, см. рисунок 48a-48d), C и $p\text{O}_2$ (образец 2, см. рисунок 48e-48h), P_i и $p\text{O}_2$ (образец 3, см. рисунок 48i-48l). Экспериментальные и средние вычисленные значения, их стандартные отклонения для каждой ампулы перечислены в Таблице 4, видно, что средние вычисленные значения находятся в согласии с экспериментальными значениями.

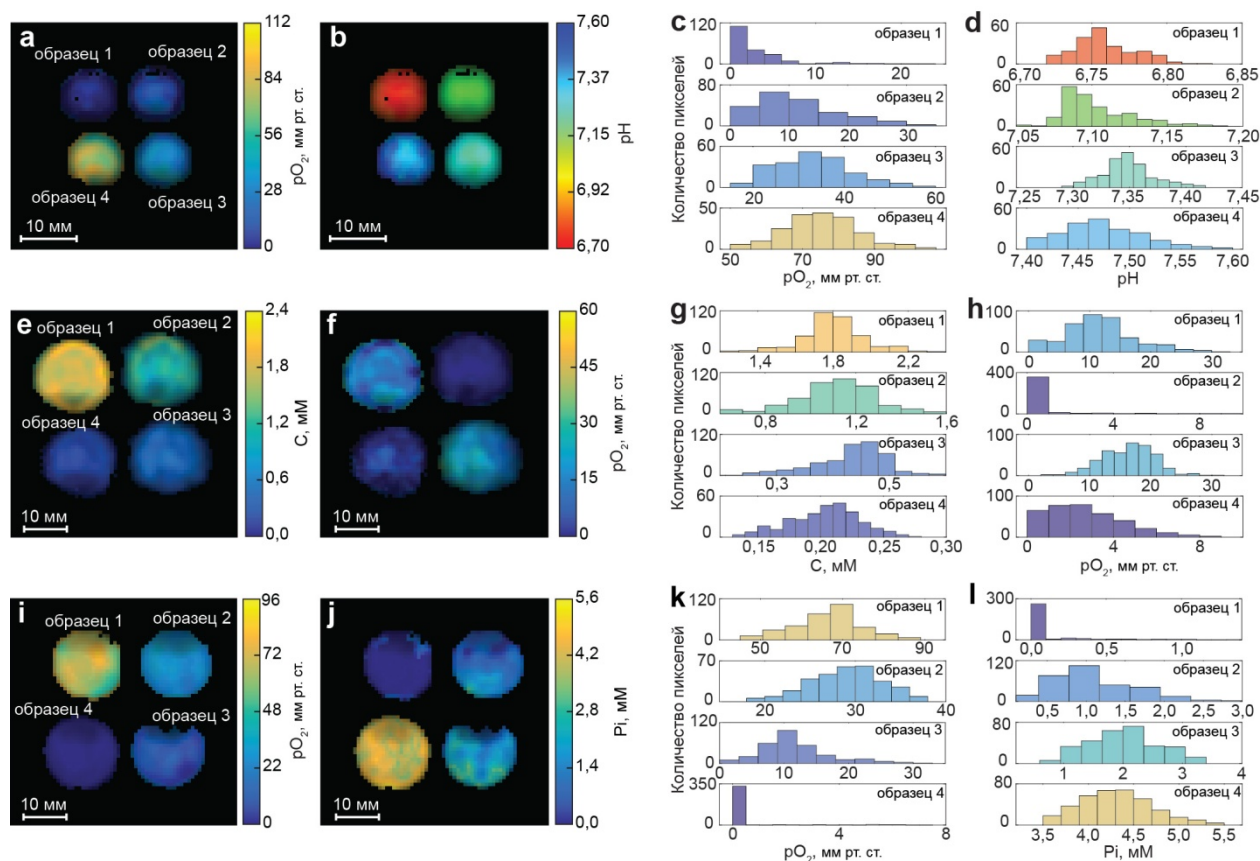


Рис. 48. (a-d) Карты $p\text{O}_2$ и pH первого фантомного образца, состоящего из четырех ампул (помеченных как образцы 1, 2, 3, 4, соответственно) и гистограммы распределения полученных параметров. (e-h) Карты распределения концентрации контрастного агента (C) и $p\text{O}_2$ для второго образца и соответствующие гистограммы распределения. (i-l) Карты $p\text{O}_2$ и P_i для третьего фантомного образца и гистограммы распределения этих параметров. Экспериментальные и вычисленные значения, их стандартные отклонения для каждого флакона приведены в Таблице 4. Параметры получения данных: T_{EPR} , 500 мс; T_R , 1200 мс; T_E , 37 мс; размер матрицы пикселей, 64×64 ; размер области изображения, $40 \times 40 \text{ мм}^2$ для первого фантомного образца и $30 \times 30 \text{ мм}^2$ для второго и третьего; толщина среза, 100 мм; полное время записи изображения, 3,5 мин для первого и второго фантомного образца и 4,3 мин для третьего образца; одновременная визуализация концентрации контрастного агента $p\text{O}_2$ и pH осуществлена с использованием двух мощностей и двух частот ЭПР, визуализация P_i требует использования третьей частоты при двух мощностях излучения; примененные мощности накачки ЭПР

0,5 и 4 Вт, 0,25 и 2 Вт, 0,5 и 8 Вт для первого, второго и третьего фантомного образца.

Таблица 4. Экспериментальные и вычисленные значения, рН, концентрации контрастного агента (С), парциального давления кислорода (pO_2) и P_i для фантомных образцов, представленных на рисунке 48. Символ * означает, что экспериментальное значение использовалось для расчета как параметр.

Образец №	Ампула №	Экспериментальные значения				Вычисленные значения $\pm$ стандартные отклонения			
		рН	С, мМ	pO_2 , мм рт. ст.	P_i , мМ	рН	С, мМ	pO_2 , мм рт. ст.	P_i , мМ
1	1	6,77	1,2	0	–	$6,76 \pm 0,02$	*	3 ± 4	–
	2	7,12	1,2	15,2	–	$7,10 \pm 0,02$	*	11 ± 7	–
	3	7,33	1,2	38	–	$7,35 \pm 0,02$	*	33 ± 8	–
	4	7,51	1,2	76	–	$7,47 \pm 0,04$	*	75 ± 10	–
2	1	7,0	2	15,2	–	$6,97 \pm 0,02$	$1,80 \pm 0,16$	12 ± 6	–
	2	7,0	1	0	–	$7,05 \pm 0,02$	$1,1 \pm 0,2$	0 ± 2	–
	3	7,0	0,4	15,2	–	$7,03 \pm 0,03$	$0,43 \pm 0,06$	16 ± 4	–
	4	7,0	0,2	0	–	$7,00 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$	3 ± 2	–
3	1	6,8	1	76	0	$6,83 \pm 0,03$	*	66 ± 8	$0,1 \pm 0,2$
	2	6,8	1	38	1	$6,79 \pm 0,02$	*	29 ± 4	$1,1 \pm 0,5$
	3	6,8	1	15,2	2	$6,74 \pm 0,02$	*	12 ± 5	$2,0 \pm 0,6$
	4	6,8	1	0	4	$6,76 \pm 0,02$	*	$0,3 \pm 1,2$	$4,3 \pm 0,4$

Данные рисунка 48 и таблицы 4 показывают, что решение мультипараметрической задачи сопровождается вычислительными ошибками, в результате чего происходит уширение распределения параметров. Так же причиной уширения являются ошибки реконструкции изображения, проявляемые в неоднородности интенсивности сигнала ОМРТ в пределах одного гомогенного образца. Для реконструкции изображений использовался алгоритм обратных фильтрованных проекций, встроенный в программное обеспечение МРТ-томографа. Так же необходимо отметить, что практическое применение разработанного подхода для визуализации нескольких параметров ограничено концентрацией контрастного агента, равной 2 мМ. Это ограничение связано с влиянием спинового обмена Гейзенберга при высоких концентрациях спиновой пробы $dpTAM$. В самом деле, в данном случае влияние концентрационного обмена сложно отличить от эффекта обмена с фосфатным буфером.

4.3.3 Томография здоровых и опухолевых тканей *in vivo*

После успешных экспериментов с фантомными образцами были проведены эксперименты на животных, с целью визуализировать параметры рН, С, pO_2 , и P_i в нормальной и опухолевых тканях молочной железы мышей. На рисунке 49 представлены карты функциональных параметров и гистограммы их распределения в ткани молочной железы. Карты параметров на рисунках совмещены с изображением МРТ, отображающим

анатомическую структуру животного. Томограммы и гистограммы показывают, что в исследуемой области наблюдается практически однородное распределение высоких значений pO_2 , нейтральных значений pH и низких Pi . Средние значения параметров и их стандартные отклонения равны $1,0 \pm 0,4$ mM, 53 ± 6 мм рт. ст., $7,00 \pm 0,06$, $0,9 \pm 0,4$ mM для карт параметров C, pO_2 , pH и Pi , соответственно.

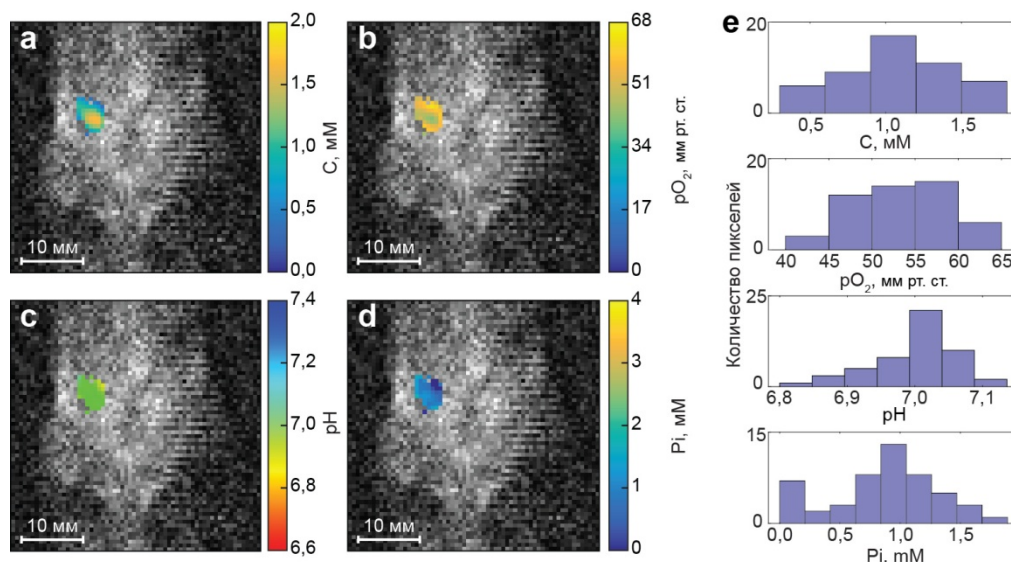


Рис. 49. Мультифункциональная томография молочной железы мыши. Карты параметров совмещены с изображением МРТ. (a-d) Карты концентрации контрастного агента (C), pO_2 , pH и Pi . (e) Гистограммы распределения данных параметров. Фактор эффективности резонатора α составлял $7,3 \text{ мкТл}^2/\text{Вт}$. Параметры получения изображений: T_{EPR} , 500 мс; T_R , 700 мс; T_E , 37 мс; размер матрицы, 64×64 ; область томограммы, $40 \times 40 \text{ мм}^2$; толщина среза, 4 мм; полное время записи, 4,3 мин; используемые мощности накачки ЭПР, 0,25 и 8 Вт, используемые частоты накачки ЭПР, 456,6, 456,8 и 457 МГц; частота ЯМР, 686,3 кГц.

На рисунке 50 представлены карты параметров pH, C, pO_2 , и Pi и их гистограммы распределения для опухолевой ткани мыши (объем опухоли составляет $1,4 \text{ см}^3$). Изображения и гистограммы отображают следующие характеристики злокачественного образования: практически однородная гипоксичная область, среднее значение pO_2 которой в два раза меньше значения для нормальной ткани; распределение pH с областями ацидоза и с нейтральными значениями; распределение Pi , среднее значение которого в два раза больше, чем в здоровой ткани. Средние значения параметров и их стандартные отклонения равны $0,7 \pm 0,2$ mM, 26 ± 5 мм рт. ст., $6,95 \pm 0,07$, $2,2 \pm 0,6$ mM для карт параметров C, pO_2 , pH и Pi , соответственно. Детали проведения экспериментов с животными изложены в главе “Экспериментальная Часть” в разделе 2.2.4, а так же значения использованных калибровочных параметров приведены в разделе 2.2.5.

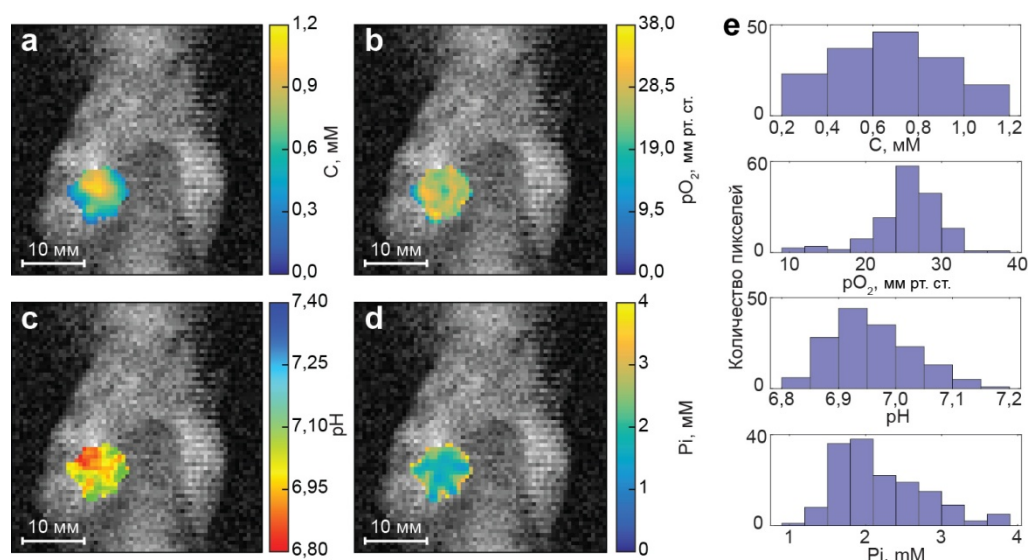


Рис. 50. Мультифункциональная томография опухоли мыши. Карты параметров совмещены с изображением МРТ. (a-d) Карты концентрации контрастного агента (C), pO_2 , pH и P_i . (e) Гистограммы распределения данных параметров. Фактор эффективности резонатора α составлял 6,4 мкТл²/Вт. Параметры получения изображений: T_{EPR} , 500 мс; T_R , 700 мс; T_E , 37 мс; размер матрицы, 64×64; область томограммы, 40×40 мм²; толщина среза, 4 мм; полное время записи, 4,3 мин; используемые мощности накачки ЭПР, 0,25 и 8 Вт, используемые частоты накачки ЭПР, 456,6, 456,8 и 457 МГц; частота ЯМР, 686,3 кГц.

Аналогичные эксперименты по визуализации были проведены на нескольких животных с нормальными (полное количество $n = 7$) и опухолевыми тканями ($n = 4$). Полученные средние значения параметров pH, C, pO_2 , и P_i представлены в Таблице 5. Из приведенных данных можно сделать вывод, что наблюдается воспроизводимость результатов – опухолевые ткани более гипоксичные, имеют меньшее значение pH и завышенное значение P_i , по сравнению с нормальной тканью. Так же в Таблице 5 представлены объемы исследованных опухолей, определенные с помощью изображений МРТ согласно принятой методике [136].

На рисунке 51 изображены гистограммы для параметров pO_2 , pH и P_i в здоровой и опухолевой ткани мыши, для построения этих распределений использовались все данные, полученные в экспериментах с животными (для опухолевой ткани $n = 4$, для здоровой молочной железы $n = 7$). Данные были сгруппированы для того, чтобы получить статистически более достоверную информацию о характеристиках распределения параметров. Гистограммы были аппроксимированы функциями нормального распределения для того, чтобы получить средние значения параметров pO_2 , pH и P_i и их стандартные отклонения. Полученные значения равны: 27 ± 4 и 34 ± 11 мм рт. ст. (распределение pO_2 в опухоли является комбинацией двух нормальных распределений), $6,86 \pm 0,15$ и $2,0 \pm 0,8$ мМ для опухолевой ткани; 45 ± 10 мм рт. ст., $7,15 \pm 0,14$ и $1,3 \pm 0,3$ мМ для ткани молочной железы. Из полученных значений видно, что

два вида ткани имеют разные характеристики распределения параметров. Многообразие значений pO_2 в опухоли сформировано двумя нормальными распределениями, средние значения которых существенно меньше среднего для нормальной ткани. Распределение pH для злокачественной ткани сдвинуто относительно ткани молочной железы примерно на 0,3 единицы pH в сторону кислых значений. В то же время многообразие значений Pi для опухолевой ткани описывается широким распределением со средним значением в два раза большим по сравнению со здоровой тканью молочной железы. Все представленные результаты измерений *in vivo* находятся в согласии со значениями, полученными с помощью спектроскопии ЭПР в L-диапазоне [18].

Таблица 5. Средние вычисленные значения и стандартные отклонения концентраций контрастного агента (C), pO_2 , pH и Pi в нормальных молочных железах и опухолях мышей. Так же в таблице представлены объемы исследованных опухолей.

Тип мыши	C, mM	pO_2 , мм рт. ст.	pH	Pi , mM	Объем опухоли, см ³
Молочная железа № 1	$1,0 \pm 0,4$	53 ± 6	$7,00 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,4$	—
Молочная железа № 2	$0,7 \pm 0,2$	58 ± 11	$6,98 \pm 0,04$	$1,0 \pm 0,7$	—
Молочная железа № 3	$0,30 \pm 0,03$	49 ± 6	$7,00 \pm 0,07$	$1,1 \pm 0,3$	—
Молочная железа № 4	$0,8 \pm 0,1$	43 ± 4	$7,1 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3$	—
Молочная железа № 5	$1,5 \pm 0,2$	45 ± 9	$7,20 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,2$	—
Молочная железа № 6	$1,2 \pm 0,3$	50 ± 9	$7,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,3$	—
Молочная железа № 7	$1,0 \pm 0,3$	42 ± 9	$7,10 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,3$	—
Опухоль № 1	$0,7 \pm 0,2$	26 ± 5	$6,95 \pm 0,07$	$2,2 \pm 0,6$	1,4
Опухоль № 2	$0,6 \pm 0,2$	32 ± 7	$6,7 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,9$	0,2
Опухоль № 3	$0,7 \pm 0,3$	41 ± 10	$6,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 1,2$	0,4
Опухоль № 4	$0,5 \pm 0,2$	33 ± 9	$6,78 \pm 0,07$	$2,2 \pm 1,4$	0,25

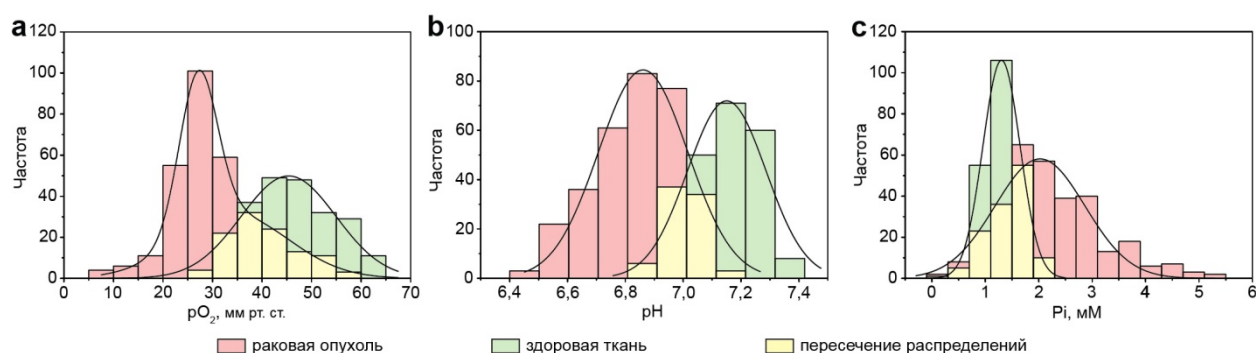


Рис. 51. Гистограммы распределения pO_2 (a), pH (b) и Pi (c) для опухолевой и здоровой ткани молочной железы. Данные собраны и скомбинированы из нескольких томограмм с животными. Число животных было равно 4 и 7 для мышей с опухолью и здоровой молочной железой. Сплошные линии являются аппроксимацией функцией нормального распределения. Полученные средние значения pO_2 , pH и Pi ($\pm$ стандартное отклонение) равны: 27 ± 4 и 34 ± 11 мм рт. ст. (распределение pO_2 в опухоли является

комбинацией двух нормальных распределений), $6,86 \pm 0,15$ и $2,0 \pm 0,8$ мМ для злокачественной ткани; 45 ± 10 мм рт. ст., $7,15 \pm 0,14$ и $1,3 \pm 0,3$ мМ для ткани молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были разработаны методы визуализации оксигенации, pH и концентрации неорганического фосфата в биологических тканях на основе методов томографии ЭПР и ОМРТ. В качестве спиновых зондов были применены обладающие функциональной чувствительностью нитроксильные и триарилметильные радикалы.

Специально разработанные чувствительные к pO_2 и pH нитроксильные радикалы были использованы для визуализации оксигенации и pH миокардиальной ткани методом томографии ЭПР. Для исследований была выбрана модель изолированного и перфузируемого сердца крысы при региональной ишемии. В полученных изображениях наблюдались области гипоксии и ацидоза, также было установлено, что при реперфузии оксигенация ткани восстанавливается не полностью по сравнению с предишемическим уровнем. Последнее наблюдение вызвано ослабленным потоком перфузируемого буфера через поврежденную сеть сосудов в ишемической области миокарда. Необходимо отметить, что для решения данной задачи был разработан собственный алгоритм для реконструкции спектрально-пространственных томограмм ЭПР.

Стоит обратить внимание на то, что визуализация pO_2 и pH миокарда была осуществлена с использованием двух разных радикалов и, следовательно, разных сердец. Значительный практический интерес представляет измерение параметров pO_2 и pH в биологической ткани одновременно с помощью одного спинового зонда. Эту идею удалось реализовать с помощью метода ОМРТ и специального триарилметильного радикала, спектры ЭПР и ДПЯ которого помимо чувствительности к pO_2 и pH чувствительны к P_i . Однако для реализации поставленной задачи мультипараметрической томографии пришлось столкнуться с рядом других задач.

Во-первых, было обнаружено, что в использованных ранее выражениях, описывающих усиление сигнала в экспериментах ОМРТ, должным образом не учитывалось влияние кислорода на утечку спиновой поляризации, что в свою очередь приводило к ошибкам определения pO_2 и концентрации контрастного агента. Такие ошибки имеют существенное влияние на точность определения других параметров в задаче мультипараметрической томографии. Влияние дополнительного парамагнитного агента на сигнал ОМРТ нами было изучено экспериментально и учтено необходимым образом в уравнениях, описывающих эффект Оверхаузера. Предложенные улучшения позволили корректно описать зависимость сигнала ОМРТ при высоких мощностях накачки ЭПР в присутствии кислорода, что существенно увеличило точность измерения концентраций кислорода и контрастного агента. Метод был

использован для визуализации оксигенации в мышинных опухолях и фантомных образцах. Было продемонстрировано, что пренебрежение влиянием кислорода на фактор утечки при больших концентрациях кислорода в диапазоне 30-80 мм рт. ст. может привести к существенным вычислительным ошибкам 10-20 мм рт. ст.

Во-вторых, для решения задачи мультипараметрической томографии было необходимо разработать теоретическое описание зависимости усиления сигнала МРТ от искомых параметров. Были получены выражения, которые позволили корректно описать экспериментальные зависимости, благодаря чему, удалось разработать алгоритм для одновременной визуализации четырех параметров, используя шесть изображений ОМРТ, полученных при трех разных частотах и двух мощностях накачки ЭПР.

Таким образом, после решения этих задач удалось воплотить в реальность идею мультипараметрической томографии. Возможность одновременной визуализации pH , pO_2 и P_i была продемонстрирована с помощью фантомных образцов. После успешной визуализации фантомных образцов, разработанные методы были применены для одновременной визуализации pH , pO_2 и P_i в молочных железах и опухолевой ткани мышей *in vivo*. На полученных изображениях видно, что злокачественные образования характеризуются наличием областей ацидоза, гипоксии и повышенного содержания неорганического фосфата. Анализ гистограмм искомых параметров выявил существенные различия в характере их распределения для нормальной и опухолевой ткани.

В заключение можно добавить, что разработанные методы так же могут быть использованы для неинвазивного пространственно-разрешенного наблюдения за параметрами микроокружения других живых биологических объектов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elas M., Williams B. B., Parasca A., Mailer C., Pelizzari C. A., Lewis M. A., River J. N., Karczmar G. S., Barth E. D., Halpern H. J. Quantitative tumor oxymetric images from 4D electron paramagnetic resonance imaging (EPRI): methodology and comparison with blood oxygen level-dependent (BOLD) MRI // *Magn Reson Med.* – 2003. – Т. 49, № 4. – С. 682-91.
2. Elas M., Magwood J., Butler B., Li C., Wardak R., Barth E. D., Epel B., Rubinstein S., Pelizzari C. A., Weichselbaum R. R. EPR oxygen images predict tumor control by a 50 percent tumor control radiation dose // *Cancer research.* – 2013. – C. canres. 0069.2013.
3. Sundramoorthy S. V., Epel B., Halpern H. J. Orthogonal resonators for pulse in vivo electron paramagnetic imaging at 250 MHz // *Journal of Magnetic Resonance.* – 2014. – Т. 240. – С. 45-51.
4. Epel B., Bowman M. K., Mailer C., Halpern H. J. Absolute oxygen R1e imaging in vivo with pulse electron paramagnetic resonance // *Magn Reson Med.* – 2014. – Т. 72, № 2. – С. 362-8.
5. Zweier J. L., Kuppusamy P. Electron paramagnetic resonance measurements of free radicals in the intact beating heart: a technique for detection and characterization of free radicals in whole biological tissues // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1988. – Т. 85, № 15. – С. 5703-5707.
6. Komarov D. A., Dhimitruka I., Kirilyuk I. A., Trofimiov D. G., Grigor'Ev I. A., Zweier J. L., Khramtsov V. V. Electron paramagnetic resonance monitoring of ischemia-induced myocardial oxygen depletion and acidosis in isolated rat hearts using soluble paramagnetic probes // *Magnetic resonance in medicine.* – 2012. – Т. 68, № 2. – С. 649-655.
7. Ilangoan G., Liebgott T., Kutala V. K., Petryakov S., Zweier J. L., Kuppusamy P. EPR oximetry in the beating heart: Myocardial oxygen consumption rate as an index of postischemic recovery // *Magnetic Resonance in Medicine.* – 2004. – Т. 51, № 4. – С. 835-842.
8. Zhu X., Zuo L., Cardounel A. J., Zweier J. L., He G. Characterization of in vivo tissue redox status, oxygenation, and formation of reactive oxygen species in postischemic myocardium // *Antioxid Redox Signal.* – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 447-55.
9. Zhu X., Liu B., Zhou S., Chen Y. R., Deng Y., Zweier J. L., He G. Ischemic preconditioning prevents in vivo hyperoxygenation in postischemic myocardium with preservation of mitochondrial oxygen consumption // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – Т. 293, № 3. – С. H1442-50.
10. Xu Y., Liu B., Zweier J. L., He G. L. Formation of Hydrogen Peroxide and Reduction of Peroxynitrite via Dismutation of Superoxide at Reperfusion Enhances Myocardial Blood Flow and Oxygen Consumption in Postischemic Mouse Heart // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2008. – Т. 327, № 2. – С. 402-410.

11. Zhao X., He G., Chen Y. R., Pandian R. P., Kuppusamy P., Zweier J. L. Endothelium-derived nitric oxide regulates postischemic myocardial oxygenation and oxygen consumption by modulation of mitochondrial electron transport // *Circulation*. – 2005. – T. 111, № 22. – C. 2966-72.
12. Bobko A. A., Eubank T. D., Voorhees J. L., Efimova O. V., Kirilyuk I. A., Petryakov S., Trofimov D. G., Marsh C. B., Zweier J. L., Grigor'ev I. A., Samouilov A., Khramtsov V. V. In vivo monitoring of pH, redox status, and glutathione using L-band EPR for assessment of therapeutic effectiveness in solid tumors // *Magn Reson Med*. – 2012. – T. 67, № 6. – C. 1827-36.
13. Golman K., Petersson J. S., Ardenkjaer-Larsen J. H., Leunbach I., Wistrand L. G., Ehnholm G., Liu K. Dynamic in vivo oxymetry using overhauser enhanced MR imaging // *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. – 2000. – T. 12, № 6. – C. 929-938.
14. Krishna M. C., English S., Yamada K., Yoo J., Murugesan R., Devasahayam N., Cook J. A., Golman K., Ardenkjaer-Larsen J. H., Subramanian S. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximetry: coregistration of tumor anatomy and tissue oxygen concentration // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – T. 99, № 4. – C. 2216-2221.
15. Matsumoto S., Utsumi H., Aravalluvan T., Matsumoto K., Matsumoto A., Devasahayam N., Sowers A. L., Mitchell J. B., Subramanian S., Krishna M. C. Influence of proton T1 on oxymetry using Overhauser enhanced magnetic resonance imaging // *Magn Reson Med*. – 2005. – T. 54, № 1. – C. 213-7.
16. Matsumoto S., Yasui H., Batra S., Kinoshita Y., Bernardo M., Munasinghe J. P., Utsumi H., Choudhuri R., Devasahayam N., Subramanian S., Mitchell J. B., Krishna M. C. Simultaneous imaging of tumor oxygenation and microvascular permeability using Overhauser enhanced MRI // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – T. 106, № 42. – C. 17898-903.
17. Samouilov A., Efimova O. V., Bobko A. A., Sun Z., Petryakov S., Eubank T. D., Trofimov D. G., Kirilyuk I. A., Grigor'ev I. A., Takahashi W., Zweier J. L., Khramtsov V. V. In vivo proton-electron double-resonance imaging of extracellular tumor pH using an advanced nitroxide probe // *Anal Chem*. – 2014. – T. 86, № 2. – C. 1045-52.
18. Bobko A. A., Eubank T. D., Driesschaert B., Dhimitruka I., Evans J., Mohammad R., Tchekneva E. E., Dikov M. M., Khramtsov V. V. Interstitial Inorganic Phosphate as a Tumor Microenvironment Marker for Tumor Progression // *Scientific Reports*. – 2017. – T. 7. – C. 41233.
19. Bobko A. A., Dhimitruka I., Zweier J. L., Khramtsov V. V. Fourier transform EPR spectroscopy of trityl radicals for multifunctional assessment of chemical microenvironment // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2014. – T. 53, № 10. – C. 2735-8.
20. Zavoisky. Spin-Magnetic Resonance in Paramagnets // *Journal of Physics*. – 1945. – T. 9. – C. 245.
21. Feldman A., Wildman E., Bartolinini G., Piette L. H. In vivo electron spin resonance in rats // *Phys Med Biol*. – 1975. – T. 20, № 4. – C. 602-12.

22. Lukiewicz S. In vivo ESR spectroscopy of large biological objects // *Magn Reson Med.* – 1984. – T. 1. – C. 297.
23. Subczynski W. K., Lukiewicz S., Hyde J. S. Murine in vivo L-band ESR spin-label oximetry with a loop-gap resonator // *Magnetic resonance in medicine.* – 1986. – T. 3, № 5. – C. 747-754.
24. Bensebaa F., Andre J. Effect of oxygen on phthalocyanine radicals. 1. ESR study of lithium phthalocyanine spin species at different oxygen concentrations // *The Journal of Physical Chemistry.* – 1992. – T. 96, № 14. – C. 5739-5745.
25. Liu K., Gast P., Moussavi M., Norby S., Vahidi N., Walczak T., Wu M., Swartz H. Lithium phthalocyanine: a probe for electron paramagnetic resonance oximetry in viable biological systems // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1993. – T. 90, № 12. – C. 5438-5442.
26. Clarkson R. B., Odintsov B. M., Ceroke P. J., Ardenkjaer-Larsen J. H., Fruianu M., Belford R. L. Electron paramagnetic resonance and dynamic nuclear polarization of char suspensions: surface science and oximetry // *Phys Med Biol.* – 1998. – T. 43, № 7. – C. 1907-20.
27. Bacic G., Liu K. J., Ohara J. A., Harris R. D., Szybinski K., Goda F., Swartz H. M. Oxygen-Tension in a Murine Tumor - a Combined Epr and Mri Study // *Magnetic Resonance in Medicine.* – 1993. – T. 30, № 5. – C. 568-572.
28. Zhao X., Chen Y. R., He G., Zhang A., Druhan L. J., Strauch A. R., Zweier J. L. Endothelial nitric oxide synthase (NOS3) knockout decreases NOS2 induction, limiting hyperoxygenation and conferring protection in the postischemic heart // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – T. 292, № 3. – C. H1541-50.
29. Ullman E. F., Call L., Osiecki J. H. Stable free radicals. VIII. New imino, amidino, and carbamoyl nitroxides // *The Journal of Organic Chemistry.* – 1970. – T. 35, № 11. – C. 3623-3631.
30. Woldman Y. Y., Khramtsov V. V., Grigorev I. A., Kiriljuk I. A., Utepbergenov D. I. Spin-Trapping of Nitric-Oxide by Nitronyl nitroxides - Measurement of the Activity of No Synthase from Rat Cerebellum // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1994. – T. 202, № 1. – C. 195-203.
31. Bobko A. A., Bagryanskaya E. G., Reznikov V. A., Kolosova N. G., Clanton T. L., Khramtsov V. V. Redox-sensitive mechanism of no scavenging by nitronyl nitroxides // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2004. – T. 36, № 2. – C. 248-258.
32. Mathew A. E., Dodd J. R. Synthesis of substituted, 2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl spin labels–PH sensitivity studies // *Journal of heterocyclic chemistry.* – 1985. – T. 22, № 1. – C. 225-228.
33. Hsia J. C., Boggs J. M. Influence of pH and cholesterol on the structure of phosphatidylethanolamine multibilayers // *Biochim Biophys Acta.* – 1972. – T. 266, № 1. – C. 18-25.
34. Saracino G. A. A., Tedeschi A., D'Errico G., Improta R., Franco L., Ruzzi M., Corvaia C., Barone V. Solvent polarity and pH effects on the magnetic properties of ionizable nitroxide radicals: A

- combined computational and experimental study of 2,2,5,5-tetramethyl-3-carboxypyrrolidine and 2,2,6,6-tetramethyl-4-carboxypiperidine nitroxides // *Journal of Physical Chemistry A*. – 2002. – T. 106, № 44. – C. 10700-10706.
35. Khramtsov V. V., Weiner L. M., Grigoriev I. A., Volodarsky L. B. Proton-Exchange in Stable Nitroxyl Radicals - Electron-Paramagnetic-Res Study of the Ph of Aqueous-Solutions // *Chemical Physics Letters*. – 1982. – T. 91, № 1. – C. 69-72.
36. Kirilyuk I. A., Bobko A. A., Grigor'ev I. A., Khramtsov V. V. Synthesis of the tetraethyl substituted pH-sensitive nitroxides of imidazole series with enhanced stability towards reduction // *Org Biomol Chem*. – 2004. – T. 2, № 7. – C. 1025-30.
37. Kirilyuk I. A., Bobko A. A., Khramtsov V. V., Grigor'ev I. A. Nitroxides with two p K values—useful spin probes for pH monitoring within a broad range // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2005. – T. 3, № 7. – C. 1269-1274.
38. Gallez B., Mader K., Swartz H. M. Noninvasive measurement of the pH inside the gut by using pH-sensitive nitroxides. An in vivo EPR study // *Magnetic resonance in medicine*. – 1996. – T. 36, № 5. – C. 694-697.
39. Potapenko D. I., Foster M. A., Lurie D. J., Kirilyuk I. A., Hutchison J. M. S., Grigor'ev I. A., Bagryanskaya E. G., Khramtsov V. V. Real-time monitoring of drug-induced changes in the stomach acidity of living rats using improved pH-sensitive nitroxides and low-field EPR techniques // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2006. – T. 182, № 1. – C. 1-11.
40. Woldman Y. Y., Semenov S. V., Bobko A. A., Kirilyuk I. A., Polienko J. F., Voinov M. A., Bagryanskaya E. G., Khramtsov V. V. Design of liposome-based pH sensitive nano SPIN probes: nano-sized particles with incorporated nitroxides // *Analyst*. – 2009. – T. 134, № 5. – C. 904-910.
41. Bobko A. A., Dhimitruka I., Zweier J. L., Khramtsov V. V. Trityl radicals as persistent dual function pH and oxygen probes for in vivo electron paramagnetic resonance spectroscopy and imaging: Concept and experiment // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – T. 129, № 23. – C. 7240-+.
42. Dhimitruka I., Bobko A. A., Hadad C. M., Zweier J. L., Khramtsov V. V. Synthesis and characterization of amino derivatives of persistent trityl radicals as dual function pH and oxygen paramagnetic probes // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – T. 130, № 32. – C. 10780-10787.
43. Dhimitruka I., Bobko A. A., Eubank T. D., Komarov D. A., Khramtsov V. V. Phosphonated Trityl Probes for Concurrent in Vivo Tissue Oxygen and pH Monitoring Using Electron Paramagnetic Resonance-Based Techniques // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – T. 135, № 15. – C. 5904-5910.

44. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature*. – 1980. – T. 288, № 5789. – C. 373-6.
45. Ignarro L. J., Buga G. M., Wood K. S., Byrns R. E., Chaudhuri G. Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric-Oxide // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1987. – T. 84, № 24. – C. 9265-9269.
46. Vanin A. F., Mordvinov P. I., Kleschyov A. L. Nitrogen-Oxide Appearance in Animal-Tissues In vivo // *Studia Biophysica*. – 1984. – T. 102, № 2. – C. 135-143.
47. Vanin A. F., Kubrina L. N., Kurbanov I. S., Mordvinov P. I., Khrapova N. V., Galagan M. E., Matkhanov E. I. Iron as an Inducer of the Formation of Nitric-Oxide in Animal Organisms // *Biochemistry-Moscow*. – 1989. – T. 54, № 12. – C. 1609-1613.
48. Joseph J., Kalyanaraman B., Hyde J. S. Trapping of nitric oxide by nitronyl nitroxides: an electron spin resonance investigation // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1993. – T. 192, № 2. – C. 926-34.
49. Akaike T., Yoshida M., Miyamoto Y., Sato K., Kohno M., Sasamoto K., Miyazaki K., Ueda S., Maeda H. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/. bul. NO (nitric oxide) through a radical reaction // *Biochemistry*. – 1993. – T. 32, № 3. – C. 827-832.
50. Bobko A. A., Ivanov A., Khramtsov V. V. Discriminative EPR detection of NO and HNO by encapsulated nitronyl nitroxides // *Free Radical Research*. – 2013. – T. 47, № 2. – C. 74-81.
51. Bobko A. A., Sergeeva S. V., Bagryanskaya E. G., Markel A. L., Khramtsov V. V., Reznikov V. A., Kolosova N. G. 19F NMR measurements of NO production in hypertensive ISIAH and OXYS rats // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2005. – T. 330, № 2. – C. 367-370.
52. Khramtsov V. V., Yelinova V. I., Glazachev Y. I., Reznikov V. A., Zimmer G. Quantitative determination and reversible modification of thiols using imidazolidine biradical disulfide label // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 1997. – T. 35, № 2. – C. 115-128.
53. Roshchupkina G., Bobko A. A., Bratasz A., Reznikov V. A., Kuppusamy P., Khramtsov V. V. In vivo EPR measurement of glutathione in tumor-bearing mice using improved disulfide biradical probe // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2008. – T. 45, № 3. – C. 312-320.
54. Bacic G., Nilges M. J., Magin R. L., Walczak T., Swartz H. M. In vivo localized ESR spectroscopy reflecting metabolism // *Magn Reson Med*. – 1989. – T. 10, № 2. – C. 266-72.
55. Utsumi H., Muto E., Masuda S., Hamada A. In vivo ESR Measurement of Free-Radicals in Whole Mice // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1990. – T. 172, № 3. – C. 1342-1348.
56. Lauterbur P. C. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance // . – 1973.

57. Hoch M. J. R., Day A. R. Imaging of Paramagnetic Centers in Diamond // Solid State Communications. – 1979. – Т. 30, № 4. – С. 211-213.
58. Berliner J. L., Fujii H. Magnetic resonance imaging of biological specimens by electron paramagnetic resonance of nitroxide spin labels // Science. – 1985. – Т. 227, № 4686. – С. 517-9.
59. Berliner L. J., Fujii H., Wan X. M., Lukiewicz S. J. Feasibility study of imaging a living murine tumor by electron paramagnetic resonance // Magn Reson Med. – 1987. – Т. 4, № 4. – С. 380-4.
60. Горелинский Ю. В. Измерение пространственных распределений парамагнитных центров различного типа методом ЭПР-томографии // Известия АН КазССР, Сер. физ.-мат. – 1985. – Т. 2. – С. 24-27.
61. Maltempo M. M. Differentiation of spectral and spatial components in EPR imaging using 2-D image reconstruction algorithms // Journal of magnetic resonance. – 1986. – Т. 69. – С. 156-161.
62. Ewert U., Herrling T. Spectrally resolved EPR tomography with stationary gradient // Chemical physics letters. – 1986. – Т. 129, № 5. – С. 516-520.
63. Halpern H. J., Yu C., Peric M., Barth E., Grdina D. J., Teicher B. A. Oxymetry deep in tissues with low-frequency electron paramagnetic resonance // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1994. – Т. 91, № 26. – С. 13047-51.
64. Velan S. S., Spencer R. G., Zweier J. L., Kuppusamy P. Electron paramagnetic resonance oxygen mapping (EPROM): direct visualization of oxygen concentration in tissue // Magn Reson Med. – 2000. – Т. 43, № 6. – С. 804-9.
65. Kuppusamy P., Chzhan M., Samouilov A., Wang P. H., Zweier J. L. Mapping the Spin-Density and Lineshape Distribution of Free-Radicals Using 4d Spectral-Spatial Epr Imaging // Journal of Magnetic Resonance Series B. – 1995. – Т. 107, № 2. – С. 116-125.
66. Glover G. H. Overview of functional magnetic resonance imaging // Neurosurg Clin N Am. – 2011. – Т. 22, № 2. – С. 133-9, vii.
67. Hyodo F., Matsumoto S., Devasahayam N., Dharmaraj C., Subramanian S., Mitchell J. B., Krishna M. C. Pulsed EPR imaging of nitroxides in mice // J Magn Reson. – 2009. – Т. 197, № 2. – С. 181-5.
68. Kuppusamy P., Ohnishi S. T., Numagami Y., Ohnishi T., Zweier J. L. Three-Dimensional Imaging of Nitric Oxide Production in the Rat Brain Subjected to Ischemia—Hypoxia // Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1995. – Т. 15, № 6. – С. 899-903.
69. Kuppusamy P., Wang P., Samouilov A., Zweier J. L. Spatial mapping of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance imaging // Magnetic resonance in medicine. – 1996. – Т. 36, № 2. – С. 212-218.
70. Kuppusamy P., Shankar R. A., Roubaud V. M., Zweier J. L. Whole body detection and imaging of nitric oxide generation in mice following cardiopulmonary arrest: detection of intrinsic nitrosoheme complexes // Magn Reson Med. – 2001. – Т. 45, № 4. – С. 700-7.

71. Fujii S., Suzuki Y., Yoshimura T., Kamada H. In vivo three-dimensional EPR imaging of nitric oxide production from isosorbide dinitrate in mice // *Am J Physiol.* – 1998. – T. 274, № 5 Pt 1. – C. G857-62.
72. Strizhakov R. K., Shundrin L. A., Kolosova N. G., Stefanova N. A., Fursova E. U., Ovcharenko V. I., Bagryanskaya E. G. Nitronyl Nitroxides as a Spin Probe in EPR Tomography In Vivo // *Applied Magnetic Resonance.* – 2014. – T. 45, № 8. – C. 743-758.
73. Alecci M., Ferrari M., Quaresima V., Sotgiu A., Ursini C. L. Simultaneous 280 MHz EPR imaging of rat organs during nitroxide free radical clearance // *Biophys J.* – 1994. – T. 67, № 3. – C. 1274-9.
74. Kuppusamy P., Afeworki M., Shankar R. A., Coffin D., Krishna M. C., Hahn S. M., Mitchell J. B., Zweier J. L. In vivo electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity and oxygenation in a murine model // *Cancer Res.* – 1998. – T. 58, № 7. – C. 1562-8.
75. Kuppusamy P., Li H., Ilangovan G., Cardounel A. J., Zweier J. L., Yamada K., Krishna M. C., Mitchell J. B. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels // *Cancer Res.* – 2002. – T. 62, № 1. – C. 307-12.
76. Hauser K. H., Stehlik D. Dynamic nuclear polarization in liquids // *Advances in Magnetic and Optical Resonance* Elsevier, 1968. – C. 79-139.
77. Lurie D. J., Bussell D. M., Bell L. H., Mallard J. R. Proton Electron Double Magnetic-Resonance Imaging of Free-Radical Solutions // *Journal of Magnetic Resonance.* – 1988. – T. 76, № 2. – C. 366-370.
78. Lurie D. J., Nicholson I., Foster M. A., Mallard J. R. Free radicals imaged in vivo in the rat by using proton-electron double-resonance imaging // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* – 1990. – T. 333, № 1632. – C. 453-456.
79. Lurie D. J., Foster M. A., Yeung D., Hutchison J. M. Design, construction and use of a large-sample field-cycled PEDRI imager // *Physics in Medicine & Biology.* – 1998. – T. 43, № 7. – C. 1877.
80. Foster M. A., Grigor'ev I. A., Lurie D. J., Khramtsov V. V., McCallum S., Panagiotelis I., Hutchison J. M., Koptioug A., Nicholson I. In vivo detection of a pH-sensitive nitroxide in the rat stomach by low-field ESR-based techniques // *Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine.* – 2003. – T. 49, № 3. – C. 558-567.
81. Ardenkjaer-Larsen J., Laursen I., Leunbach I., Ehnholm G., Wistrand L.-G., Petersson J., Golman K. EPR and DNP properties of certain novel single electron contrast agents intended for oximetric imaging // *Journal of Magnetic Resonance.* – 1998. – T. 133, № 1. – C. 1-12.
82. Khramtsov V. V., Caia G. L., Shet K., Kesselring E., Petryakov S., Zweier J. L., Samouilov A. Variable Field Proton-Electron Double-Resonance Imaging: Application to pH mapping of aqueous samples // *J Magn Reson.* – 2010. – T. 202, № 2. – C. 267-73.

83. Takahashi W., Bobko A. A., Dhimitruka I., Hirata H., Zweier J. L., Samouilov A., Khramtsov V. V. Proton-Electron Double-Resonance Imaging of pH using phosphonated trityl probe // *Appl Magn Reson.* – 2014. – T. 45, № 9. – C. 817-826.
84. Ahn K. H., Scott G., Stang P., Conolly S., Hristov D. Multiparametric imaging of tumor oxygenation, redox status, and anatomical structure using overhauser-enhanced MRI–prepolarized MRI system // *Magnetic resonance in medicine.* – 2011. – T. 65, № 5. – C. 1416-1422.
85. Yamato M., Shiba T., Naganuma T., Ichikawa K., Utsumi H., Yamada K. Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging characterization of mitochondria functional changes in the 6-hydroxydopamine rat model // *Neurochem Int.* – 2011. – T. 59, № 6. – C. 804-11.
86. Kawano T., Murata M., Hyodo F., Eto H., Kosem N., Nakata R., Hamano N., Piao J. S., Narahara S., Akahoshi T. Noninvasive mapping of the redox status of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis using in vivo dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging // *Scientific reports.* – 2016. – T. 6. – C. 32604.
87. Nakata R., Hyodo F., Murata M., Eto H., Nakaji T., Kawano T., Narahara S., Yasukawa K., Akahoshi T., Tomikawa M. In vivo redox metabolic imaging of mitochondria assesses disease progression in non-alcoholic steatohepatitis // *Scientific reports.* – 2017. – T. 7, № 1. – C. 17170.
88. Eto H., Hyodo F., Kosem N., Kobayashi R., Yasukawa K., Nakao M., Kiniwa M., Utsumi H. Redox imaging of skeletal muscle using in vivo DNP-MRI and its application to an animal model of local inflammation // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2015. – T. 89. – C. 1097-1104.
89. Mellet P., Massot P., Madelin G., Marque S. R., Harte E., Franconi J.-M., Thiaudière E. New concepts in molecular imaging: non-invasive MRI spotting of proteolysis using an Overhauser effect switch // *PloS one.* – 2009. – T. 4, № 4. – C. e5244.
90. Koonjoo N., Parzy E., Massot P., Lepetit-Coiffé M., Marque S. R., Franconi J. M., Thiaudiere E., Mellet P. In vivo Overhauser-enhanced MRI of proteolytic activity // *Contrast media & molecular imaging.* – 2014. – T. 9, № 5. – C. 363-371.
91. Jain A. K. Fundamentals of Digital Image Processing (Prentice Hall Information and System Sciences Series) // Book Fundamentals of Digital Image Processing (Prentice Hall Information and System Sciences Series) / Editor Prentice Hall, NJ, 1989.
92. Subramanian S., Krishna M. C. Dancing with the Electrons: Time-Domain and Cw in Vivo Epr Imaging // *Magn Reson Insights.* – 2008. – T. 2. – C. 43-74.
93. Stark H., Woods J. W., Paul I., Hingorani R. Direct Fourier Reconstruction in Computer-Tomography // *Ieee Transactions on Acoustics Speech and Signal Processing.* – 1981. – T. 29, № 2. – C. 237-245.

94. Sato-Akaba H., Abe H., Fujii H., Hirata H. Slice-selective images of free radicals in mice with modulated field gradient electron paramagnetic resonance (EPR) imaging // *Magn Reson Med.* – 2008. – Т. 59, № 4. – С. 885-90.
95. Strohmer T., Vershynin R. A Randomized Kaczmarz Algorithm with Exponential Convergence // *Journal of Fourier Analysis and Applications.* – 2009. – Т. 15, № 2. – С. 262-278.
96. Общий курс компьютерной томографии. / Филонин О. В.: Phylonin Oleg Vasilievich, 2012.
97. Itounsfield G. Computerized transverse axial scanning (tomography) // *British Journal of Radiology.* – 1973. – Т. 45. – С. 1016-1022.
98. Matsumoto K., Chandrika B., Lohman J. A., Mitchell J. B., Krishna M. C., Subramanian S. Application of continuous-wave EPR spectral-spatial image reconstruction techniques for in vivo oxymetry: comparison of projection reconstruction and constant-time modalities // *Magn Reson Med.* – 2003. – Т. 50, № 4. – С. 865-74.
99. Sivakumar S., Krishna M. C., Murugesan R. Evaluation of Algebraic Iterative Algorithms for Reconstruction of Electron Magnetic Resonance Images // *ICVGIP* –, 2004. – С. 353-358.
100. Zeng G. L. Image reconstruction—a tutorial // *Computerized medical imaging and graphics.* – 2001. – Т. 25, № 2. – С. 97-103.
101. Gerchberg R. Super-resolution through error energy reduction // *Optica Acta: International Journal of Optics.* – 1974. – Т. 21, № 9. – С. 709-720.
102. Papoulis A. A new algorithm in spectral analysis and band-limited extrapolation // *IEEE Transactions on Circuits and systems.* – 1975. – Т. 22, № 9. – С. 735-742.
103. Пикалов В. В., Лихачев А. В. Применение метода Гершберга-Папулиса в трехмерной доплеровской томографии // *Вычислительные методы и программирование.* – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 146-153.
104. Liu J. K., Ning R. L., Cai W. X., Benitez R. B. Enhancement of breast calcification visualization and detection using a modified PG method in Cone Beam Breast CT // *Journal of X-Ray Science and Technology.* – 2012. – Т. 20, № 1. – С. 107-120.
105. Kayvanrad M. H., McLeod A. J., Baxter J. S., McKenzie C. A., Peters T. M. Stationary wavelet transform for under-sampled MRI reconstruction // *Magn Reson Imaging.* – 2014. – Т. 32, № 10. – С. 1353-64.
106. Minerbo G. Maximum entropy reconstruction from cone-beam projection data // *Comput Biol Med.* – 1979. – Т. 9, № 1. – С. 29-37.
107. Tseitlin M., Dhimi A., Eaton S. S., Eaton G. R. Comparison of maximum entropy and filtered back-projection methods to reconstruct rapid-scan EPR images // *J Magn Reson.* – 2007. – Т. 184, № 1. – С. 157-68.

108. Smith C. M., Stevens A. D. Reconstruction of images from radiofrequency electron paramagnetic resonance spectra // *Br J Radiol.* – 1994. – T. 67, № 804. – C. 1186-95.
109. Johnson C. A., McGarry D., Cook J. A., Devasahayam N., Mitchell J. B., Subramanian S., Krishna M. C. Maximum entropy reconstruction methods in electron paramagnetic resonance imaging // *Annals of Operations Research.* – 2003. – T. 119, № 1-4. – C. 101-118.
110. Armstrong B. D., Han S. A new model for Overhauser enhanced nuclear magnetic resonance using nitroxide radicals // *J Chem Phys.* – 2007. – T. 127, № 10. – C. 104508.
111. Hui A. K., Armstrong B. H., Wray A. A. Rapid computation of the Voigt and complex error functions // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* – 1978. – T. 19, № 5. – C. 509-516.
112. Krynicky K. Proton spin-lattice relaxation in pure water between 0 C and 100 C // *Physica.* – 1966. – T. 32, № 1. – C. 167-178.
113. Dhimitruka I., Velayutham M., Bobko A. A., Khramtsov V. V., Villamena F. A., Hadad C. M., Zweier J. L. Large-scale synthesis of a persistent trityl radical for use in biomedical EPR applications and imaging // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2007. – T. 17, № 24. – C. 6801-6805.
114. Keana J. F. W., S. Pou, and G.M. Rosen. Nitroxides as Potential Contrast Enhancing Agents for MRI Application - Influence of Structure on the Rate of Reduction by Rat Hepatocytes, Whole Liver Homogenate, Subcellular-Fractions, and Ascorbate // *Magnetic Resonance in Medicine.* – 1987. – T. 5, № 6. – C. 525-536.
115. Burks S. R., Bakhshai J., Makowsky M. A., Muralidharan S., Tsai P., Rosen G. M., Kao J. P. Y. H-2,N-15-Substituted Nitroxides as Sensitive Probes for Electron Paramagnetic Resonance Imaging // *Journal of Organic Chemistry.* – 2010. – T. 75, № 19. – C. 6463-6467.
116. Glazachev Y. I., Grigor'ev I. A., Reijerse E. J., Khramtsov V. V. EPR studies of N-15- and H-2-substituted pH-sensitive spin probes of imidazoline and imidazolidine types // *Applied Magnetic Resonance.* – 2001. – T. 20, № 4. – C. 489-505.
117. Goodwin J., Yachi K., Nagane M., Yasui H., Miyake Y., Inanami O., Bobko A. A., Khramtsov V. V., Hirata H. In vivo tumour extracellular pH monitoring using electron paramagnetic resonance: the effect of X- ray irradiation // *Nmr in Biomedicine.* – 2014. – T. 27, № 4. – C. 453-458.
118. Friedman B. J., Grinberg O. Y., Isaacs K. A., Walczak T. M., Swartz H. M. Myocardial oxygen tension and relative capillary density in isolated perfused rat hearts // *J Mol Cell Cardiol.* – 1995. – T. 27, № 12. – C. 2551-8.
119. Khan M., Mohan I. K., Kutala V. K., Kotha S. R., Parinandi N. L., Hamlin R. L., Kuppusamy P. Sulfaphenazole protects heart against ischemia-reperfusion injury and cardiac dysfunction by overexpression of iNOS, leading to enhancement of nitric oxide bioavailability and tissue oxygenation // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – T. 11, № 4. – C. 725-38.

120. Li Y., Cai M., Xu Y., Swartz H. M., He G. Late phase ischemic preconditioning preserves mitochondrial oxygen metabolism and attenuates post-ischemic myocardial tissue hyperoxygenation // *Life Sci.* – 2011. – T. 88, № 1-2. – C. 57-64.
121. Abiko Y., Nishimura T., Sakai K. Nicorandil attenuates myocardial acidosis during coronary occlusion in dogs // *Br J Pharmacol.* – 1984. – T. 81, № 2. – C. 409-11.
122. Marzouk S. A., Ufer S., Buck R. P., Johnson T. A., Dunlap L. A., Cascio W. E. Electrodeposited iridium oxide pH electrode for measurement of extracellular myocardial acidosis during acute ischemia // *Anal Chem.* – 1998. – T. 70, № 23. – C. 5054-61.
123. Weiss R. G., Mejia M. A., Kass D. A., DiPaula A. F., Becker L. C., Gerstenblith G., Chacko V. P. Preservation of canine myocardial high-energy phosphates during low-flow ischemia with modification of hemoglobin-oxygen affinity // *J Clin Invest.* – 1999. – T. 103, № 5. – C. 739-46.
124. Canyon S. J., Dobson G. P. The effect of an adenosine and lidocaine intravenous infusion on myocardial high-energy phosphates and pH during regional ischemia in the rat model in vivo // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2006. – T. 84, № 8-9. – C. 903-12.
125. Rehr R. B., Clarke G., Tatum J., Hirsch J., Fatouros P., Lower R., Wetstein L. Intracellular myocardial pH measured in vivo with sustained and reperfused coronary occlusion // *Surgery.* – 1987. – T. 102, № 2. – C. 178-85.
126. Clarke K., Stewart L. C., Neubauer S., Balschi J. A., Smith T. W., Ingwall J. S., Nedelec J. F., Humphrey S. M., Kleber A. G., Springer C. S., Jr. Extracellular volume and transsarcolemmal proton movement during ischemia and reperfusion: a ³¹P NMR spectroscopic study of the isovolumic rat heart // *NMR Biomed.* – 1993. – T. 6, № 4. – C. 278-86.
127. Borgias B. A., James T. L. [9] Two-dimensional nuclear Overhauser effect: Complete relaxation matrix analysis // *Methods in enzymology* Elsevier, 1989. – C. 169-183.
128. Macura S., Ernst R. R. Elucidation of Cross Relaxation in Liquids by Two-Dimensional Nmr-Spectroscopy // *Molecular Physics.* – 1980. – T. 41, № 1. – C. 95-117.
129. Efimova O. V., Caia G. L., Sun Z., Petryakov S., Kesselring E., Samouilov A., Zweier J. L. Standard-based method for proton-electron double resonance imaging of oxygen // *J Magn Reson.* – 2011. – T. 212, № 1. – C. 197-203.
130. Christmas K. M., Bassingthwaite J. B. Equations for O₂ and CO₂ solubilities in saline and plasma: combining temperature and density dependences // *J Appl Physiol* (1985). – 2017. – T. 122, № 5. – C. 1313-1320.
131. Teng C.-L., Hong H., Kiihne S., Bryant R. G. Molecular oxygen spin-lattice relaxation in solutions measured by proton magnetic relaxation dispersion // *Journal of Magnetic Resonance.* – 2001. – T. 148, № 1. – C. 31-34.

132. Laurent S., Elst L. V., Muller R. N. Comparative study of the physicochemical properties of six clinical low molecular weight gadolinium contrast agents // *Contrast Media Mol Imaging*. – 2006. – T. 1, № 3. – C. 128-37.
133. Wang Y., Spiller M., Caravan P. Evidence for weak protein binding of commercial extracellular gadolinium contrast agents // *Magn Reson Med*. – 2010. – T. 63, № 3. – C. 609-16.
134. Vallet P., Van Haverbeke Y., Bonnet P. A., Subra G., Chapat J. P., Muller R. N. Relaxivity enhancement of low molecular weight nitroxide stable free radicals: importance of structure and medium // *Magn Reson Med*. – 1994. – T. 32, № 1. – C. 11-5.
135. Persson B., Malmgren L., Salford L. Paramagnetic ions affect relaxation rate dispersion of blood: implications for magnetic resonance relaxation dispersion imaging // *J Bioengineer & Biomedical Sci*. – 2012. – T. 2, № 105. – C. 2.
136. Ryzhov S., Novitskiy S. V., Zaynagetdinov R., Goldstein A. E., Carbone D. P., Biaggioni I., Dikov M. M., Feoktistov I. Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth // *Neoplasia*. – 2008. – T. 10, № 9. – C. 987-95.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.ф.-м.н., профессору Багрянской Елене Григорьевне за помощь в постановке цели и задач и обсуждении результатов.

Отдельная благодарность профессору Храмцову Валерию Владимировичу за предоставленную возможность для проведения исследований в Университете Западной Виргинии. Искренняя благодарность другим сотрудникам центра мультифункционального магнитного резонанса *in vivo* в Университете Западной Виргинии: профессору Бобко Андрею за помощь в постановке задач и проведении экспериментов; профессору Бенуа Дрессчаерт и Мартину Понселе за предоставленные контрастные агенты; профессору Тимоти Юбанку за помощь в проведении экспериментов на животных; профессору Марку Цейтлину, Оксане Цейтлин и Урихан Санжаевой за поддержку, помощь и создание атмосферы для работы.

Автор благодарен к.х.н. Комарову Денису Александровичу за научное наставничество, а также сотрудникам НИОХ СО РАН к.х.н. Кирилюку Игорю Анатольевичу за предоставленные спиновые зонды и к.х.н. Зайцевой Елене Васильевне за создание атмосферы для продуктивной работы.