

ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ^{19}F МРТ

Д.В. Волков¹, Н.В. Анисимов¹, Л.Л. Гервиц³, М.В. Гуляев¹, Ю.А. Пирогов¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

² Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН,
Москва

Описано применение методов ^{19}F ЯМР-спектроскопии и ^{19}F МРТ для диагностики состояния желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека и лабораторных животных (крыс). Исследовались параметры ЖКТ – проходимость по отношению к перорально введенному твердому объекту малого размера, а также его пищеварительные и выделительные функции для случая, когда оболочка проглоченного объекта способна растворяться под действием слюны, желудочного сока и других внутрикишечных реагентов. В качестве заглатываемых объектов применялись капсулы, наполненные биологически инертными (нетоксичными) препаратами, а именно, жидкими перфторуглеродами (ПФУ) – перфтордекалином или перфтортрибутиламином. По ^{19}F МРТ изображениям определялась локализация капсул в ЖКТ. В случае, когда применялись капсулы с растворимой оболочкой, для оценки содержания ПФУ в ЖКТ после ее растворения снимались спектры ^{19}F ЯМР. МРТ сканирование и съемка спектров проводились через фиксированные интервалы времени, что позволяло отслеживать динамику функционирования ЖКТ при попадании в него фторсодержащего препарата.

Ключевые слова: ^{19}F МРТ, ^{19}F ЯМР-спектроскопия, желудочно-кишечный тракт, фторуглеродные соединения

Введение

Ключевым процессом, характеризующим работу желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и отдельных его участков, является динамика продвижения пищи [1]. Исследование функциональных возможностей ЖКТ позволяет локально определять моторные функции кишечника и связанный с этим процесс транспортировки питательных веществ и лекарств [2]. Информация о локализации лекарственного препарата в конкретный момент времени очень важна для фармакологии и гастроэнтерологии [3].

Традиционные методы исследования желудочно-кишечного тракта, такие как пальпация, гастро- и колоноскопия не дают достаточной информации для оценки функциональных возможностей ЖКТ [4–5]. Использование рентгенографии и компьютерной томографии связано с воздействием ионизирующего излучения, что ограничивает количество получаемых изображений. Поэтому представляет интерес использовать методы МРТ-визуализации, позволяющие неинвазивным и безопасным способом проследить динамику продвижения веществ по ЖКТ, то есть оценить его функциональные параметры.

Проблемой протонной (^1H) МРТ, обычно применяемой в медицинской диагностике, является мощный фоновый сигнал от окружающих органов, затрудняющий дифференциацию тканей в брюшной полости. Поэтому требуется проведение нескольких сканирований с различными параметрами импульсной последовательности, обеспечивающих разный тканевой контраст. Кроме того для управления тканевым контрастом также применяются контрастные агенты, действие которых при изменении интенсивности ^1H сигнала ЯМР не всегда может быть однозначно интерпретировано. К тому же в ряде случаев для применения контрастных агентов, содержащих гадолиний, возможны противопоказания.

Поэтому представляет интерес регистрация сигналов ЯМР от ядер, отличных от протонов, например, фтора ^{19}F . Это возможно, если для диагностики ЖКТ использовать перфторуглероды (ПФУ) – биологически инертные соединения [6], широко применяемые в медицинской практике. Среди них можно отметить перфтордекалин (ПФД), применяемый в витрео-ретинальной хирургии [7], а также созданный на его основе препарат Перфторан®, хорошо известный как кровезаменитель [8–9].

При исследовании ЖКТ наиболее безопасным представляется использование нерастворимых полимерных капсул, заполненных ПФУ, которые пациент может без затруднения проглотить [10]. Поскольку содержание фтора в организме очень мало, то ^{19}F сигнал ЯМР будет регистрироваться только от содержимого капсулы. Методами ^{19}F ЯМР спектроскопии и ^{19}F МРТ можно оценить объем ПФУ, находящегося в ЖКТ, и определить его локализацию.

Цель данной работы состояла в исследовании динамики перемещения ПФУ соединений по ЖКТ путем регистрации сигналов ^{19}F ЯМР. Кроме того, предполагалось посредством МРТ проследить перемещение растворимой капсулы до ее растворения и оценить объем высвобождаемого после растворения ее содержимого.

Материал и методы

В качестве ПФУ использовались перфтордекалин (ПФД, $\text{C}_{10}\text{F}_{18}$) и перфтортрибутиламин (ПФТБА, $\text{C}_{12}\text{F}_{27}\text{N}$). Интерес к ПФТБА объясняется тем, что от него можно получить более ин-

тенсивный сигнал ЯМР, чем от ПФД. Объясняется это тем, что в молекуле ПФТБА 9 магнитноэквивалентных атома фтора от трех трифторметильных групп, а не 4, как в ПФД. Благодаря этому регистрация сигналов методом МРТ упрощается. Препарат ПФТБА так же, как и другие ПФУ, нетоксичен. Поэтому препараты на его основе в медицинских исследованиях также используются [6]. В клинической практике он пока не применяется из-за длительного времени выведения из организма [11]. Это, однако, относится лишь к внутривенным инъекциям и никак не связано с данным исследованием ЖКТ.

В экспериментах с лабораторными животными использовались твердые желатиновые капсулы сферической формы от препаратов Эспумизан® и Омепразол® диаметрами 4 и 10 мм, соответственно. Капсулы освобождались от содержимого и заполнялись 0,2 мл ПФУ. Капсулы из-под Эспумизана® были заполнены ПФД, а капсулы из-под Омепразола® – ПФТБА.

В качестве лабораторных животных использовались крысы линии Вистар с массой тела 200–300 г. За два дня до приема капсул из рациона исследуемых животных исключалась еда. Капсулы вводились перорально, когда животное находилось в состоянии ингаляционной анестезии, обеспечиваемой смесью кислорода и изофлурана. Обездвижение животного на этом этапе необходимо – в противном случае возможно повреждение капсул из-за движения челюстей животного. Для проталкивания капсулы по пищеводу за счет естественных процессов (выработки желудочного сока и др.) лабораторное животное выводилось из состояния сна и ему предоставлялась привычная для него пища – мелко нарезанные морковь и яблоко.

МРТ-эксперименты с животными проводились на биоспектротографе Bruker BioSpec 70/30 USR с магнитной индукцией 7 Тл. Возбуждение и прием сигналов ЯМР осуществлялось с помощью фирменного резонатора, который был модифицирован для регистрации не только протонов (300,8 МГц), но и ядер фтора (293 МГц). Модификация состояла в добавлении в контур резонатора дополнительного конденсатора и переключателя для его подключения или отключения от контура [12]. Регистрировались ^1H и ^{19}F МРТ-изображения в коронарной проекции с 3 мм толщиной срезов, причем ^{19}F МРТ 3D-сканирование проводилось по методике многократного спи-

нового эхо (RARE) с параметрами TR/TE=500/5,6 мс, ETL=8, Matrix=48×48×8, FOV=15×15 см, BW=61,7 кГц. Продолжительность сканирования составляла 8 мин.

МРТ-исследования с участием здоровых добровольцев выполнялись на медицинском томографе Bruker Tomikon S50 с магнитной индукцией 0,5 Тл (частота протонного ЯМР 21,08 МГц), который также был адаптирован на прием сигналов ^{19}F ЯМР (19,83 МГц). В частности, была модифицирована фирменная катушка, используемая обычно как приемная для исследования брюшной полости. Модификация заключалась в том, что катушка из приемной была переоборудована в приемно-передающую, поскольку фирменная передающая катушка не настраивалась на частоту фтора [13]. Объектами исследования были два пациента мужского пола весом 100 и 60 кг (№1 и №2 соответственно). Рацион питания и график употребления продуктов не регламентировался. Пациенты проглатывали капсулу с ПФУ, а затем употребляли привычные для них пищевые продукты и соки, чтобы облегчить продвижение капсулы по ЖКТ.

Для экспериментов с участием добровольцев были изготовлены две капсулы цилиндрической формы размерами 10×25 мм, одна желатиновая, покрытая полиэтилсульфонатом, заполненная 0,9 мл ПФД, другая – из капрона, заполненная 1,1 мл ПФТБА. После заглатывания капсул проводились сеансы ^{19}F МРТ сканирования с интервалами от 20 мин до 1 часа в коронарной проекции для зоны размерами 30×30×30 см. Применялась методика 3D градиентного эха (GE) с параметрами: TR/TE=600/4,6 мс, BW=35,7 кГц, угол поворота вектора намагниченности FA= 30°, толщина среза 3,75 см. Сигнал от ПФТБА был примерно в 2 раза сильнее, чем от ПФД. Поэтому продолжительность сеанса сканирования для этих ПФУ различалась в 4 раза – 5 и 20 мин соответственно.

Полученные ^{19}F МРТ изображения обрабатывались методом проекции максимальной интенсивности (MIP). Для сглаживания шума изображения подвергались фильтрации методом Gaussian Blur в рамках программного пакета ImageJ [14].

Помимо ^{19}F МРТ регистрировались также ^1H МРТ-изображения для сопоставления локализации капсул с анатомическими структурами.

Специально еще раз отметим, что использованные в настоящих *in vivo* экспериментах препараты ПФД и ПФТБА относятся к веществам нетоксичным. Как показано в работе [6], все чистые фторуглеродные соединения, в том числе, и ПФД и ПФТБА, токсичными не являются, отличаясь только временем выведения из организма. Вместе с тем, можно отметить, что препарат ПФД, являясь основным компонентом известного кровезаменителя Перфторан®, давно разрешен для клинических применений, а ПФТБА был дополнительно исследован на токсичность в ИНЭОС (Москва) и ИТЭБ РАН (Пушино, М. обл.) [8, 9, 11]. Кроме того, препараты ПФТБА и их комбинации с МРТ контрастными агентами Гадовист® и Омнискан® были исследованы на токсичность в экспериментах на малых животных в ИТЭБ РАН по заданию госконтракта МГУ с Минобрнауки РФ № 14.604.21.0060 [15] и показали отсутствие токсических проявлений.

Результаты и обсуждение

В экспериментах с лабораторными животными оболочки капсул были растворимыми. Поэтому информативные ^{19}F МРТ-изображения могли быть получены лишь в течение небольшого промежутка времени после перорального введения.

С другой стороны, требуется некоторое время для прохождения капсулы через пищевод к желудку животного, находящегося в состоянии анестезии. С учетом этих факторов МРТ обследование производилось спустя 10 минут после перорального введения.

На рис. 1 слева представлены ^{19}F МРТ изображения, на которых визуализируются капсулы с ПФУ (отмечены стрелками). “Раздвоение” капсулы с ПФТБА и “разбухание” капсулы с ПФД объясняются динамикой процесса, усредняемого за время сканирования. В первом случае имеет место задержка перемещения капсулы через пищевод, что связано со сравнительно большим размером капсулы. Во втором случае играет роль вовлеченность органов, прилегающих к капсуле, в двигательные процессы, связанные с дыханием и/или сердцебиением.

По нашим данным, капсула с ПФД, пройдя через пищевод и желудок, через 20 мин позиционируется у входа в кишечник. Капсула с ПФТБА, как более объемная, продвигалась мед-

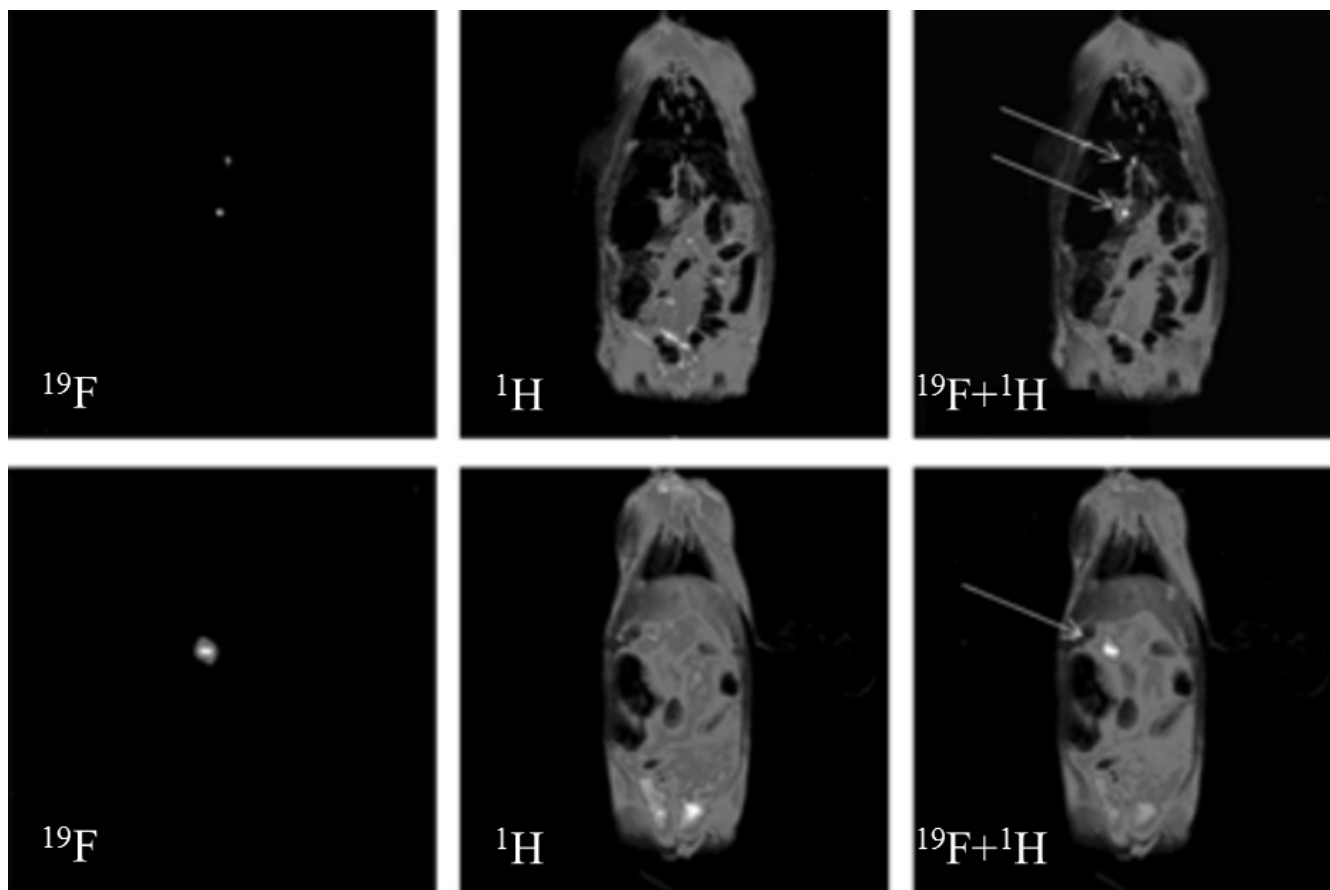


Рис. 1. ^{19}F , ^1H и комбинированные МРТ-изображения крысы через 20 мин после перорального введения капсулы с ПФТБА (верхний ряд) и с ПФД (нижний ряд)

ленное, с задержкой. Обе капсулы растворились достаточно быстро и последующие МРТ-сканирования уже не выявили их присутствие, что указывает на хорошую работу пищеварительной системы у обоих животных.

Состояние крыс отслеживалось в течение нескольких дней после эксперимента, но признаков отклонения от нормы не было обнаружено.

Таким образом, на животных была отработана методика перорального введения капсул с ПФУ, причем каких-либо признаков токсического воздействия или других побочных проявлений выявлено не было. Это дало дополнительные основания о возможности проведения аналогичных экспериментов на человеке с привлечением здоровых добровольцев. В случае работы с людьми ситуация упрощалась – не было необходимости разрабатывать специальные методы перорального введения капсул или вводить ограничения на режим питания.

При этом можно было проводить измерения функциональных параметров ЖКТ в состоянии, близком к естественному.

Основные различия в экспериментах с добровольцами состояли в том, что пациент №1 принимал капсулу с растворимой оболочкой из желатина и полимера, а пациент №2 – с нерастворимой оболочкой из капрона.

В случае первого пациента через 20 мин после приема капсулы с ПФД были получены МРТ-изображения, аналогичные представленным на рис. 1. Они показали, что, как и в экспериментах с лабораторными животными, капсула за время менее 20 мин прошла через желудок и остановилась у входа в двенадцатиперстную кишку.

Спустя 1 ч сигнал от капсулы пропал на ^{19}F МРТ-изображении. Это означало, что оболочка капсулы растворилась. Тем не менее, присутствие ПФД в организме и динамику его выведения удалось определить, сопоставляя

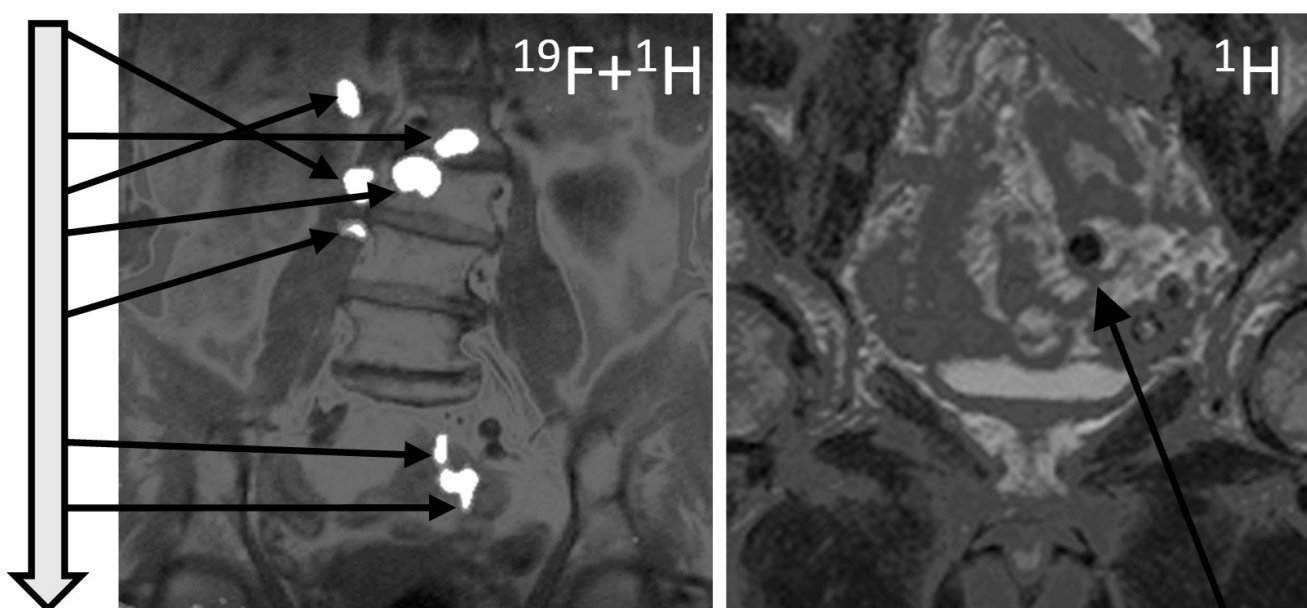


Рис. 2. Слева – сумма ^{19}F и ^1H МРТ-изображений области интереса для пациента №2, полученных в разных сеансах ^{19}F МРТ сканирования. Концы стрелок указывают на локализацию капсулы в разные моменты времени, а их начальные участки соотнесены с временной осью, обозначенной в виде утолщенной вертикальной стрелки. Справа – ^1H МРТ-изображение малого таза пациента. Стрелкой отмечена зона выпадения МРТ-сигнала из-за присутствия капсулы с не содержащим водород препаратом (ПФУ)

спектры ^{19}F ЯМР от разных частей тела пациента (локальные спектры) в текущий момент и спектры от исходной капсулы. На тот момент процесс выведения ПФД через ЖКТ шел весьма динамично – сигнал ^{19}F ЯМР регистрировался не только в верхней части ЖКТ, но и в нижней его части.

Анализ спектров ЯМР показал, что сигнал уменьшился примерно в 1,7 раза через 2,5 сут после приема капсулы. При этом сигнал в верхней части ЖКТ был выше, чем в нижней, примерно в 2 раза. Соответственно, объем содержимого капсулы, оставшегося в организме, составлял примерно 60 % от начального.

Последующие измерения были сделаны лишь спустя 7 сут, когда сигнал ^{19}F ЯМР от тела пациента совсем не регистрировался. Это неудивительно, поскольку по известным биохимическим данным даже из кровеносной системы и печени человека препарат ПФД в течение недели выводится из организма полностью [11].

Пациент №2 перорально принял нерастворимую капсулу с ПФТБА. Через 4 мин после приема капсулы было проведено МРТ- обследо-

вание. Согласно полученным данным МРТ, капсула в этот момент уже располагалась у входа в двенадцатиперстную кишку, подобно тому, как это происходило в предыдущем эксперименте. Благодаря сильному сигналу от ПФУ, время МРТ-сканирования удалось сократить до 5 мин и более детально отследить динамику процесса, получая МРТ изображения через каждые 20 мин. Однако в течение часа существенных перемещений капсулы не было замечено, несмотря на попытки пациента стимулировать работу ЖКТ путем приема легкой пищи (куриный бутерброд и фруктовые соки). Далее МРТ-изображения регистрировались с интервалом не более часа – на рис. 2 светлыми пятнами представлены некоторые отдельные положения капсулы, зафиксированные последовательно примерно с часовыми интервалами.

Иногда капсула на МРТ-изображении визуализировалась не вполне надежно, несмотря на то, что интенсивности спектральных линий ^{19}F ЯМР оставались неизменными. Это можно объяснить тем, что при МРТ-сканировании происходило перемещение капсулы в двенадцатиперстной кишке из-за продвижения пищевых фрагментов. Через 7 ч после начала

измерений был зарегистрирован сигнал от капсулы в области тонкой кишки.

Отметим, что на протонном изображении удалось зарегистрировать участок выпадения сигнала округлой формы – на рис. 2 справа. Его расположение совпадает с зоной локализации капсулы с ПФУ, зарегистрированной на частоте фтора-19. Можно предположить, что в момент ^1H МРТ сканирования капсула была расположена перпендикулярно плоскости сканируемого среза, а выпадение сигнала на изображении обусловлено отсутствием атомов водорода в ПФУ, т.е. во всем занятом ПФУ внутреннем объеме капсулы.

Выводы

Полученные предварительные данные свидетельствуют о том, что если прохождение перорально введенного нерастворимого объекта через пищевод и желудок человека занимает не более 5 мин, то на его прохождение вдоль всего кишечного тракта тратится около 7 ч. Эти результаты согласуются с известными данными о физиологии человека и функционировании его ЖКТ.

Результаты наших предварительных экспериментов по фармакокинетике капсул с ПФУ на лабораторных животных и добровольцах показали высокую эффективность метода ^{19}F МРТ при исследовании ЖКТ и определении его функциональных параметров, в частности, проходимости ЖКТ и пищеварительных функций. Метод представляется перспективным – он не требует существенных усилий по подготовке объектов исследования, а само исследование проходит в щадящем для них режиме. Для экспериментов используются нетоксичные ПФУ, обеспечивающие хорошую МРТ визуализацию даже в сравнительно слабом магнитном поле томографа.

Представляют интерес эксперименты с заглатыванием нескольких капсул с разными ПФУ и последующим наблюдением за продвижением каждой из них по сценарию [10]. В этом случае можно получить представление об объемной структуре ЖКТ. С помощью ^{19}F МРТ осуществляется 3D съемка траектории фторсодержащей капсулы, что позволяет определять пространственное расположение отделов кишечника и выявлять патологические изменения в их конфигурации. Метод ^{19}F МРТ может играть также важную роль в процедурах целевой до-

ставки лекарственных препаратов к патологически пораженным отделам кишечника. Если капсула-биокапсула (или терапевтический биоробот) будет содержать не только фармпрепарат, но и фторуглеродный маркер, то по ^{19}F МРТ-отклику можно легко судить о продвижении контейнера по ЖКТ, включая сигнал (ультразвуковой, лазерный, тепловой, микроволновый) для разрушения оболочки капсулы и экстракции фармпрепарата именно в тот момент, когда контейнер будет находиться в области патологии. После проведения подобных экспериментов на животных с верифицированными патологиями ЖКТ (язва, опухоль, непроходимость кишечника) можно будет решать вопросы, связанные с доклиническими исследованиями человека.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ 17-02-00465-а на оборудовании ЦКП МГУ и комплекса УНУ “Биоспектротография”.

Список литературы

1. Hirtz J. The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation // *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 1985. Vol. 19. № S2. P. 77S–83S.
2. Camilleri M., Hasler W. L., Parkman H.P. et al. Measurement of gastrointestinal motility in the GI laboratory // *Gastroenterology.* 1998. Vol. 115. № 3. P. 747–762.
3. Camilleri M., Malagelada J.R., Brown M.L. et al. Relation between antral motility and gastric emptying of solids and liquids in humans // *Amer. J. Physiol. Liver Physiol.* 1985. Vol. 249. № 5. P. G580–G585.
4. Camilleri M., Brown M.L., Malagelada J.-R. Relationship between impaired gastric emptying and abnormal gastrointestinal motility // *Gastroenterology.* 1986. Vol. 91. № 1. P. 94–99.
5. Hinton J.M., Lennard-Jones J.E., Young A.C. A new method for studying gut transit times using radioopaque markers // *Gut.* 1969. Vol. 10. № 10. P. 842–847.
6. Riess J.G. Fluorous Materials for Biomedical Uses in the Handbook of Fluorous Chemistry. Ed. by John A. Gladysz, Dennis P. Curran, Istvarn T. Horvarth. 2004. – Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

7. Kramer S.G., Hwang D., Peyman G.A. et al. Perfluorocarbon liquids in ophthalmology // Survey Ophthalmol. 1995. Vol. 39. № 5. P. 375–395.
8. Maevsky E., Ivanitsky G., Bogdanova L. et al. Clinical results of Perftoran application: present and future // Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology. 2005. Vol. 33. № 1. P. 37–46.
9. Maevsky E., Ivanitsky G. Oxygen-Dependent and Oxygen-Independent Effects of Perftoran // In: Artificial Oxygen Carrier. Its Frontline. Eds: Kobayashi K., Tsuchida E., Horinouchi H., Keio University Int. Symp. Life Sciences & Medicine. – Tokyo: Springer, 2005. Vol. 12. P. 221–228.
10. Hahn T., Kozerke S., Schwizer W., Fried M. et al. Visualization and quantification of intestinal transit and motor function by real-time tracking of ^{19}F labeled capsules in humans // Magn. Reson. Med. 2011. Vol. 66. P. 812–820.
11. Maevsky E.I., Gervits L.L. Perfluorocarbon-based blood substitute-PERFTORAN: Russian Experience // Chimica oggi. 2008. Vol. 26. № 3. P. 34–37.
12. Гуляев М.В., Гервиц Л.Л., Устынюк Ю.А. и соавт. Получение изображений в магнитно-резонансной томографии на ядрах ^{19}F с помощью препарата Перфторан // Журнал радиоэлектроники, 2013. № 8. URL: <http://jre.cplire.ru/alt/aug13/11/text.html>.
13. Анисимов Н.В., Гервиц Л.Л., Гуляев М.В. и соавт. Методы ^{19}F ЯМР и МРТ в изучении поведения препарата Перфторан в организме лабораторных животных // Электромагнитные волны и электронные системы. 2015. Т. 20. № 8. С. 66–71.
14. <https://imagej.nih.gov/ij/>
15. Фторуглеродные соединения в биомедицинских исследованиях *in vivo* с применением мультядерной МРТ-визуализации // Итоговый отчет по Соглашению МГУ имени М.В. Ломоносова с Минобрнауки РФ № 14-604.21.0060 от 14.05.2014 г. – 2016. 176 с.

STUDY OF HUMAN AND ANIMAL GASTROINTESTINAL TRACT BY ^{19}F MRI

D.V. Volkov¹, N.V. Anisimov¹, L.L. Gervits², M.V. Gulyaev¹, Yu.A. Pirogov¹

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of RAS, Moscow, Russia

The application of ^{19}F NMR and ^{19}F MRI methods for the diagnostics of the gastrointestinal tract (GIT) of laboratory animals (rats) and humans is described. Permeability of GIT parameters were studied in relation to oral entered a small solid object, as well as its digestive and secretory functions for cases when the shell swallowed object can dissolve under the influence of saliva, gastric juice and other inside-intestinal reagents. For this, capsules filled with perfluorocarbon compounds (PFC) – perfluorodecalin and perfluorotributylamine – were orally administered into the GIT of subject. Signals of ^{19}F MRI were measured to determine the location of the capsule, as well as ^1H MRI pictures were obtained for its correlation with anatomical structures. Used capsules had soluble or non-soluble shell. In the case of soluble shell, ^{19}F NMR spectra were registered to assess the content of the PFC in the region of interest and its excretion dynamics. After swallowing a fluorocontaining capsule, MRI scanning and surveying conducted spectra were indicated through fixed intervals of time, allowing to follow dynamics of GIT functioning.

Key words: ^{19}F MRI, ^{19}F NMR-spectrometry, gastrointestinal tract, fluorocarbons

E-mail: mdanf1@gmail.com