

# Диагностический ЯМР

А. В. Никитина<sup>1</sup>, Ю. В. Богачев<sup>2</sup>

Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет  
«ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина)

<sup>1</sup>nasty\_a\_nikitina1996@mail.ru, <sup>2</sup>yu.bogachev@mail.ru

**Аннотация.** В данном докладе рассматривается новое направление применения ядерного магнитного резонанса в медицинской диагностике – метод диагностического ядерного магнитного резонанса – ДЯМР. Сравниваются основные типы диагностических микро-ЯМР систем, анализируются их особенности, недостатки и преимущества. Рассматриваются достижения и перспективы применения ДЯМР для обнаружения широкого спектра целей, включая ДНК/микроРНК, белки, ферменты, лекарственные препараты, патогены и опухолевые клетки.

**Ключевые слова:** диагностический ядерный магнитный резонанс (ДЯМР), ЯМР-релаксация, магнитные наночастицы, микро-ЯМР системы

## I. ВВЕДЕНИЕ

Метод диагностики, использующий магнитные наночастицы (МНЧ) для обнаружения биомаркеров в виде определенных белков, клеток и патогенов на основе явления ядерного магнитного резонанса, получил название «диагностический ядерный магнитный резонанс» (ДЯМР). Метод диагностического ЯМР основан на детектировании изменения времен или скоростей ЯМР-релаксации протонов анализируемых водосодержащих биологических жидкостей или тканей при взаимодействии молекул, связанных (конъюгированных) с магнитными наночастицами, с целевыми (таргетными) молекулярными структурами [1], [2], [3].

## II. МЕТОД ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЯМР

В методе ДЯМР используются различные диагностические схемы.

Одна из них использует явление переключения ЯМР-релаксации (magnetic relaxation switching), в котором конъюгированные МНЧ при взаимодействии с молекулярными мишенями образуют кластеры связанных магнитных наночастиц, что вносит изменения во времена и скорости поперечной ЯМР-релаксации окружающих их водных протонов. Возможны как прямое ЯМР-релаксационное переключение, так и обратное.

Свойства ядерной магнитной релаксации протонов водосодержащих жидкостей зависят от присутствия в них магнитных наночастиц, однородности их распределения в объеме образца, магнитного состояния. При объединении МНЧ в кластеры наблюдается усиление взаимодействия их магнитных моментов, что вызывает более сильное расфазирование спинов соседних протонов воды по сравнению со случаем, когда наночастицы распределены равномерно. В результате уменьшается время спин-спиновой (поперечной) релаксации  $T_2$  и, соответственно, увеличивается скорость поперечной релаксации протонов воды ( $R_2 = 1/T_2$ ).

Помимо этого, неоднородная кластеризация МНЧ в объеме образца приводит к увеличению неоднородности локальных магнитных полей, в которых находятся протоны водных суспензий, в результате чего уменьшается их время эффективной поперечной ЯМР-релаксации  $T_2^*$ .

Обратное ЯМР-релаксационное переключение основывается на разборке предварительно образованных кластеров МНЧ посредством разрушения молекулярных связей в определенных местах с помощью ферментов, или когда для дестабилизации поперечных связей используется конкурентное связывание молекул, в результате чего происходит увеличение  $T_2$  или уменьшение  $R_2$  протонов водных растворов биологических образцов.

Другая диагностическая схема включает в себя мечение магнитными наночастицами поверхности клеток, посредством чего клетки наделяются магнитным моментом, пропорциональным количеству присоединенных наночастиц.

Возможно также внедрение и концентрирование магнитных наночастиц внутри клеток. Но при этом предварительно, до проведения измерений времени релаксации  $T_2$  необходима стадия удаления избыточных свободных несвязанных магнитных наночастиц с помощью магнитной сепарации или фильтрации.

## III. МНЧ ДЛЯ ЯМР-ДИАГНОСТИКИ

Магнитные наночастицы, используемые для диагностического ЯМР, должны быть суперпарамагнитными и, одновременно, обладать большим магнитным моментом, чтобы создавать более выраженные изменения скорости поперечной ЯМР-релаксации. Они должны иметь гидрофильную и биосовместимую оболочку, чтобы не было агрегации и осаждения в водосодержащих жидкостях, и чтобы была возможность конъюгации различными биомолекулами. Предпочтение отдается МНЧ меньших размеров, поскольку они более стабильны в растворах (меньше осаждение даже в магнитном поле) и могут иметь более плотную упаковку на поверхности покрытия, что актуально при мечении клеток.

Для применений ДЯМР в основном исследуются следующие МНЧ [1], [2], [3]: – наночастицы оксида железа с поперечными связями (cross-linked iron oxide – CLIO); – магнитные наночастицы с ядром из элементного железа и ферритовой оболочкой; – магнитные наночастицы, легированные ионами переходных металлов.

В CLIO-наночастицах суперпарамагнитное ядро оксида железа, состоящее из ферримагнитного магнетита ( $Fe_3O_4$ ) и/или маггемита ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) имеет декстрановую оболочку, которая обрабатывается эпихлоргидрином для формирования стабилизирующих поперечных связей и

аммиаком для создания аминокрупп, которые могут затем реагировать с различными реагентами для присоединения биомолекул через ангидридные, аминные, гидроксильные, карбоксильные, тиоловые или эпоксидные группы.

Магнитный момент ядра оксида железа может быть увеличен легированием МНЧ ионами переходных металлов, такими как кобальт, марганец и никель. Кроме того, пропорционально увеличению диаметра магнитного ядра возрастает поперечная релаксационная эффективность МНЧ.

Магнитные наночастицы с ядром из элементного железа и ферритовой оболочкой, получившие название «cannonballs» («пушечные ядра»), обладают более высокой намагниченностью, чем оксиды металлов, и имеют наибольшую среди МНЧ поперечную релаксационную эффективность. Наличие ферритовой оболочки позволяет защитить ферромагнитные ядра от окисления, уменьшить коэрцитивную силу и остаточную намагниченность МНЧ и предотвратить или уменьшить процессы агрегации между наночастицами.

Для достижения более высоких значений намагниченности МНЧ из элементного железа и ферритовой оболочкой также легируют ионами переходных металлов. Использование наночастиц  $Fe@MnFe_2O_4$  в исследованиях ДЯМР показало высокую чувствительность при обнаружении авидина (на уровне одного пикомоля) и отдельных раковых клеток в образцах цельной крови.

Чтобы уменьшить размеры МНЧ с большим магнитным ядром их покрывают водорастворимыми небольшими молекулами мезо-2,3-димеркаптосукцининовой кислоты (DMSA). Через группу карбоксильной кислоты на одном конце молекула DMSA взаимодействует с магнитным ядром, а сульфогидрильная группа на другом конце молекулы образует дитиол-перекрестные связи с другими молекулами DMSA, что позволяет повысить их устойчивость. Для присоединения целевых биомолекул используются оставшиеся свободные сульфогидрильные группы.

#### IV. ЯМР-РЕЛАКСАЦИОННЫЕ ДЕТЕКТИРУЮЩИЕ УСТРОЙСТВА

Стандартные ЯМР-релаксометры применяются в основном в исследовательских целях для отработки методик ДЯМР-тестирования. Применение ЯМР-релаксометров в клинической диагностике несмотря на их относительно высокую чувствительность затруднено, поскольку в них требуется достаточно большой объем образца и невозможно проведение параллельных мультиплексных измерений. Чтобы преодолеть эти ограничения, были разработаны миниатюрные системы ЯМР (микро-ЯМР) [1], [2], [3], [4].

В самой первой системе «микро-ЯМР-1» для проведения параллельных измерений ДЯМР на чипе была реализована система планарных РЧ-микрокатушек, к которой была подведена микрофлюидная система, с помощью которой осуществлялась транспортировка и смешивание исследуемых жидкостей. Концевая часть чипа с микрокатушками размещалась между полюсами небольшого постоянного магнита, создававшего поляризирующее магнитное поле. Все электронные узлы ЯМР-релаксометра были размещены на отдельной плате.

Система планарных микрокатушек, позволяющая осуществить параллельное детектирование нескольких биомаркеров при микролитровых объемах образца, вместе с тем имела определенные недостатки, связанные с невысокой чувствительностью и недостаточной однородностью как РЧ-поля, так и магнитного поля в местах расположения образцов.

Во втором поколении систем «микро-ЯМР-2» были применены соленоидальные микрокатушки, располагавшиеся непосредственно в микрофлюидной структуре. Такая конфигурация микрокатушки обеспечила более высокий коэффициент заполнения при меньшем объеме образца (до 1 мкл) и позволила создавать более однородные радиочастотное и магнитное поля внутри микрокатушки.

Последнее, третье поколение систем «микро-ЯМР-3» [4] использует достоинства предыдущих систем, но оно уже модифицировано для стандартной клинической диагностики. В системе «микро-ЯМР-3» решена проблема воспроизводимости измерений в зависимости от температурных флуктуаций магнитного поля, связанных с нагреванием постоянного магнита в процессе его эксплуатации. Решение этой проблемы повысило надежность и чувствительность измерений. Цифровая реализация электронных узлов системы «микро-ЯМР-3» в виде готовых чипов на одной плате позволило уменьшить стоимость устройства (<200\$), сделать его полностью программируемым, способным связываться с мобильными планшетами или смартфонами для управления измерениями. Это позволяет медицинским работникам получать результаты прямо через специальные ДЯМР-приложения и открывать к ним доступ через беспроводную сеть для отдаленных клинических отделений.

#### V. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЯМР

Анализ результатов исследований [1], [2], [3] показывает, что метод ДЯМР обладает высокой чувствительностью и избирательностью измерений и может успешно использоваться для обнаружения различных молекулярных мишеней, включая патогены, раковые клетки, белки, ферменты, метаболиты, ДНК, РНК, лекарственные препараты. Среди различных методик использования ДЯМР в клинической практике наиболее интересными является метод детектирования циркулирующих раковых клеток с использованием новой биосенсорной платформы микро-ЯМР и новой стратегии таргетинга – BOND (Bio Orthogonal Nanoparticle Detection) [5]. Метод BOND основан на циклоприсоединении {4+2} Дильса-Альдера, в частности на реакции между тетразином (Tz) и трансциклооктеном (TCO). Реакция быстрая, необратимая (ковалентная) и может протекать при комнатной температуре без катализатора. Технология BOND адаптирована для мечения клеток с помощью МНЧ, где клетки предварительно нацеливаются на модифицированные TCO антитела и впоследствии инкубируются с Tz нагруженными МНЧ (Tz-МНЧ). Несколько меток TCO (обычно ~20) могут быть включены в антитело без потери сроства. Следовательно, функция антитела как каркаса, способствует множественному прикреплению Tz-МНЧ. Кроме того, по сравнению с использованием прямых конъюгатов «антитела-МНЧ», двухэтапный подход (т. е. последовательное применение модификации антитела-TCO и Tz-МНЧ) обеспечивает

более легкий доступ антител к поверхности клетки. Таким образом, большее количество целевых маркеров может быть занято отдельными каркасами антител, что приводит к более плотной упаковке МНЧ. Преимущества метода BOND были подтверждены при обнаружении клеток на основе микро-ЯМР платформы, когда были получены более выраженные изменения  $R_2$  и был улучшен предел обнаружения клеток.

Метод BOND был адаптирован для детектирования в крови циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) [5]. Точное обнаружение и профилирование ЦОК является высоко востребованной технологией для улучшения лечения рака. Такие «жидкие биопсии» могли бы обеспечить неинвазивное, воспроизводимое окно в опухоль каждого пациента, облегчая раннюю диагностику рака и мониторинг лечения. Однако редкость ЦОК, приблизительно равная одной ЦОК на каждый миллиард клеток периферической крови, создает значительные проблемы для их обнаружения. Для идентификации ЦОК, их чувствительного и надежного обнаружения методом микро-ЯМР был разработан набор из четырех белковых маркерных панелей (MUC-1+EGFR+HER2+EpCAM), так называемый quad-маркер, который обеспечивает диагностическую точность обнаружения ЦОК в 96 %.

Наличие четырех различных антител, модифицированных транс-циклооктеном и впоследствии соединенных с Tz-МНЧ, привело к большему количеству МНЧ, нацеленных на ЦОК, таким образом, генерируя более высокий сигнал микро-ЯМР.

Технология микро-ЯМР, с ее способностью к молекулярному профилированию ЦОК в местах оказания медицинской помощи, станет важным шагом вперед, к клиническому внедрению персонализированных и высокоспецифичных методов лечения рака.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клиническое применение технологий диагностического ЯМР удовлетворит многим ключевым требованиям, предъявляемым к технологиям бионанодиагностики, а именно: высоким чувствительности, селективности и универсальности анализа, низкой стоимости и портативности используемой аппаратуры.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Богачев Ю.В., Марченко Я.Ю., Наумова А.Н., Черненко Ю.С. Магнитно-резонансная бионанодиагностика. СПб.: СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2013. 31 с.
- [2] Богачев Ю.В., Князев М.Н., Марченко Я.Ю., Наумова А.Н., Тютюкин К.В., Фокин В.А., Фролов В.В., Черненко Ю.С. Диагностический магнитный резонанс. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2013. 212 с.
- [3] Богачев Ю. В., Фролов В. В., Чижик В. И. Магнитно-резонансная тераностика. СПб.: Изд-во СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2020. 224 с.
- [4] Issadore D., Min C., Liang M., Chung J., Weissleder R., Lee H. Miniature magnetic resonance system for point-of-care diagnostics // Lab Chip. 2011. V.11.P.2282–2287.
- [5] Castro C.M., Ghazani A.A., Jaehoon Chung, Huilin Shao, Issadore D., Tae-Jong Yoon, Weissleder R., Hakho Lee. Miniaturized Nuclear Magnetic Resonance Platform for Detection and Profiling of Circulating Tumor Cells // Lab Chip. 2014. V.14. P.14-23.