

«Фторуглеродные соединения в биомедицинских исследованиях *in vivo* с применением магнитно-резонансной визуализации»

Л.Л.Гервиц

gervits@ineos.ac.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук.
Москва, ул.Вавилова 28.

¹H магнитно-резонансная визуализация (МРВ) стала незаменимым инструментом для определения состояния болезни на уровне описания анатомических изменений. Для идентификации специфических тканей и наблюдения биологических процессов на клеточном уровне требуется уже молекулярная визуализация. Одним из способов получения такой информации является МРТ на ядрах ¹⁹F. Реализуемость этого подхода обусловлена наличием стабильных наноразмерных эмульсий перфторуглеродов (ПФУ), разработанных для использования в качестве кровезаменителей переносчиков кислорода. Возможности использования этих эмульсий для ¹⁹F МРВ в различных комбинациях с МРТ-контрастирующими веществами, клетками различной природы и лекарственными препаратами описываются в данном обзоре. Дается общее представление о состоянии исследований в данной области и перспективах применения и развития отдельных направлений.

Ключевые слова: ¹⁹F магнитно-резонансная визуализация (¹⁹F МРВ), перфторуглероды, эмульсия перфторуглеродов, наночастицы, контрастирующие вещества.

“Organofluorine compounds for biomedical investigation in vivo with MRI application”.

L.L.Gervits

gervits@ineos.ac.ru

A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds Russian Academy of Sciences
(INEOS RAS)

Moscow, Vavilov str.28.

^1H magnetic resonance imaging (MRI) becomes an indispensable tool for determination of the state of disease at the level of description of anatomic changes. At the same time, the identification of specific tissues and the observation of biological processes at the cellular level requires molecular imaging. One of the ways to get such information is provided by ^{19}F MRT. This approach is realizable due to the availability of stable nanosize perfluorocarbon emulsions developed for the use as a blood substitute of oxygen carriers. The capabilities of these emulsions in ^{19}F MRI - in combination with MRT- contrasting substances, various cells, and medical products - are described in this review article. The article provides a general idea of the state of research in the given area and also discusses the outlook for the use and development of some research directions.

¹⁹F Magnetic Resonance Imaging (MRI), Perfluorocarbons, Perfluorocarbon emulsions, Nanoparticles, Contrast agents.

Введение

Л. Кларк и Ф. Голлан в 1966 году обнаружили, что мышь может дышать перфторуглеродом насыщенным кислородом. Как бывает со всяким тонущим животным, легкие крысы наполнялись жидкостью, и она погружалась на дно стакана, но к великому удивлению продолжала дышать (Рис.1). В опытах Кларка она дышала до 10 минут. Затем крысу вынимали, удаляли из нее жидкость, после чего она жила два-три дня.

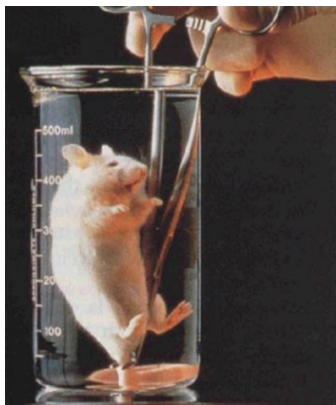


Рис.1 Эксперимент Кларка по дыханию мыши оксигенированным перфторуглеродом.

После впечатляющих результатов использования перфторуглеродов в качестве переносчиков кислорода для биологических и медицинских целей, полученных Л. Кларком и Ф. Голланом [1], Х.Словитером и Т.Камимото [2], Р. Гейером [3] , идея *"создать эффективный кровезаменитель на основе перфторуглеродов"* овладела многими исследовательскими группами во всем мире.

Что представляют собой эти соединения?

Перфторуглероды – рукотворные соединения, не встречающиеся в природе. Они химически инертны, так как энергия связи C-F больше, чем энергии связи C-H: для $\text{CH}_3\text{-F}$ она равна 119 ккал/мол, а для $\text{CH}_3\text{-H}$ - 99 ккал/мол. Длина связи C-F несколько больше длины связи C-H (длина связи $\text{CH}_3\text{-H}$ 1.09 Å, $\text{CH}_3\text{-F}$ 1.39 Å).

Перфторуглероды (ПФУ) обладают высокой термической, химической стабильностью, обладают низкой полярностью, слабым межмолекулярным взаимодействием и низким поверхностным натяжением. Они исключительно гидрофобны и существенно липофобны. ПФУ способны физически растворять значительные количества газов. Например, около 50 об. % O_2 и 150 об. % CO_2 . Комплекс этих уникальных свойств обеспечил ПФУ биологическую инертность и сделал их весьма привлекательными для целого ряда медико-биологических применений. ПФУ наиболее инертные органические

ксенобиотики, не подвергаются метаболизму в организме и не токсичны *in vivo* даже в больших дозах. ПФУ выводятся из организма выдыханием через лёгкие.

К концу 80-х годов в Японии, СССР и США были созданы экспериментальные препараты на основе эмульсий различных ПФУ (Флюосол ДА, Перфторан, Оксифлуор), прошедшие детальные испытания на животных и, в ряде случаев, на людях. Результаты этих испытаний были весьма обнадеживающими [4-9].

¹H магнитно-резонансная томография (МРТ)

Практически одновременно, в эти же годы появился и развивался новый метод медицинской диагностики – магнитно-резонансная томография. Метод исследования внутренних органов и тканей с использованием физического явления ядерного магнитного резонанса. Основы визуализации посредством ядерного магнитного резонанса (ЯМР) были заложены в начале 1970 Lauterbur [10]. Этот метод основан на измерении электромагнитного отклика ядер атомов водорода на их возбуждение определённой комбинацией электромагнитных волн в постоянном магнитном поле высокой напряжённости.

Создание новых эффективных методов диагностики – одно из центральных направлений современной биомедицины. Магнитно-резонансная томография (МРТ), в которой для визуализации структур внутренних органов используется наблюдение сигналов от ядер водорода молекул воды и органических молекул, входящих в состав мягких тканей и биологических жидкостей организма, за последние 30 лет стала одним из основных методов медицинских обследований. МРТ позволяет получать наиболее полную информацию о строении отдельных внутренних органов человека и животных, а также и всего тела в виде послойных срезов в разных плоскостях. Высокая разрешающая способность современных ЯМР-томографов, полная безвредность обследования для пациента, а также возможность трехмерной визуализации объектов привели к тому, что МРТ прочно вошла в медицинскую практику во всех странах мира.

Несмотря на то, что с помощью МРТ на протонах достигнуты выдающиеся результаты в ранней диагностике патологий сердечно-сосудистой системы, в обнаружении канцерогенеза на начальных стадиях, в диагностике многих других социально-значимых заболеваний, жизнь выдвигает перед медиками и специалистами по МРТ все новые и все более сложные задачи. При этом все отчетливее проявляются и вполне очевидные недостатки традиционной МРТ на протонах.

Одной из наиболее изучаемых стратегий для преодоления этих недостатков – разработка «второго цвета» изображения за счёт использования гетероядерного МРТ на таких ядрах, как ¹³C, ²³Na, ³¹P и ¹⁹F в добавление к ¹H МРТ (Табл.1). В этом случае к анатомической картине в серой шкале ¹H изображения добавится МРТ-изображение

другого цвета, несущее дополнительную информацию от добавочного ядра. Высокий магнитный момент ядра фтора-19, близкая к протонам относительная чувствительность и его 100%-ное природное содержание, делают фтор наиболее привлекательным для этой цели.

Табл.1 ЯМР свойства клинически интересных ядер.

Ядро	Гиромагнитное отношение (MHz/T)	Спиновое квантовое число	Относительное содержание	Относительная чувствительность
^1H	42,6	1\2	99	1.0
^{13}C	10,7	1\2	1,1	0,016
^{17}O	5,8	5\2	0,1	0,029
^{19}F	40,0	1\2	100	0,83
^{23}Na	11,3	3\2	100	0,093
^{31}P	17,2	1\2	100	0,07

^{19}F МРТ

Первые фантомы объектов, содержащих ядра ^{19}F – NaF и перфтортрибутиламин были получены ещё в 1977 году [11]. Были получены изображения геометрических фигур от трёх трубок с 1,4 М раствором NaF с разрешением около 0,13 x 0,13 x 3,0 мм³ и трубок диаметром 2 и 6 мм, наполненных жидким перфторуглеродом – перфтортрибутиламином. Все изображения были получены при 0,7 Т за 400 с.

Особый интерес ^{19}F -МРТ представляет из-за того, что в живом организме практически отсутствует эндогенный фтор и, таким образом, отсутствует возможность маскировки сигнала. Поэтому появление эмульсий перфторуглеродов не прошло незамеченным для специалистов, занимающихся магнитно-резонансной томографией. С середины 90-х работы по использованию эмульсий перфторуглеродов в качестве F-контрастов в МРТ получили широкое распространение в нескольких научных центрах. Эти работы ещё раз убедительно доказали биологическую инертность перфторуглеродов.

С появлением исследовательских томографов, способных работать на частоте ядер фтора стали активно публиковаться работы по использованию чистых перфторуглеродов в качестве контрастирующих веществ для *in vivo* визуализации естественных полостей организма. Прежде всего, это касалось желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Авторам удавалось получать весьма информативные изображения при пероральном введении перфторуглеродов мышам. [12], а также проводить диагностику различных заболеваний ЖКТ людей на протонных томографах используя перфторуглероды в качестве отрицательного контраста. [13].

Исключительная биологическая инертность ПФУ, в частности перфтороктилбромида, позволила использовать его непосредственно для МРТ исследований кишечника и почечных лоханок на третьей стадии клинических испытаний [14, 15,]. Более того, эта жидкость без вкуса и запаха не абсорбируется на всём протяжении желудочно-кишечного тракта, так что его употребление в литровых дозах для визуализации кишечника было разрешено в США.

Комбинация ^{19}F и ^1H МРТ изображений, полученных при регистрации движения небольшой капсулы, заполненной фторуглеродом, позволяет оценивать транзит и моторную функцию кишечника человека. Координаты капсулы были успешно зарегистрированы с привязкой к анатомии ЖКТ. Это дало возможность определить такие параметры, как моторика кишечника, время пребывания в отдельных участках, длина и скорость поступательного движения [16].

При использовании эмульсий фторуглеродов в *in vivo* визуализации, во весь рост встаёт вопрос о концентрации магнитно эквивалентных атомов фтора (имеющих одинаковый химический сдвиг в спектре ^{19}F ЯМР) в единице исследуемого объема [17]. Именно это становится ключевым параметром для получения достаточно контрастного изображения на ядрах фтора за приемлемое время сканирования. Таким образом, помимо концентрации фторуглерода – основы эмульсионной системы, строение его молекулы приобретает чрезвычайно важное значение.

Ниже представлены примеры визуализации эмульсий на основе различных фторуглеродов (Рис. 2) [18]. Показно, как зависит контрастность изображения в зависимости от выбора опорного сигнала из ЯМР-спектра используемого перфторуглерода. Очевидно, что соединение Е – перфтор 15-краун-5-эфир (Пф15К5Э) наиболее подходящее для МР-визуализации. Оно имеет 20 магнитно-эквивалентных атомов фтора.

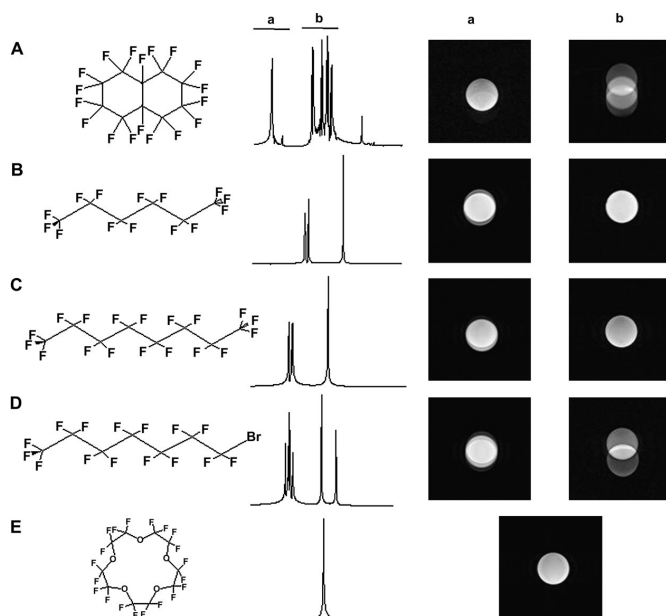


Рис.2 ^{19}F ЯМР спектры и молекулярная структура различных ПФУ . Опорная частота МРТ-изображения центрировалась на каждый пик или группу пиков и соответствующее изображение показывалось (отмечено как а и b).

Полноценная эксплуатация МРТ оборудования для *in vivo* использования на ядре ^{19}F была ограничена отсутствием клинических сканеров, т.к. изначально они были сконструированы для ^1H МРТ использования. Возможность модифицировать МРТ сканеры путём добавления соответствующих катушек и другого «железа» для добавочного ядра ^{19}F (предусилители, приёмо-передающие переключатели, радиочастотные усилители, подходящие для ядра ^{19}F) способствовало использованию новых возможностей такого оборудования в медицинских исследовательских центрах.

Оксиметрия

Как уже отмечалось ранее, перфторуглероды способны растворять большие объёмы газов, включая кислород. Поскольку кислород парамагнитен, очевидно, что должно проявиться парамагнитное релаксационное влияние кислорода на ядра ^{19}F . Это должно приводить к изменениям в скорости спин-решеточной релаксации ($1/T_1$) и может изменять химический сдвиг фторированных групп. Использование ЯМР оксиметрии основано на линейной зависимости скорости ^{19}F продольной (спин-решеточной) релаксации ($R_1 = 1/T_1$) ядер фтора перфторуглерода (ПФУ) от парциального давления кислорода ($p\text{O}_2$) [19,20,21,].

Перфторуглероды демонстрируют специфические характеристики очень важные для *in vivo* оксиметрии: высокую кислородную емкость и гидрофобность. Именно гидрофобность обеспечивает газовый обмен между ПФУ и окружающими тканями, одновременно препятствуя обмену водорастворимыми ионами, влияющими на R_1 . Линейная зависимость R_1 ПФУ от $p\text{O}_2$ может быть понята следующим образом. Можно

представить два типа ПФУ молекул в объеме ПФУ – с и без молекул кислорода в ближайшем окружении. Если такие молекулы, свободные от кислорода, имеют диамагнитную продольную скорость релаксации R_{1d} . То другие, с кислородом, имеют скорость продольной релаксации $R_{1d} + R_{1p}$, где R_{1p} парамагнитный вклад кислорода. Так как молекулы кислорода быстро диффундируют в растворитель, наблюдаемая скорость релаксации для каждого типа атомов фтора является молярной средневзвешенной величиной: $= (1-x) R_{1d} + x (R_{1d} + R_{1p}) = R_{1d} + x \cdot R_{1p}$ (1), где x мольная фракция кислорода. Так как ПФУ ведут себя практически как идеальные жидкости, растворимость кислорода в ПФУ подчиняется закону Генри $pO_2 = k \cdot x$ (2), где k константа, отражающая растворимость кислорода в ПФУ. Комбинация уравнений 1 и 2 дает

$$R_1 = R_{1d} + pO_2 \cdot R_{1p} / k \quad (3)$$

Таким образом зависимость R_1 от pO_2 при данной температуре должна быть линейной [22].

Гипоксия в опухолях и некрозы результат дисбаланса между потреблением и поступлением кислорода в ткани. В настоящее время установлено, что ткани опухоли в состоянии гипоксии являются резистентными к радиотерапии и многим видам химиотерапии. Более того, гипоксия приводит к ангиогенезу и росту опухолей [23]. ()

Неинвазивные методы диагностики гипоксии новообразований могут дать дополнительные возможности в борьбе с раком. МРТ оксиметрия может быть использована для предсказания ответа опухоли на классическую радиационную терапию [24].

Возможности ^{19}F -оксиметрии постоянно и всё активнее изучаются и совершенствуются [25,26], измерения напряжения кислорода проводились на нескольких моделях животных: крысах [27-37], кроликах [38,39], мышах [40,41,42,] и свиньях [43] на нескольких моделях опухолей. Перфторуглеродные соединения использовались главным образом в виде эмульсий или как альгинатные частицы.

Скорость спин-решеточной релаксации гексафторбензола демонстрирует исключительную чувствительность к изменению напряжения кислорода pO_2 , с одновременной нечувствительностью к изменению температуры [30]. Использование гексафторбензола для *in vivo* оксиметрии интенсивно распространяется [30,32,33]. Наряду с гексафторбензолом, другие перфторуглероды и их эмульсии используются в сочетании с получением фантомов [44,45]. Скорость релаксации R_1 измерялась с использованием быстрого 2D Look-Locker последовательности [46,47]. Сравнение гексафторбензола и перфтор-15-краун-5-эфира в параллельных исследованиях в качестве сенсоров кислорода в ^{19}F МРТ показало более высокую чувствительность и более продолжительное нахождение в тканях перфтор-15-краун-5-эфира [48].

При ЯМР оксиметрии следует иметь в виду, что только равномерное распределение ПФУ в ткани и отсутствие ПФУ в кровотоке гарантирует минимальное отклонение значений напряжения кислорода, измеренного этим методом от реального pO_2 . Это связано с тем, что присутствие ПФУ в организме приводит к общему росту pO_2 в тканях. Этот эффект особенно заметен если ПФУ присутствует в крови [49].

^{19}F МРТ и перфторированные газы .

Существующие методы диагностики легких (спирометрия, рентгенография, флюорография, компьютерная томография и пр.) или используют вредное для человека излучение и/или способны выявлять лишь глобальные повреждения. Не смотря на огромные успехи МРТ в получении изображений большинства мягких тканей организма, легкие остаются проблемой . Основная - в тканях легких не достаточно воды для получения изображения от ядер водорода. Выход был найден в использовании суперполяризованных инертных газов (^3He и ^{129}Xe), которые добавлялись в дыхательную смесь при диагностике. [50,51] . Однако такие газы весьма дороги, сложны в хранении и использовании. Поэтому перфторированные газы привлекли внимание исследователей для визуализации легких в качестве альтернативы суперполяризованным инертным газам. На базе таких газов, как гексафторид серы (SF_6), гексафторэтан (C_2F_6) и октафторпропан (C_3F_8) готовились дыхательные смеси различного состава, обеспечивающие нормальное дыхание у подопытных животных. Несмотря на то, что перфторированные газы имеют существенно меньшее соотношение сигнал/шум по сравнению с суперполяризованными инертными газами целый ряд исследователей сообщили о получении не только изображений легких на разных стадиях вдоха и выдоха, но и о получении данных о соотношении вентиляции и перфузии (скорости газообмена в легких и скорости кровотока) [52-58] . Это соотношение является ключевым параметром характеризующим легочную функцию. Таких результатов удалось достичь благодаря тому, что перфторированные газы имеют ничтожную растворимость в воде, что минимизирует их влияние на газообмен, происходящий в легких.

В статье J.Marcus с соавторами приводится очень информативная сравнительная таблица (Таблица 2), суммирующая важнейшие свойства суперполяризованных газов и перфторуглеродов используемых на сегодня при МРВ легких [59].

Таблица 2. Сравнение свойств ^{129}Xe , ^3He и перфторированных газов.

Параметр	^{129}Xe	^3He	перфторпропан	гексафторид серы
Ядерный спин	1	1/2	1/2	

Гиромагнитное отношение, γ [MHz rad T ⁻¹]	74.521	203.782	251.662	
Природное содержание, %	26,4	1,37	100	
Время спин-решеточной релаксации в легких, T ₁	20 s	25 s	12.4 ms	1.2 ms
Освальдова растворимость, L	0.17	0.0085	$5,2 \times 10^{-4}$	$5,4 \times 10^{-3}$
Цена	800-1200\$/L	170\$/L	15-20\$/L	

Впервые МРТ изображение человеческих легких с использованием дыхательной смеси из SF₆ и O₂ было получено в 2008 г. [60]. В недавней работе Couch с соавторами показаны результаты использования дыхательной смеси из 79% перфторпропилена и 21% кислорода на здоровых волонтерах. Было показано, что из-за того, что перфторированные газы имеют малые времена релаксации T₂, 3D ultrashort echo time (UTE) магнитно-резонансная визуализация дает большее отношение сигнал/шум.

Получены ¹⁹F 3D UTE МРТ изображения легких (Рис. 3) при 15 секундных задержках дыхания на приборе 3T [61].

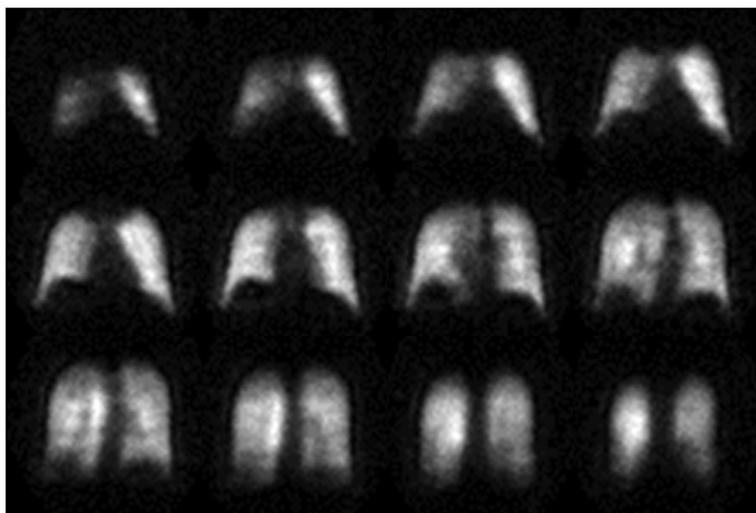


Рис. 3. Корональное ¹⁹F 3D UTE МРВ легких, полученное у волонтера с 15-секундными задержками дыхания после продолжительного дыхания 5 литрами смеси 79% перфторпропана и 21% кислорода и 1-литровой ингаляции этой же смеси.

Другой пример, полученный на волонтерах по аналогичной методике демонстрирует карты измеряемых диффузионных коэффициентов (Рис. 4) [59].

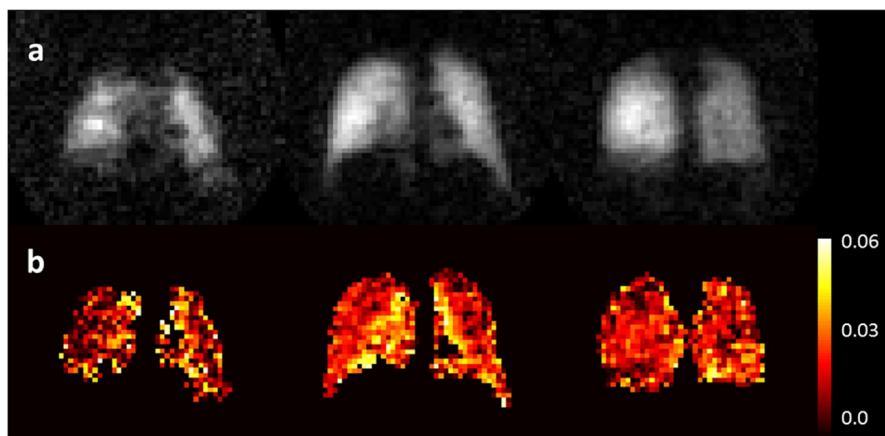


Рис. 4 . Три среза с ^{19}F 3D UTE изображения полученных на здоровых волонтерах с использованием дыхательной смеси из 79% перфторпропана и 21% кислорода при 15 секундных задержках дыхания. Изображения (a) - без диффузионного взвешивания . Изображения (b) – соответствующие карты измеряемых диффузионных коэффициентов.

Одновременно, Halaweish с соавторами показали, что МРВ с использованием инертных перфторированных газов способна детектировать инфизему у пациентов по методике аналогичной для суперполяризованных инертных газов. При этом для разных целей предпочтительно использование различных перфторированных газов [62].

С использованием смесей SF_6 и C_3F_8 с кислородом были получены зональные карты вентиляции легких крыс на клиническом сканере (3T). Эти результаты демонстрируют, что перфторированные газы могут использоваться для *in vivo* динамического исследования легких и являются реальной альтернативой гиперполяризованным инертным газам [63].

Таким образом, уже сейчас очевидно, что ^{19}F МРВ легких перспективный метод для получения информации не только об анатомических параметрах, но и дефектах вентиляции и газового распределения, что может быть использовано для диагностики хронических обструктивных заболеваний легких.

Эмульсии перфторуглеродов как контрастные вещества в ^{19}F МРВ

В то время как текущим золотым стандартом для получения картин коронарной области является рентгеновская ангиография, накапливаются доказательства того, что это может быть не самая чувствительная техника для обнаружения нестабильных склеротических бляшек. Другие методы получения изображения, такие как сердечно-сосудистый магнитный резонанс (CMR), могут использоваться для характеристики склеротических бляшек, но они страдают долгими временами просмотра и реконструкции для того, чтобы определить области стеноза. Исследователи из

Вашингтонского университета (St.Louis, MO, USA) показали возможность использования наноразмерной эмульсии перфторуглеродов в качестве внутрисосудистого контрастного агента, который может использоваться для ангиографии с сердечно-сосудистым магнитным резонансом на обычных клинических томографах 1.5 Т [64].

Возможности магнитно-резонансной визуализации (МРВ) были наглядно представлены в серии динамических ^{19}F -изображений эмульсии фторуглерода, текущей через пластмассовый шланг. Эти результаты были развиты авторами в получении динамических ^{19}F -изображений эмульсии фторуглерода, введенной в коронарную артерию изолированного сердца свиньи (Рис.5). Где G, единственное ^1H -изображение части того же самого сердца, чтобы продемонстрировать основную анатомию [64].

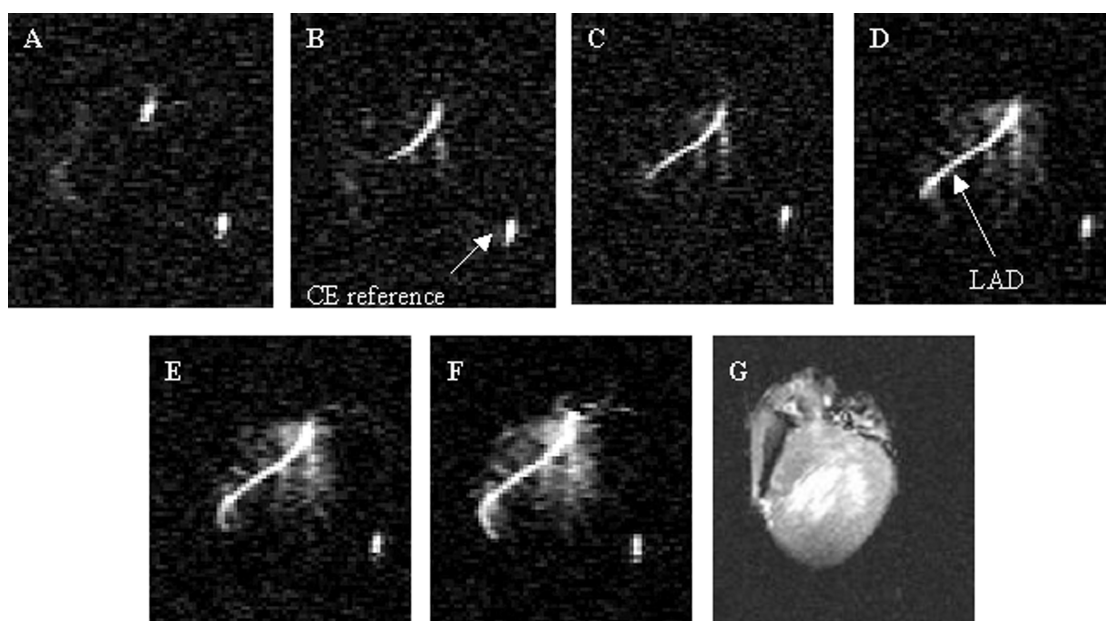


Рис.5(А–F) динамические ^{19}F -изображения неразбавленных наночастиц Пф15К5Э, введенных в левую переднюю ниспадающую коронарную артерию изолированного сердца свиньи. G – ^1H изображение среза того же сердца для демонстрации анатомии.

Впечатляющие результаты, представлены на следующем примере [65]. Авторам удалось зафиксировать распределение ПФУ в сосудистой системе мыши *in vivo* через 3 часа после инъекции (Рис 6). В хвостовую вену вводилось 12 μl эмульсии Пф15К5Э/ г. массы тела, что эквивалентно 0,021 г ПФУ/кг веса.

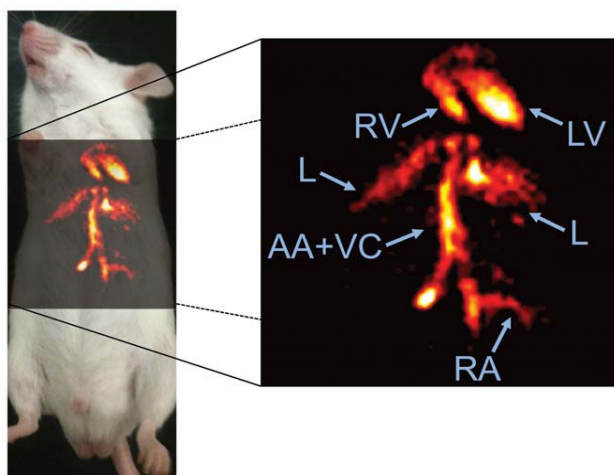


Рис. 6 На изображении, длинные непрерывные сегменты грудной и брюшной сосудистой системы можно различить с минимальным фоновым загрязнением. (RV) –правый желудочек, (LV) – левый желудочек, (AA+VC) абдоминальная аорта и полая вена, (RA)- почечная артерия, (L) -печень.

Эти примеры демонстрируют базовые возможности использования эмульсий ПФУ в качестве контрастного средства для МРВ при внутривенном введении и открывают новые возможности, связанные уже со свойствами эмульсионной системы на основе ПФУ.

Эмульсии перфторуглеродов как маркированный транспорт.

Исследования в геномике, протеомике и цитобиологии являются лидирующими в направлении грядущего индивидуализированного подхода к лечению пациентов основанного на раннем, неразрушающем распознавании уникальных биоподписей. Хотя исследования в молекулярном отображении в прошлом были представлены главным образом агентами ядерной медицины (single photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET)), приход нанотехнологий в 1990-ых привел к молекулярным соединениям для магнитного резонанса (MR), которые позволяют обнаруживать редкие биомаркеры с модальностью отображения высокого разрешения.

Молекулярное отображение - новый инструмент, который обеспечивает переход от грубого анатомического описания к неразрушающему диагностическому отображению и идентификации определенных антигенных детерминант ткани и наблюдению за биологическими процессами на клеточном уровне.

Перфторуглеродные эмульсии являются уникальной технологической платформой, сочетающей транспортные и маркирующие возможности. Эти эмульсии могут быть использованы в существующих клинических условиях с использованием многих ключевых принципов найденных для других контрастирующих агентов, таких как парамагнитные и ферромагнитные контрастирующие вещества.

Эмульсии ПФУ представляют собой коллоидные системы типа масло-вода, состоящие из наноразмерных капель фторуглеродов, покрытых поверхностно-активными веществами различных типов (Рис. 7). Эти соединения снижают межфазную энергию и образуют структурно-механический барьер, препятствующий коалесценции капель ПФУ. Для *in vivo* использования применяется два типа эмульгаторов полоксамеры и фосфолипиды. Полоксамеры это блоксополимеры окими этилена и окиси пропилена, где центральный блок состоит из гидрофобных окиспропильных звеньев, а две боковые цепи являются гидрофильными полиоксиэтильными. Наиболее используемыми является Pluronic F68 и его аналоги. В качестве фосфолипидов используются натуральные фосфолипиды яичного желтка или соевые.

Устойчивость эмульсий во многом зависит от природы ПФУ, их растворимости в воде. На устойчивость эмульсий влияет не только седиментация, флокуляция и коалесценция, но и Освальдово созревание – процесс молекулярной перегонки через дисперсную фазу, приводящий к росту более крупных частиц эмульсии за счёт более мелких [66].

Площадь поверхности частиц эмульсии, состоящей из 20% ПФУ при среднем размере частиц 100 нм составляет порядка 12 м²/мл. Поверхность наночастиц эмульсии, модифицированная различными поверхностноактивными веществами позволяет использовать их как транспорт для доставки различных маркёров и лекарств в органы и ткани. Кроме того интенсивный фторный сигнал от фторуглеродной части капли позволяет неинвазивно и количественно оценивать лиганд-связанные частицы, что позволит клиницистам подтвердить концентрацию лекарства в тканях.

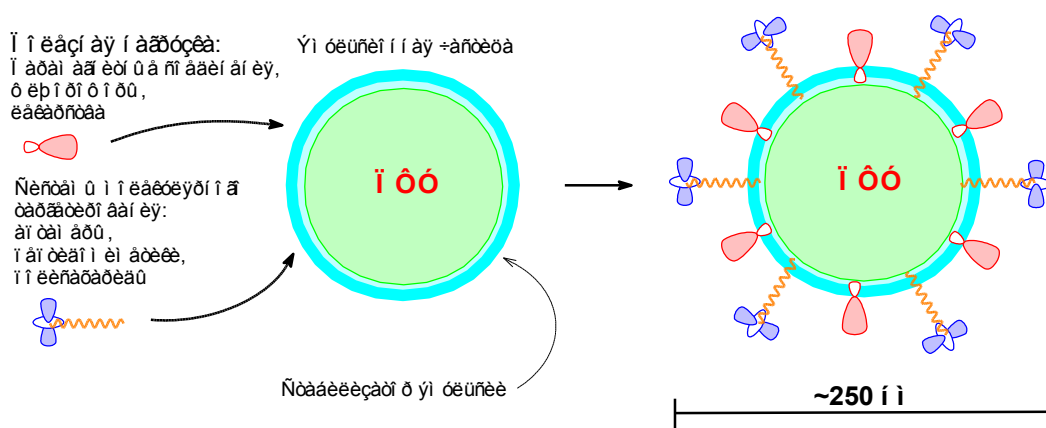


Рис.7. Иллюстрация строения перфторуглеродной наночастицы и её использования в качестве ¹⁹F –контраста и как транспорта для парамагнитных контрастирующих агентов (хелатов Gd³⁺), биологически активных лигандов и лекарств.

Для достижения приемлемой ¹⁹F МР-визуализации фторсодержащий агент (¹⁹F-контраст) должен содержаться в необходимом количестве в заданном вокселе и давать сигнал достаточной интенсивности. Таким образом необходимо увеличивать число атомов

фтора в МРТ пробе. Однако, простое увеличение числа атомов фтора будет увеличивать размер молекулы у которой может изменяться молекулярная подвижность. Это может уменьшать время релаксации T_2 и уменьшает МРТ-сигнал. На сегодня, для экспериментальных целей оптимальными свойствами для экспериментальных нужд МРВ обладает перфтор-15-краун-5-эфир.

Контрастирующие агенты, в отличие от ^{19}F -контрастов, не визуализируясь сами, влияют на ^1H сигналы окружающей их воды и таким образом проясняют анатомические и патологические особенности в наблюдаемых тканях усиливая контрастность изображения. МРТ-контрастирующие агенты классифицируются на T_1 – гиперинтенсивные и T_2 -гипоинтенсивные.

T_1 – продольное или спин-решеточное время релаксации. Каждое соединение (или ткань) имеет характеристическое T_1 , которое отражает время необходимое для восстановления сигнала после возбуждающего импульса. Таким образом уменьшение T_1 , вызванное действием контрастного агента приводит к ускорению восстановления сигнала и делает участок изображения более ярким. Gd^{3+} наиболее распространенный T_1 агент. Для клинического использования большая часть его семи неспаренных электронов связана хелаторами для уменьшения токсичности. Хелаты и других парамагнитных ионов (Eu^{3+} и Mn^{2+}) используются на практике для МРТ контрастирования в особых случаях.

T_2 – поперечное или спин-спиновое время релаксации, определяющее затухание сигнала в поперечном плане. Ускорение затухания этого сигнала под действием T_2 агента приводит к локальному затемнению пятна из-за большой неоднородности магнитного поля, создаваемого T_2 агентом. Суперпарамагнитная окись железа (SPIO) с размером частиц меньше 50 нм один из наиболее часто используемых МРТ T_2 контрастирующих агентов.

Иммобилизация данных соединений на различных наноразмерных матрицах, таких как липосомы, фторуглероды и дендримеры приводит к получению наноструктурированных ионных T_1 МРТ контрастирующих агентов высокой эффективности [67,68].

Локализация контрастирующего агента зависит главным образом от присущей организму системы очищения от инородных частиц – ретикулоэндотелиальной системы (РЕС). Макрофаги РЕС отвечают за удаление этих контрастирующих агентов из системы циркуляции, в результате чего они оказываются в зависимости от размера в легких, селезенке, печени и костном мозге. Кроме того, фагоцитоз и аккумуляция внутри специфических мест могут быть повышены за счёт биологических меток с такими протеинами крови, как иммуноглобулины, белки комплемента или неиммунный сывороточный фактор.

Этот процесс неспецифического и ненаправленного поглощения частиц является «пассивным таргетированием». Лиганд-направленные контрастирующие агенты

предназначены для идентификации особых патологических тканей, наблюдение которых может быть затруднено на фоне окружающих нормальных тканей. Могут использоваться разнообразные лиганды. Это моноклональные антитела и их фрагменты, пептиды, полисахариды, аптамеры и лекарства. Такие лиганды могут связываться с контрастирующим агентом ковалентно или нет. Для демонстрации эффективности этой концепции ориентированных контрастирующих агентов стоит взглянуть на применение парамагнитных МРТ-контрастирующих агентов.

Парамагнитные агенты действуют только на протоны, находящиеся в их непосредственной близости и удаление этих контрастирующих агентов РЕС в процессе пассивного таргетирования может уменьшать их эффективность по двум механизмам:

- аккумуляция контрастирующего агента в конкретных органах удаленных от зоны интереса;
- эндоцитоз и дальнейшее уменьшение влияния на свободные протоны воды.

В результате ориентирования контрастирующего агента, парамагнитный ион может быть доставлен в зону интереса с существенным концентрированием его в этой зоне, что компенсирует эффект частичного разбавления свойственного некоторым МРТ-контрастирующим агентам.

Займствованные из ^1H МРТ специальные гадолиниевые комплексы в качестве сигнал модулирующих ингредиентов были использованы для приготовления наноэмульсий фторуглеродов как многообещающий подход и для улучшения фторного сигнала. Несколько подходов для увеличения чувствительности ^{19}F MR для целей визуализации изучались разными авторами.

Методики получения наночастиц, включающих в свою структуру различные контрастирующие агенты (хелаты Gd^{3+} , Fe_3O_4), основанные на использовании полимерных нанокapsул продолжают совершенствоваться [69,70,71]

Аналогичные подходы в дизайне фторсодержащих наночастиц для МРВ позволили включать релаксационные агенты (Gd^{3+}) в различные части эмульсионной частицы, по разному их ориентировать. В построении наночастицы в качестве комплексообразователя для Gd иона использовался бис-олеат (BOA) диэтиленпентауксусная кислота (DTPA), которая вынужденно отделялась от ПФУ центральной части не более, чем на длину липидного составляющего монослоя ($\sim 15\text{\AA}$). Измерение содержания Gd хелатов, локализованных на наночастицах, полученных при различных условиях, проводилось по стандартной нейтрон активационной методике. Число атомов Gd иммобилизованных на одной наночастице рассчитывалось исходя из диаметра наночастицы (Табл. 3). Отсутствие непосредственного контакта Gd и ядер фтора, но наличие их близкого соседства ускоряло релаксацию ^{19}F , что проявлялось в заметном увеличении ^{19}F сигнала от 200-nm

наночастицы. При 1,5 Т увеличение сигнала достигало 125%. При варьировании поверхностной концентрации Gd^{3+} , релаксационный эффект существенно изменялся [72]. При этом было показано, что скорость $^{19}F R_1$ зависит не только от концентрации гадолиния, но и уменьшается с увеличением напряженности поля и наоборот.

Табл. 3 Перечень характеристик исследованных наночастиц ПФУ.

Количество Gd-DTPA-BOA В липидном монослое (mol%)	[Gd] в общем Объем (mM)	[Gd] в объеме ПФУ (mM)	Средний диаметр частиц (nm)	Рассчитанное количество Gd атомов на одну наночастицу
10	1.44	6.56	232	2.6×10^4
20	4.50	20.46	191	4.5×10^4
30	6.25	29.63	171	4.7×10^4

Влияние положения и ориентации хелатов Gd во фторуглеродной наночастице на сигналы ^1H и ^{19}F продолжали изучать и другие авторы. Например было показано что соседство гадолиниевого иона ($Gd(III)$) существенно увеличивает скорость продольной релаксации $^{19}F R_1$ (s^{-1}) [73].

Три различные фторуглеродные эмульсионные системы были изучены при пяти разных напряженностях магнитного поля. Перфтор-15 краун-5 эфир использовался в качестве основной дисперсной фазы и $Gd(III)DOTA-DSPE$, $Gd(III)DOTA-C6-DSPE$ и $Gd(III)DTPA-BSA$ как компоненты влияющие на релаксацию. В то время, как $Gd(III)DOTA-DSPE$, $Gd(III)DOTA-C6-DSPE$ были предпочтительны для ^1H ЯМР, $Gd(III)DTPA-BSA$, демонстрировал самое сильное увеличение $^{19}F R_1$ [74]. Полученные авторами результаты демонстрируют потенциал использования парамагнитных частиц для увеличения $^{19}F R_1$ при полях, используемых в клинических томографах (1,5-3 Т). При более высоких полях (6-14 Т) гадолиний не приводит к увеличению $^{19}F R_1$ в сравнении с эмульсиями не содержащими гадолиний, но приводят к существенному увеличению $^{19}F R_2$.

PARACEST (PARAMagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer) на основе хелатов других лантанидов Eu^{3+} и Yb^{3+} позволяют генерировать «контрастирование на заказ» исключая необходимость получать исходное изображение до введения контрастирующего агента. Этот способ служит для создания контраста изображения посредством использования химического обменно-зависимого переноса насыщения (CEST) с определенных, предварительно магнитнонасыщенных протонов, в суммарный сигнал молекул воды, определяемый MPT. CEST в сочетании с парамагнитным сдвигающим реактивом (параCEST) представляет собой способ, в котором намагничивание набора парамагнитно смещенных протонов CEST контрастного

вещества избирательно насыщают с использованием радиочастотного излучения. Перенос указанного насыщения к массе молекул воды протонным обменом приводит к уменьшению количества возбужденных протонов воды в окружающей среде CEST контрастного вещества. Следовательно, получают уменьшение интенсивности сигнала всей массы воды, что может быть использовано для создания (отрицательного) контрастного усиления в МРТ изображениях.

Главным преимуществом CEST-агентов является то, что они позволяют обнаружить протоны макромолекул и мембран в биологических тканях, которые имеют низкое значение T2 и не могут быть непосредственно определены методом МРТ.

Перфторуглеродные наночастицы могут доставлять значительные порции PARACEST агентов снижая предел эффективного детектирования для молекулярного изображения рассеянных биомаркёров.

Водорастворимый комплекс PARACEST, базирующийся на 1,4,7,10- тетрааза макроцикле был синтезирован с бензильным фрагментом на одном из ответвлений макроцикла с образованием Eu3+-DOTA-4AMCbenzyl (Рис.8).

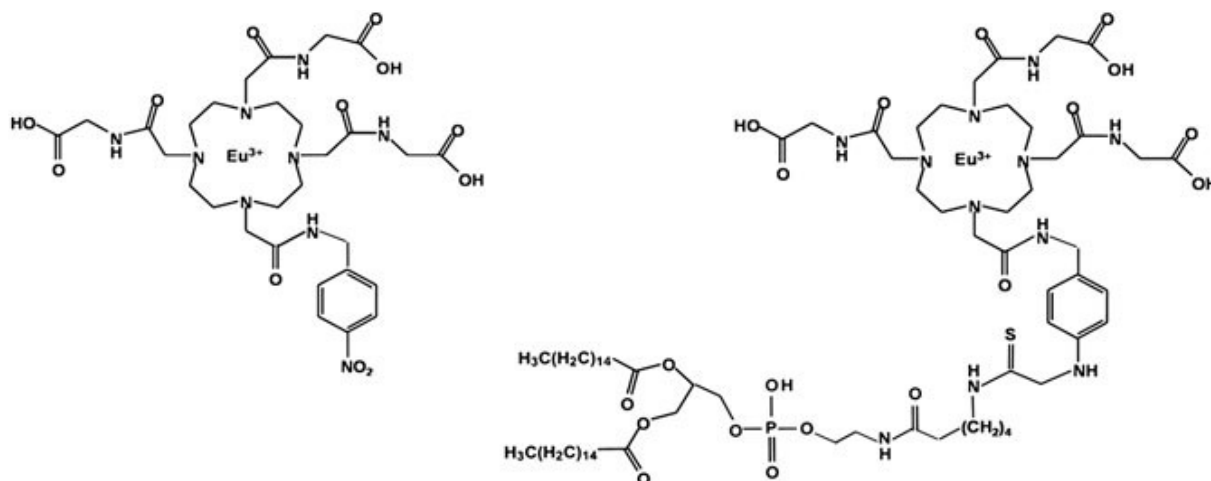


Рис.8. Химическая структура водорастворимого PARACEST хелата (слева), Eu3+-DOTA-4AMC-benzyl связанный с липидом PARACEST (справа) Eu3+-DOTA-4AMC-benzyl-PE, который был помещен на поверхность ПФУ наночастицы.

ПФУ- PARACEST наночастицы целевым образом помещались на фибрин и привязывались на поверхность *in vitro* тромба. Обработанные тромбы демонстрировали PARACEST контрастирование только вдоль по связи тромба без контрастирования внутренней его части и окружающего солевого раствора (Рис. 9).

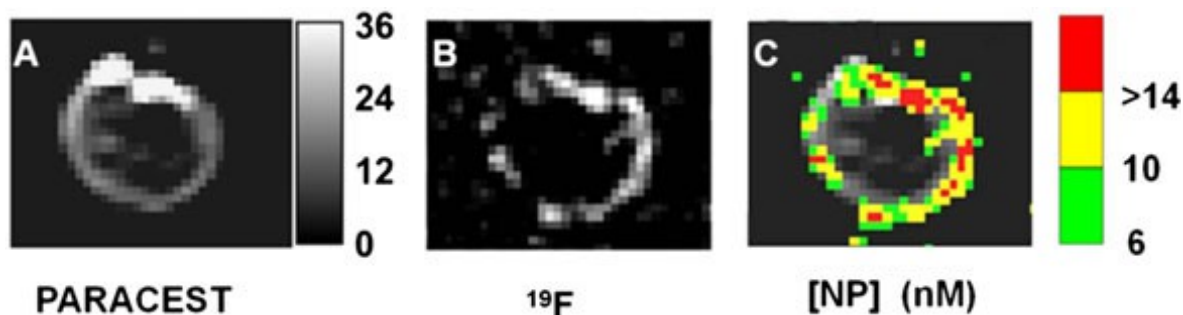


Рис. 9. Двойное Парацест и ^{19}F изображение тромба, обработанного фибрин связанными наночастицами ПФУ с Парацестом. Парацест контраст/шум карта (A), ^{19}F изображение (B) совместно показывают наночастицы привязанные на поверхности тромба. Планка серой шкалы представляет величину отношения контраст/шум. (C) концентрация наночастиц (nM) с цветной кодировкой, наложенной поверх изображения от Парацеста для демонстрации сококализации двух различных сигналов.

Авторы демонстрируют что наночастицы PARACEST – фторуглерод могут предоставлять две уникальные подписи (^{19}F и PARACEST) для количественного целевого молекулярного отображения фибрина [75].

Описаны и другие варианты бимодальных контрастных агентов на базе фторуглеродных наночастиц. Например, эмульсионные системы в которых во фторуглеродную фазу включены квантовые точки на основе модифицированных частиц InGaP/ZnS или «фторофильные» красители. Данные системы помимо ^{19}F -MPB возможностей за счет флуоресцентных квантовых точек или красителей обеспечивают дополнительную оптическую модальность [76,77].

Маркировка клеток перфторуглеродами.

Использование ПФУ в качестве меток для отслеживания клеток с помощью MPB впервые было описано Аренсом с соавторами в 2005г [78]. Маркированные ПФУ клетки можно детектировать в форме позитивного контраста. Изображение имеет яркость пропорциональную количеству ПФУ, содержащемуся в помеченных клетках. Поскольку ПФУ не искажают локального магнитного поля, то одновременно можно получать окружающую анатомическую структуру используя 1H MPB. Эти изображения позволяют контролировать локализацию меченых клеток, как в местах инъекций, так и в зонах их миграций – органах и лимфатической системе. Очень важно, что ПФУ не изменяют свойств самих клеток, не изменяют их фенотип или поведение.

За последние 10 лет кратно увеличилось количество публикаций, посвященных отслеживанию с помощью ^{19}F MPB клеток помеченных фторуглеродами [79].

Существует два подхода для введения фторуглеродных меток в клетки и их отслеживания:

1. Эмульсия ПФУ вводится внутривенно, эмульсионные частицы захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), включая макрофаги и моноциты. Эти же клетки оказываются и в очагах воспаления, что приводит к накоплению атомов фтора в такой зоне.

^{19}F МРВ сигнал может быть зафиксирован в зоне обследования и оценен количественно, так как его величина пропорциональна «загруженности» макрофагов.

2. Изолированные исследуемые клетки метятся *ex vivo* (в культуре) с использованием эмульсии ПФУ. Клетки, помещенные в объект, отслеживаются с помощью МРВ и ЯМР. Фтор, содержащийся в меченых клетках, обеспечивает их визуализацию при отсутствии фоновых сигналов. Это может быть использовано для количественного определения числа клеток в зоне аккумуляции. Этот подход, называемый «*in vivo* цитометрией» способен отслеживать клетки различных типов в их специфическом поведении. Альтернативно, биораспределение клеток может быть точно измерено в панели интактных образцов тканей при использовании ^{19}F ЯМР спектроскопии.

Опубликован ряд работ очень хорошо иллюстрирующих взаимодействие ретикулоэндотелиальной системы и фторуглеродной эмульсии при наличии воспалений различной этиологии.

Так, у мыши вызывалась пневмония интратрахеальным введением липополисахаридов (LPS) с последующим внутривенным введением эмульсии ПФУ [80]. В то время, как регулярные ^1H МРТ-исследования не свидетельствовали ни о каких повреждениях через 24 часа после введения LPS, конкурентное ^{19}F МРТ обследование ясно показало накопление ПФУ в обеих лёгочных долях.

В другом варианте воспаления у мышей IL-10 вызывали колит с патологией близкой к человеческому кишечному воспалению. На 15 день мышам вводили внутривенно 0.2 мл эмульсии ПФУ (VS-1000H, Celsens). Мыши визуализировались на 2,9,16,23 30 день после инъекции ПФУ на 11,7 Т томографе (Bruker Biospin). $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ - МРВ аксиального среза брюшного отдела демонстрируют распределение ПФУ в стенках толстой кишки в соответствии с воспалением кишечника мыши [81].

Аналогично, собственный иммунный ответ при абсцессе, вызванном *Staphylococcus aureus* в бедре мыши может наблюдаться *in vivo* с помощью ^{19}F -МРВ [82]. Это дает возможность контролировать эффективность антимикробной терапии при бактериальных инфекциях. Flögel et al. d 2008 г успешно использовали ^{19}F -МРВ для обнаружения воспаления после инфаркта, экспериментально вызванного у мышей при наложении лигатуры на переднюю нисходящую артерию [83]. Воспаление после миокардиального инфаркта индуцированного баллонной ангиопластикой (50 минут) перефирической левой передней нисходящей артерии свиньи надежно регистрировалось и на медицинском

томографе 3T [84]. Описана визуализация воспалений при таких аутоиммунных заболеваниях, как ревматоидный артрит [85]. $^{19}\text{F}/^1\text{H}$ -МРВ позволяет зафиксировать на ранних стадиях отторжение трансплантата после пересадки сердца или почки за счет инфильтрации макрофагов на границе пересаженного органа [86,87].

Очень наглядной является иллюстрация механизма попадания частиц фторуглеродной эмульсии в область воспаления при введении эмульсии в кровяное русло и взаимодействия фторуглеродных микрочастиц с элементами ретикулоэндотелиальной системы организма (Рис.10)[88].

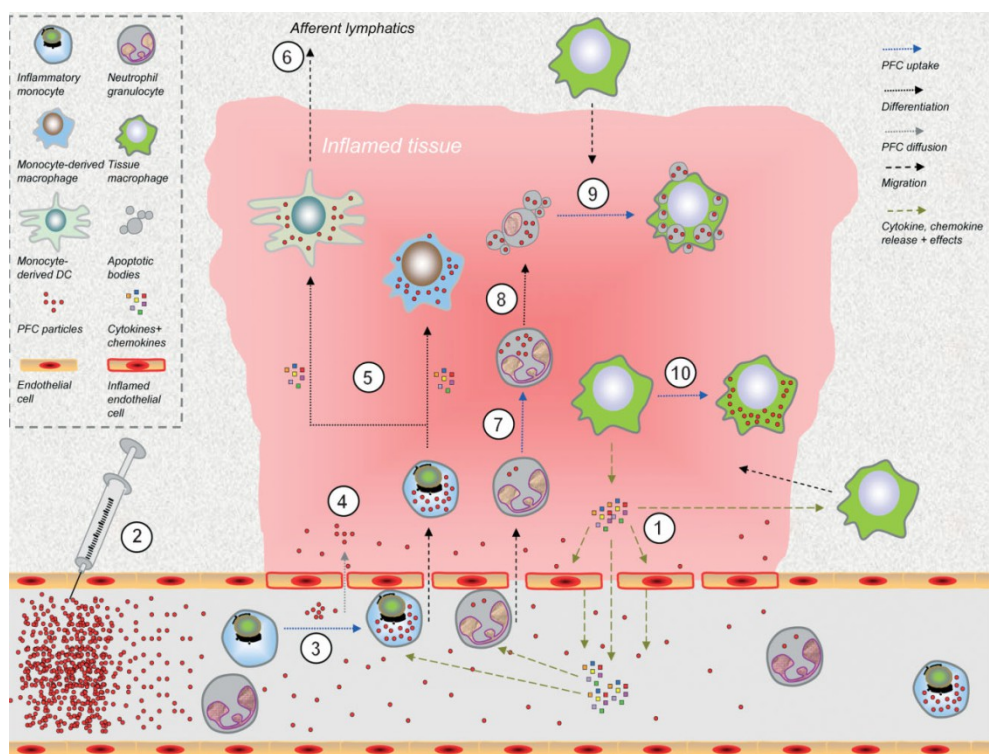


Рисунок 10. Механизмы ^{19}F - маркировки воспаленной ткани.

Цитокины и хемокины, образующиеся в результате воспаления, взаимодействуют с макрофагами окружающих тканей и активируют клетки эндотелия (1). Это приводит к миграции моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов из циркулирующей крови в область воспаления. После внутривенного введения (2), фторуглеродные частицы эмульсии захватываются моноцитами (3) и в меньшей степени нейтрофильными гранулоцитами. Благодаря малому размеру (100 нм) эмульсионные частицы могут также пассивно диффундировать в область воспаления через воспаленный эндотелий (4). После миграции в воспаленную ткань, моноциты трансформируются в макрофаги или DCs из-за влияния воспалительных цитокинов (5). Так как фторуглероды химически инертны, можно предположить, что они не теряются в процессе этой дифференциации моноцитов и маркировка сохраняется. Моноцитные производные DCs покидают область воспаления через лимфатические узлы (6) благодаря согласованному адаптивному

иммунному ответу. По этому пути ^{19}F -метки вместе с DCs также транспортируются в лимфатические узлы. В отличие от нейтрофилов в крови, нейтрофилы гранулоциты расположенные внутри области воспаления содержат существенные количества фторуглеродных частиц (7), приобретенных возможно за счет фагоцитоза эмульсионных частиц, находящихся в ткани. Нейтрофильные гранулоциты имеют относительно короткую жизнь и погибают после миграции в область воспаления (8). Апоптирующие нейтрофилы удаляются местными макрофагами, которые могут уже сами захватить ^{19}F -метки из гибнущих нейтрофилов (9). Кроме того, тканевые макрофаги могут захватывать фторуглеродные эмульсионные частицы, проникающие в ткань через эндотелиальный барьер (10).

Как следует из этой схемы, степень ^{19}F -маркировки зоны воспаления зависит от количества и активности моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов в кровеносном русле и способности фторуглеродных эмульсионных частиц диффундировать через эндотелиальный барьер. Именно эти факторы ответственны за брутто количество фторуглеродной метки оказавшейся в зоне воспаления. Однако, для конечного детектирования критически важно и строение фторуглерода, используемого в качестве контраста, а именно количество магнитноэквивалентных атомов фтора в его молекуле, имеющих одинаковый химический сдвиг в ЯМР-спектре.

Многие лаборатории исследовали возможность использования обычного ^1H МРТ, чтобы визуализировать иммунциты, стволовые клетки и другие типы клеток. В некоторых исследованиях культивируемые клетки переводились в магнитно помеченные *ex vivo* через введение парамагнитных контрастирующих агентов, например, используя наноразмерную или микронную суперпарамагнитную окись железа (SPIO) [89,90]. Есть также многочисленные исследования, где частицы окиси железа использовались, чтобы маркировать макрофаги в естественных условиях (то есть, на месте) при непосредственной инъекции [91]. Однако, МРТ определение концентрации окиси железа все еще не надежно, потому что нет никакой ясной корреляции между сигналом окиси железа и числом маркированных клеток, и измерение уменьшения в сигнале всегда было проблемой (Таб.4).

Таб. 4. Соединения для маркировки клеток и их базовые свойства.

Детектируемый агент	Способ детектирования	Влияние на изображение	чувствительность	Определение количества	Токсичность
Окись железа (FeO , Fe_2O_3 , Fe_3O_4)	T_2	Снижение интенсивности	+++	+	++
Gd^{3+} , Mn^{2+}	T_1	Увеличение интенсивности	++	+	+++
^{19}F	Спиновая плотность	Присутствие или отсутствие	+	+++	+

Существенным преимуществом ^{19}F -контрастов для маркировки клеток является отсутствие необходимости иметь картинку области интересов до процедуры. На Рис 10 показано, что обнаружение клеток, маркированных перфторуглеродами с использованием ^{19}F МРТ существенно отличается от предшествующих методов маркировки клеток контрастирующими агентами. В случае последнего каждый обнаруживает присутствие парамагнитного агента косвенно через его влияние на времена релаксации окружающих протонов в мобильной воде. Напротив, перфторуглеродный реагент действует, как сигнальная лампа, и посредством ЯМР ^{19}F непосредственно обнаруживается плотность спинов ^{19}F , содержащихся в частицах фторуглеродов в клетках [92].

Терапевтические клетки (дендритные или стволовые клетки) метятся с помощью контрастирующего агента (Gd или SPIO), или с помощью ^{19}F . Наоборот, типично анатомическое МРТ использует ^1H из воды в тканях. Меченные клетки пересаживаются в пациента с локализацией (интрадермально или интранодально). Пациент затем осматривается для определения клеточной локализации. Gd и SPIO метки обычно требуют перед (before) и после (after) получения образов для локализации (белые стрелки на Рис. 11) результирующего гиперинтенсивного или гипоинтенсивного конечного сигнала. С фторированной меткой, при наличии анатомической ^1H картины, можно рассматривать только конечную картину. Более того, конечный фторный сигнал может быть рассчитан и определено количество клеток.

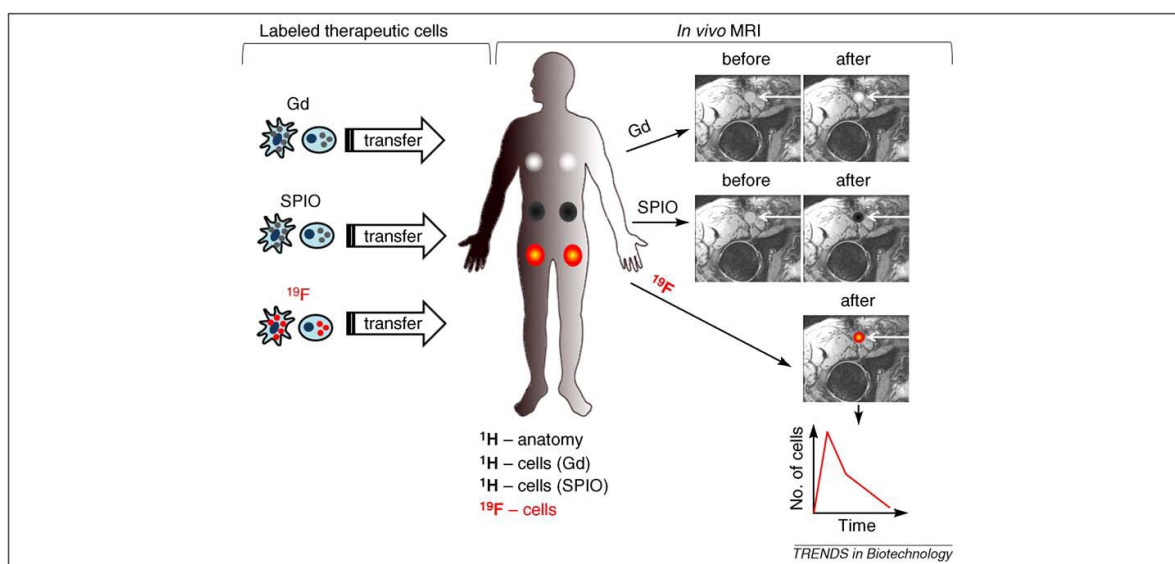


Рис. 11 Примеры маркировки клеток и получение МРТ-изображений с использованием контрастирующих агентов и ^{19}F –контрастов [92].

В общих чертах, количественное изучение маркировки ПФУ эмульсиями различных клеток дало результат, что клетка может нагружаться 10^{11} - 10^{13} атомами фтора. С уровнем обычно большим для фагоцитирующих клеток [92].

Исследования по отслеживанию клетки с фторированными метками показали [93], что маркированные клетки могут быть обнаружены при группе 10^4 – 10^5 клеток на voxel для клинических систем МРТ и 10^3 – 10^4 клеток на voxel для высоко-полевых сканеров для животных. Изображения ^{19}F МРТ, чрезвычайно избирательны для маркированных клеток. Абсолютное число маркированных клеток может быть измерено непосредственно в естественных условиях ^{19}F -изображения. Сигнал ^{19}F имеет также большое преимущество для прослеживания клетки в регионах, таких как легкие, ткани и органы брюшной полости и кости. Например, ПФУ эмульсией маркировали моноциты и макрофаги непосредственно перед внутривенным введением и получали положительные сигналы на местах воспаления в моделях на животных.

Ниже, на Рис. 12 приведена принципиальная методологическая схема таких исследований [93].

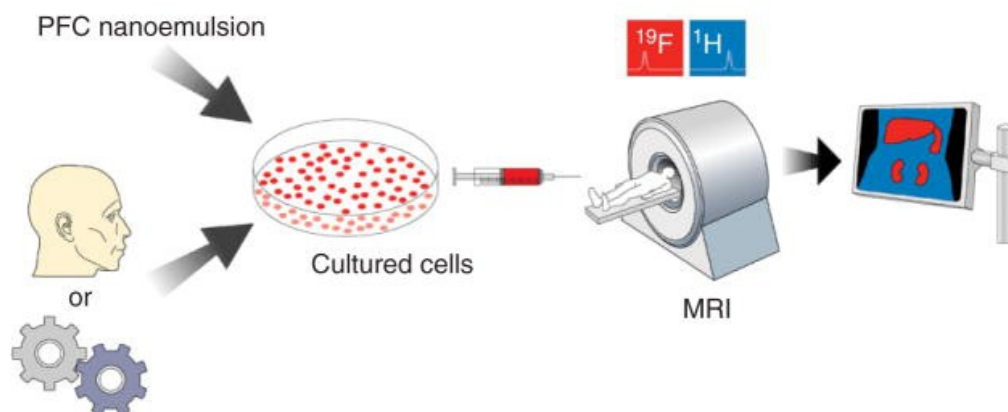


Рис. 12. Клеточная МРВ с использованием ПФУ наноземulsion. ПФУ наноземulsion добавляется к культуре клеток полученных от объекта или из искусственной линии. Помеченные клетки трансплантируются в объект исследования и изображения на ядрах ^{19}F и ^1H получают в одной и той же сессии. Записанные изображения накладываются и получается изображение маркированных клеток в их анатомическом контексте.

Недавно был использован интересный прием по использованию двух перфторуглеродов с разными химическими сдвигами ^{19}F опорных сигналов для того, чтобы различать популяции разных помеченных клеток [94,95]. Для смешанных популяций помеченных ПФУ и SPIO-меченных клеток, ширина линий в ЯМР и химический сдвиг были в три-четыре раза больше чем измеренные в клеточных агрегатах. Важность результата в том, что ^{19}F -сигнал в совместно помеченных и совместно локализованных клеточных агрегатах могут быть разделены, что является базисом для использования этой техники для *in vivo* применения. Уширенные линии ^{19}F -сигнала не препятствуют способности обнаруживать популяцию помеченных клеток, т.к.

«фторное» изображение может быть получено при существенно более низком разрешении (>2 раза меньше), чем типичное ^1H -изображение [96].

И ^{19}F МРТ для детектирования ПФУ-меченных клеток и ^1H МРТ контрастная техника обнаруживает влияние SPIO-меченных клеток на сигнал от окружающей воды. Эта мощная техника позволяет визуализировать миграцию и аккумуляцию клеток в глубоких тканях. Однако, они оба обременены потенциальной проблемой генерирования фальшивых положительных результатов если метка переходит от мёртвого клеточного трансплантата к макрофагу *in situ*. Авторы следующей работы попытались найти решение этой проблемы. Их подход был основан на исследовании способности SPIO подавлять ПФУ сигнал по тому же принципу, что и использование SPIO для контрастирования ^1H изображения [97]. Они установили, что не наблюдается изменений ^{19}F T_1 ПФУ в помеченной наноземulsionей клетке в случае смешения со SPIO наночастицами. При этом ими было установлено, что ^{19}F T_2 сильно уменьшается когда два реагента тесно взаимодействуют. Например, в случае если клетка помечена двумя типами наночастиц. Кроме того, они установили, что ^{19}F T_2 ПФУ совсем не затрагивается, когда SPIO метка находится на расстоянии, в отличие от близко расположенной SPIO-меченной клетки. Таким образом T_2 контраст может быть использован для детектирования близости положения клетка-клетка.

Для получения бифункциональной системы, позволяющей получать изображения в ультразвуковой и магнитнорезонансной (US/MR) техниках была разработана магнетит/ПФУ (органически/неорганическая) наноразмерная гибридная эмульсионная система. Получают эту систему на базе самоорганизующегося золь-гель процесса с использованием модифицированного полиэтиленгликолем магнетита, перфтороктилбромида и амфифильного блок сополимера – полистирол-полиакриловая кислота (PS-b-PAA) с последующим сшиванием тиол-силаном (3-меркаптолтропил триметоксисилан MPTMS) [98]. По утверждению авторов данная наноразмерная гибридная система с оболочкой состоящей из сшитого тиол-силана обладает высокой *in vivo* стабильностью в сравнении с другими типами мицелл (не сшитыми) [99], которые легко разрушаются при разбавлении и под действием потока крови. Помимо диагностики, данная гибридная наноразмерная система даёт возможность использовать её в высокоинтенсивной фокусированной ультразвуковой дезинтеграции (high intensity focused ultrasound (HIFU) ablation) при терапии рака.

Японские авторы разработали новую эмульсионную систему состоящую из ПФУ ядра и мезопористой силикагельной оболочки FLAME (FLuorine Accumulated silica nanoparticles for MRI Enhancement). Для получения этой системы использовалась приготовленная из перфтор-15-краун-5-эфира и фосфолипида наноразмерная эмульсия на поверхности

частиц которой, как на матрице с помощью специального поверхностно-активного вещества инициировался золь-гель процесс из тетраэтил ортосиликата [100]. Данная эмульсия демонстрировала высокую стабильность и хорошую МРТ чувствительность. Поверхность частиц может легко модифицироваться и служить хорошим транспортным средством.

Микрокапсулирование – активно развивающееся направление в получении стабильных эмульсионных систем на основе фторуглеродов. Формирование водонерастворимой полимерной оболочки, покрывающей фторуглеродное ядро фактически сводит на нет Оствальдово созревание и обеспечивает стабильность дисперсионного состава во времени.

Биосовместимые и биodeградируемые полиэфиры, такие как поли(ε-капролактон) (PCL), поли(лактид) (PLA), поли(гликолид) (PLG) и разнообразные сополимеры, такие как поли(лактид-со-гликолид) (PLGA) различного молекулярного веса и строения широко используются для получения микрокапсул для доставки лекарств пролонгированного действия. Srinivas с соавторами описал использование биodeградирующих поли(D,L-лактид-со-гликолид) (PLGA) олигомеров для получения полимерных микрокапсул различных ПФУ со средним размером 220 и 320 нм. Эти системы демонстрировали высокую стабильность и механическую прочность в сравнении с известными эмульсиями[18]. При этом сами PLGA получили разрешение FDA для использования в медицинской практике. В другой работе авторы показали, что PLG микрокапсулы наполненные ПФД по своей механической устойчивости сравнимы с эритроцитами. При этом полимерная оболочка демонстрирует достаточную проницаемость для обмена кислородом с окружающей водной средой [101]. Использование различных вариаций методик получения микрокапсул с использованием PLGA олигомеров позволяет получать капсулы различного диаметра (от 0,1 до 4 микрон) с различной толщиной покрытия. Использование модифицированных PLGA, например PLGA -PEG дает возможность увеличить время циркуляции фторуглеродных микрокапсул в кровотоке почти в два раза по сравнению с гомополимерной PLGA –микрокапсулами [102]. Введение в PLGA-микрокапсулу наряду с ПФУ индоцианина зеленого для визуализации в близкой инфракрасной области и хемотерапевтического средства – дексорубина делает такие капсулы многофункциональными, сочетающими диагностические и лечебные возможности [103].

Другим, активно используемым для получения микрокапсул полимером, является бутилцианакрилат [104]. Эмульсии из из бутилцианакрилатных микрокапсул, наполненных ПФД, изучались в качестве переносчиков кислорода [105,106]. Эти же авторы использовали эту микроэмульсионную систему для введения в нее флуоресцентных

красителей растворимых в ПФД, квантовых точек и модифицированных наночастиц золота.

Как уже отмечалось выше, высокая площадь поверхности наночастиц эмульсии, модифицированная различными поверхностноактивными веществами позволяет использовать их как транспорт для доставки различных лекарств в органы и ткани. Хотя наночастицы по мнению авторов [108]сами являются антикоагулянтами в сосудистом сегменте и предотвращают коагуляцию за счёт тромбин адсорбирующей поверхности в случае сосудистых повреждений [109], не было показано, что они могут функционировать в качестве антитромбоцитов *in vivo*, но их способность быть увиденными, может детектировать острые состояния даже в пораженных артериях и венах [110]. Дальнейшее развитие этого направления привело к нанесению соединения с антитромботической активностью на поверхность фторуглеродной эмульсии. PPACK (Phe[D]-Pro-Arg-Chloromethylketone) был ковалентно связан с поверхностью перфторуглеродной наночастицы. Эти частицы ингибирующие тромбин вводились в сонную артерию мыши, предварительно поврежденную фотохимически. Была установлена высокая антитромбиновая активность такой системы [111].

Безвредный для организма способ маркирования клеток является ключом для полного понимания функции мобильной и/или пересаженной клетки, особенно иммунных клеток в клеточной терапии. ^{19}F МРТ для маркировки клеток имеет несколько преимуществ, главное из которых – его неразрушающая природа, позволяющая получать данные, используя стабильный, не радиоактивный изотоп без ограничения времени в отсутствие эндогенного сигнала и возможность определять количество клеток на основе полученного изображения [112]. Однако, обеспечение достаточного сигнала ^{19}F от помеченной клетки является ключевой задачей, особенно для не фагоцитирующих клеток таких как лимфоциты и стволовые клетки.

В последние годы опубликован целый ряд работ использующих платформу эмульсий перфторуглеродов с различными типами стабилизаторов эмульсий образующих тот или иной адсорбционный слой. Варианты ^{19}F меток, которые могут быть использованы включают эмульсии, частицы, полимеры и соединения для клинического использования. Различные клетки животных и человека, такие как дендритные клетки, липосомы и фагоциты, клетки эндотелия, макрофаги, моноциты, а также клетки различных опухолей успешно метятся и изучаются в моделях аутоиммунных заболеваний, воспалений, трансплантационных отторжениях и многих других [113 -123]. Первичные клетки человека, особенно дендритные клетки, которые используются при вакцинации уже тестируются для ближайшего клинического использования [124].

Аналогичная мультимодальная платформа использовалась для наблюдения меченных стволовых клеток при лечении тяжелых повреждений мозга у мыши [125].

Новые фторсодержащие соединения для ^{19}F МРТ.

Для улучшения сигнала ^{19}F частиц эмульсии, используемых в качестве меток группа авторов начиная с 2009 года начала использовать производные перфторполиэфира [126] (ПФПЭ) (Fomblin Z) – линейного перфторированного олигомера окиси тетрафторэтилена (Рис. 13.). Это высоко гидрофобное и олеофобное масло с высокой температурой кипения, молекулярным весом порядка 1700 Да и низким поверхностным натяжением. В каждой молекуле содержится порядка 55 атомов фтора и основная их часть, входящие во фрагменты $-\text{CF}_2\text{O}-$, являются магнитно эквивалентными и дают в спектре ЯМР ^{19}F синглет. Концевые сложноэфирные группы этих ПФПЭ превращали в различные производные, содержащие красители. Ковалентно связанные флюоресцентные флажки на фторированной молекуле позволяют проводить дополнительный контроль за клетками [126]. Эти олигомерные модифицированные ПФПЭ эмульгировались различными способами с использованием неионных поверхностно-активных соединений типа Плурионик (Pluronic) образуя наноразмерные эмульсии типа масло/вода. В настоящий момент эти препараты коммерчески доступны под название V-Sense (Cell Sense Inc) Celsense. <http://www.celsense.com/vsense.html> (Accessed May 6th, 2014). Проводятся клинические испытания для их использования в клинике.

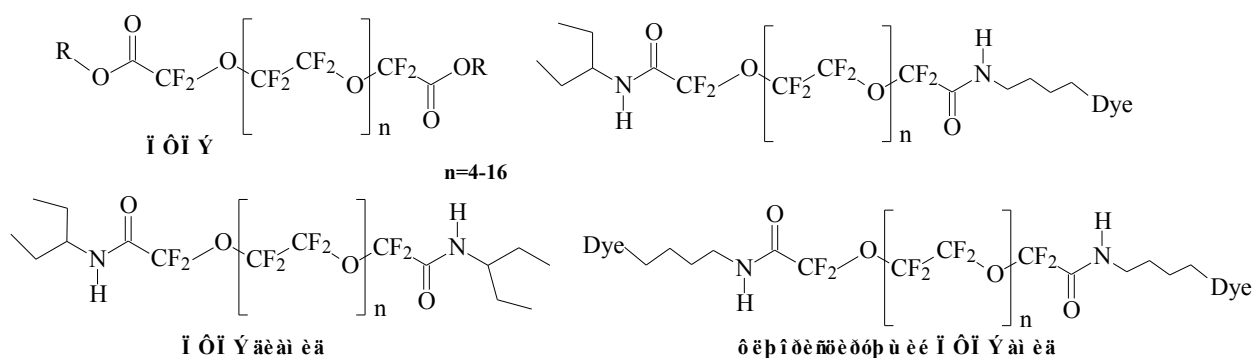


Рис. 13. Химическая структура перфторполиэфиров (ПФПЭ), и амидное производное ПФПЭ с флюоресцентным красителем .

Продолжаются поиски новых фторсодержащих соединений, нацеленных на специальные задачи исследователей. В недавней работе сообщалось об использовании перфтор-трет-бутилового эфира - [1,1,1,3,3,3-гексафтор-2(трифторметил)пропан-2-ил]окси-октана (C8-PFTE) – липофильного инертного соединения с синглетным сигналом от перфтортрет-бутильной группы в качестве ^{19}F МРТ- метки для клеток [127]. Это дифильное соединение по мнению авторов удобно именно для выращивания клеток в его присутствии. Меньший удельный вес данного соединения по сравнению с ПФУ делает эмульсионную систему более седиментационно устойчивой.

Совсем недавно, группа итальянских исследователей сообщила о синтезе молекулы с 36 эквивалентными атомами фтора. Они назвали это соединение PERFECTA (Рис.14) Хотя эта молекула формально не является перфторированной и содержит 4 эфирные связи и 4 CH₂ – группы, способные к энзимной деградации в организме, рентгеноструктурный анализ показал, что полярный фрагмент молекулы полностью экранирован перфторированными разветвленными группами (изображение на рис справа). В ЯМР PERFECTA даёт очень интенсивный синглет T₁ и T₂ составляют соответственно 622 мс и 187 мс. PERFECTA образует устойчивую эмульсию хорошо сочетающуюся с культурами клеток [128].

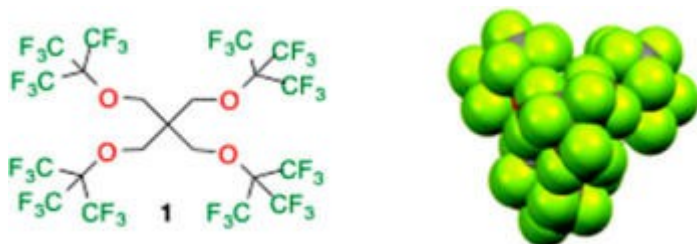


Рис. 14. PERFECTA. Химическая формула и вид молекулы по данным рентгеноструктурного анализа.

В последние годы особенно активно развиваются исследования различных типов фторсодержащих дифильных соединений, подобных фторсодержащим поверхностно-активным веществам, способных при определенных условиях образовывать мицеллы.

Недавно, Peng с соавторами [129] сообщили об исследовании ряда амфифильных diblock-сополимеров в которых гидрофильная часть состояла из полиакриловой кислоты, а гидрофобная часть содержал сополимер н-бутилакрилата с частично фторированным акрилатом или метакрилатом. Как было показано, эти diblock-сополимеры успешно самоорганизуются в стабильные мицеллы, с гидрофобной сердцевинной, содержащей большое количество фтора (Рис.15.). Размер этих мицелл колеблется от 20 до 45 нм. ¹⁹F ЯМР показал, что во всех образцах атомы фтора магнитно эквивалентны и дают синглет и время релаксации T₁ составляло 500-600 мс.

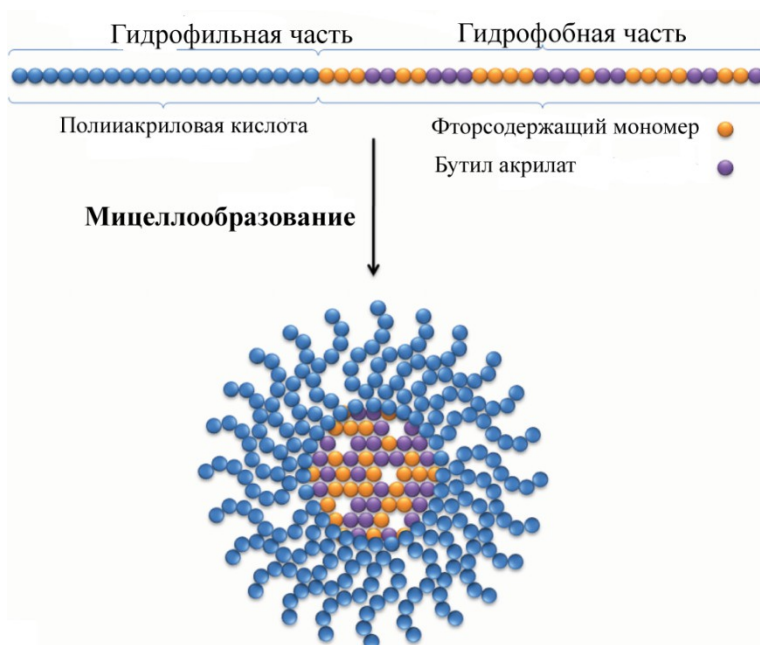


Рис. 15. Наглядное изображение мицеллы, содержащей гидрофобное ядро с большим содержанием атомов фтора

Аналогичное исследование опубликовал Du с соавторами, исследовавшими свойства другой новой серии сверхразветвленных звездчатых амфифильных фторполимеров [130]. Эти полимеры также показали способность к мицеллообразованию. Размер этих мицелл составлял 20-30 нм. ^{19}F ЯМР эксперименты демонстрировали единственный узкий сигнал и хорошие времена релаксации T_1 и T_2 составляющие 500 и 50 мс соответственно.

Были синтезированы фторсодержащие полимерные поверхностно-активные вещества, состоящие из полиэтиленгликольной гидрофильной группы и 1,2 или 3 перфтор-трет-бутильных групп, как фторофильных фрагментов. Изучалась их способность самоорганизовываться в воде с целью использования для получения «тераностических»¹ наночастиц. Полимеры с тремя перфтор-трет-бутильными группами (ПФТБ_{три}) самостоятельно образует стабильные, сферические мицеллы с примерно 12 нм диаметром. Эти ПФТБ_{три}-замещенные сурфактанты показывали характеристики схожие с полимерами с линейными перфторированными заместителями, несмотря на существенные различия в строении заместителей. Главным их преимуществом является интенсивный синглет от девяти трифторметильных групп, который обнаруживается в растворе при концентрации 1 мМ на приборе 4,7 Т. Набор этих свойств делает подобные соединения перспективными и в качестве меток и для доставки лекарств [131].

Бисферическая дифильная молекула также содержащая ПФТБ_{три} была синтезирована Jiang с сотрудниками [132] для использования в качестве ^{19}F меток. Эти

¹ Тераностика - термин, объединяющий в одном слове два понятия – терапия и диагностика.

водорастворимые молекулы образуют мицеллы при концентрации 7мМ. Время релаксации T_1 составляет 163 ms, что существенно меньше, чем у перфтор-15-краун-5-эфира ($T_1 = 1069$ ms)

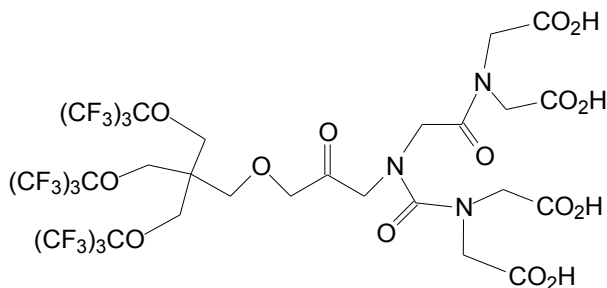


Рис.16. Дифильная молекула, содержащая перфтор-трет-бутильные группы (ПФТБ_{три}).

Были получены изображения от всего тела мыши на ядрах ^1H и ^{19}F после введения раствора данного соединения-метки в фосфатном буфере. Оказалось, что после 1-2 часов после введения ^{19}F -сигнал быстро уменьшался до ненаблюдаемого уровня во всех органах. Основываясь на данных по скорости уменьшения сигнала от ^{19}F спектра всего тела и в образцах мочи, было установлено, что период полувыведения данного соединения в организме составляет примерно 0,5 дня. Это существенно меньше чем периоды полувыведения перфторуглеродов, которые используются для МРТ визуализации и составляют от нескольких дней до нескольких месяцев.

Позднее, ими (Jiang с соавторами) было синтезировано другое соединение, содержащее перфтор-трет-бутильную группу, предназначенное для получения комплексов с ионами металлов [133].

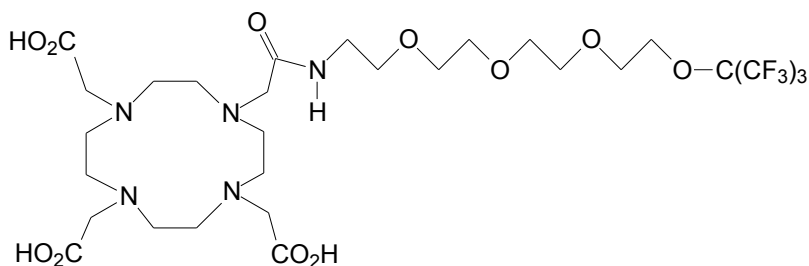


Рис.17. Фторсодержащий комплексообразователь у которого резонансный сигнал атомов фтора сдвигается в зависимости от природы металла в комплексе.

Ядра фтора в данном соединении находятся на определенном расстоянии от места расположения ионов металлов в комплексе (Рис. 17). Было показано, что ^{19}F сигнал и времена релаксации T_1 и T_2 сильно зависят от природы хелатируемого металла. Наибольший сдвиг частоты наблюдался когда Tb^{3+} образовывал комплекс с фторсодержащим лигандом.

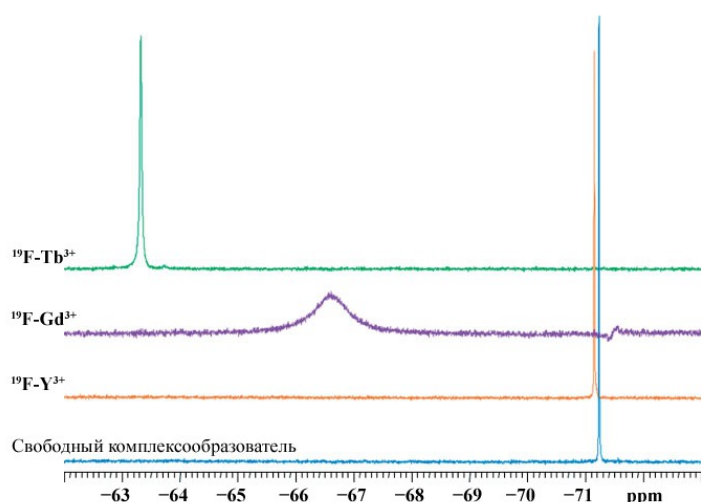


Рис. 18. ^{19}F ЯМР спектры комплексов трёх металлов. Двух парамагнитных - Tb^{3+} Gd^{3+} и одного диамагнитного - Y^{3+} . Спектр свободного комплексообразователя представлен для сравнения.

Парамагнитные металлы Fe^{3+} , Gd^{3+} , Er^{3+} , Dy^{3+} и Ho^{3+} также дают большой сдвиг. T_1 и T_2 времена релаксации были существенно снижены при образовании хелата Gd^{3+} , однако Fe^{3+} , Ni^{2+} и Cu^{2+} тоже существенно снижают времена релаксации по сравнению со свободным лигандом. Эти же закономерности наблюдались и для ранее синтезированного соединения с ПФТБ_{три} (Рис. 16). Таким образом эти соединения могут быть легко соединены с различными терапевтическими агентами, а при использовании различных металлов, могут превращаться в мультиспектральные метки, которые можно отслеживать при определённых частотах. Например, выбор иона металла будет давать уникальный для диагностики сдвиг частоты сигналов атомов фтора [133].

Ряд работ посвящен изучению фторсодержащих дендримерных полимеров, представляющих собой наночастицы с размером 15-80 нм и дающие соответствующие резонансные пики от фторсодержащих заместителей. Такие наночастицы также могут использоваться в диагностике и в качестве средств доставки [134,135,136].

Увеличение чувствительности метода ^{19}F MRT достигалось не только поиском новых ПФУ с еще большим количеством эквивалентных атомов фтора в молекуле, но и усовершенствованием методов получения сигнала. Несколько попыток было сделано для исследования новых импульсных последовательностей с целью расширения возможностей MRT [137].

Был разработан метод 3-D сжатия для усиления ^{19}F сигнала от меченых клеток. Было показано 8-кратное снижение времени получения образа без ухудшения соотношения сигнал/шум [138].

Для ПФУ с магнитно-неэквивалентными атомами фтора, имеющими ЯМР-спектры с набором сигналов с разными химическими сдвигами, разработана новая двойная $^{19}\text{F}/^1\text{H}$

сбалансированная UTE-SSFP последовательность демонстрирующая высокое отношение сигнал/шум, с более чем двукратной детектируемой чувствительностью по сравнению с традиционной техникой [139].

Совершенствование МРТ аппаратуры, возможность использовать всё более и более мощные приборы, появление новых рецептур многомодалых эмульсионных систем для экспериментов привлекают к данной, пока ещё экспериментальной, области диагностики, имеющей все предпосылки перейти в разряд «тераностики», всё большее внимание специалистов разных профилей. В 2005 году, при Carnegie Mellon University была основана частная компания Celsense (www.celsense.com). Это биотехнологическая компания предлагает новые МРТ агенты, которые позволяют учёным и клиницистам отслеживать локализацию количество трансплантированных клеток. Основой инноваций компании является использование эмульсий перфторуглеродов и ^{19}F -визуализации для исследований с маркированными клетками [140].

Помимо экспериментальных работ, приведенных в данном обзоре литературы следует отметить целый ряд опубликованных в последние годы обзоров по конкретным разделам применения перфторуглеродов в различных эмульсионных системах и в комбинации с различными МРТ-контрастами, традиционными метками других типов, клетками и лекарственными препаратами [141-156].

Заключение

Анализ всей приведенной литературы показывает, что исследователи, при формировании требований к ^{19}F МРТ контрастной системе основывались на том, что все ПФУ являются биологически инертными веществами и, потому, руководствовались исключительно необходимостью получения системы, обеспечивающей максимальную интенсивность сигнала ^{19}F . Отбор перфторуглерода для использования его в качестве ^{19}F МРТ контраста, проводился исключительно по его спектральным параметрам – оптимальным является соединение, имеющее максимально большое число магнитно эквивалентных атомов фтора. Такое соединение было сконструировано, синтезировано и поступило на научный рынок, это перфтор 15-краун-5-эфир, общей формулы $\text{C}_{10}\text{F}_{20}\text{O}_5$. Все 20 атомов фтора в этой молекуле эквивалентны. При выборе данного соединения принималось к сведению, что все перфторуглероды биологически инертны, не токсичны и растворяют значительные объёмы кислорода и углекислого газа, могут, при определенных условиях и рецептурах, давать достаточно устойчивые эмульсии. Этого было достаточно для научных экспериментов. Не принималась в расчёт стоимость и доступность этого соединения (в настоящий момент цена 100 г перфтор 15-краун-5-эфира составляет примерно 800\$). Кроме того нигде в публикациях не обсуждается скорость выведения этого соединения из организма, а это очень важный параметр.

Исходя из строения данного соединения период полувыведения данного соединения составляет примерно 200 дней.

Частично фторированные дифильные соединения, разрабатываемые и исследуемые в качестве специальных ^{19}F -контрастов для маркирования клеток или в качестве маркированного транспорта для лекарственных средств, а также в качестве комплексообразователей для парамагнитных металлов, вызывают ряд вопросов. Главный из них – судьба этих соединений в организме. Лишь в нескольких работах сообщалось о путях выведения таких соединений из организма.

Аналогично обстоит дело и с используемыми для стабилизации эмульсий эмульгаторами. Следует особо отметить, что практически все вышеперечисленные направления исследований эмульсий перфторуглеродов, проводимые в зарубежных исследовательских центрах не выходят и пока не могут выйти за рамки экспериментов на животных. Это обусловлено тем, что нигде за рубежом нет препарата на основе эмульсии перфторуглерода разрешённого для использования в медицинской практике (на людях). Безусловно, для экспериментов, для накопления экспериментального опыта всё описанное чрезвычайно важно и полезно, эти работы являются бесценным фундаментом для внедрения этих результатов в клиническую практику.

В нашей стране уже разработан и внедрен в клиническую практику (разрешение Фармкомитета 1996г.) препарат «Перфторан» - эмульсионная система на базе смеси двух перфторуглеродов - перфтордекалина и перфтор параметилциклогексилпиперидина. Он используется как кровезаменитель с газотранспортной функцией и зарегистрирован ещё ряд областей его применения в клинической практике [7,9,157-160].

Были сделаны первые эксперименты по изучению возможностей использования препарата Перфторан и ПФУ, входящих в его состав в МРТ-визуализации [161]. Показано, в частности, что с помощью ^{19}F ЯМР спектров от тела животного можно получать данные *in vivo* о скорости выведения различных ПФУ из организма [162]. Мы предполагаем адаптировать данный препарат для целей МРТ диагностики, определив области его возможного применения. Безусловно, перфторуглероды входящие в состав Перфторана не идеальны для использования в МРТ визуализации, поскольку имеют сложные ^{19}F ЯМР спектры и, априори, проигрывают перфтор 15-краун-5-эфиру в соотношении сигнал/шум, но зато имеется полная, проверенная годами использования информация о поведении этих соединений в человеческом организме. Поэтому возможно использование препарата Перфторан и его компонентов в качестве средств доставки и маркировки, а последние достижения в совершенствовании аппаратного комплекса МРТ томографов и методиках получения изображения вселяют оптимизм.

Список литературы

1. Clark L.C. and Gollan F. (1966). Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science*, **152**, 1755-1756.
2. Sloviter H.A. and Kamimoto T. (1967). Erythrocyte substitute for perfusion of brain. *Nature*, **216**, 458-460.
3. Geyer R.P., Monroe R.G. and Taylor K. (1968). Survival of rats totally perfused with a fluorocarbon-detergent preparation. In: J.C. Norman, J. Folkman, W.G. Hardison, L.E. Rudolf, F.J. Veith (eds), *Organ perfusion and preservation*. Appleton-Century-Crofts, New York. pp. 85-96.
4. Riess J.G. and Krafft M.P. (2006). Perfluorocarbon emulsions as in vivo oxygen delivery systems: background and chemistry. Chapter 24 in: R.M. Winslow (ed.) "Blood Substitutes", Elsevier, Acad. Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 259-275.
5. Lowe K.C. (2006). Fluosol: the first commercial injectable perfluorocarbon oxygen carrier. Chapter 25. Ibid, pp. 276-287.
6. Shaw R.F. and Richard T.J. (2006). Rational development of Oxyfluor. Chapter 27. Ibid, pp. 299-311.
7. Moroz V.V., Krylov N.L., Ivanitskiy G.R.; (1995) [Perftoran application in clinical medicine] (in Russian) // *Anesthesiology and Reanimatology* (Moscow). № 6. pp. 12-17.
8. United State Patent No. US 6,562,872, B1, May 13, 2003. Emulsion of perfluoroorganic compounds for medical purposes, a process for the preparation thereof and methods for treating and preventing diseases with the use thereof. Maevsky, E.I., Ivanitsky, G.R., Makarov K.N. et al.
9. Maevsky, E.I., Ivanitsky, H.R., Islamov B.I., Moroz V.V., Bogdanova L.A. Karmen N.B., Pushkin S.Yu., Maslenikov I.A. (2006). Perftoran. Chapter 26 in: R.M. Winslow (ed.) "Blood Substitutes", Elsevier, Acad. Press, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, pp. 288-297
10. Lauterbur, P. C. *Nature* 1973, 242, 190.
11. Holland GN, Bottomley PA, Hinshaw WS. ¹⁹F magnetic resonance imaging. *J. Magn. Reson.* 1977; 28: 133–136.
12. Roman Schwarz, Mace. Schuurmans, Joachim Seelig, and Basil Ku., ¹⁹F-MRI of Perfluorononane as a Novel Contrast Modality for Gastrointestinal Imaging, *Magnetic Resonance in Medicine* 41:80–86 (1999)
13. Mattrey, R. F.; Trambert, M. A.; Brown, J. J.; Young, S. W.; Bruneton, J. N.; Wesbey, G. E.; Balsara, Z. N. *Radiology* 1994, 191, 841.

14. Mattrey, R. F.; Trambert, M. A.; Brown, J. J.; Young, S. W.; Bruneton, J. N.; Wesbey, G. E.; Balsara, Z. N. *Radiology* 1994, 191, 841.
15. Roman Schwarz, Mace. Schuurmans, Joachim Seelig, and Basil Ku., ¹⁹F-MRI of Perfluorononane as a Novel Contrast Modality for Gastrointestinal Imaging, *Magnetic Resonance in Medicine* 41:80–86 (1999).
16. Tobias Hahn, Sebastian Kozerke, Werner Schwizer, Michael Fried, Peter Boesiger, and Andreas Steingoetter; Visualization and Quantification of Intestinal Transit and Motor Function by Real-time Tracking of ¹⁹F Labeled Capsules in Humans; *Magnetic Resonance in Medicine* 66:812–820 (2011)
17. Mikhail V. Gulyaev, Nikolay V. Anisimov, Nadezhda E. Ustyuzhanina, Andrey S. Dmitrenok, Alexander S. Shashkov, Dmitry V. Yashunsky, Lev L. Gervits, Yury A. Pirogov and Nikolay E. Nifantiev*; Sensitivity of magnetic resonance imaging based on the detection of ¹⁹F NMR signals; *Mendeleev Commun.*, 2016, 26, 24–25.
18. Mangala Srinivas , Luis J. Cruz , Fernando Bonetto , Arend Heerschap , Carl G. Figdor , I. Jolanda M. de Vries., Customizable, multi-functional fluorocarbon nanoparticles for quantitative in vivo imaging using ¹⁹F MRI and optical imaging., *Biomaterials* 31 (2010) 7070e7077.
19. Zhao, D., L. Jiang & R. P. Mason: Measuring changes in tumor oxygenation. *Methods Enzymol*, 386, 378-418 (2004)
20. Thomas, S. R. C. L. Partain, R. R. Price, J. A. Patton, M. V. Kulkarni & A. E. J. James. W.B.: The biomedical applications of Fluorine-19 NMR. In: *Magnetic Resonance Imaging*. Eds: Saunders Co., London (1988)
21. Mason, R. P.: Non-invasive physiology: ¹⁹F NMR of perfluorocarbon. *Art. Cells, Blood Sub. & Immob. Biotech.*, 22, 1141-1153 (1994)
22. Vikram D. Kodibagkar¹, Xianghui Wang¹ , Ralph P. Mason¹, Physical principles of quantitative nuclear magnetic resonance oximetry., *Frontiers in Bioscience* 13, 1371-1384, January 1, 2008.
23. Harris, A. L. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Rev. Cancer* 2, 38-47, 2002
24. Bourke VA, Zhao D, Gilio J, Chang CH, Jiang L, Hahn EW, Mason RP (2007) Correlation of radiation response with tumor oxygenation in the dunning prostate R3327-AT1 tumor. *Int J Radiat Oncol. Biol Phys* 67(4):1179–1186
25. Zhao D, Jiang L, Mason RP Measuring changes in tumor oxygenation. *Meth Enzymol* (2004) 386:378–418
26. Yu J-X, Kodibagkar V, Cui W, Mason R (2005) ¹⁹F: a versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance. *Curr Med Chem* 12(7):819–848

27. Fishman JE, Joseph PM, Carvlin MJ, Saadi-Elmandjra M, Mukherji B, Sloviter HA (1989) In vivo measurements of vascular oxygen tension in tumors using MRI of a fluorinated blood substitute. *Invest Radiol* 24(1):65–71
28. Dardzinski B, Sotak C Rapid tissue oxygen tension mapping using ¹⁹F inversion-recovery echo-planar imaging of Perfluoro-15-crown-5-ether. *Magn Reson Med.* (1994) 32(1):88–97.
29. Shukla H, Mason R, Woessner D, Antich P A comparison of three commercial perfluorocarbon emulsions as high-field ¹⁹F NMR probes of oxygen tension and temperature. *J Magn Reson B* (1995) 106(2):131–141.
30. Mason R, Rodbumrung W, Antich P Hexafluorobenzene: a sensitive ¹⁹F NMR indicator of tumor oxygenation. *NMR in Biomed* (1996) 9(3):125–134.
31. Shukla H, Mason R, Bansal N, Antich P Regional myocardial oxygen tension: ¹⁹F MRI of sequestered perfluorocarbon. *Magn Reson Med* (1996) 35:827–833.
32. Le D, Mason R, Hunjan S, Constantinescu A, Barker B, Antich P Regional tumor oxygen dynamics: ¹⁹F PBSR EPI of hexafluorobenzene. *Magn Reson Med* (1997) 15(8):971–981.
33. Hunjan S, Mason R, Constantinescu A, Peschke P, Hahn E, Antich P Regional tumor oximetry: ¹⁹F NMR spectroscopy of hexafluorobenzene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1998) 41(1):161–171.
34. Hunjan S, Zhao D, Constantinescu A, Hahn EW, Antich PP, Mason RP Tumor oximetry: demonstration of an enhanced dynamic mapping procedure using fluorine-19 echo planar magnetic resonance imaging in the Dunning prostate R3327-AT1 rat tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2001) 49(4):1097–1108
35. Fan X, River J, Zamora M, Al-Hallaq H, Karczmar G Effect of carbogen on tumor oxygenation: combined fluorine-19 and proton MRI measurements. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2002) 54(4):1202–1209
36. Noth U, Rodrigues L, Robinson S, Jork A, Zimmermann U, Newell B, Griffiths J In vivo determination of tumor oxygenation during growth and in response to carbogen breathing using ¹⁵C5- loaded alginate capsules as fluorine-19 magnetic resonance imaging oxygen sensors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2004) 60(3):909–919
37. Siyuan Liu, Sameer J. Shah, Lisa J. Wilmes, John Feiner, Vikram D. Kodibagkar, Michael F. Wendland, Ralph P. Mason, Nola Hylton, Harriet W. Hopf, and Mark D. Rollins., Quantitative Tissue Oxygen Measurement in Multiple Organs Using ¹⁹F MRI in a Rat Model , *Magnetic Resonance in Medicine* 66:1722–1730 (2011)

38. Lee H, Price RR, Holburn GE, Partain CL, Adams MD, Cacheris WP (1994) In vivo fluorine-19 MR imaging: relaxation enhancement with Gd-DTPA. *J Magn Reson Imaging* 4(4):609–613
39. Guo Q, Mattrey R, Guclu C, Buxton R, Nalcioğlu O (1994) Monitoring of pO₂ by spin-spin relaxation rate 1/T₂ of ¹⁹F in a rabbit abscess model. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 22(4):1449–1454
40. van der Sanden B, Heerschap A, Simonetti A, Rijken P, Peters H, Stuben G, van der Kogel A Characterization and validation of noninvasive oxygen tension measurements in human glioma xenografts by ¹⁹F-MR relaxometry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (1999) 44(3):649–658
41. Jordan B, Cron G, Gallez B Rapid monitoring of oxygenation by ¹⁹F magnetic resonance imaging: simultaneous comparison with fluorescence quenching. *Magn Reson Med* (2009) 61:634–638
42. McIntyre DJO, McCoy CL, Griffiths JR (1999) Tumour oxygenation measurements by F-19 magnetic resonance imaging of perfluorocarbons. *Curr Sci* 76(6):753–762
43. Thomas SR, Pratt RG, Millard RW, Samarasinghe RC, Shiferaw Y, McGoron AJ, Kim KT In vivo pO₂ imaging in the porcine model with perfluoro carbon F-19 NMR at low field. *Magn Reson Imaging* (1996) 14(1):103–114
44. An oxygen-consuming phantom simulating perfused tissue to explore oxygen dynamics and ¹⁹F MRI oximetry Steven H(ubert) Baete · Jan Vandecasteele · Luc Colman · Wilfried De Neve · Yves De Deene. *Magn Reson Mater Phy* (2010) 23:217–226
45. Siyuan Liu, Sameer J. Shah, Lisa J. Wilmes, John Feiner, Vikram D. Kodibagkar, Michael F. Wendland, Ralph P. Mason, Nola Hylton, Harriet W. Hopf, and Mark D. Rollins., Quantitative Tissue Oxygen Measurement in Multiple Organs Using ¹⁹F MRI in a Rat Model , *Magnetic Resonance in Medicine* 66:1722–1730 (2011)
46. Nkongchu K, Santyr G (2005) An improved 3-D Look-Locker imaging method for T₁ parameter estimation. *Magn Reson Imaging* 23(7):801–807.
47. Nkongchu K, Santyr G (2007) Phase-encoding strategies for optimal spatial resolution and T₁ accuracy in 3D Look-Locker imaging. *Magn Reson Imaging* 25(8):1203–1214
48. Lionel Mignon, Julie Magat, Olivier Schakman, Etienne Marbaix, Bernard Gallez, and Benedicte F. Jordan., Hexafluorobenzene in Comparison with Perfluoro-15-crown-5-ether for Repeated Monitoring of Oxygenation Using ¹⁹F MRI in a Mouse Model., *Magnetic Resonance in Medicine* 69:248–254 (2013).
49. S H Baete, J Vandecasteele¹ and Y De Deene..¹⁹F MRI oximetry: simulation of perfluorocarbon distribution impact., *Phys. Med. Biol.* 56 (2011) 2535–2557.

50. Albert MS, Cates GD, Driehuys B, Happer W, Saam B, Wishnia A. Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized ^{129}Xe . *Nature*. 1994; 370(6486):199–201.
51. Parraga G, Ouriadov A, Evans A, et al. Hyperpolarized ^3He ventilation defects and apparent diffusion coefficients in chronic obstructive pulmonary disease: preliminary results at 3.0 Tesla. *Invest Radiol*. 2007;42(6):384–391.
52. D.O. Kuethe, A. Caprihan, E. Fukushima, R.A. Waggoner, Imaging lungs using inert fluorinated gases, *Magn. Reson. Med*. 39 (1998) 85–88.
53. Kuethe DO, Caprihan A, Gach M, Lowe IJ, Fukushima E. Imaging obstructed ventilation with NMR using inert fluorinated gases. *J. Appl. Physiol*. 2000; 88: 2279–2286.
54. Perez-Sanchez JM, Perez de Alejo R, Rodriguez I, Cortijo M, Peces-Barba G, Ruiz-Cabello J. In vivo diffusion weighted ^{19}F MRI using SF_6 . *Magn. Reson. Med*. 2005; 54: 460–463.
55. Wolf U, Scholz A, Heussel CP, Markstaller K, Schreiber WG. Subsecond fluorine-19 MRI of the lung. *Magn. Reson. Med*. 2006; 55: 948–951.
56. W.G. Schreiber, B. Eberle, S. Laukemper-Ostendorf, K. Markstaller, N. Weiler, A. Scholz, K. Burger, C.P. Heusel, M. Thelen, H.-U. Kauczor, Dynamic ^{19}F -MRI of pulmonary ventilation using sulfur hexafluoride (SF_6) gas, *Magn. Reson. Med*. 45 (2001) 605–613.
57. Adolphi NL, Kuethe DO. Quantitative mapping of ventilation–perfusion ratios in lungs by ^{19}F MR imaging of T1 of inert fluorinated gases. *Magn. Reson. Med*. 2008; 59: 739–746.
58. Scholz AW, Wolf U, Fabel M, Weiler N, Heussel CP, Eberle B, David M, Schreiber WG. Comparison of magnetic resonance imaging of inhaled SF_6 with respiratory gas analysis. *Magn. Reson. Imaging*, 2009; 27: 549–556.
59. Marcus J. Couch, Iain K. Ball, Tao Li, Matthew S. Fox, Alexei V. Ouriadov, Birubi Biman and Mitchell S. Albert, Inert fluorinated gas MRI: a new pulmonary imaging modality, *NMR Biomed*. 2014; 27: 1525–1534.
60. Wolf U, Scholz A, Terekhov M, Muennemann K, Kreitner K, Werner C, Dueber C, Schreiber WG. Fluorine-19 MRI of the lung: first human experiment. In: *Proceedings of the 16th Annual Meeting of ISMRM*, Toronto, Canada, 2008; 3207.
61. Couch MJ, Ball IK, Li T, Fox MS, Littlefield SL, Biman B, Albert MS. Pulmonary ultrashort echo time ^{19}F MR imaging with inhaled fluorinated gas mixtures in healthy volunteers: feasibility. *Radiology* 2013; 269: 903–909.
62. Halaweish AF, Moon RE, Foster WM, Soher BJ, McAdams HP, MacFall JR, Ainslie MD, MacIntyre NR, Charles HC. Perfluoropropane gas as a magnetic resonance lung imaging contrast agent in humans. *Chest* 2013; 144: 1300–1310.

63. Alexei V. Ouriadov, Matthew S. Fox, Marcus J. Couch, Tao Li, Iain K. Ball, and Mitchell S. Albert; In Vivo Regional Ventilation Mapping Using Fluorinated Gas MRI with an X-Centric FGRE Method; *Magnetic Resonance in Medicine* 74:550–557 (2015).
64. Anne M. Neubauer, Shelton D. Caruthers, Franklin D. Hockett, Tillman Cyrus, J. David Robertson, J. Stacy Allen, Todd D. Williams, Ralph W. Fuhrhop, Gregory M. Lanza, and Samuel A. Wickline, Fluorine Cardiovascular Magnetic Resonance Angiography *In Vivo* at 1.5 T with Perfluorocarbon Nanoparticle Contrast Agent. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* (2007) 9, 565–573.
65. 14.Ruud B. van Heeswijk, Yves Pilloud, Ulrich Flo. gel, Ju. rg Schwitter, Matthias Stuber. Fluorine-19 Magnetic Resonance Angiography of the Mouse. *PLoS ONE*, July 2012 | Volume 7 | Issue 7 | e42236.
66. Kabalnov A.S., Makarov K.N., Sherbakova O.V., Solubility of fluorocarbons in water as a key parameter determining fluorocarbon emulsion stability, *J. Fluor.Chem*, 1990, 50, p. 271-284.
67. Hyon Bin Na and Taeghwan Hyeon., Nanostructured T1 MRI contrast agents., *J. Mater. Chem.*, 2009, 19, 6267–6273.
68. Lev L. Gervits, Andrey V. Shibaev, Mikhail V. Gulyaev, Vyacheslav S. Molchanov, Nikolai V. Anisimov, Yury A. Pirogov, Alexei R. Khokhlov, Olga E. Philippova; A Facile Method of Preparation of Polymer-Stabilized Perfluorocarbon Nanoparticles with Enhanced Contrast for Molecular Magnetic Resonance Imaging; *BioNanoSci*, Feb. 2017, DOI 1007/s12668-017-0400-8
69. Sonu Sharma, Umaporn Paiphansirib, Vinzenz Hombach, Volker Mailänder, Oliver Zimmermann, Katharina Landfester, and Volker Rasche., Characterization of MRI contrast agent-loaded polymeric nanocapsules as versatile vehicle for targeted imaging., *Contrast Media Mol. Imaging* 2010, 5 59–69
70. Gerlinde Schmidtke-Schrezenmeier, Markus Urban, Anna Musyanovych, Volker Mailänder, Markus Rojewski, Natalie Fekete, Cedric Menard, Erika Deak, Karin Tarte, Volker Rasche, Katharina Landfester & Hubert Schrezenmeier., Labeling of mesenchymal stromal cells with iron oxide – poly(L -lactide) nanoparticles for magnetic resonance imaging: uptake, persistence, effects on cellular function and magnetic resonance imaging properties., *Cytotherapy*, 2011; 13: 962–975.
71. I. Vernikouskayaa, N. Fekete, M. Bannwarth, A. Erlec, M. Rojewski, K. Landfester, G. Schmidtke-Schrezenmeier, H. Schrezenmeier, and V. Rasche., Iron-loaded PLLA nanoparticles as highly efficient intracellular markers for visualization of mesenchymal stromal cells by MRI., *Contrast Media Mol. Imaging* 2014, 9 109–121.

72. Anne M. Neubauer, Jacob Myerson, Shelton D. Caruthers, Franklin D. Hockett, Patrick M. Winter, Junjie Chen, Patrick J. Gaffney, J. David Robertson, Gregory M. Lanza, and Samuel A. Wickline., Gadolinium-Modulated ¹⁹F Signals From Perfluorocarbon Nanoparticles as a New Strategy for Molecular Imaging., *Magnetic Resonance in Medicine* 60:1066–1072 (2008).
73. Chalmers KH, De Luca E, Hogg NH, Kenwright AM, Kuprov I, Parker D, et al. Design principles and theory of paramagnetic fluorine-labelled lanthanide complexes as probes for (19)F magnetic resonance: a proof-of-concept study. *Chemistry* 2010; 16: 134–148.
74. Anke de Vriesa, Rik Moonena, Muhammed Yildirimb, Sander Langereisb, Rolf Lamerichsb, Jeroen A. Pikkemaatb, Simona Baronc, Enzo Terrenoc, Klaas Nicolaya, Gustav J. Strijkersa and Holger Grull., Relaxometric studies of gadolinium functionalized perfluorocarbon nanoparticles for MR imaging., *Contrast Media Mol. Imaging* 2014, 9 83–91
75. Kejia Caia, Garry E. Kieferb, Shelton D. Caruthersa, Samuel A. Wicklinea, Gregory M. Lanzaa and Patrick M. Winter., Quantification of water exchange kinetics for targeted PARACEST perfluorocarbon nanoparticles., *NMR Biomed.* 2012; 25: 279–285.
76. Yong Taik Lim, Mi Young Cho, Ji-Hyun Kang, Young-Woock Noh, Jee-Hyun Cho, Kwan Soo Hong, Jin Woong Chung, Bong Hyun Chung; Perfluorodecalin/[InGaP/ZnS quantum dots] nanoemulsions as ¹⁹F MR/optical imaging nanoprobe for the labeling of phagocytic and nonphagocytic immune cells; *Biomaterials* 31 (2010) 4964e4971.
77. J. Laudien, D. Naglav, C. Grob-Heitfeld, K. B. Frenz, H. de Groot, C. Mayer, S. Schulz, A. Schnepf, and M. Kirsch; Perfluorodecalin-soluble fluorescent dyes for the monitoring of circulating nanocapsules with intravital fluorescence microscopy; *J Microencapsul*, Early Online: 1–8, DOI: 10.3109/02652048.2014.918668
78. Ahrens ET, Flores R, Xu H, Morel PA. In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23(8):983–987.
79. Matthew S. Fox^{1,2}, Jeffrey M. Gaudet^{1,2} and Paula J. Foster; Fluorine-19 MRI Contrast Agents for Cell Tracking and Lung Imaging; *Magnetic Resonance Insights* 2015;8(S1).
80. Bernd Ebner, Patrick Behm, Christoph Jacoby, Sandra Burghoff, Brent A. French, Jürgen Schrader, Ulrich Flögel, PhD., Early Assessment of Pulmonary Inflammation by ¹⁹F MRI In Vivo., *Circ Cardiovasc Imaging.* 2010;3:202-210.
81. Kadayakkara DK, Ranganathan S, Young WB, Ahrens ET. Assaying macrophage activity in a murine model of inflammatory bowel disease using fluorine-19 MRI. *Lab Invest.* 2012; 92(4):636–645. [PubMed: 22330343].

82. Hertlein T, Sturm V, Kircher S, Basse-L . usebrink T,Haddad D, Ohlsen K, Jakob P. Visualization of abscess formation in a murine thigh infection model of *Staphylococcus aureus* by ¹⁹F magnetic resonance imaging (MRI). *PLoS One* 2011, 6:e18246.
83. Fl ögel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, Schubert R, Schrader J. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 2008, 118:140–148.
84. F. Bönner, M.W. Merx, K. Klingel, P. Begovatz, U. Flögel, M. Sager, S. Temme, C. Jacoby, M. Salehi Ravesh, C. Grapentin, R. Schubert, J. Bunke, M. Roden, M. Kelm, and J. Schrader; Monocyte imaging aftermyocardial infarction with ¹⁹FMRI at 3 T: a pilot study in explanted porcine hearts; Cardiovascular Imaging (2015) 16, 612–620, doi:10.1093/ehjci/jev008
85. Anthony Balducci, Brooke M. Helfer, Eric T. Ahrens, Charles F. O’Hanlon III and Amy K. Wesa , Visualizing arthritic inflammation and therapeutic response by fluorine-19 magnetic resonance imaging (¹⁹F MRI), *Journal of Inflammation* 2012, 9:24.
86. Flögel U, Su S, Kreideweiss I, Ding Z, Galbarz L, Fu J, Jacoby C, Witzke O, Schrader J. Noninvasive detection of graft rejection by in vivo ¹⁹F MRI in the early stage. *Am J Transplant* 2011, 11:235–244. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03372.
87. Hitchens TK, Ye Q, Eytan DF, Janjic JM, Ahrens ET, Ho C. ¹⁹F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo erfluorocarbon labeling of immune cells. *Magn Reson Med* 2011, 65:1144–1153. doi: 10.1002/mrm.22702.
88. Sebastian Temme, Florian Bonner, Ju rgen Schrader and Ulrich Flogel ; ¹⁹F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation; *Nanomed Nanobiotechnol* 2012, 4:329–343. doi: 10.1002/wnan.1163.
89. **Corot C, Robert P, Idée JM, Port M.**, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. **Adv Drug Deliv Rev.** 2006 Dec 1;58(14):1471-504. Epub 2006 Sep 30.
90. Yeh TC, Zhang W, Ildstad ST, Ho C., Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents. Magn Reson Med. 1993 Nov;30(5):617-25.
91. Bulte JW, Arbab AS, Douglas T, Frank JA., Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging. Methods Enzymol. 2004;386:275-99.
92. Mangala Srinivas, Arend Heerschap, Eric T. Ahrens, Carl G. Figdor and I. Jolanda M. de Vries ·¹⁹F MRI for quantitative in vivo cell tracking , *Trends in Biotechnology* 28 (2010) 363–370
93. Janjic, J.M.; Ahrens, E.T. Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking. *Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 492–501.

94. Janjic JM, Kadayakkara DK, Pusateri LK, Ahrens ET. Novel perfluorocarbon nanoemulsion for ¹⁹F cell tracking of two cell populations in vivo. In Proceedings of the 17th Annual Meeting of ISMRM, Honolulu, Hawaii, 2009.
95. Kampf T, Fischer A, Basse-Lusebrink TC, Ladewig G, Breuer F, Stoll G, Jakob PM, Bauer WR. Application of compressed sensing to in vivo 3D ¹⁹F CSI. *J Magn Reson* 2010;207:262–273.
96. Hitchens TK, Ye Q, Eytan DF, Janjic JM, Ahrens ET, Ho C. ¹⁹F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells. *Magn Reson Med* 2011;65:1144–1153.
97. T. Kevin Hitchens, Li Liu, Lesley M. Foley, Virgil Simplaceanu, Eric T. Ahrens, and Chien Ho., Combining Perfluorocarbon and Superparamagnetic Iron-Oxide Cell Labeling for Improved and Expanded Applications of Cellular MRI., *Magnetic Resonance in Medicine* 00:00–00 (2014).
98. Dechao Niu , Xia Wang , Yongsheng Li , * Yuanyi Zheng , Faqi Li , Hangrong Chen , Jinlou Gu , Wenru Zhao , and Jianlin Shi,. Facile Synthesis of Magnetite/Perfluorocarbon Co-Loaded Organic/Inorganic Hybrid Vesicles for Dual-Modality Ultrasound/Magnetic Resonance Imaging and Imaging-Guided High-Intensity Focused Ultrasound Ablation., *Adv. Mater.* 2013, 25, 2686–2692.
99. C. F. van Nostrum , Covalently cross-linked amphiphilic block copolymer micelles *Soft Matter* 2011 , 7 , 3246.
100. Hisashi Matsushita, Shin Mizukami, Fuminori Sugihara, Yosuke Nakanishi, Yoshichika Yoshioka, and Kazuya Kikuchi, Multifunctional Core–Shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 1008 –1011.
101. J. Bauer, M. Zahres, A. Zellermann, M. Kirsch, F. Petrat, H. de Groot and C. Mayer; Perfluorocarbon-filled poly(lactide-co-glycolide) nano- and microcapsules as artificial oxygen carriers for blood substitutes: a physico-chemical assessment; *Journal of Microencapsulation*, 2010; 27(2): 122–132.
102. Odile Diou, Nicolas Tsapis, Celine Giraudeau, Julien Valette, Claire Gueutin, Fanchon Bourasset, Sandrine Zanna, Christine Vauthier, Elias Fattal; Long-circulating perfluorooctyl bromide nanocapsules for tumor imaging by ¹⁹F MRI; *j.biomaterials*.2012.04.037.
103. Hieu Vu-Quang, Mads Sloth Vinding, Thomas Nielsen, Marcus Gorge Ullisch, Niels Christian Nielsen, Jorgen Kjems; Theranostic tumor targeted nanoparticles combining drug delivery with dual near infrared and ¹⁹F magnetic resonance imaging modalities; <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.04.010>.

104. N. Altinbas, C. Fehmer, A. Terheiden, A. Shukla, H. Rehage, C. Mayer; Alkylcyanoacrylate nanocapsules prepared from mini-emulsions: A comparison with the conventional approach; *Journal of Microencapsulation*, August 2006; 23(5): 567–581.
105. Claudia Stephan, Carolin Schlawne, Stefan Grass, Indra N. Waack, Katja B. Ferenz, Michael Bachmann, Sabine Barnert, Rolf Schubert, Martin Bastmeyer, Herbert de Groot, and Christian Mayer; Artificial oxygen carriers based on perfluorodecalin-filled poly(n-butyl-cyanoacrylate) nanocapsules; *J Microencapsul*, 2014; 31(3): 284–292.
106. Julia Laudien, Christoph Gro.-Heitfeld, Christian Mayer, Herbert de Groot, Michael Kirsch, and Katja B. Ferenz; Perfluorodecalin-Filled Poly(n-butyl-cyanoacrylate) Nanocapsules as Potential Artificial Oxygen Carriers: Preclinical Safety and Biocompatibility ; *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015, Vol. 15, No. 8.
107. J. Laudien, D. Naglav, C. Grob-Heitfeld, K. B. Ferenz, H. de Groot, C. Mayer, S. Schulz, A. Schnepf, and M. Kirsch; Perfluorodecalin-soluble fluorescent dyes for the monitoring of circulating nanocapsules with intravital fluorescence microscopy; *J Microencapsul*, Early Online: 1–8, DOI: 10.3109/02652048.2014.918668.
108. Peters D, Kastantin M, Kotamraju VR, Karmali PP, Gujraty K, Tirrell M, Ruoslahti E. Winter PM, Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM., Molecular Targeting atherosclerosis by using modular, multifunctional micelles. *Proc Nat Acad Sci* 2009; 106: 9815–9. 17 .
109. Winter PM, Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM. Molecular imaging by MRI. *Curr Cardiol Rep* 2006; 8: 65–9.
110. Wickline SA, Mason RP, Caruthers SD, Chen J, Winter PM, Hughes MS, Lanza GM. Weissleder R, Ross BD, Gambhir SS, Shelton, CT: Fluorocarbon agents for multimodal molecular imaging and targeted therapeutics. In: eds. *Molecular Imaging: Principles and Practice*. Peoples Medical Publishing House, 2010: 542–73.
111. J. Myerson, L. He, G. Lanza, D. Tollefsen and S. Wickline., Thrombin-inhibiting perfluorocarbon nanoparticles provide a novel strategy for the treatment and magnetic resonance imaging of acute thrombosis., *J Thromb Haemost* 2011; 9: 1292–300.
112. Mangala Srinivas a*, Philipp Boehm-Sturm b, Carl G. Figdor a, I. Jolanda de Vries a, Mathias Hoehn., Labeling cells for in vivo tracking using 19F MRI *Biomaterials*. 2012.08.048.
113. Boehm-Sturm P, Mengler L, Wecker S, Hoehn M, Kallur T. In vivo tracking of human neural stem cells with 19F magnetic resonance imaging. *PLoS One* 2011;6(12):e29040.
114. Waiczies H, Lepore S, Janitzek N, Hagen U, Seifert F, Ittermann B, et al. Perfluorocarbon particle size influences magnetic resonance signal and immunological properties of dendritic cells. *PLoS One* 2011;6(7):e21981.

115. Bible E, Dell'acqua F, Solanky B, Balducci A, Crapo PM, Badylak SF, et al. Noninvasive imaging of transplanted human neural stem cells and ECM scaffold remodeling in the stroke-damaged rat brain by (19)F- and diffusion-MRI. *Biomaterials* 2012;33(10):2858e71.
116. Kadayakkara DK, Janjic JM, Pusateri LK, Young WB, Ahrens ET. In vivo observation of intracellular oximetry in perfluorocarbon-labeled glioma cells and chemotherapeutic response in the CNS using fluorine-19 MRI. *Magn Reson Med* 2010;64(5):1252e9.
117. Malaisse WJ, Zhang Y, Louchami K, Sharma S, Dresselaers T, Himmelreich U, et al. (19)F-heptuloses as tools for the non-invasive imaging of GLUT2-expressing cells. *Arch Biochem Biophys* 2012;517(2):138e43.
118. Lim YT, Cho MY, Kang JH, Noh YW, Cho JH, Hong KS, et al. Perfluorodecalin/[InGaP/ZnS quantum dots] nanoemulsions as 19F MR/optical imaging nanoprobe for the labeling of phagocytic and nonphagocytic immune cells. *Biomaterials* 2010;31(18):4964e71.
119. Zhou ZX, Zhang BG, Zhang H, Huang XZ, Hu YL, Sun L, et al. Drug packaging and delivery using perfluorocarbon nanoparticles for targeted inhibition of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(11):1577e84.
120. Barnett BP, Ruiz-Cabello J, Hota P, Ouwerkerk R, Shamblott MJ, Lauzon C, et al. Use of perfluorocarbon nanoparticles for non-invasive multimodal cell tracking of human pancreatic islets. *Contrast Media Mol Imaging* 2011;6(4):251e9.
121. Bartusik D, Tomanek B. Detection of fluorine labeled herceptin using cellular (19)F MRI ex vivo. *J Pharm Biomed Anal* 2010;51(4):894e900.
122. Bartusik D, Tomanek B. Application of 19F magnetic resonance to study the efficacy of fluorine labeled drugs in the three-dimensional cultured breast cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 2010;493(2):234e41.
123. Ahrens ET, Young WB, Xu H, Pusateri LK. Rapid quantification of inflammation in tissue samples using perfluorocarbon emulsion and fluorine-19 nuclear magnetic resonance. *Biotechniques* 2011;50(4):229e34.
124. Kadayakkara DK, Ranganathan S, Young WB, Ahrens ET. Assaying macrophage activity in a murine model of inflammatory bowel disease using fluorine-19 MRI. *Lab Invest* 2012;92(4):636e45.
125. Philipp Boehm-Sturm , Markus Aswendt , Anuka Minassian , Stefanie Michalk , Luam Mengler , Joanna Adamczak , Laura Mezzanotte, Clemens Lowik, Mathias Hoehn., A multi-modality platform to image stem cell graft survival in the naive and stroke-damaged mouse brain., *Biomaterials*.2013.11.085.

126. Jelena M. Janjic, Mangala Srinivas, Deepak K. K. Kadayakkara, and Eric T. Ahrens, Self-delivering Nanoemulsions for Dual Fluorine-19 MRI and Fluorescence Detection, *J. AM. CHEM. SOC.* 2008, 130, 2832-2841.
127. Sravan K. Patel 1, Jonathan Williams 2 and Jelena M. Janjic., Cell Labeling for 19F MRI: New and Improved Approach to Perfluorocarbon Nanoemulsion Design *Biosensors* 2013, 3, 341-359.
128. Ilaria Tirotta, Alfonso Mastropietro, Chiara Cordiglieri, Lara Gazzera, Fulvio Baggi, Giuseppe Baselli, Maria Grazia Bruzzone, Ileana Zucca, Gabriella Cavallo, Giancarlo Terraneo, Francesca Baldelli Bombelli, Pierangelo Metrangolo, and Giuseppe Resnati, A Superfluorinated Molecular Probe for Highly Sensitive in Vivo 19F-MRI, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136 (24), pp 8524–8527.
129. H. Peng, I. Blakey, B. Dargaville, F. Rasoul, S. Rose and A. K. Whittaker, Synthesis and Evaluation of Partly Fluorinated Block Copolymers as MRI Imaging Agents, *Biomacromolecules*, 2009, 10, 374–381.
130. W. Du, A. M. Nystrom, L. Zhang, K. T. Powell, Y. Li, C. Cheng, S. A. Wickline and K. L. Wooley, Amphiphilic Hyperbranched Fluoropolymers as Nanoscopic 19F Magnetic Resonance Imaging Agent Assemblies, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 2826–2833.
131. Sarah Decato, Troy Bemis, Eric Madsen and Sandro Mecozz, Synthesis and characterization of per fluoro-tert-butyl semifluorinated amphiphilic polymers and their potential application in hydrophobic drug delivery. The Royal Society of Chemistry, *Polym.Chem.*, 2014,5, 6461–6471.
132. Z.-X. Jiang, X. Liu, E.-K. Jeong and Y. B. Yu, Symmetry-Guided Design and Fluorous Synthesis of a Stable and Rapidly Excreted Imaging Tracer for 19F MRI *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, 48, 4755–4758.
133. Jiang Z-X, Feng Y, Yu YB. Fluorinated paramagnetic chelates as potential multi-chromic 19F tracer agents. *Chem Commun* 2011, 47:7233–7235.
134. Criscione, J. M.; Le, B. L.; Stern, E.; Brennan, M.; Rahner, C.; Papademetris, X.; Fahmy, T. M. *Biomaterials* 2009, 30, 3946.
135. Ogawa, M.; Nitahara, S.; Aoki, H.; Ito, S.; Narazaki, M.; Matsuda, T. *Macromol. Chem. Phys.* 2010, 211, 1369.
136. Ogawa, M.; Nitahara, S.; Aoki, H.; Ito, S.; Narazaki, M.; Matsuda, T. *Macromol. Chem. Phys.* 2010, 211, 1602. Boas, U.; Heegaard, P. M. H. *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 43.
137. (Yu, J.-X.; Hallac, R. R.; Chiguru, S.; Mason, R. P., New frontiers and developing applications in 19F NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2013, 70, 25.).

138. Jia Zhong, Parker H. Mills, T. Kevin Hitchens, and Eric T. Ahrens., Accelerated Fluorine-19 MRI Cell Tracking Using Compressed Sensing., *Magnetic Resonance in Medicine* 69:1683–1690 (2013).
139. Matthew J. Goette, Jochen Keupp, Jürgen Rahmer, Gregory M. Lanza, Samuel A. Wickline, and Shelton D. Caruthers, Balanced UTE-SSFP for 19F MR Imaging of Complex Spectra, *Magnetic Resonance in Medicine* 00:00–00 (2014).
140. Celsense, First Clinical Results Using the Cell Sense Product Published in *Journal Magnetic Resonance in Medicine*, September 19, 2014 - Pittsburgh, Pennsylvania.
141. Ann-Marie Chacko, Elizabeth D. Hood, Blaine J. Zern, Vladimir R. Muzykantov Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation ., *J.COCIS*.2011.01.008
142. Eric T. Ahrens and Jeff W. M. Bulte., Tracking immune cells *in vivo* using magnetic resonance imaging ., *Nat Rev Immunol*. 2013 October ; 13(10).
143. PatrickM.Winter., Perfluorocarbon Nanoparticles: Evolution of a Multimodality and Multifunctional Imaging Agent., Hindawi Publishing Corporation Scientifica Volume 2014, Article ID 746574, 10 pages.
144. Megan M. Kaneda, Shelton Caruthers, Gregory M. Lanza, and Samuel A. Wickline., Perfluorocarbon Nanoemulsions for Quantitative Molecular Imaging and Targeted Therapeutics., *Ann Biomed Eng*. 2009 October ; 37(10): 1922–1933.
145. Jaehong Key, James F Leary., Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine., *International Journal of Nanomedicine* 2014;9 711–726.
146. Dipanjan Pana, Gregory M. Lanzaa, Samuel A. Wicklinea, Shelton D. Caruthers., Nanomedicine: Perspective and promises with ligand-directed molecular imaging., *European Journal of Radiology* 70 (2009) 274–285
147. S.D. Caruthers, P.M Winter, S.A. Wickline, G.M. Lanza, MR molecular imaging of angiogenesis using targeted perfluorocarbon nanoparticles., *Medicamundi*. 2010 ; 54(2): 5–13.
148. L. Curvo-Semedo and F. Caseiro-Alves, MR contrast agents., *Clinical MRI of the Abdomen*, p17-39, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
149. Mangala Srinivas a, Philipp Boehm-Sturm , Carl G. Figdor , I. Jolanda de Vries , Mathias Hoehn., Labeling cells for in vivo tracking using 19F MRI., *J.BIOMATERIALS*, 2012.08.048.
150. Mangala Srinivas, Arend Heerschap, Eric T. Ahrens, Carl G. Figdor and I. Jolanda M. de Vries., 19F MRI for quantitative in vivo cell tracking., *Trends in Biotechnology* 28 (2010) 363–370.

151. Antti Saraste, MD, PhD, Stephan G. Nekolla, PhD, Markus Schwaiger, MD., Cardiovascular molecular imaging: an overview., Cardiovascular Research Advance Access published June 24, 2009.
152. Jian-Xin Yu, Rami R. Hallac, Srinivas Chiguru, Ralph P. Mason, ; New frontiers and developing applications in ^{19}F NMR, Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 70 (2013) 25–49.
153. Eric T. Ahrens and Jia Zhong, In vivo MRI cell tracking using perfluorocarbon probes and fluorine-19 detection, NMR Biomed. 2013; 26: 860–871.
154. Jesu' s Ruiz-Cabello, Brad P. Barnett, Paul A. Bottomley and Jeff W.M. Bulte, Fluorine (^{19}F) MRS and MRI in biomedicine, NMR Biomed. 2011; 24: 114–129.
155. James C. Knight, Peter G. Edwards and Stephen J. Paisey, Fluorinated contrast agents for magnetic resonance imaging; a review of recent developments, RSC Adv., 2011, 1, 1415–1425.
156. Ilaria Tirotta, Valentina Dichiarante, Claudia Pigliacelli, Gabriella Cavallo, Giancarlo Terraneo, Francesca Baldelli Bombelli, Pierangelo Metrangolo, and Giuseppe Resnati , ^{19}F Magnetic Resonance Imaging (MRI): From Design of Materials to Clinical Applications, Chem. Rev. 2015, 115, 106–1129.
157. E. Maevsky, G.Ivanitsky Oxygen-Dependent and Oxygen-Independent Effects of Perftoran // Artificial Oxygen Carrier. Its Frontline. Eds: Kobayashi, K., Tsuchida, E., Horinouchi Hirohisa. Keio University Int. Symp.Life Sciences & Medicine . Tokyo. Springer, 2005.vol.12: 221-228.
158. E Maevsky, G Ivanitsky, L Bogdanova, O Axenova, N Karmen, E Zhiburt, ... Clinical results of Perftoran application: present and future Artificial cells, blood substitutes, and biotechnology. 2005. 33 (1): 37-46.
159. В.В. Мороз, Е.И. Маевский, Г.Р. Иваницкий, Н.Б. Кармен, Л.А. Богданова и др. Эмульсия перфторорганических соединений как средство для лечения нарушений регионального кровотока // Общая реаниматология 2007 3 (3): 49-53.
160. E.I. Maevsky, L.L. Gervits Perfluorocarbon-based blood substitute-PERFTORAN: Russian Experience //Chimica oggi. 2008 26 (3): 34-37.
161. М. В. Гуляев , Л. Л. Гервиц , Ю. А. Устынюк , Н. В. Анисимов , Ю. А. Пирогов , А. Р. Хохлов, Получение изображений в магнитно-резонансной томографии на ядрах ^{19}F с помощью препарата перфторан, Журнал радиоэлектроники, п8, 2013, 1-13.
162. Н.В.Анисимов, Л.Л.Гервиц, М.В.Гуляев, Д.Н.Силачев, Д.В.Волков, О.С.Павлова, Г.М. Юсубалиева, Е.А.Шаламова, Ю.А.Пирогов, А.Р.Хохлов, Методы ^{19}F ЯМР и МРТ в изучении поведения препарата Перфторан® в организме лабораторных животных, “Электромагнитные волны и электронные системы”, 2015 г., т. 20, № 8.

Работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки РФ № 14.604.21.0060 (RFMEFI60414X0060).