

УДК 616-073: 537.63:544.722:615.45:577.112.824

DOI: 10.15372/KhUR20160501

## Визуализирующие системы на основе человеческого сывороточного альбумина для МРТ-диагностики патологических процессов

А. С. ЧУБАРОВ<sup>1</sup>, В. Н. СИЛЬНИКОВ<sup>1</sup>, S. AHMAD<sup>2</sup>, Т. С. ГОДОВИКОВА<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия<sup>2</sup>Integral University,  
Uttar Pradesh, India

E-mail: silnik@niboch.nsc.ru

(Поступила 20.04.16; после доработки 07.06.16)

### Аннотация

Магнитно-резонансная томография (МРТ) – один из самых мощных неинвазивных методов исследования органов и тканей, который широко используется в современной клинической медицине. Для достижения лучшей визуализации патологического очага применяются контрастирующие/контрастные агенты, а в случае <sup>1</sup>H МРТ – вещества, которые повышают скорость релаксации протонов воды в окружающих тканях и за счет этого увеличивают контраст изображения. В обзоре рассмотрены различные способы улучшения свойств современных контрастирующих/контрастных агентов: от ковалентного/нековалентного связывания хелатных комплексов парамагнитных ионов металла с человеческим сывороточным альбумином (HSA) до разработки на основе HSA мультифункциональных наноконструкций для исследования патологических процессов методом МРТ, как на ядрах <sup>1</sup>H, так и на ядрах <sup>19</sup>F. Основное внимание уделено оценке и систематизации известных результатов в области разработки визуализирующих систем для детекции злокачественных опухолей.

Анализ публикаций, посвященных проблемам создания аффинных хелатных комплексов парамагнитных ионов металла с высоким сродством к определенному сайту на альбумине, указывает на активный и растущий интерес к этой области химии. Накопление знаний о молекулярной структуре альбумина и его комплексах с лекарственными препаратами и эндогенными лигандами в совокупности с развитием биоинформатики создает предпосылки для разработки аффинных контрастирующих/контрастных агентов с оптимальными параметрами высокоизбирательного связывания с белком.

На основе критического анализа сделаны обобщенные выводы о ключевых параметрах визуализирующих систем на основе альбумина, которые определяют информативность исследования зоны поражения методами <sup>1</sup>H/<sup>19</sup>F МРТ. Благодаря связыванию контрастирующих/контрастных агентов с альбумином повышается релаксирующая способность препарата, увеличиваются время его циркуляции в крови и повышается эффективность накопления в опухоли. Это способствует усилению контраста на МР-изображении между здоровой и патологической тканью, повышает точность диагноза и, как следствие, эффективность терапии.

**Ключевые слова:** магнитно-резонансная томография, контрастирующие и контрастные вещества, хелатные комплексы, визуализирующие системы, диагностика патологических процессов, человеческий сывороточный альбумин, функционализация белка, молекулярные зонды

### ВВЕДЕНИЕ

Магнитно-резонансная томография (МРТ) – широко востребованный сегодня метод медицинской диагностики благодаря безопасности

и высокой информативности исследования. Наибольшее распространение в медицинской диагностике получил метод МРТ на ядрах <sup>1</sup>H. Это связано с тем, что протон, основной изотоп атома водорода (<sup>1</sup>H), характеризуется

практически максимальным гиромангнитным отношением  $\gamma$ , что обуславливает сильный сигнал ЯМР, а также его значительным содержанием в биологических тканях. Снимки, полученные с помощью  $^1\text{H}$  МРТ-диагностики, в сочетании с современной компьютерной техникой позволяют построить точную трехмерную модель органа, увидеть его в разрезе и тем самым обеспечить лечащего врача всеми необходимыми сведениями о состоянии организма пациента. Контрастность патологического очага по отношению к окружающим тканям зависит как от собственных свойств ткани, так и от способа получения изображения на томограммах. МРТ-изображение, получаемое на томограммах, строится на основе магнитных характеристик тканей, главные из которых: плотность спинов протонов ( $\rho$ ), магнитная восприимчивость, продольное время релаксации  $T_1$  (спин-решеточная релаксация) и поперечное время релаксации  $T_2$  (спин-спиновая релаксация). Времена релаксации протонов в системе можно уменьшить за счет источников, обладающих магнитным моментом (спином) и создающих локальные магнитные поля, – контрастирующих/контрастных агентов. Степень влияния контрастирующего/контрастного агента на время релаксации протонов может быть охарактеризована параметром релаксивности. Релаксивность ( $r_1$  и  $r_2$ ) – это вклад контрастирующего/контрастного агента в скорость релаксации протонов воды в исследуемом растворе при концентрации 1 ммоль/л.

Контрастирующие агенты можно разделить на два класса:  $T_1$ -контрастирующие агенты (укорачивают спин-решеточное время релаксации  $T_1$ ) и  $T_2$ -контрастирующие агенты (укорачивают спин-спиновое время релаксации  $T_2$ ).  $T_1$ -агенты называют еще позитивными контрастирующими агентами, потому что доминирующий  $T_1$ -снижающий эффект приводит к увеличению интенсивности сигнала в ткани.  $T_2$ -контрастирующие агенты – отрицательные контрастирующие агенты – в значительной степени избирательно увеличивают  $1/T_2$  ткани, что приводит к снижению интенсивности сигнала. В качестве контрастирующих агентов обычно применяются вещества, содержащие парамагнитные ионы металлов с магнитным моментом (спином):  $\text{Gd}^{3+}$ ,

$\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ . Парамагнитные контрастирующие агенты на основе гадолиния (III) [1, 2] и марганца [2, 3] – это примеры  $T_1$ -агентов, в то время как магнитные наночастицы железа [2, 4], как правило, выступают в качестве  $T_2$ -контрастирующих агентов.

Контрастирующий эффект препаратов значительно улучшает диагностику заболеваний. Так, например, введение контрастирующих препаратов пациентам с онкологическими заболеваниями позволило выявить метастазирование опухоли в головной мозг, не обнаруженное другими методами исследования [5]. Благодаря контраст-усиленной МРТ впервые была показана множественность поражения головного мозга у пациентов с рассеянным склерозом [6]. Однако при очевидных достижениях высокие дозы препаратов и неспецифическое распределение оставляют открытым вопрос разработки более эффективных контрастирующих агентов. Также практически важно отметить, что рыночная стоимость (цена) парамагнитных комплексных контрастных препаратов для МРТ на основе гадолиния достигает 100 долл. США за флакон объемом 20 мл. При этом необходимая доза для однократного исследования функции печени с использованием препарата Eovist составляет не менее 0.1 мл/кг. Учитывая средний ежемесячный доход на душу населения в России, очевидно, что использование контрастных препаратов в МРТ в рутинной практике проблематично. Повышение экономической доступности препаратов с одновременным улучшением качества контрастных средств может эффективно расширить их применение.

Известны различные подходы к улучшению свойств контрастирующих веществ: от конъюгации хелатных комплексов парамагнитных ионов металлов с макромолекулами или наночастицами до использования мультифункциональных систем для визуализации различными методами (ПЭТ/МРТ [7], МРТ/флуоресцентная визуализация [7]). Для создания макромолекулярных систем, содержащих контрастирующие агенты, хелатные комплексы парамагнитных ионов могут быть нековалентно включены в структуру носителя (например, белка) или ковалентно присоединены к нему.

Известная структура человеческого сывороточного альбумина (HSA) и возможность

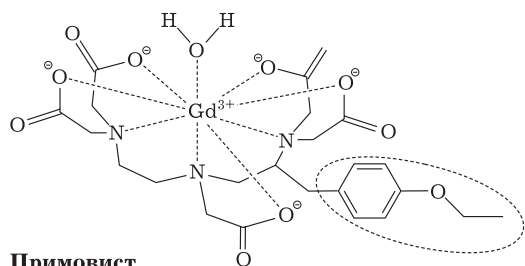
получения рекомбинантного белка делают его привлекательным кандидатом для использования в качестве биосовместимого макромолекулярного белка-носителя в дизайне контрастирующих агентов. Роль альбумина в разработке препаратов медицинского назначения с каждым годом становится существеннее [8–10]. Патентные поиски выявляют примерно 20 исследовательских и медицинских центров и компаний, разрабатывающих наноконструкции на основе сывороточного альбумина для терапии и диагностики злокачественных опухолей и ряда других приложений. На данный момент ими оформлено большое количество патентов на способы получения и применения терапевтических препаратов и диагностических систем, содержащих альбумин. Некоторые наноконструкции на основе HSA окончательно утвердились в качестве медицинских препаратов, успешных как в клиническом, так и в коммерческом плане. Альбумин – стабильный белок, который может храниться в виде 5–20 % растворов на протяжении ряда лет, очень устойчив в широком диапазоне значений pH, температур и в разных растворителях. За его накопление в солидных опухолях отвечает несколько факторов, причем некоторые из них свойственны только альбумину: а) проявление EPR-эффекта (Enhanced Permeability and Retention, повышение проникновения и сохранения), т. е. способность альбумина накапливаться в злокачественных тканях путем пассивного транспорта [11]; б) аккумуляция альбумина в составе наночастиц в опухолевых клетках, обусловленная трансцитозом в интерстициальное пространство опухоли, который инициируется связыванием альбумина с албондином (гликопротеин с молекулярной массой 60 кДа, рецептор gp60) и последующим взаимодействием с другим вектором – рецептором SPARC (Secreted Protein Acid and Rich in Cysteine, кислый секретлируемый белок, богатый цистеином [12]); в) проникновение альбумина внутрь клеток и обеспечение пула аминокислот для поддержания пролиферации опухолевых клеток благодаря макропиноцитозу – процессу захвата клеткой относительно “больших” объемов жидкости [13]. В совокупности эти факторы способствуют более мощному локальному накоплению ви-

зуализирующей конструкции на основе альбумина, что компенсирует потерю интенсивности сигнала, вызванную увеличением ширины спектральной линии при присоединении низкомолекулярного контрастирующего агента к белку. Кроме того, природный стерический барьер затрудняет удаление альбумина в водных средах ретикулоэндотелиальной системой *in vivo*, тем самым увеличивая время циркуляции альбуминосодержащих молекулярных зондов в кровотоке без нежелательных печеночно-специфических аккумуляций [14, 15].

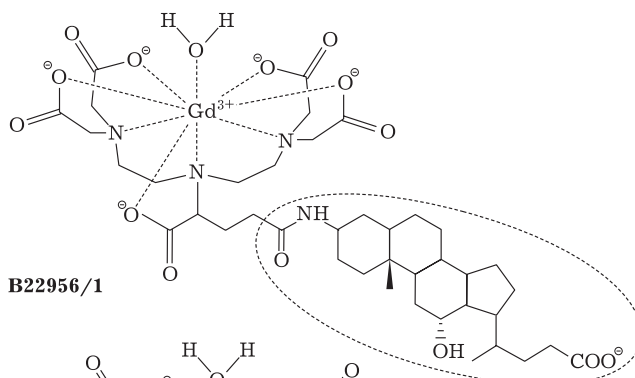
Настоящий обзор посвящен оценке и систематизации известных результатов в области разработки визуализирующих систем на основе HSA для диагностики патологических процессов методом МРТ, как на ядрах  $^1\text{H}$ , так и на ядрах  $^{19}\text{F}$ . Наибольшее внимание уделено проблемам разработки визуализирующих систем для детекции злокачественных опухолей. Наряду с опубликованными данными представлены также оригинальные результаты авторов по разработке молекулярных зондов на основе HSA, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ).

#### **ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИЕ ХЕЛАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ИОНОВ ПАРАМАГНИТНЫХ МЕТАЛЛОВ**

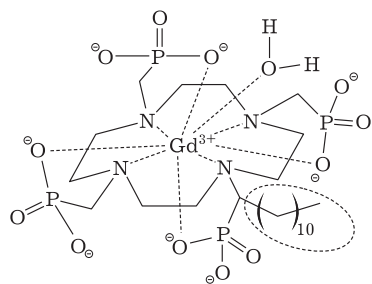
В последние десятилетия за счет разработки различных протоколов и отбора оптимальных параметров сканирования [16], а также использования комбинированных техник исследования [17, 18] значительно улучшилось качество визуализации патологических тканей методом МРТ. Этому также способствовало создание на основе альбумина макромолекулярных визуализирующих систем, содержащих хелатные комплексы парамагнитных ионов металлов [19–21]. В настоящее время разработано множество хелатных комплексов гадолиния (III) [2, 21–51], марганца [2, 52, 53] и ванадия [54] с заместителями, способными к сильному нековалентным взаимодействиям с сывороточным альбумином (рис. 1). Три хелатных комплекса  $\text{Gd}^{3+}$  – коммерчески доступные контрастирующие вещества: Вазовист (Gadofosveset, Eovist; MS-325, фирма Beyer Schering, Германия), Мультиханс (Gadobenate dimeglumine, фирма Вассо



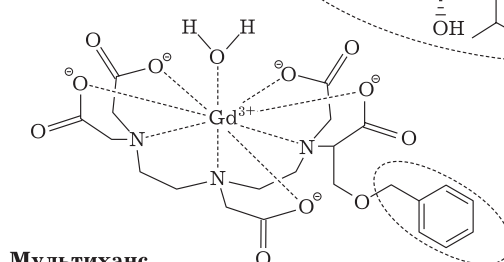
**Примовист**  
(Primovist, Eovist, Gadovetic, Gd-S-EOB-DTPA)



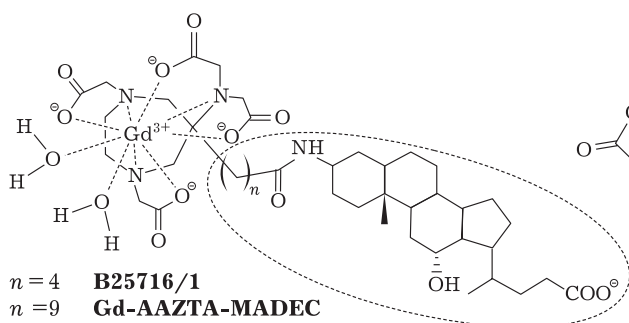
**B22956/1**



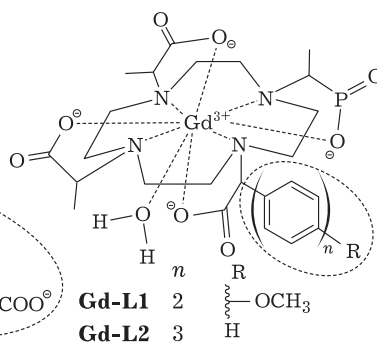
**Gd-C<sub>11</sub>-DOTP**



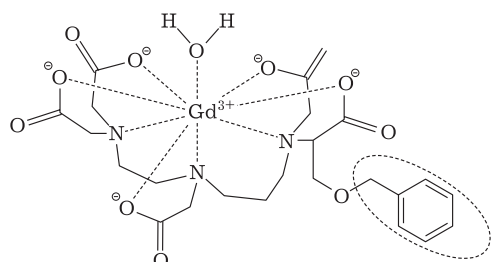
**Мультиханс**  
(Multihance, Gadobenate dimeglumine, Gd-BOPTA)



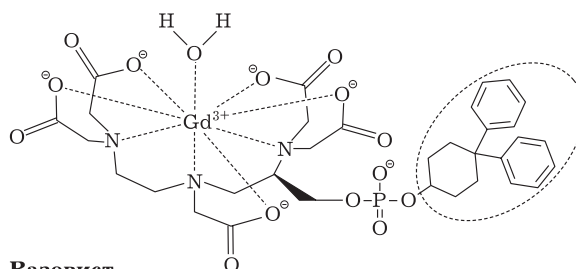
$n = 4$  **B25716/1**  
 $n = 9$  **Gd-AAZTA-MADEC**



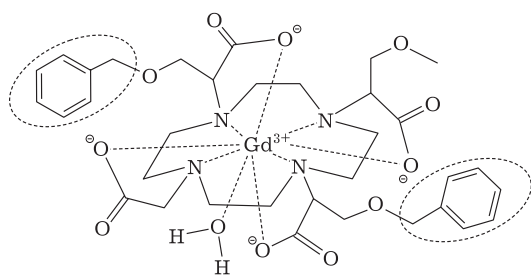
**Gd-L1** 2  $\text{R} = \text{OCH}_3$   
**Gd-L2** 3  $\text{R} = \text{H}$



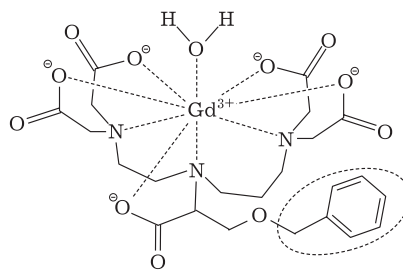
**Gd-TTDA-BOM**



**Вазовист**  
(Vasovist, Gadofosveset, MS-325)



**Gd-DOTA-(BOM)<sub>3</sub>**



**Gd-5 (аналог MS-325)**

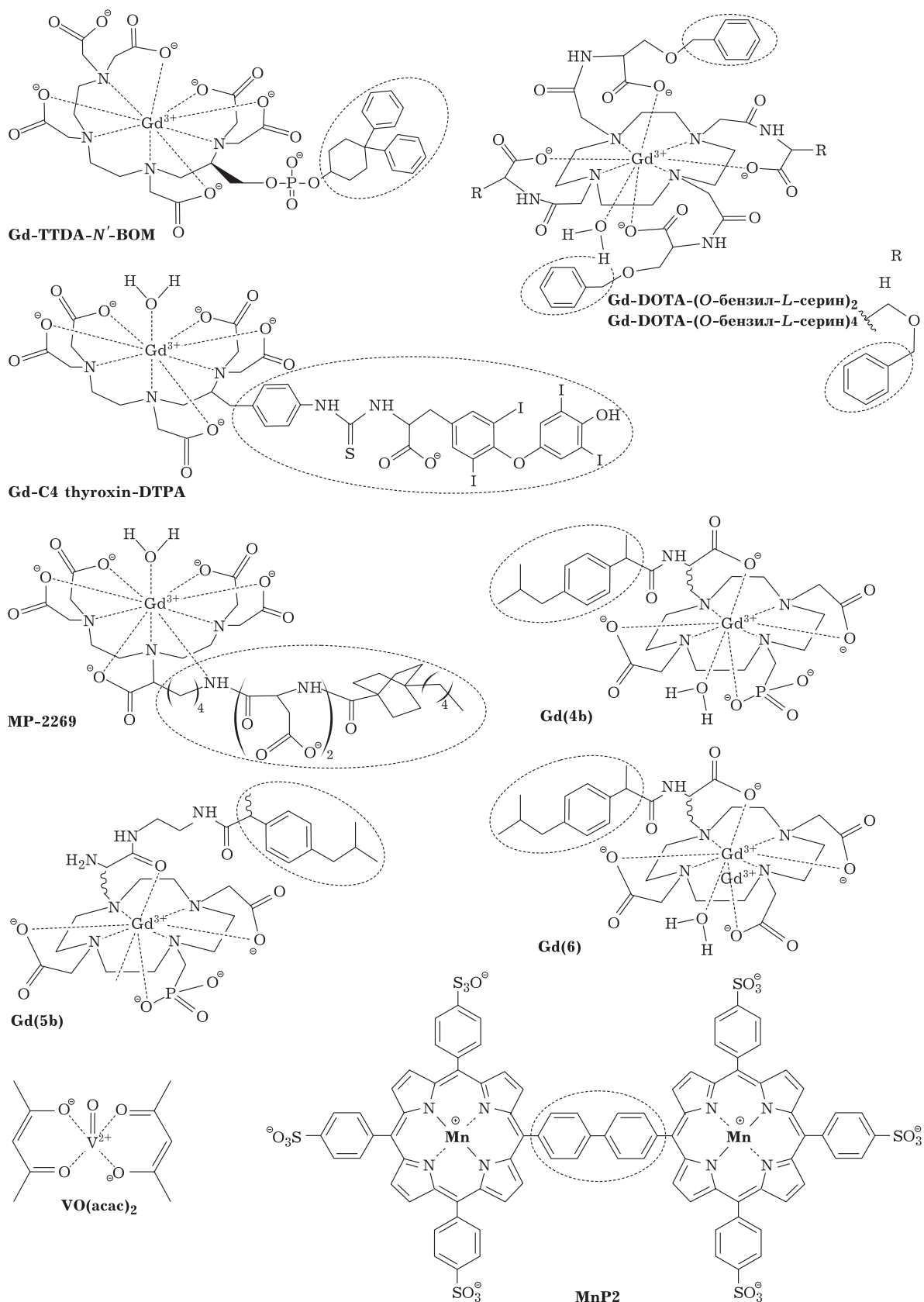


Рис. 1. Хелатные комплексы с ионами парамагнитных металлов, способные нековалентно связываться альбумином. Пунктирным овалом выделены остатки, за счет которых предположительно осуществляется связывание контрастирующего препарата с белком.

Imaging, Италия) и Примовист (Gadoxetic, фирма Bayer Pharmaceuticals, Германия) (см. рис. 1). Контрастирующие агенты на основе гадолиния (III) оказывают одинаковое влияние на времена релаксации  $T_1$  и  $T_2$ , но для тканей величина  $T_1$  гораздо больше по сравнению с  $T_2$ , поэтому при низких дозах агента преобладает эффект уменьшения параметра  $T_1$  протонов. Таким образом, ткани, накапливающие контрастирующие агенты на основе гадолиния (III), становятся яркими на  $T_1$ -взвешенных томограммах.

Способность альбумина связывать вещества различного размера и химической природы реализуется благодаря конформационной лабильности молекулы белка, которая обеспечивает наличие множественных сайтов связывания лигандов, каждый из которых имеет свою специфику. Полагают [22, 24, 28, 31, 48, 50], что определенную селективность связывания контрастирующих агентов с белком обеспечивают гидрофобные остатки, присутствующие в структурах контрастирующих препаратов (см. рис. 1).

Основные сайты связывания хелатных комплексов гадолиния (III) в структуре HSA,

предположительно, находятся в субдоменах ПА и ПИА (рис. 2). Их принято называть сайт I (Sudlow's site I) и сайт II (Sudlow's site II) соответственно [55]. Сайт I представляет собой "карман", внутренняя стенка которого образована гидрофобными аминокислотными остатками, а доступный для молекул растворителя вход окружен положительно заряженными боковыми радикалами основных аминокислот [56]. Сайт II – это гидрофобный карман размером  $8 \times 16 \text{ \AA}$  [57] (по другим оценкам,  $8 \times (21-25) \text{ \AA}$  [58]), содержащий кластер из остатков полярных аминокислот, расположенных вблизи "входа" в карман [56]. Этот сайт чувствителен к введению даже небольших заместителей в структуру лиганда.

Интерес к разработке хелатных комплексов  $\text{Gd}^{3+}$ , обладающих повышенным сродством к HSA, обусловлен, во-первых, тем, что контрастирующие препараты, как правило, вводят внутривенно, поэтому HSA как мажорный белок крови может влиять на их фармакокинетические и фармакодинамические свойства. Благодаря связыванию хелатных комплексов  $\text{Gd}^{3+}$  альбумином, время их жизни в крови, а следовательно, и внутрисосу-

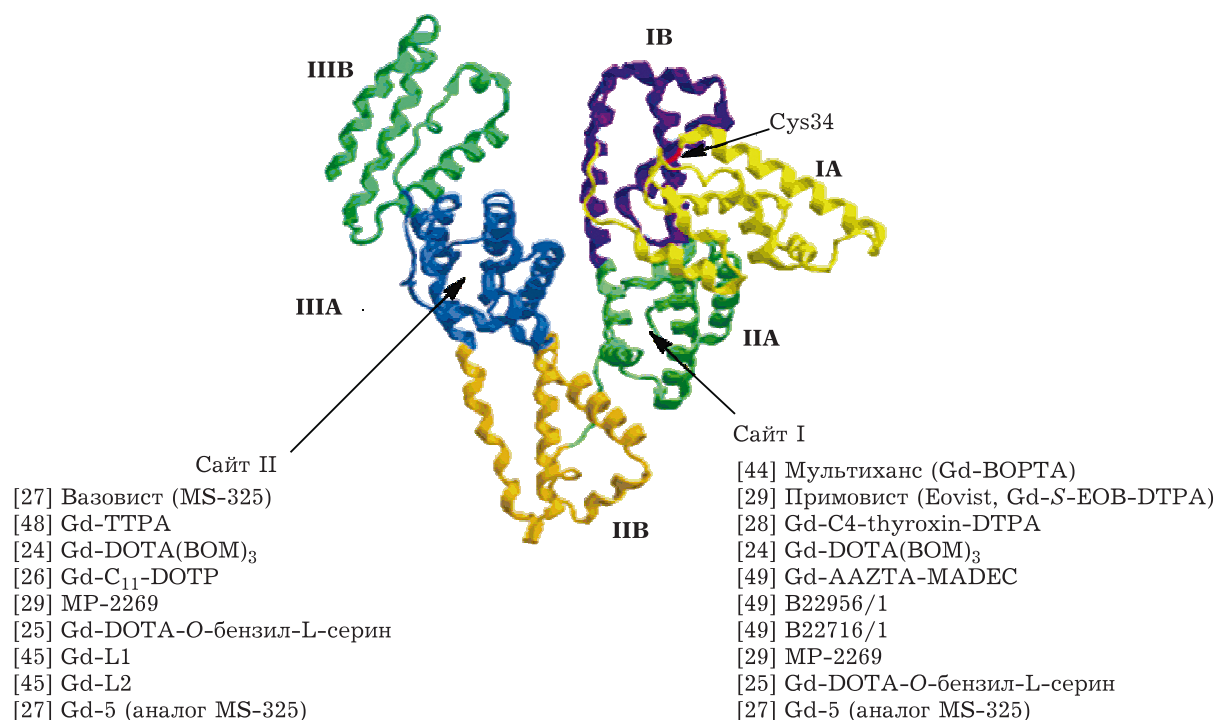


Рис. 2. Структура человеческого сывороточного альбумина (HSA), полученная по данным кристаллографического анализа (PDB код: 4K2C [59]), и сайты связывания контрастирующих агентов.

ТАБЛИЦА 1

Значения релаксивности для препаратов и других хелатных комплексов на основе  $Gd^{3+}$ , определенные в разных растворах при температуре 37 °С при различной индукции магнитного поля томографов

Препараты и состав раствора	Релаксивность, $mM^{-1} \cdot c^{-1}$		Индукция магнитного поля, Тл	Лит. ссылка
	$r_1$	$r_2$		
Вазовист (MS-325) (водный раствор)	5.2 (4.9–5.5)	5.9 (5.3–6.5)	1.5	[34]
	5.3 (5.0–5.6)	6.1 (5.7–6.5)	3.0	
	5.5 (5.2–5.8)	6.9 (6.5–7.3)	4.7	
Вазовист + HSA	42.3±7.6	–	0.47	[29]
	19 (при 35 °С)	–	1.5	[35]
	9.9	–	3.0	[34]
Вазовист + человеческая плазма	38 (28–47)	–	0.47	[36]
	24 (19–28)	–	1.5	
	15 (10–19)	–	3.0	
Вазовист + бычья плазма	19 (18–20)	34 (32–36)	1.5	[34]
	9.9 (9.4–10.4)	60 (56–64)	3.0	
	6.9 (6.6–7.2)	60 (57–63)	4.7	
Вазовист + человеческая кровь	9±3	38±5	1.5	[37]
	6.1±0.7	92±13	3.0	
	4.6±0.8	266±42	7.0	
Вазовист + собачья кровь	19 (18–20)	37 (35–39)	1.5	[34]
Мультиханс (водный раствор)	48	–	0.47	[38]
	4.0 (3.8–4.2)	4.3 (3.8–4.8)	1.5	[34]
	4.0 (3.7–4.3)	4.7 (4.4–5.0)	3.0	
	4.0 (3.8–4.2)	5.0 (4.7–5.3)	4.7	
Мультиханс + HSA	32±7	–	0.47	[38]
Мультиханс <i>in vivo</i>	7.1 (6.3–7.9)	–	1.5	[39], [40]
	5.7 (5.5–5.9)	–	3.0	[39], [41]
Мультиханс + бычья плазма	6.3 (6.0–6.6)	8.7 (7.8–9.6)	1.5	[34]
	5.5 (5.2–5.8)	11.0 (10.0–12.0)	3.0	
	5.2 (4.9–5.5)	10.8 (10.1–11.5)	4.7	
Мультиханс + собачья кровь	6.7 (6.3–7.1)	8.9 (7.9–9.9)	1.5	[34]
Примовист (водный раствор)	6.0±1.0	–	0.47	[30]
	4.7 (4.5–4.9)	5.1 (4.5–5.7)	1.5	[34]
	4.3 (4.0–4.6)	5.5 (5.2–5.8)	3.0	
	4.9 (4.7–5.1)	6.3 (6.0–6.6)	4.7	
Примовист + HSA	35.5±0.5	–	0.47	[30]
	36.0±3.0	–	0.47	[29]
Примовист + бычья плазма	6.9 (6.5–7.3)	8.7 (7.8–9.6)	1.5	[30]
	6.2 (5.9–6.5)	11 (10–12)	3.0	
	5.9 (5.6–6.2)	12 (11–13)	4.7	
Примовист + собачья кровь	7.3 (6.9–7.7)	9.1 (8.2–10.0)	1.5	[30]
MP-2269 (водный раствор)	6.5±0.3	–	0.47	[30]
	62	–	0.47	[29]
MP-2269 + HSA	32.0±2.5	–	0.47	[30]
	35±4.1	–	0.47	[29]
Gd-C <sub>11</sub> -DOTP + HSA	19.86	–	0.47	[26]
Gd-C <sub>4</sub> -thyroxin-DTPA (водный раствор)	7.5±0.4	–	0.47	[28]
Gd-C <sub>4</sub> -thyroxin-DTPA + HSA	41.0±2.0	–	0.47	

Примечания. 1. Структуры хелатных комплексов см. рис. 1. 2. DOTP – 1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7,10-тетраакис(метилен фосфонат), DTPA – диэтиленetriаминопентауксусная кислота.

дистого удерживания, будет расти. Как следствие, увеличится локальное накопление визуализирующей конструкции в очаге опухолевого процесса. Во-вторых, связывание хелатного комплекса парамагнитного иона альбумином, как правило, способствует существенному увеличению релаксивности ( $r_1$ ) при низкой индукции магнитного поля томографов (табл. 1).

Видно, что для хелатных комплексов гадолиния (III) величина  $r_1$  растет при переходе от буфера к плазме или крови. Обычно это объясняют связыванием парамагнитного зонда с белками, в том числе и с сывороточным альбумином [23, 24, 27, 30, 34, 36, 37]. При этом в зависимости от донора плазмы (человеческая [36] или бычья [34]) и крови (человеческая [37] или собачья [34]) значения релаксивности для одного и того же контрастирующего агента, полученные на томографах с одинаковой напряженностью магнитного поля, могут существенно отличаться (см. табл. 1, например, препарат Вазовист). Таким образом, при оптимизации структуры контрастирующих препаратов для МРТ-диагностики большое внимание уделяется выбору моделей для изучения вклада хелатных комплексов в составе макромолекулярных систем в скорость релаксации протонов воды в окружающих тканях.

Исследования взаимодействия альбумина с контрастирующими агентами выявили, что сродство и локализация сайта связывания зависят от структуры гидрофобного остатка и наличия отрицательного заряда в хелатном комплексе парамагнитного иона (см. рис. 2) [50]. Показано, что контрастирующий агент МР-2269 связывается с альбумином, и в сайте I и в сайте II ( $K_d = 4.0 \cdot 10^{-5}$  и  $2.1 \cdot 10^{-3}$  М соответственно) [22, 47], тогда как агенты Gd-L1

и Gd-L2 – только в сайте II, причем с разной аффинностью ( $K_d = 3.7 \cdot 10^{-4}$  и  $1.1 \cdot 10^{-5}$  М соответственно) [45].

Накопление знаний о молекулярной структуре альбумина и его комплексах с лекарственными препаратами и эндогенными лигандами в совокупности с развитием информационных возможностей создает предпосылки для развития технологий получения контрастных препаратов с оптимальными параметрами высокоизбирательного связывания с белком. Одна из стратегий синтеза высокоаффинных контрастирующих агентов заключается в присоединении к хелатному комплексу  $Gd^{3+}$  через линкер синтона, обладающего высоким сродством к определенному сайту на альбумине. Однако объединение в пределах одной молекулы лиганда, обеспечивающего высокоаффинное связывание альбумином, и хелатного комплекса  $Gd^{3+}$ , ответственного за катализ релаксации протонов, может драматически отразиться на их свойствах. Известно [60], что такие лекарственные препараты, как ибупрофен и L-тироксин, обладают высокой аффинностью к сайту II, расположенному в субдомене IIIA ( $K_a = 2.7 \cdot 10^6$  и  $3.0 \cdot 10^5$  М<sup>-1</sup> соответственно). Эти лиганды использовали в качестве синтонов при получении контрастирующих агентов Gd(4b), Gd(5b), Gd(6) (ибупрофен) [42] и Gd-C4-thyroxin-DTPA (L-тироксин) (см. рис. 1) [28]. Авторы [28] обнаружили, что Gd-C4-thyroxin-DTPA (L-тироксин), в отличие от L-тироксина, теряет способность связываться с сайтом II на альбумине. Известно [60], что сайт II чувствителен к введению даже небольших заместителей в структуру лиганда. Очевидно, присоединение тироксина к хелатному комплексу  $Gd^{3+}$  понижает сродство лиганда к белку, при этом основным сайтом связывания становится сайт I. Сайт I характери-

ТАБЛИЦА 2

Процент связывания хелатных комплексов с альбумином [42] и данные по релаксивности для контрастирующих агентов Gd(4b), Gd(5b) и Gd(6), определенные для 4.5 % р-ра HSA при температуре 37 °С и различной индукции магнитного поля томографов

Показатели	Gd(4b)		Gd(5b)		Gd(6)	
	PBS	HSA	PBS	HSA	PBS	HSA
Процент связывания с HSA	–	88	–	70	–	70
$r_1$ (0.47 Тл), мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	3.9	19	3.2	9	5.6	37
$r_1$ (1.41 Тл), мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	3.8	14	3.0	7.8	4.8	22



зуется меньшей по сравнению с сайтом II аффинностью к L-тироксину. Однако сайт I сравнительно большой и достаточно гибкий, что, возможно, и обеспечивает связывание с ним лигандов разного размера – L-тироксина и его конъюгата с хелатным комплексом  $Gd^{3+}$ .

Большая эффективность связывания лиганд-ориентированного контрастирующего конъюгата не всегда коррелирует со степенью влияния хелатного комплекса  $Gd^{3+}$  на время релаксации протонов. Сравнительный анализ параметров релаксивности ( $r1$ ) (табл. 2) трех ибупрофенсодержащих комплексов гадолиния (III) –  $Gd(4b)$ ,  $Gd(5b)$  и  $Gd(6)$  (см. рис. 1) – свидетельствует о том, что замедление вращения комплексов гадолиния (III) при связывании с крупной биомолекулой, такой как сывороточный альбумин, значительно увеличивает скорость релаксации ядер водорода для контрастирующих агентов  $Gd(4b)$  и  $Gd(6)$ . Как следует из данных табл. 2, без альбумина релаксивность хелатного комплекса  $Gd(4b)$  всего на 25 % выше по сравнению с величиной  $r1$  для комплекса  $Gd(5b)$ , в то время как в присутствии альбумина релаксивность контрастирующего агента  $Gd(4b)$  возрастает на 120 и 80 % при 0.47 и 1.4 Тл соответственно. Хотя эффективность связывания альбумином у агента  $Gd(4b)$  выше по сравнению с  $Gd(6)$ , последний, при образовании комплекса с белком, обеспечивает большую скорость релаксации протонов воды (см. табл. 2).

Степень влияния контрастирующего агента на время релаксации протонов можно регулировать следующими параметрами: 1) расстоянием протонов до иона гадолиния (III); 2) корреляционным временем вращения комплекса  $\tau_r$ ; 3) относительным временем обмена

протонов воды в первой координационной сфере ( $\tau_m$ ); 4) относительным временем диффузии молекул воды ( $\tau_d$ ) (рис. 3) [21]. Воду условно можно разделить на два типа: 1) молекулы воды внутренней сферы (1-я координационная сфера), где кислород воды непосредственно координирует с ионом  $Gd^{3+}$ ; 2) молекулы воды внешней сферы (2-я координационная сфера), где молекула воды взаимодействует с лигандами хелатного комплекса. Молекулы воды во внутренней сфере, как правило, имеют гораздо большее время жизни ( $8 \cdot 10^{-10}$  с), и их вклад в результирующее влияние всех факторов на колебания магнитных диполей, определяется преимущественно вращательной диффузией или электронной релаксацией. Молекулы воды во внешней сфере имеют ограниченное время жизни (порядка  $1 \cdot 10^{-12}$  с), и их вклад в результирующее влияние всех факторов на колебания магнитных диполей определяется временем диффузии воды  $\tau_d$ . Времена релаксации ядер водорода изменяются в результате взаимодействия спина протона с неспаренным спином электрона. Если такое взаимодействие происходит при непосредственном контакте молекулы воды и контрастирующего агента, то изменяется время спин-решеточной релаксации. В таком случае механизм будет внутрисферным. Когда протон молекулы воды оказывается на некотором удалении от контрастирующего агента, он попадает в область действия его локальных полей, что приводит к сокращению времени спин-спиновой релаксации. Механизм релаксации в этом случае будет внешнесферным. Вклад  $T_1$ -контрастирующего агента в скорость релаксации протонов воды, в первую очередь, определяется временем электронной релаксации  $T_{1e}$ , корреляционным временем вращения комплекса  $\tau_r$  и относительным временем обмена протонов воды в первой координационной сфере ( $\tau_m$ ) (см. рис. 3) [21].

Соединение  $Gd(5b)$  отличается от контрастирующих агентов  $Gd(4b)$  и  $Gd(6)$  тем, что в его комплексе с белком во внутренней сфере нет молекулы воды, непосредственно контактирующей с ионом  $Gd^{3+}$  (см. рис. 1) [42]. Зависимость релаксивности контрастирующего агента от наличия молекулы воды во внутренней сфере наблюдали авторы [27] при ис-

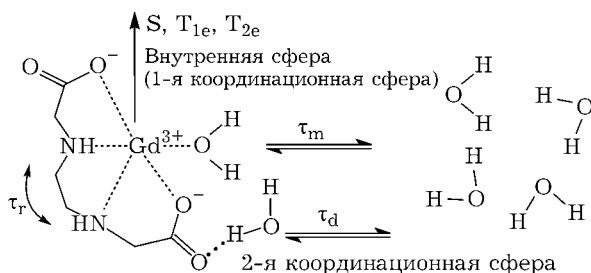


Рис. 3. Принцип работы контрастирующих препаратов – хелатных комплексов гадолиния (III).

следовании препарата MS-325 и Gd-5, не содержащего молекулы воды в первой координационной сфере. Для них в водных растворах в отсутствие белка получены значения релаксивности  $r1$  (25 °С, 0.47 Тл), равные 7.5 и 2.5  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  соответственно (структуры см. рис. 1). Замедление вращения комплексов гадолиния (III) при связывании их альбумином приводило к большему росту скорости релаксации ядер водорода для контрастирующего препарата MS-325, имеющего молекулу воды в первой координационной сфере. Так, релаксивность  $r1$  для агента MS-325 возрастала до 45  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , в то время, как для агента Gd-5 она не превышала 10  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Сокращение времени релаксации ядер водорода комплексами гадолиния (III) происходит через дипольный механизм. Заместители в хелатном комплексе могут влиять на скорость обмена протонов координационной сферы, при этом возможно изменение соотношения молекул воды на внутренней и внешней сферах контрастирующего соединения в пользу внешней сферы, что обязательно снижает общую релаксивность. Так, например, при замене карбоксильной группы в структуре хелатного комплекса гадолиния (III) (агент Gd(6)) на фосфонатную (агент Gd(4)) релаксивность препарата уменьшается (см. табл. 2, структуры см. рис. 1). При разработке контрастирующих препаратов необходимо также учитывать, что боковые радикалы аминокислотных остатков, присутствующие в сайте связывания препарата, могут влиять на скорость обмена молекул воды, координированной ионом гадолиния. Зависимость времени релаксации ядер водорода от скорости обмена протонов наблюдали авторы работы [45], исследуя связывание альбумином хелатных комплексов Gd-L1 и Gd-L2 (структуры см. рис. 1). При образовании комплекса альбумина с Gd-L1 релаксивность  $r1$  увеличивается с 6.0 до 35  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Для комплекса Gd-L2 (более длинный и гидрофобный радикал по сравнению с Gd-L1, см. рис. 1)  $r1$  возрастает с 6.4 до 43.5  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ . Меньшая каталитическая активность агента Gd-L1 в релаксации протонов воды может быть обусловлена замедлением обмена металлокоординированной молекулы воды из-за образования водородной связи с карбоксильной группой остатка Glu-492 [45].

Повышение релаксивности контрастирующих препаратов возможно также за счет использования хелатирующих агентов, в которых ион гадолиния (III) способен координировать более одной молекулы воды. Авторы [49, 61] провели сравнительный анализ релаксивности  $r1$  комплексов гадолиния (III), функционализированных остатком дезоксихолевой кислоты – B22956/1, B25716/1 и Gd-AAZTA-MADEC (структуры см. рис. 1). Структурная модификация в хелатирующем комплексе B22956/1 с превращением его в контрастирующие агенты B25716/1 и Gd-AAZTA-MADEC позволила скоординировать две молекулы воды во внутренней координационной сфере и тем самым повысить релаксивность при связывании с альбумином (например, при 0.47 Тл для B25716/1  $r1 = 29.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , для B22956/1  $r1 = 26.8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ). С увеличением длины мостика (см. рис. 1, комплексы B25716/1 и Gd-AAZTA-MADEC), через который присоединялся остаток дезоксихолевой кислоты, релаксивность Gd-AAZTA-MADEC при связывании с альбумином возрастает до 38.7  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , что практически соответствует релаксивности клинически значимого хелатного комплекса MS-325 (40  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ) [49]. Предполагается, что увеличение релаксивности Gd-AAZTA-MADEC по сравнению с его структурным аналогом B22956/1 связано с увеличением сродства к альбумину ( $K_a = 8.9 \cdot 10^5$  и  $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  соответственно) [49]. Образование прочных комплексов с альбумином за счет липофильных остатков дезоксихолевой кислоты обеспечивает эффективную доставку контрастирующих препаратов в злокачественную опухоль, что было продемонстрировано с использованием метода МРТ в экспериментах на лабораторных животных с модельной аденокарциномой простаты [61] и B16F10 меланомы [49]. Для агента B25716/1 авторы наблюдали большее по сравнению с агентом B22956/1 увеличение интенсивности сигнала в ткани [61]. Для Gd-AAZTA-MADEC наблюдались лучшие локальное накопление зонда в опухоли и контраст изображения по сравнению с B22956/1, B25716/1 и MS-325 [49].

При работе с экспериментальными животными, которые, в отличие от человека, должны находиться под анестезией, временной фактор имеет существенное значение. По

этой причине МРТ-эксперименты с лабораторными животными проводятся на высокопольных томографах (7 Тл и выше). Оказалось, что при расчете показателей продольной релаксивности в условиях проведения экспериментов на более высокопольных МР-томографах ( $>0.5$  Тл) значения  $r_1$  для комплексов контрастирующих препаратов с альбумином меньше, чем при использовании МР-томографа с индукцией магнитного поля 0.47 Тл (см. табл. 1 и 2). Таким образом, при переходе к высоким магнитным полям необходимо дополнительно исследовать физические и структурные факторы, влияющие на релаксивность хелатных комплексов гадолиния (III).

Улучшение контрастирования патологического очага с помощью комплексов контрастирующих препаратов гадолиния (III) с альбумином обусловлено, с одной стороны, присутствием альбумина, а с другой, связано с нарушением сосудистой проницаемости либо с изменением кровотока, либо с индукцией ангионогенеза [11, 62–64]. Именно поэтому динамическое контрастирование позволяет получать хорошую визуализацию злокачественных образований, которые отличаются большим количеством сосудов и их повышенной проницаемостью, что способствует быстрому накоплению и быстрому вымыванию внеклеточных парамагнитных контрастных средств. Таким образом, высокомолекулярные парамагнитные контрастные средства в сочетании со сверхбыстрыми импульсными последовательностями позволяют в реальном времени определить малейшие изменения кровотока. Однако в случае нековалентных комплексов возможно преждевременное высвобождение контрастирующего препарата из комплекса с белком, что может привести к нарушению корреляций между морфологическими изменениями, определенными с помощью гистологических исследований, и данными МРТ. Данную проблему пытаются решить путем ковалентного присоединения хелатных комплексов гадолиния (III) к альбумину. Авторы работы [65] получили конъюгаты альбумина с 19 остатками Gd-DTPA. Намного позднее были синтезированы альбумин-(Gd-DTPA)<sub>30</sub> и альбумин-(Gd-DTPA)<sub>37</sub> [9, 66–69]. Конъюгирование хелатного комплекса с альбумином приводит, как правило, к существен-

ному увеличению релаксивности  $r_1$  при низкой индукции магнитного поля томографов. Так, например, для ковалентного аддукта альбумин-(Gd-DTPA)<sub>19</sub> значение  $r_1$  увеличилось до  $273 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  в расчете на концентрацию полимера, или  $14.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  в расчете на концентрацию ионов гадолиния (III) [65]. Конъюгаты альбумин-Gd-DTPA успешно используются для детекции, например, солидной опухоли гепатоклеточной карциномы [20], рака легких [9].

Конъюгирование хелатных комплексов гадолиния (III) с альбумином изменяет как биофизические, так и фармакологические свойства  $T_1$ -контрастирующих агентов. Длительная циркуляция в организме приводит не только к повышенному накоплению в органе-мишени и увеличению контрастности патологического очага по отношению к окружающим тканям, но и к возможности неполного выведения препарата. Увеличение биодоступности препарата обеспечивает хороший захват его клетками, следовательно, лучшее переваривание и (потенциально) повышение уровня токсичных продуктов распада макромолекулярных контрастных агентов. По этой причине стабильность вновь разрабатываемых препаратов имеет актуальное значение при изучении их эффективности и безопасности. Необходимо учитывать риск высвобождения высокотоксичных ионов  $\text{Gd}^{3+}$  из хелатного комплекса в кровеносное русло за счет реакции трансметаллирования с ионами других металлов (например,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ). Авторы [70] опубликовали данные об увеличении экскреции цинка и других микроэлементов с мочой за счет высвобождения высокотоксичного  $\text{Gd}^{3+}$ . Перечисленные выше факторы, а также необходимость проведения сложного многостадийного химического синтеза контрастирующих конъюгатов накладывают некоторые ограничения на применение ковалентных комплексов для медицинской диагностики [9, 20]. В настоящее время такого типа визуализирующие системы используются только при проведении научных исследований. Таким образом, вопрос разработки на основе альбумина эффективных визуализирующих систем остается открытым.

Одно из современных направлений в разработке визуализирующих систем – созда-

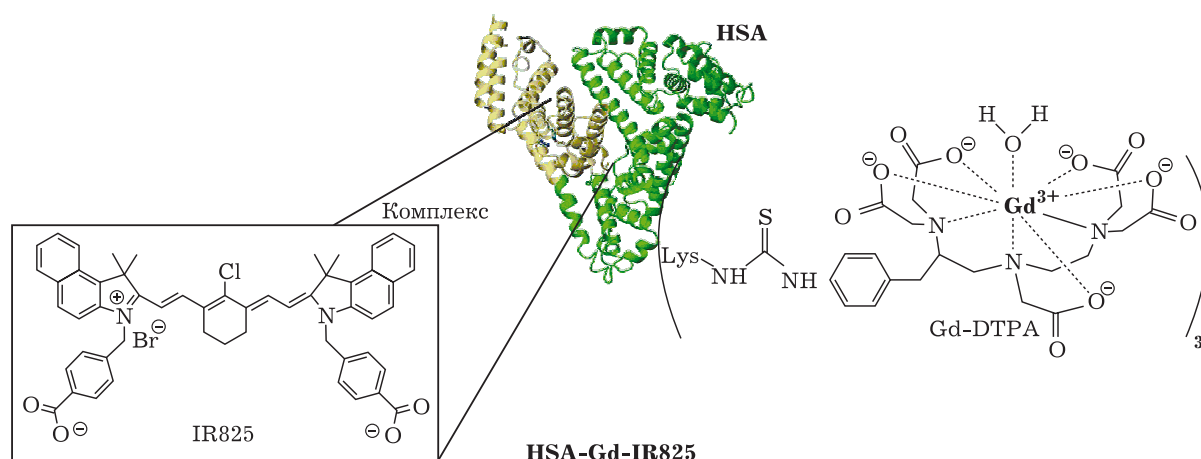


Рис. 4. Мульти模альная наноконструкция для МРТ/флуоресцентной визуализации и фототермальной терапии.

ние контрастирующих препаратов, которые можно детектировать с помощью разных методов томографии. Такие визуализирующие системы необходимы, например, для получения подробной информации об опухоли с целью выбора подходящей стратегии лечения (предоперационная диагностика) и определения точной локализации злокачественных областей при хирургическом вмешательстве (интраоперационная диагностика). Авторы [19] на основе альбумина разработали multifunctionальную наноконструкцию для диагностики патологических процессов, оценки эффективности действия терапевтических препаратов методами МРТ/флуоресцентной томографии (рис. 4).

На первой стадии посредством взаимодействия функциональных групп белка с фенилизотиоцианатным производным ДТРА получен конъюгат альбумина, содержащий три остатка хелатного комплекса гадолиния (III). Для последующего введения флуоресцентного красителя IR825 авторы [19] использовали способность альбумина связывать вещества различного размера и химической природы благодаря конформационной лабильности молекулы белка. При связывании красителя альбумином, содержащим хелатный комплекс гадолиния (III), авторы наблюдали резкое увеличение (приблизительно в 100 раз) интенсивности флуоресценции красителя IR825 на длине волны 600 нм (квантовый выход примерно равен 40 %), что обеспечивает высокую чувствительность флуоресцентной визу-

ализации образующегося нековалентного комплекса. Релаксивность разработанного конъюгата составила  $r_1 = 4.82 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  в расчете на концентрацию ионов гадолиния (III), что сопоставимо по величине с магнестом – коммерчески доступным контрастирующим препаратом ( $r_1 = 4.25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ ) [19].

Вышеописанная наноконструкция HSA-Gd-IR825 служит агентом для тераностики злокачественных опухолей, другими словами, совмещает в себе диагностику и фототермальную терапию. Последняя основана на локальном разогреве определенного участка ткани в организме до температуры 40–45 °С, при которой клетки начинают гибнуть. Связанный альбумином краситель IR825 обладает высоким коэффициентом фототермального превращения за счет максимума поглощения в диапазоне длин волн 810–825 нм, где квантовый выход флуоресценции минимален [19, 71]. Используя разные каналы подаваемого излучения, можно проводить отдельно диагностические исследования методом флуоресцентной томографии и/или фототермальную терапию после доставки препарата в опухоль. После разрушения наноконструкции краситель IR825 может достаточно быстро выводиться с мочой и не оказывать токсического воздействия на организм [19].

По результатам многочисленных клинических исследований, препараты гадолиния (III) высокоэффективны в качестве контрастирующих средств для МРТ. Однако для контрастных препаратов на основе этого парамагнит-

ного иона остаются нерешенными две важные практические проблемы – высокая стоимость этих соединений и потенциальная токсичность ионов гадолиния в свободном состоянии, что исключает создание препаратов с даже минимальным высвобождением этого иона в результате метаболических изменений препарата в организме. В то же время известно, что марганец имеет близкие с гадолинием парамагнитные свойства [52], при этом содержится в тканях организма и имеет свой естественный метаболизм. Благодаря схожести по кинетическим свойствам поглощения клетками с кальцием, марганец широко используется в эксперименте для магнитно-резонансной оценки широкого круга физиологических и патофизиологических процессов [72]. Возник даже специальный термин – MEMRI (сокращение от Manganese-Enhanced MRI) [73, 74]. Хотя количество неспаренных электронов у марганца (II) меньше, чем у гадолиния (III) (4 и 7 соответственно), но благодаря малым размерам он лучше взаимодействует с близлежащими молекулами воды как в растворе, так и в составе более сложных комплексов.

В работе [52] получены интересные результаты при исследовании  $T_1$ -контрастирующего агента MnP2 – димера  $Mn^{3+}$ -тетрафенилсульфоната порфирина (см. рис. 1). С помощью метода флуоресцентного титрования авторы показали [52], что в структуре HSA имеется сайт связывания MnP2, характеризующийся высоким сродством ( $K_d = (0.23 \pm 0.03) M^{-1}$ ). Высокоаффинное связывание альбумином комплекса MP2, по-видимому, происходит за счет бифенильного мостика [52]. Известно [75, 76], что бифенильный остаток проявляет высокое сродство к HSA, что ранее было показано на хелатных комплексах гадолиния.

Отличительная особенность агента MnP2 от контрастирующих препаратов гадолиния (III) заключается в том, что при связывании альбумином значение релаксивности  $r1$  практически не уменьшается при возрастании индукции магнитного поля: при 37 °C  $r1 = 12.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  (0.47 Тл) и уменьшается до  $10.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  (3 Тл) в расчете на ион марганца (II). Для сравнения: для препарата Вазовист  $r1$  уменьшается с 47.2 (0.47 Тл) до  $9.9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$

(3 Тл) [52]. Стоит учесть, что на одну молекулу MnP2 приходится два катиона марганца (II), и тогда  $r1 = 20.0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , а это вдвое больше по сравнению с величиной  $r1$  для хелатного комплекса  $Gd^{3+}$  (например, Вазовиста). По мнению авторов [52], данное поведение MnP2 может быть обусловлено тем, что при связывании агента в гидрофобном кармане альбумина ограничивается доступ молекул воды к иону, а это способствует снижению скорости обмена металлокоординированной молекулы воды.

Помимо ионов гадолиния и марганца, для МРТ могут быть также использованы ванадил-ионы ( $VO^{2+}$ ) (см. рис. 1). Они могут накапливаться в клетках, где взаимодействуют с внутриклеточными гликолитическими ферментами. Предложенный в работе [54] комплекс  $VO(acac)_2$  (см. рис. 1) с высокой аффинностью связывается HSA ( $K_d = 2.5 \cdot 10^{-7} M$ ), что обеспечивает продолжительное время его пребывания в крови, а также лучшее прохождение через сосудистую систему опухоли. Как известно, наиболее агрессивные типы рака метаболически активны. Ионы ванадила могут эффективно поглощаться клетками с высокой активностью гликолиза, что обеспечит накопление зонда в опухоли, а также позволит получить при МРТ изображение функциональной границы опухоли и ее внутренней структуры с высоким разрешением [54]. Эксперименты *in vivo* с использованием МРТ показали, что максимум кривой накопления препарата  $VO(acac)_2$  в опухоли АТ6.1 наблюдается через 3 ч после внутривенного введения комплекса [54]. Значения релаксивности  $r1$  для  $VO(acac)_2$  и Gd-DTPA составляют при 4.7 Тл в водном растворе  $0.31$  и  $4.3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$  соответственно. Хотя комплекс  $VO(acac)_2$  уступает по релаксивности комплексам гадолиния (III), его использование для МРТ-диагностики перспективно благодаря нетоксичности и способности накапливаться в опухоли [54].

#### СИСТЕМЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ОЧАГОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА

Магнитные наночастицы (МНЧ) магнетита – смешанного типа оксида железа  $FeO \cdot Fe_2O_3$  (оксид-диоксид) – считаются од-

ними из перспективных для использования в биомедицине. Они могут изменять как продольную, так и поперечную релаксацию протонов, повышая тем самым достоверность визуализации объектов и тканей *in vitro* и *in vivo* методом МРТ. В настоящее время контрастирующие препараты, содержащие суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, используются в качестве  $T_2$ -контрастирующих агентов [2], ускоряющих преимущественно спин-спиновую релаксацию. Надо отметить, что значения  $T_2$ -релаксации для МНЧ на порядок выше по сравнению с  $T_1$ -релаксации для используемых повсеместно в клинике контрастирующих агентов на основе хелатных комплексов  $Gd^{3+}$ , а это позволяет существенно снизить дозировку диагностического препарата. При определенных условиях МНЧ могут уменьшать время спин-решеточной релаксации, т. е. контрастировать на  $T_1$ -взвешенных МР-томограммах. Так, при уменьшении диаметра наночастиц увеличивается релаксивность  $r_1$  и уменьшается  $r_2$ , например, для модифицированных наночастиц размером 3 нм  $r_1 = 4.77 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ , а отношение  $r_2/r_1 = 6.12$  (3 Тл) [77]. Однако до сих пор отсутствуют результаты систематического исследования зависимости интенсивности МР-сигнала на  $T_1$ -взвешенных изображениях от концентрации наночастиц, хотя данная информация могла бы быть полезна при изучении распределения МНЧ *in vivo* с использованием МРТ.

Бесспорное достоинство МНЧ – возможность управлять их перемещением с помощью внешнего магнитного поля и осуществлять их нагрев осциллирующим магнитным полем. Благодаря этому их можно использовать как для диагностики (магнитно-резонансные исследования) [78–83], так и в терапии (гипертермия и доставка лекарств и генов непосредственно в пораженные области и клетки) [78, 82, 83]).

Сложной задачей при разработке наносистем на основе МНЧ для биомедицины является создание устойчивых биосовместимых покрытий и закрепления на их поверхности биовекторов и лекарственных веществ. Для формирования устойчивого белкового покрытия на МНЧ необходимо обеспечить ковалентное сшивание макромолекул на МНЧ. Будучи белком плазмы крови, сывороточный альбумин может использоваться как универсальная

основа для устойчивого макромолекулярного покрытия на поверхности МНЧ в биологии и медицине. Авторы работы [84] адсорбировали альбумин на поверхности МНЧ в присутствии карбодиимида, однако белковые молекулы десорбировались с поверхности частиц.

Авторы [85] предложили способ получения устойчивого белкового покрытия на поверхности МНЧ магнетита в водной дисперсии, который основан на физической адсорбции альбумина и закреплении адсорбционного слоя через химическую модификацию белка с образованием межбелковых ковалентных связей под действием свободных радикалов. Для получения покрытия из альбумина, закрепленного по механизму свободнорадикального сшивания, использовались реакционные системы, включающие раствор белка, гидрозоль магнетита и водорастворимый инициатор генерации свободных радикалов – пероксид водорода. Генерация свободных радикалов осуществлялась на поверхности МНЧ магнетита по реакции Фентона

$$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$$

Поскольку свободные радикалы возникают только в области контакта с веществом-инициатором поверхности, содержащей ионы металла переменной валентности, то процесс ковалентного сшивания, придающий покрытию повышенную прочность, локализуется строго в слое белка, адсорбированного на поверхности наночастицы. При этом исключается возможность образования перекрестных сшивок между макромолекулами белка в растворе, а также возможность формирования полидисперсного ансамбля частиц вследствие сшивания молекул белка, иммобилизованных на разных МНЧ.

Предпринимались попытки создания белкового покрытия путем адсорбции на МНЧ белков и последующего ковалентного сшивания с помощью бифункциональных реагентов. Следует отметить, что закрепление молекул белка на поверхности МНЧ с помощью бифункциональных сшивающих агентов может сопровождаться нежелательным образованием полидисперсного ансамбля наночастиц. Это обусловлено тем, что процесс сшивания носит не избирательный характер: сшиваются не только молекулы, адсорбированные на отдельных частицах, но и находящиеся в растворе, а также принадлежащие разным МНЧ.

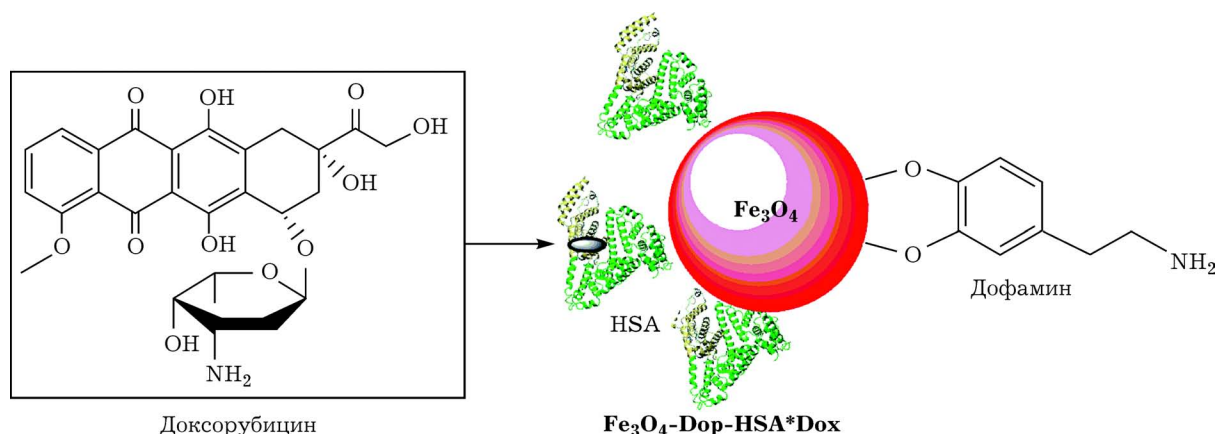


Рис. 5. Мультифункциональные МНЧ с белковым покрытием для терапии злокачественных опухолей.

Традиционно при создании белковых покрытий на МНЧ используют метод нанесения промежуточного покрытия, а белки присоединяют в качестве биологически активных веществ [86]. Молекулы, содержащие гидроксильные, карбоксильные, фосфатные, фосфонатные, сульфатные, сульфитные группы, могут физически и химически связываться с поверхностью МНЧ оксидов железа. По аналогии с соответствующими координационными соединениями молекулы, содержащие электронодонорные атомы O, N, P, S, которые обеспечивают связь с поверхностью МНЧ, называют лигандами. Один из таких лигандов – дофамин (Dop), природный нейромедиатор, который присутствует в различных животных организмах и содержит гидроксильные и аминогруппы. Он обладает исключительной способностью координировать с ионами Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> МНЧ. В работах [87, 88] описано связывание Dop с поверхностью МНЧ оксидов железа за счет образования жесткого цикла при взаимодействии гидроксигрупп с магнетитом, после чего они могут быть дополнительно модифицированы альбумином и доксорубицином (Dox) (рис. 5) [87].

Магнитные свойства функционализированных МНЧ во многом определяются их природой и размерами. Основные параметры, зависящие от размеров частиц, – намагниченность насыщения и время релаксации. Под размером частиц обычно подразумевается общий диаметр частиц, включая ядро и покрытие. Гидродинамический диаметр МНЧ, полученных авторами [85], примерно равен

30 нм, при этом 15 нм составляет ядро, а 5–6 нм – это размер “короны” Dop/HSA. Авторы [85] обнаружили, что функционализированные Dop и HSA МНЧ более эффективно уменьшают время поперечной релаксации ( $T_2$ ) протонов по сравнению с коммерческим препаратом Feridex. Для Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dop-HSA и контрастного препарата Feridex значения релаксационности  $r_2$  составляют 314 и 123.6 mM<sup>-1</sup> · с<sup>-1</sup> соответственно. Благодаря высокой скорости  $T_2$ -релаксации и низкой токсичности МНЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dop-HSA могут найти применение в биомедицине. Введение химиотерапевтического агента Dox в наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dop-HSA приводило к увеличению гидродинамического диаметра МНЧ примерно до 50 нм [84]. Сконструированная система (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dop-HSA\*Dox) служит средством для диагностики заболевания (МРТ-контрастный агент) и одновременно содержит лекарственный препарат Dox, т. е. является агентом для терапии злокачественных опухолей. Широко используемый противоопухолевый препарат Dox обладает низкой селективностью к раковым клеткам, вследствие чего считается довольно токсичным веществом. В работе [84] показано, что, в отличие от свободного Dox, Dox в составе контрастирующего препарата Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Dop-HSA\*Dox обладает повышенной способностью накапливаться в опухолевых клетках. Адресную доставку лекарственного препарата в опухоль авторы [84] связывают с трансцитозом агента для терапии в интерстициальное пространство опухоли, который инициируется связыванием альбумина,

присутствующего в составе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Dop-HSA\*Dox, с gp60-рецептором, и с дальнейшим взаимодействием с другим вектором – рецептором SPARC. Введение Dox в конструкцию, как показано авторами [87], подавляет опухоль 4T1. Таким образом, функционализованные HSA МНЧ обладают большим потенциалом для создания на их основе агентов для тераностики злокачественных опухолей.

#### **ВИЗУАЛИЗИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА, СОДЕРЖАЩИЕ МАГНИТНО- РЕЗОНАНСНУЮ МЕТКУ (ЯДРА $^{19}\text{F}$ )**

Проблемой регистрации ядер, отличных от  $^1\text{H}$ , является низкая чувствительность. У разных ядер значения  $\gamma$  в 2.5 и более раза ниже, чем у протонов. Например, для  $^{13}\text{C}$   $\gamma = 10.71$  МГц/Тл; для  $^{31}\text{P}$  – 17.25 МГц/Тл. Лишь для  $^{19}\text{F}$  она сопоставима с  $^1\text{H}$  ((40.07 и 42.57 МГц/Тл соответственно). Природное изотопное содержание ядра  $^{19}\text{F}$  составляет 100 %, а резонансная частота для ядра  $^{19}\text{F}$  – 94 % от частоты ядер  $^1\text{H}$ . В результате этого чувствительность при регистрации сигнала ЯМР для ядер  $^{19}\text{F}$  составляет 83 % от чувствительности для ядер  $^1\text{H}$  (при одинаковой амплитуде шумов). В организме человека структуры на основе  $^{19}\text{F}$  присутствуют исключительно в форме твердых солей, например, в зубах и костях. Как следствие, время релаксации  $T_2$  эндогенных атомов  $^{19}\text{F}$  очень короткое, а сигнал магнитного резонанса трудно детектируется. Иными словами, физиологическая концентрация обнаруживаемого эндогенного фтора в организме человека ниже предела чувствительности метода. Таким образом, отсутствие фонового сигнала при использовании молекулярных зондов, содержащих ядра  $^{19}\text{F}$ , потенциально обеспечивает для молекулярной томографии в организме высокое отношение сигнала к шуму и специфичность. Экзогенные контрастные средства для МРТ на основе  $^{19}\text{F}$  могли бы детектироваться как “горячее пятно на холодном фоне”, что позволяет не только визуализировать в живом организме органы или места накопления определенных контрастных препаратов, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), но и оценить активность протекающих биохимических процессов [89, 90].

При разработке мультимодальных зондов, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), удается реализовать уникальный потенциал альбумина, который имеет модульную структуру и набор функций, связанных с отдельными структурными модулями. Путем селективной модификации остатка Cys-34 HSA малеимидным производным флуоресцентного красителя Cy5 и последующего *N*-гомоцистеинилирования белка в присутствии аналога природного модификатора – производного тиолактона гомоцистеина, содержащего  $^{19}\text{F}$  ЯМР-метку, – авторы [91] получили биосовместимый бимодальный молекулярный зонд PFT-Hcy-HSA-Cy5 (рис. 6; PFT-Hcy – *N*-(*n*-перфтортолуолил)гомоцистеинил), детектируемый с помощью МРТ/МРС на ядрах  $^{19}\text{F}$  и флуоресцентной микроскопии.

Применение бимодального зонда PFT-Hcy-HSA-Cy5 (см. рис. 6) в качестве контрастного агента в экспериментах на мышцах SPF-статуса линии SCID с опухолью головного мозга, вызванной внутривенной инъекцией клеточной культурой глиомы U87 человека, помогло визуализировать экспериментальную глиому [91]. Таким образом, сывороточный альбумин, содержащий магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ), обладает значительным потенциалом для визуализации опухоли с помощью метода  $^{19}\text{F}$  МРТ при проведении исследований *in vivo*.

Авторы работы [92] отмечали, что конъюгирование остатка фторорганического соединения с белком существенно уменьшает время релаксации  $T_2$ . Так, время спин-спиновой релаксации для конъюгата альбумина с трифторацетатом  $T_2 = 70$  мс (4.7 Тл), в то время как для свободного трифторацетата натрия  $T_2 \sim 760$  мс. Уменьшение времени релаксации обусловлено замедлением вращения остатка фторорганического соединения при ковалентном присоединении к такой высокомолекулярной биомолекуле, как сывороточный альбумин. При конъюгировании остатка трифторацетата с белком в  $^{19}\text{F}$  ЯМР-спектре наблюдается уширение линии магнитно-резонансного сигнала в 4–5 раз (для конъюгатов ширина линии составляет 80–100 Гц, а для трифторацетата  $\sim 20$  Гц) [92]. Аналогичные наблюдения отмечались также и для нековалентных комплексов альбумина с фторорганичес-



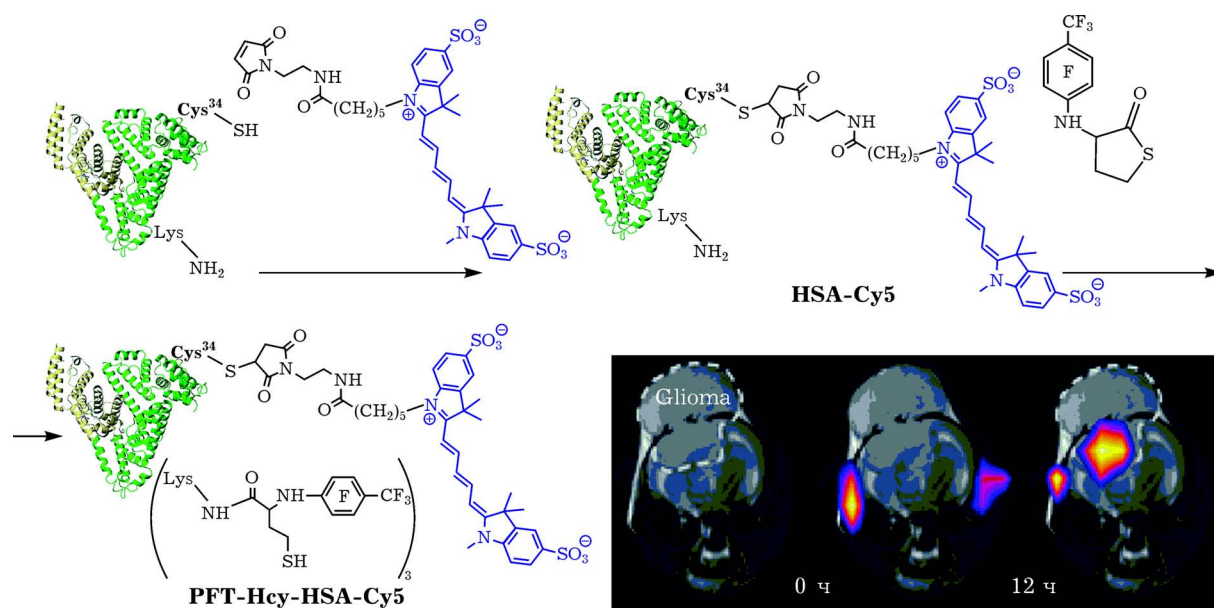


Рис. 6. Схема получения бимодального зонда на основе альбумина (PFT-Нсу-HSA-Cy5), содержащего  $^{19}\text{F}$  магнитно-резонансную и флуоресцентную репортерные группы, и результаты МРТ, полученные на мыши SPF-статуса линии SCID с опухолью головного мозга, вызванной внутривенной инъекцией клеточной культурой глиомы U87 человека. Внизу слева –  $^1\text{H}$  магнитно-резонансная томограмма до инъекции PFT-Нсу-HSA; в центре (0 ч) – наложение  $^{19}\text{F}/^1\text{H}$  томограмм сразу после подкожной инъекции PFT-Нсу-HSA в область шеи; справа (12 ч) – наложение  $^{19}\text{F}/^1\text{H}$  томограмм спустя 12 ч после инъекции PFT-Нсу-HSA.

кими соединениями [91], а также для HSA, модифицированного с помощью *N*-трифтор-ацетилтиолактона гомоцистеина [93].

Наблюдаемые изменения  $^{19}\text{F}$ -ЯМР-характеристик фторорганических соединений при связывании их белком легли в основу подхода off-to-on, обеспечивающего контрастирование очагового поражения в организме в результате локального стимула [94]. Авторы [94] получили эфиры трифторалкилспирта и *N*-замещенного *n*-аминофенола, обладающие сродством к HSA. Обнаружено, что взаимодействие фторорганического эфира с альбумином существенно уменьшает время релаксации  $T_2$ . Так, например, величина  $T_2$  для 2-((4-(2,2,2-трифторэтокси(фенил)амино)этанол) в комплексе с альбумином равна  $(14.7 \pm 1.6)$  мс, для свободного трифторэтилового эфира *N*-замещенного *n*-аминофенола  $T_2 = (873.6 \pm 184.9)$  мс, а для трифторэтанола –  $(1744.6 \pm 324.0)$  мс. При связывании 2-((4-(2,2,2-трифторэтокси(фенил)амино)этанол) с альбумином в спектре  $^{19}\text{F}$ -ЯМР сигнал не регистрировался (рис. 7, положение off). В то же время, в присутствии такого сильного окис-

лителя, как гипохлорит-анион, контрастный препарат претерпевал изменение (см. рис. 7, положение on). В  $^{19}\text{F}$  ЯМР-спектрах реакционной смеси с гипохлоритом авторы [94] наблюдали появление сигнала при  $-76.6$  м. д., который по положению в поле соответствовал трифторэтанола – продукту окисления эфира гипохлорит-анионом. Спин-эхо исследования, проведенные в  $T_2$ -взвешенном режиме при времени эхо (TE), зафиксированном на величине TE = 11.1 мс, при величине времени повторения (TR) длительностью в 4 000 мс, выявляли зависимость интенсивности  $T_2$ -взвешенного изображения от концентрации трифторэтанола.

В биологических системах гипохлорит-анион образуется в реакции хлорид-аниона с пероксидом водорода, катализируемого миелопероксидазой, повышенный уровень которой наблюдается в опухолевых клетках при некоторых лейкозах. Связывание контрастных препаратов альбумином позволяет увеличить их время циркуляции в крови, а за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания патологических сосудов опухоли, а так-

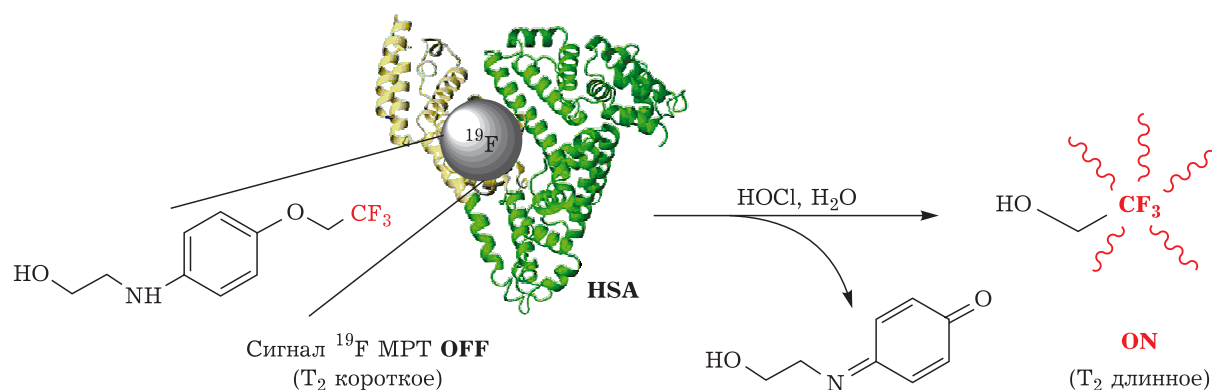


Рис. 7. Схема подхода off-to-on [94].

же стимул-опосредованного (окисление гипохлорит-анионом) высвобождения из комплекса можно увеличить концентрацию контрастного агента непосредственно в зоне опухоли, что обеспечит повышение диагностической точности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение необходимо упомянуть ряд обзоров, имеющих непосредственное отношение к теме данного обзора [2, 10, 21, 50, 95, 96].

В обзорах [2, 21, 50] рассмотрены принципы МРТ на ядрах  $^1\text{H}$  и обсуждены различные параметры, которые необходимо учитывать при разработке новых контрастирующих/контрастных агентов на основе хелатных комплексов парамагнитных лантаноидов (III). Повышение релаксирующей способности вещества, селективность связывания с патологическим очагом, увеличение времени циркуляции в крови способствуют усилению контраста на МР-изображении между здоровой и патологической тканью, что повышает точность диагноза и, как следствие, эффективность терапии и точность прогноза заболевания. Однако необходимо не только учитывать увеличение релаксивности, повышение специфичности связывания с патологическими очагами, но и оценивать безопасность (токсичность, стабильность) потенциальных контрастирующих/контрастных препаратов.

Анализ литературных данных показал, что подавляющее число публикаций посвящено разработке контрастирующих препаратов на основе хелатных комплексов  $\text{Gd}^{3+}$ . Применение комплексов альбумина с гадолинием (III) небезопасно из-за высвобождения высокотоксичного  $\text{Gd}^{3+}$  из комплексов в кровеносное русло при длительном времени их циркуляции. Тем не менее в настоящее время при проведении клинических исследований с помощью МРТ используют преимущественно препараты на основе  $\text{Gd}^{3+}$ .

Накопление знаний о молекулярной структуре альбумина и его комплексах с лекарственными препаратами и эндогенными лигандами в совокупности с развитием биоинформатики создает предпосылки для разработки аффинных контрастирующих/контрастных агентов с оптимальными параметрами высокоизбирательного связывания с белком. Мы проанализировали и систематизировали опубликованные к настоящему моменту данные по локализации сайтов на альбумине, которые могут с определенными константами связывать лиганд-ориентированные хелатные комплексы контрастирующих/контрастных агентов. Необходимо заметить, что образование комплекса альбумина с МРТ-агентами может влиять как на фармакокинетику агентов, увеличивая время их жизни в крови, так и изменять способность белка связывать и переносить широкий круг эндогенных соединений.

В настоящее время стремительно развивается новое направление медицины, называемое тераностикой, которое предполагает создание объектов, совмещающих в себе диагностическую и терапевтическую функции. Эта область привлекает большое внимание исследователей, о чем свидетельствует ряд обзоров, опубликованных в последние два года [10, 95, 96]. Магнитные наночастицы оксида железа, функционализированные альбумином, отвечают требованиям, предъявляемым этой концепцией, так как не только оказывают локальное терапевтическое (термическое) воздействие на ткани за счет преобразования электромагнитной энергии в тепловую, но и могут выступать контрастирующими агентами для диагностики патологий с помощью МРТ. Можно ожидать, что в ближайшее десятилетие МНЧ станут уникальным по своей эффективности неинвазивным средством в различных областях биомедицины, в том числе в тераностике злокачественных опухолей.

На данный момент наметилась тенденция в направлении создания на основе сывороточного альбумина мультимодальных зондов, детектируемых различными методами (МРТ/флуоресцентная визуализация). Настоящий обзор отражает очередной этап развития знаний по данной проблеме. Наряду с опубликованными данными представлены также оригинальные результаты авторов по разработке молекулярных зондов на основе HSA, содержащих магнитно-резонансную метку (ядра  $^{19}\text{F}$ ) и флуоресцентный краситель.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (проект № 14.613.21.0015 (RFMEFI61314X0015)) и DBT, MST, Индии (проект № DBT/IC-2/Индия-Россия/2014-16/02).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huang C.-H., Tsourkas A. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2013. Vol. 13, No. 4. P. 411–421.
- Aime S., Crich S.G., Gianolio E., Giovanzana G.B., Tei L., Terreno E. // *Coord. Chem. Rev.* 2006. Vol. 250, No. 11–12. P. 1562–1579.
- Huang H., Yue T., Xu K., Goltzarian J., Yu J., Huang J. // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2015. Vol. 131. P. 148–154.
- Neuwelt A., Sidhu N., Hu C.-A. A., Mlady G., Eberhardt S. C., Sillerud L. O. // *AJR. Am. J. Roentgenol.* 2015. Vol. 204, No. 3. P. 302–313.
- Claussen C., Laniado M., Schörner W., Niendorf H. P., Weinmann H. J., Fiegler W., Felix R. // *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 1985. Vol. 6, No. 5. P. 669–674.
- Rocca M.A., Anzalone N., Falini A., Filippi M. // *Radiol. Med.* 2013. Vol. 118, No. 2. P. 251–264.
- Kjær A., Loft A., Law I., Berthelsen A. K., Borgwardt L., Löfgren J., Johnbeck C. B., Hansen A. E., Keller S., Holm S., Højgaard L. // *MAGMA.* 2013. Vol. 26, No. 1. P. 37–47.
- Elsadek B., Kratz F. // *J. Control. Release.* 2012. Vol. 157, No. 1. P. 4–28.
- Yang M., Hoppmann S., Chen L., Cheng Z. // *Curr. Pharm. Des.* 2012. Vol. 18, No. 8. P. 1023–31.
- Yhee J. Y., Lee J., Chang H., Lee J., Kwon I. C., Kim K. // *Curr. Pharm. Des.* 2015. Vol. 21, No. 14. P. 1889–1898.
- Maeda H., Fang J., Inutsuka T., Kitamoto Y. // *Int. Immunopharmacol.* 2003. Vol. 3, No. 3. P. 319–328.
- Merlot A. M., Kalinowski D. S., Richardson D. R. // *Front. Physiol.* 2014. Vol. 5. P. 1–7.
- Hauser C. A., Stockler M. R., Tattersall M. H. N. // *Support. Care Cancer.* 2006. Vol. 14, No. 10. P. 999–1011.
- Elzoghby A. O., Samy W. M., Elgindy N. A. // *J. Control. Release.* 2012. Vol. 157, No. 2. P. 168–182.
- Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. Vol. 60, No. 15. P. 1650–1662.
- Andersen I. K., Szymkowiak A., Rasmussen C. E., Hanson L. G., Marstrand J. R., Larsson H. B. W., Hansen L. K. // *Magn. Reson. Med.* 2002. Vol. 48, No. 2. P. 351–361.
- Jung J. H., Choi Y., Jung J., Kim S., Lim H. K., Im K. C., Oh C. H., Park H., Kim K. M., Kim J. G. // *Med. Phys.* 2015. Vol. 42, No. 5. P. 2354–2363.
- Tatsumi M., Yamamoto S., Imaizumi M., Watabe T., Kanai Y., Aoki M., Kato H., Shimosegawa E., Hatazawa J. // *Ann. Nucl. Med.* 2012. Vol. 26, No. 5. P. 444–449.
- Chen Q., Liang C., Wang X., He J., Li Y., Liu Z. // *Biomaterials.* 2014. Vol. 35, No. 34. P. 9355–9362.
- Watcharin W., Schmithals C., Pleli T., Küberle V., Korkusuz H., Huebner F., Zeuzem S., Korf H.W., Vogl T.J., Rittmeyer C., Terfort A., Pliiper A., Gelperina S., Kreuter J. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014. Vol. 87, No. 1. P. 132–141.
- Caravan P. // *Chem. Soc. Rev.* 2006. Vol. 35, No. 6. P. 512–523.
- Adzhami K., Elst L. V., Laurent S., Muller R. N. // *Magn. Reson. Mater. Physics, Biol. Med.* 2001. Vol. 12. P. 92–95.
- Aime S., Barge A., Gianolio E., Pagliarin R., Silengo L., Tei L. // *Ernst Schering Res. Found. Workshop.* 2005. No. 49. P. 99–121.
- Aime S., Botta M., Fasano M., Crich S.G., Terreno E. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 1996. Vol. 1, No. 4. P. 312–319.
- Ali M.M., Woods M., Suh E.H., Kovacs Z., Tircso G., Zhao P., Kodibagkar V. D., Sherry A. D. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. Vol. 12, No. 6. P. 855–865.
- Caravan P., Greenfield M. T., Li X., Sherry A. D. // *Inorg. Chem.* 2001. Vol. 40, No. 26. P. 6580–6587.
- Caravan P., Cloutier N. J., Greenfield M. T., McDermid S. A., Dunham S. U., Bulte J. W., Amedeo Jr. J. C., Looby R. J., Supkowski R. M., Horrocks Jr. W. D., McMurry T. J., Lauffer R. B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. Vol. 124, No. 12. P. 3152–3162.
- Henoumont C., Elst L. V., Laurent S., Muller R. N. // *J. Phys. Chem.* 2010. Vol. 114. P. 3689–3697.
- Henoumont C., Laurent S., Muller R. N., Elst L. V. // *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55, No. 8. P. 4015–4019.
- Henrotte V., Muller R. N., Bartholet A., Elst L. V. // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2007. Vol. 2, No. 5. P. 229–239.

- 31 Elst L. V., Chapelle F., Laurent S., Muller R. N. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2001. Vol. 6, No. 2. P. 196–200.
- 32 Wallace R. A., Haar J. P., Miller D. B., Woulfe S. R., Polta J. A., Galen K. P., Hynes M. R., Adzamlı K. // *Magn. Reson. Med.* 1998. Vol. 40, No. 5. P. 733–739.
- 33 Zhou Q., Henoumont C., Elst L. V., Laurent S., Muller R. N. // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2013. Vol. 8, No. 4. P. 361–365.
- 34 Rohrer M., Bauer H., Mintonovitch J., Requardt M., Weinmann H.-J. // *Invest. Radiol.* 2005. Vol. 40, No. 11. P. 715–724.
- 35 Alford J. K., Rutt B. K., Scholl T. J., Handler W. B., Chronik B. A. // *Magn. Reson. Med.* 2009. Vol. 61, No. 4. P. 796–802.
- 36 Goyen M. // *Vasc. Health Risk Manag.* 2008. Vol. 4, No. 1. P. 1–9.
- 37 Blockley N. P., Jiang L., Gardener A. G., Ludman C. N., Francis S. T., Gowland P. A. // *Magn. Reson. Med.* 2008. Vol. 60, No. 6. P. 1313–1320.
- 38 Laurent S., Elst L. V., Muller R. N. // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2006. Vol. 1, No. 3. P. 128–137.
- 39 Seidl Z., Vymazal J., Mechl M., Goyal M., Herman M., Colosimo C., Pasowicz M., Yeung R., Paraniak-Gieszczyk B., Yemen B., Anzalone N., Citterio A., Schneider G., Bastianello S., Ruscalleda J. // *Am. J. Neuroradiol.* 2012. Vol. 33, No. 6. P. 1050–1058.
- 40 Pintaske J., Martirosian P., Graf H., Erb G., Lodemann K.-P., Claussen C. D., Schick F. // *Invest. Radiol.* 2006. Vol. 41, No. 3. P. 213–21.
- 41 Rumboldt Z., Rowley H. A., Steinberg F., Maldjian J. A., Ruscalleda J., Gustafsson L., Bastianello S. // *J. Magn. Reson. Imaging.* 2009. Vol. 29, No. 4. P. 760–767.
- 42 Boros E., Karimi S., Kenton N., Helm L., Caravan P. // *Inorg. Chem.* 2014. Vol. 53, No. 13. P. 6985–6994.
- 43 Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P. // *IUBMB Life.* 2005. Vol. 57, No. 12. P. 787–796.
- 44 Kawel N., Santini F., Haas T., Froehlich J.M., Bremerich J. // *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2012. Vol. 14, No. 1. P. 71.
- 45 Aime S., Gianolio E., Longo D., Pagliarin R., Lovazzano C., Sisti M. // *ChemBioChem.* 2005. Vol. 6, No. 5. P. 818–820.
- 46 Elst L. V., Maton F., Laurent S., Seghi F., Chapelle F., Muller R. N. // *Magn. Reson. Med.* 1997. Vol. 38, No. 4. P. 604–614.
- 47 Henrotte V., Elst L. V., Laurent S., Muller R. N. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007. Vol. 12, No. 6. P. 929–937.
- 48 Ou M.-H., Tu C.-H., Tsai S.-C., Lee W.-T., Liu G.-C., Wang Y.-M. // *Inorg. Chem.* 2006. Vol. 45, No. 1. P. 244–254.
- 49 Longo D.L., Arena F., Consolino L., Minazzi P., Geninatti-Crich S., Giovenzana G.B., Aime S. // *Biomaterials.* 2016. Vol. 75. P. 47–57.
- 50 Chan K. W. Y., Wong W. T. // *Coord. Chem. Rev.* 2007. Vol. 251, No. 17–20. P. 2428–2451.
- 51 Zhang Y., Zou T., Guan M., Zhen M., Chen D., Guan X., Han H., Wang C., Shu C. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016. Vol. 8, No. 18. P. 11246–11254.
- 52 Cheng W., Ganesh T., Martinez F., Lam J., Yoon H., Macgregor R. B., Scholl T. J., Cheng H.-L. M., Zhang X. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014. Vol. 19, No. 2. P. 229–235.
- 53 Hu D., Sheng Z., Gao G., Siu F., Liu C., Wan Q., Gong P., Zheng H., Ma Y., Cai L. // *Biomaterials.* 2016. Vol. 93. P. 10–19.
- 54 Mustafi D., Peng B., Foxley S., Makinen M.W., Karczmar G.S., Zamora M., Ejnić J., Martin H. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009. Vol. 14, No. 8. P. 1187–1197.
- 55 Sudlow G., Birkett D. J., Wade D. N. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1975. Vol. 2, No. 2. P. 129–140.
- 56 Ghuman J., Zunszain P. A., Petitpas I., Bhattacharya A. A., Otagiri M., Curry S. // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 353, No. 1. P. 38–52.
- 57 Wanwimolruk S., Birkett D. J., Brooks P. M. // *Mol. Pharmacol.* 1983. Vol. 24, No. 3. P. 458–63.
- 58 Irikura M., Takadate A., Goya S., Otagiri M. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 1991. Vol. 39, No. 3. P. 724–728.
- 59 Wang Y., Yu H., Shi X., Luo Z., Lin D., Huang M. // *J. Biol. Chem.* 2013. Vol. 288, No. 22. P. 15980–15987.
- 60 Kragh-Hansen U., Chuang V. T. G., Otagiri M. // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25, No. 6. P. 695–704.
- 61 Gianolio E., Cabella C., Colombo S. S., Valbusa G., Arena F., Maiocchi A., Miragoli L., Tedoldi F., Uggeri F., Visigalli M., Bardini P., Aime S. // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2014. Vol. 19. P. 715–726.
- 62 Fanali G., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenzi P. // *Mol. Aspects Med.* 2012. Vol. 33, No. 3. P. 209–290.
- 63 Gossmann A., Helbich T. H., Kuriyama N., Ostrowitzki S., Roberts T. P. L., Shames D. M., van Bruggen N., Wendland M. F., Israel M. A., Brasch R. C. // *J. Magn. Reson. Imaging.* 2002. Vol. 15, No. 3. P. 233–240.
- 64 Gagner J.-P., Law M., Fischer I., Newcomb E. W., Zagzag D. // *Brain Pathol.* 2005. Vol. 15, No. 4. P. 342–363.
- 65 Ogan M. D., Schmiedel U., Moseley M. E., Grodd W., Paajanen H., Brasch R. C. // *Invest. Radiol.* 1987. Vol. 22, No. 8. P. 665–671.
- 66 Yamashita T., Takahara T., Kwee T.C., Kawada S., Horie T., Inomoto C., Hashida K., Yamamuro H., Myojin K., Luijten P. R., Imai Y. // *Jpn. J. Radiol.* 2011. Vol. 29, No. 1. P. 25–32.
- 67 Essig M., Rohrer M., Giesel F., Tüttenberg J., Weber M.-A., Michaely H., Gerigk L., Voth M. // *Eur. Radiol.* 2010. Vol. 20, No. 1. P. 218–226.
- 68 Lambregts D. M. J., Beets G. L., Maas M., Kessels A. G. H., Bakers F. C. H., Cappendijk V. C., Engelen S. M. E., Lahaye M. J., de Brumme A. P., Lammering G., Leiner T., Verwoerd J. L., Wildberger J. E., Beets-Tan R. G. H. // *Ann. Surg.* 2011. Vol. 253, No. 3. P. 539–545.
- 69 Wild J. M., Woodrow J., van Beek E. J. R., Misselwitz B., Johnson R. // *Contrast Media Mol. Imaging.* 2009. Vol. 5, No. 1. P. 39–43.
- 70 Kimura J., Ishiguchi T., Matsuda J., Ohno R., Nakamura A., Kamei S., Ohno K., Kawamura T., Murata K. // *Radiat. Med.* 2005. Vol. 23, No. 5. P. 322–326.
- 71 Gao F.-P., Lin Y.-X., Li L.-L., Liu Y., Mayerhöffer U., Spent P., Su J.-G., Li J.-Y., Würthner F., Wang H. // *Biomaterials.* 2014. Vol. 35, No. 3. P. 1004–1014.
- 72 Lin Y.-J., Koretsky A. P. // *Magn. Reson. Med.* 1997. Vol. 38. P. 378–388.
- 73 Silva A. C., Lee J. H., Aoki I., Koretsky A. P. // *NMR Biomed.* 2004. Vol. 17, No. 8. P. 532–543.
- 74 Scholl T. J., Cheng H. M., Zhang X. // *J. Med. Chem.* 2014. Vol. 57, No. 2. P. 516–520.
- 75 Jung K. H., Kim H. K., Park J. A., Nam K. S., Lee G. H., Chang Y., Kim T. J. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2012. Vol. 3, No. 12. P. 1003–1007.
- 76 Avedano S., Tei L., Lombardi A., Giovenzana G. B., Aime S., Longo D., Botta M. // *Chem. Commun.* 2007. No. 45. P. 4726–4728.
- 77 Kim B. H., Lee N., Kim H., An K., Park Y. II, Choi Y., Shin K., Lee Y., Kwon S. G., Na H. Bin, Park J.-G., Ahn T.-Y., Kim Y.-W., Moon W. K., Choi S. H., Hyeon T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133, No. 32. P. 12624–12631.
- 78 Yen S. K., Padmanabhan P., Selvan S. T. // *Theranostics.* 2013. Vol. 3, No. 12. P. 986–1003.

- 79 Lu C., Li J., Xu K., Yang C., Wang J., Han C., Liu X. // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, No. 7. P. e101898.
- 80 Ma X., Gong A., Chen B., Zheng J., Chen T., Shen Z., Wu A. // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2015. Vol. 126. P. 44–49.
- 81 Li H., Yan K., Shang Y., Shrestha L., Liao R., Liu F., Li P., Xu H., Xu Z., Chu P. K. // *Acta Biomater.* 2015. Vol. 15. P. 117–126.
- 82 Comes Franchini M., Baldi G., Bonacchi D., Gentili D., Giudetti G., Lascialfari A., Corti M., Marmorato P., Ponti J., Micotti E., Guerrini U., Sironi L., Gelosa P., Ravagli C., Ricci A. // *Small*. 2010. Vol. 6, No. 3. P. 366–370.
- 83 Zhang M., Cao Y., Wang L., Ma Y., Tu X., Zhang Z. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. Vol. 7, No. 8. P. 4650–4658.
- 84 Peng Z. G., Hidajat K., Uddin M. S. // *J. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 271, No. 2. P. 277–283.
- 85 Bychkova A. V., Rosenfeld M. A., Leonova V. B., Sorokina O. N., Lomakin S. M., Kovarski A. L. // *Colloid J.* 2013. Vol. 75, No. 1. P. 7–13.
- 86 Бычкова А. В., Сорокина О. Н., Розенфельд М. А., Коварский А. Л. // *Усп. химии*. 2012. Vol. 81, No. 11. P. 1026–1050.
- 87 Quan Q., Xie J., Gao H., Yang M., Zhang F., Liu G., Lin X., Wang A., Eden H.S., Lee S., Zhang G., Chen X. // *Mol. Pharm.* 2011. Vol. 8, No. 5. P. 1669–1676.
- 88 Xie J., Wang J., Niu G., Huang J., Chen K., Li X., Chen X. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2010. Vol. 46, No. 3. P. 433–435.
- 89 Ruiz-Cabello J., Barnett B. P., Bottomley P. A., Bulte J. W. M. // *NMR Biomed.* 2011. Vol. 24, No. 2. P. 114–129.
- 90 Cobb S. L., Murphy C. D. // *J. Fluor. Chem.* 2009. Vol. 130, No. 2. P. 132–143.
- 91 Chubarov A. S., Zakharova O. D., Koval O. A., Romaschenko A. V., Akulov A. E., Zavjalov E. L., Razumov I. A., Koptug I. V., Knorre D. G., Godovikova T. S. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. Vol. 23, No. 21. P. 6943–6954.
- 92 Mehta V. D., Kulkarni P. V., Mason R. P., Constantinescu A., Antich P. P. // *Bioconjug. Chem.* 1994. Vol. 5, No. 3. P. 257–261.
- 93 Chubarov A. S., Shakirov M. M., Koptug I. V., Sagdeev R. Z., Knorre D. G., Godovikova T. S. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. Vol. 21, No. 13. P. 4050–4053.
- 94 Doura T., Hata R., Nonaka H., Sugihara F., Yoshioka Y., Sando S. // *Chem. Commun. (Camb)*. 2013. Vol. 49, No. 97. P. 11421–11423.
- 95 Cao W., Lu X., Cheng Z. // *Curr. Pharm. Des.* 2015. Vol. 21, No. 14. P. 1908–15.
- 96 Liu F., Mu J., Xing B. // *Curr. Pharm. Des.* 2015. Vol. 21, No. 14. P. 1866–1888.

