

## МИЦЕЛЛЯРНЫЕ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫХ $\alpha$ -ФЕТОПРОТЕИНОМ АМФИФИЛЬНЫХ БЛОК-СОПОЛИМЕРОВ, СОДЕРЖАЩИХ ГАДОЛИНИЙ И КУРКУМИН

Н. В. Позднякова<sup>1</sup>✉, Е. Ю. Григорьева<sup>1</sup>, А. Б. Шевелев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии, Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина, Москва

<sup>2</sup> Лаборатория процессов фотосенсибилизации, Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва

Предложен метод получения мицеллярных композиций куркумина и ионов гадолиния на основе трехблочных амфифильных сополимеров полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля Pluronic F-127 и Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, США), поверхность которых функционализована рекомбинантным производным  $\alpha$  фетопротеина человека. Методом динамического светорассеяния определили размер наночастиц, и он составил в среднем 50–100 нм. Композиции отличались устойчивостью: в течение 10 суток хранения при +4 °С характеристики мицелл изменялись в пределах стандартной ошибки измерения для выбранных аналитических методов. Предварительные эксперименты *in vivo* на мышах показали отсутствие явно выраженной токсичности композиций при максимально возможной концентрации гадолиния, что делает возможным их дальнейшее использование для визуализации опухолевых тканей *in vivo*.

**Ключевые слова:** визуализация, контрастные средства, гадолиний, куркумин, мицеллярная композиция, Pluronic F-127, Pluronic P-123

**Финансирование:** исследование поддержано Министерством образования и науки Российской Федерации (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.607.21.0133 от 27.10.2015, уникальный идентификатор RFMEFI60715X0133).

✉ **Для корреспонденции:** Позднякова Наталья Владимировна  
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24; natpo2002@mail.ru

Статья получена: 23.06.2016 Статья принята в печать: 27.06.2016

## GADOLINIUM- AND CURCUMIN-LOADED MICELLES BASED ON $\alpha$ -FETOPROTEIN FUNCTIONALIZED AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMERS

Pozdniakova NV<sup>1</sup>✉, Grigorieva EYu<sup>1</sup>, Shevelev AB<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Radionuclide and Beam Technologies in Experimental Oncology, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Light Sensitization, N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia

This article describes a method of obtaining curcumin- and gadolinium-loaded micelles based on triblock amphiphilic polyethylene glycol and polypropylene glycol copolymers Pluronic F-127 and Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, USA) superficially functionalized with recombinant human  $\alpha$ -fetoprotein. The size of nanoparticles was measured using dynamic light scattering and amounted to an average of 50 to 100 nm. The micelles were stable: stored at +4 °C for 10 days, they exhibited no changes in their properties that would not fall within the standard error of measurement for the methods used for the analysis. Preliminary *in vivo* experiments conducted on mice showed no conspicuous toxicity of micelles with the maximum possible concentration of gadolinium, which enables their use in tumor tissue imaging *in vivo*.

**Keywords:** imaging, contrast agents, gadolinium, curcumin, micelles, Pluronic F-127, Pluronic P-123

**Funding:** the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant Agreement no.14.607.21.0133 dated October 27, 2015, Project ID RFMEFI60715X0133).

✉ **Correspondence should be addressed:** Natalia Pozdniakova  
Kashirskoe shosse, d. 24, Moscow, Russia, 115478; natpo2002@mail.ru

Received: 23.06.2016 Accepted: 27.06.2016

Ион гадолиния ( $Gd^{3+}$ ) обладает уникальными парамагнитными свойствами, важными для медицинской диагностики (магнитно-резонансная томография, МРТ) и лечения (поражение опухолевых клеток вторичным тепловым излучением) [1]. Время релаксации электронно-спиновой решетки контрастирующих агентов на основе  $Gd^{3+}$  T1 составляет около 0,1 нсек, что на порядок меньше времени релаксации протонов в воде [2]. Поскольку сам по себе  $Gd^{3+}$  токсичен даже в низких концентрациях, достаточных для контрастирования, его используют в хелатированной форме с комплексообразователями, которые обладают высокими константами связывания, например диэтилен-триаминопентауксусной кислотой [3]. Наночастицы, содержащие хелатированную форму  $Gd^{3+}$ , рутинно применяют для прижизненного контрастирования при выполнении МРТ различных тканей: структур мозга [4], сосудистых плексусов [5], миокарда и коронарных сосудов [6].

В работе Kang и соавт. [7] описан метод получения наночастиц оксида гадолиния  $Gd@SiO_2$ -DO3A и  $Gd@SiO_2$ -DO2A-BTA размером 50–60 нм. Наночастицы изготавливали из тетраэтилоксисилката (TEOS) и (3-аминопропил)триэтоксисилана (APTES) с последующей функционализацией аминопропилсилановых групп 1,4,7,10-тетраазациклодекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислотой (DOTA) или 1,4,7,10-тетраазациклодекан-1,4,7-трисукусной кислотой, конъюгированной с бензотиазолом (DO3A-BTA). Полученные наночастицы отличались высокой растворимостью и стабильностью коллоидного раствора. Их релаксивность  $r1$  оказалась намного выше, чем у низкомолекулярных контрастных веществ, а соотношение  $r2/r1$  [8] приближалось к 1, что позволяет использовать их в МРТ [9]. Исследование биораспределения наночастиц показало, что  $Gd@SiO_2$ -DO2A-BTA выводятся из организма преимущественно с желчью и мочой. Они также накапливались в опухолевых клетках и оказались пригодны для уничтожения *in vivo* таких перевиваемых клеточных линий, как SK-HEP-1, MDA-MB-231, HeLa и Hep 3В. Хотя имеются сообщения о кумулятивной токсичности наноструктурированных контрастных веществ на основе гадолиния [10, 11], в частности, нефротоксичности [12], их применение в МРТ-диагностике различных заболеваний, а также перспектива использования в терапии опухолей представляют научный интерес, что подтверждается публикациями на эту тему [13].

Целью исследования являлась разработка технологии получения низкотоксичной композиции, содержащей  $Gd^{3+}$ , для визуализации опухолевых тканей *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для обеспечения низкой токсичности композиции, предотвращения ее неспецифического связывания с нормальными тканями и обеспечения тропности к опухолевым клеткам были разработаны три решения.

Во-первых, в качестве комплексообразователя для ионов гадолиния использовали нетоксичное природное соединение — куркумин (рис. 1), содержащееся в большом количестве в корневищах индийского шафрана *Curcuma longa* и обладающее важными в контексте исследования характеристиками [14]: способностью вступать в устойчивые координационные связи с переходными металлами [15]; отсутствием токсичности в используемых концентрациях; гидрофобностью, что важно для включения комплексных соединений во внутреннюю область мицеллы

и обеспечения устойчивости мицелл в водных растворах.

Во-вторых, получили мицеллярную форму композиции. В настоящее время технология изготовления мицеллярных форм препаратов используется в биотехнологии [16] и имеет перспективу применения в фармацевтике [17]. Мицеллярные формы обладают рядом преимуществ: в водных растворах они самоорганизуются в структуры с внутренней гидрофобной частью и наружной гидрофильной сферой, что позволяет включать внутрь плохо растворимые вещества и таким образом защищать последние от инактивации в биологических средах; имеют небольшой размер (менее 100 нм); циркулируют в крови долгое время; просты в изготовлении [18]. К преимуществам мицелл на основе блок-сополимеров (плюроники) можно отнести низкую цитотоксичность и слабую иммуногенность, а также простоту модификации поверхности функциональными группами для придания различных свойств. В нашей работе в качестве мицеллообразующих веществ были использованы амфифильные трехблочные сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля Pluronic F-127 и Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, США) (рис. 2).

В-третьих, отработали технологию придания функциональности (таргетности) мицеллам путем иммобилизации на их поверхности рекомбинантного векторного белка — фрагмента  $\alpha$  фетопротейна человека, обладающего сродством к опухолям многих типов [19].

В работе использовали следующие реагенты (все — производства Sigma-Aldrich, США): гадолиния нитрат (III) шестиводный, трехблочные сополимеры Pluronic F-127 и Pluronic P-123, триэтиламин, куркумин, 1,1'-карбонилдимидазол, N-гидроксисукцинимид, 2,4,6-тринитробензолсульфоновую кислоту, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, метанол, диметилформамид, этаноламин, кобальта тиоцианат, бария гидроксид. Процедура получения векторного белка на основе  $\alpha$ -фетопротейна человека описана в работе [19].

### Получение комплексов куркумина с ионами гадолиния

Комплексы формировали в органическом растворителе тетрагидрофуране при смешивании нитрата гадолиния, куркумина и триэтиламина в молярном соотношении ~ 3 : 1 : 1 с нагреванием при 50 °C в течение 30 мин с последующим удалением триэтиламина и растворителя в роторном испарителе. Более подробный протокол: 100 мкл 0,5 М

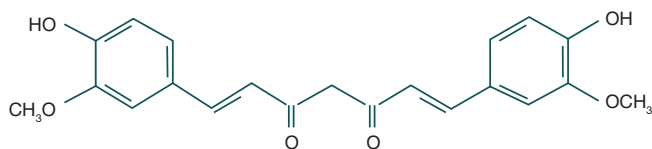


Рис. 1. Структурная формула куркумина

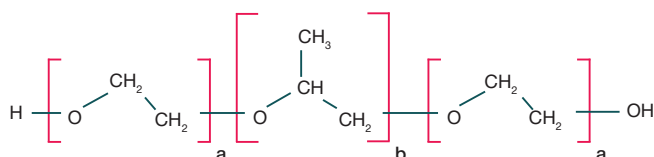


Рис. 2. Структура амфифильных трехблочных сополимеров Pluronic F-127 и Pluronic P-123 (Sigma-Aldrich, США), где а — число гидрофильных мономеров, b — число гидрофобных мономеров. Формула а-б-а для Pluronic F-127 — 98-67-98, для Pluronic P-123 — 20-70-20

раствора куркумина в тетрагидрофуране смешивали с 300 мкл 0,5 М раствора нитрата гадолиния в тетрагидрофуране; затем при интенсивном перемешивании добавляли по каплям 100 мкл 0,5 М раствора триэтиламина в метаноле в течение 1–2 мин; смесь прогревали при перемешивании при 50 °С в течение 30 мин; растворители и триэтиламин удаляли из раствора с помощью роторного испарителя при 50 °С; осадок промывали метанолом и высушивали на воздухе.

Качественный анализ образования комплекса  $Gd^{3+}$  проводили на спектрофотометре Cary 50 Scan UV-Vis (Agilent Technologies, США) в диапазоне 300–650 нм в одноразовой кювете с длиной пути 1 см (Sigma-Aldrich, кат. № Z330418). Аликвоту комплекса массой от одного до нескольких мг отбирали шпателем в сухом виде, получали маточный раствор в диметилсульфоксиде (ДМСО), который затем разбавляли ДМСО до получения оптической плотности при 450 нм от 0,5 до 1,5. Концентрацию комплекса оценивали по высоте пика при 455 нм, который отсутствует у свободного куркумина. Для определения величины этого пика [20] из полученного спектра реакционной смеси вычитали спектр раствора свободного куркумина в ДМСО, взятого в той же концентрации, что указана выше.

Получение модифицированного сополимера Pluronic F-127 с концевыми NHS-группами для иммобилизации векторного белка на поверхности мицелл

Модификацию одного из сополимеров (Pluronic F 127) проводили в диметилформамиде (ДМФА) в два этапа. Сначала активировали концевые гидроксильные группы карбонилдиимидазолом (CDIz), затем проводили реакцию с N-гидроксисукцинимидом (NHS) (рис. 3). Более подробный протокол: 204 мг Pluronic F 127, 19 мг NHS и 26 мг CDIz смешивали в сухом виде и доводили объем реакционной смеси до 500 мкл с помощью ДМФА, перемешивали в течение 1 ч при 37 °С до прекращения выделения пузырьков газообразного  $CO_2$ ; избыток CDIz удаляли, добавляя в реакционную смесь 50 мкл воды; после гидролиза избытка CDIz модифицированный сополимер экстрагировали несколько раз диэтиловым эфиром; осадок высушивали на воздухе.

Количество концевых NHS групп в модифицированном Pluronic F 127 определяли реакцией с избытком этаноламина в 10 мМ боратном буфере (pH 8,5) с последующим титрованием не прореагировавших аминогрупп 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS), как описано в работе [21].

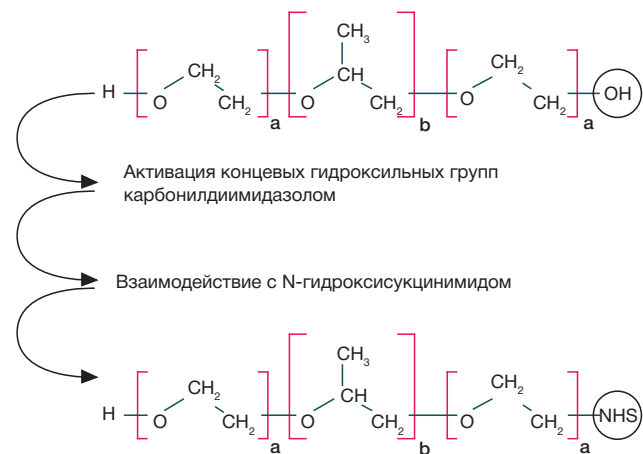


Рис. 3. Принципиальная химическая схема получения модифицированного Pluronic F-127

Получение мицеллярных композиций

Мицеллярные системы различного состава на основе модифицированного сополимера получали по следующей схеме. Навески комплекса куркумин-гадолиний и плюроники растворяли в тетрагидрофуране и смешивали. Количество и соотношение компонентов в разных композициях варьировали (таблица). Затем раствор помещали в колбу роторного испарителя и удаляли органический растворитель при 50 °С при вращении роторной колбы. Добавляли в колбу дистиллированную воду и интенсивно перемешивали в течение 15 мин, после чего центрифугировали, отбирали супернатант и диализовали против фосфатно-солевого буфера (pH 7,5) при +4 °С в течение 24 ч.

Эффективность включения основного вещества в мицеллы (%) рассчитывали по формуле

$$\Theta_{\text{вкл}} = \frac{M_{\text{вкл}} \times 100}{M_{\text{исх}}},$$

где  $M_{\text{вкл}}$  — масса включенного комплекса куркумин-гадолиний,  $M_{\text{исх}}$  — исходная масса комплекса куркумин-гадолиний.

Степень нагрузки (масс.%) рассчитывали по формуле

$$C_{\text{нгр}} = \frac{M_{\text{вкл}} \times 100}{M_{\text{вкл}} + M_{\text{пол}}},$$

где  $M_{\text{пол}}$  — масса сополимера.

Химическая модификация поверхности мицелл

Конъюгацию мицелл с белком осуществляли, смешивая мицеллярный раствор на основе модифицированного полимера с раствором белка при молярном избытке сополимера (NHS групп) по отношению к белку. В качестве функционализирующего вещества использовали рекомбинантный модифицированный белок, соответствующий изолированному третьему домену  $\alpha$  фетопротейна человека [19]. Подробный протокол: 1 мл мицеллярного раствора смешивали с 200 мкл раствора белка с концентрацией 3 мг/мл (0,1 мМ) в фосфатно-солевом буфере (pH 8,0) с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре; для блокирования избыточных реакционноспособных NHS групп по окончании конъюгации добавляли избыток этаноламина до конечной концентрации в растворе 10 мМ с дополнительной инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре и последующим диализом против фосфатно-солевого буфера (pH 7,2) при +4 °С в течение суток. Полученную композицию хранили в течение недели при +4 °С.

Качественно присутствие белка в полученной мицеллярной композиции оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующей окраской в течение 10 мин в 5 % водном растворе йодида бария [22].

Определение размера мицелл

Средний размер мицелл и их распределение по размеру измеряли методом динамического светорассеяния на приборе ZetasizerNano ZS (Malvern Ltd., Великобритания) в термостатируемых пластиковых микрокюветах ZEN0040. Измерение проводили с помощью гелий-неонового лазера с длиной волны 633 нм мощностью 4 мВт при 25 °С. Образцы перед измерением разводили деионизованной водой в 10 раз. Измерения для каждого образца проводили трижды, вычисляя среднее квадратичное отклонение.

Определение содержания гадолиния в мицеллах

Измерения проводили на рентгенофлуоресцентном анализаторе «Х-арт М» («Комита», Россия). Количественное определение производили относительным методом путем сравнения сигнала от исследуемых проб с сигналами от растворов сравнения с известными концентрациями гадолиния.

Определение содержания куркумина в мицеллах

Содержание куркумина оценивали по поглощению при длине волны 430 нм по сравнению с калибровочными растворами известной концентрации на спектрофотометре Cary 50 Scan UV-Vis в одноразовой кювете (Sigma-Aldrich, кат. № Z330418).

Содержание сухого вещества в полимерной форме

Определяли с помощью метода, описанного в работе [23] с модификациями. Приготовление реагента: смешивали 0,2 мл 2,6 М водного раствора тиоцианата кобальта (CoSCN) и 0,8 мл 0,8 М водного раствора гидроксида бария. Измерение: смешивали 10 мкл аликвоты раствора, содержащего плуроник, и 10 мкл реагента, интенсивно перемешивали, центрифугировали, тщательно удаляли супернатант, подсушивали на воздухе, добавляли к осадку 100 мкл ДМСО и 5 мкл 5 М HCl. Измеряли поглощение при 630 нм на приборе Titertek Multiskan Plus (LabX, Канада) в 96-луночных планшетах. Параллельно проводили измерения калибровочных растворов с известной концентрацией вещества и вычисляли концентрацию в анализируемом образце с помощью калибровочной кривой.

Определение общего белка

Содержание белка оценивали с помощью модифицированного метода Лоури с применением бидинхониновой кислоты (Sigma-Aldrich). В качестве калибровочного раствора взяли стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина [24].

Оценка токсичности мицеллярной композиции комплекса куркумин-гадолиний

Для подтверждения возможности дальнейших исследований *in vivo* был проведен эксперимент по исследованию переносимости мицеллярной композиции животными. Использовали 10 самок мышей линии C57/black средней массой 25 г. Характеристики композиции при введении животным: Gd<sup>3+</sup> 10 mM, куркумин 10 mM, Pluronic F-127 5 mM, диаметр мицелл — 20 нм, буфер фосфатно-солевой (pH 7,0). Композицию вводили однократно в хвостовую вену в объеме 200 мкл. При выборе дозы стремились привести концентрацию плуроника в составе мицелл к той, которая оказалась оптимальной для доставки цитостатика «Доцетаксел» (Docetaxel) в клетки опухоли легких *in vivo* на мышиной модели [25]. Мышей наблюдали ежедневно в течение 2 мес., после чего их вывели из эксперимента и исследовали ткани гистологическими и патологоанатомическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакцию комплексообразования контролировали по изменению спектра, в частности, появлению дополнительного пика при 455 нм [20] (рис. 5).

Соотношение сополимер : NHS в модифицированном плуронике F-127 составило около 1 : 1. Всего получили около 100 мг в сухом виде модифицированного сополимера, содержащего одну NHS группу на молекулу.

Использованный метод получения мицеллярных композиций характеризовался эффективностью включения основного вещества в мицеллы в диапазоне 40–87 % и степенью нагрузки, равной 10–25 масс.%. В результате были получены мицеллярные растворы с различным содержанием основных компонентов (таблица).

Соотношение куркумина и ионов гадолиния в полученных композициях предполагает наличие вакантных валентностей у атома гадолиния, которые предположительно заняты молекулами воды, что важно для сохранения контрастных свойств при МРТ [26]. При оценке стабильности

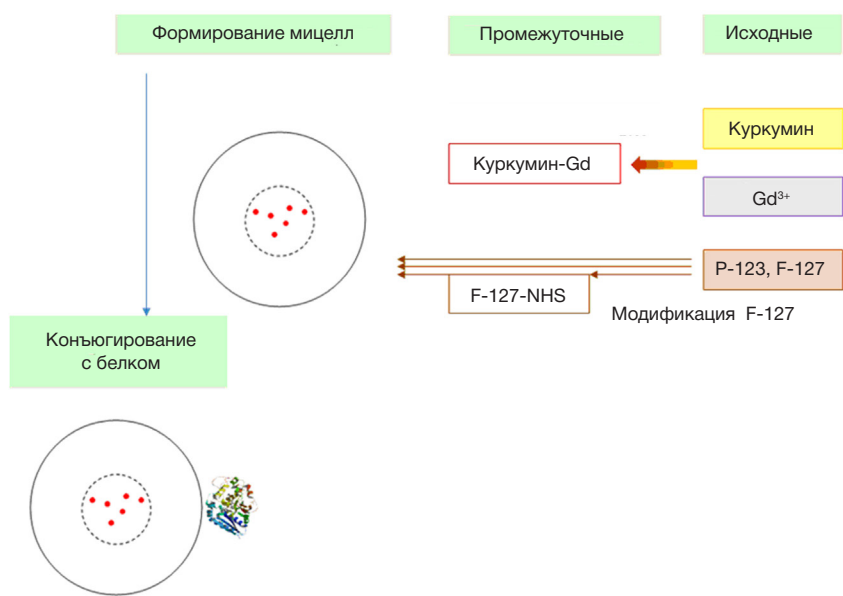


Рис. 4. Общая схема получения функционализированных мицеллярных композиций, содержащих гадолиний

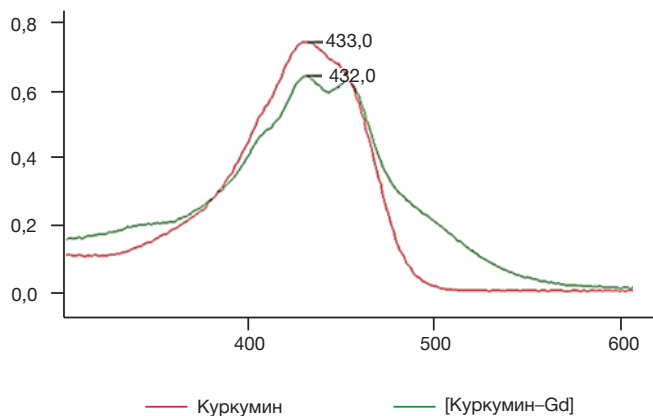


Рис. 5. Спектры куркумина и его комплекса с Gd<sup>3+</sup>

композиций необходимо отметить, что измерения их размеров методом динамического светорассеяния, а также спектра поглощения в видимой области, характерного для комплекса куркумина с ионами Gd<sup>3+</sup>, было воспроизведено через 10 дней хранения при температуре +4 °С. При этом все показатели оказались неизменными: отличия не превышали стандартной ошибки измерения первоначального эксперимента.

Размер полученных мицелл приближался к 100 нм, не превышая этой величины, что позволяет циркулировать в кровотоке долгое время, избегая захвата портальной системой печени и ретикуло-эндотелиальной системой [27]. Это свойство важно для обеспечения адресности доставки мицелл в опухолевые ткани за счет иммобилизованного на поверхности функционального белкового адреса [28].

В ходе эксперимента на животных видимых проявлений токсичности мицеллярной композиции не наблюдали. В частности, не были выявлены симптомы отравления тяжелыми металлами [1] — коллаптоидные реакции, кро-

вотечения, сохранялся аппетит, активное движение, отсутствовали патологическая жажда и светобоязнь в течение всего времени наблюдения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работах [14, 29] доказана возможность использования куркумина в качестве комплексона, подавляющего токсичность ионов гадолиния *in vivo*. Patil и соавт. [29] использовали данные комплексы для контрастирования амилоидных бляшек при диагностике болезни Альцгеймера. При этом исследователи использовали естественное средство куркумина к β амилоиду. В нашей работе впервые показана возможность инкапсуляции гидрофобных комплексов куркумина во внутреннем пространстве мицелл, образованных плурониками (блок-сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля). Благодаря выявленной устойчивости таких мицелл в водных средах собственные фармакокинетические характеристики куркумина перестают играть ключевую роль в распределении ионов Gd<sup>3+</sup> в организме, тогда как высокая стабильность хелатированного комплекса сохраняется.

В работе [7] была поставлена задача, практически идентичная нашей, однако она была решена альтернативным способом: за счет включения ионов Gd<sup>3+</sup> в наночастицы кремния. Это показывает практическую значимость самой задачи. При этом предлагаемое нами решение имеет важное технологическое преимущество перед описанным в работе [7]: оно может быть реализовано в биохимической лаборатории с применением коммерческих реагентов и общедоступного лабораторного оборудования с выходом, близким к 100 %, без привлечения профессиональных химиков-синтетиков. Предложенная технология имеет преимущество при масштабировании: она позволяет получать наноразмерные частицы, содержащие ионы Gd<sup>3+</sup>, как

Состав полученных мицеллярных композиций

№	Описание	Концентрация компонентов	Средний диаметр мицеллы, нм
1	Gd <sup>3+</sup> – куркумин – P-123	Gd <sup>3+</sup> – 12 мМ Куркумин – 12 мМ P-123 – 3 мМ	57,0 ± 1,2
2	Gd <sup>3+</sup> – куркумин – F-127	Gd <sup>3+</sup> – 10 мМ Куркумин – 10 мМ F-127 – 5 мМ	20,0 ± 0,9
3	Gd <sup>3+</sup> – куркумин – P-123 – F-127	Gd <sup>3+</sup> – 9 мМ Куркумин – 21 мМ P-123 – 2,7 мМ F-127 – 2,7 мМ	83,0 ± 1,4
4	Gd <sup>3+</sup> – куркумин – F-127 – белок	Gd <sup>3+</sup> – 57 мМ Куркумин – 30 мМ F-127 – 4 мМ Белок – 0,7 мг/мл	32,0 ± 2,2
5	Gd <sup>3+</sup> – куркумин – P-123 – F-127 – белок	Gd <sup>3+</sup> – 18 мМ Куркумин – 8,4 мМ P-123 – 2,5 мМ F-127 – 2,5 мМ Белок – 1,1 мг/мл	69,0 ± 1,3

Примечание: P-123 — Pluronic P-123, F-127 — Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich, CLIA).



в минимально необходимых для эксперимента объемах, так и в промышленных объемах. При этом, несмотря на простоту технологии, абсолютные размеры частиц, разброс размеров и содержание в них основного вещества практически не отличаются от показателей, рекомендованных в работе [8]. Этот результат достигнут, в первую очередь, благодаря оптимальным свойствам природного комплекса куркумина в качестве хелатора ионов  $Gd^{3+}$ .

Важным преимуществом мицелл перед твердыми наночастицами оксида кремния является также способность долгое время циркулировать в кровотоке, не подвергаясь элиминации производными моноцитов печени [9]. В то же время, по данным литературы мицеллы хорошо задерживаются сосудистой сетью опухолей, которая характеризуется большим числом разрывов и дефектов поверхности [30].

Дополнительное усиление адресности доставки мицелл, содержащих ионы  $Gd^{3+}$ , может быть достигнуто за счет использования различных адресных функциональных групп. Домен 3  $\alpha$ -фетопротейна, использованный в настоящей работе, имеет высокое сродство к рецепторам опухолей многих типов, так как, подобно альбумину, используется ими в качестве питательного субстрата [19]. Предложенная технология позволяет эффективно имобилизовать на поверхности мицелл любые белковые, пептидные и другие адресные группировки.

## ВЫВОДЫ

Показано, что комплексы куркумина с ионами гадолиния эффективно включаются и прочно удерживаются мицеллами, образованными блок-сополимерами полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля (плюронидами): в течение 10 суток хранения при  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  характеристики мицелл изменяются в пределах стандартной ошибки измерения выбранных аналитических методов. Мицеллы имеют стандартный размер 50–100 нм (в зависимости от соотношения компонентов), что обеспечивает их устойчивость в кровотоке долгое время.

Предложен метод модификации поверхности мицелл плюронидами, содержащих комплексы куркумина и  $Gd^{3+}$ , адресными молекулами, в частности, доменом 3  $\alpha$ -фетопротейна человека.

Благодаря простоте, высокой эффективности и возможности работы с микроколичествами компонентов предложенный метод предназначен, в первую очередь, для решения исследовательских задач по изучению распределения макромолекул и их комплексов *in vivo*. Он может быть использован при скрининге функциональных адресных группировок, обеспечивающих доставку биомолекул и их комплексов в ткани и клетки различных типов, включая опухолевые.

## Литература

- Goischke HK. MRI with gadolinium-based contrast agents: practical help to ensure patient safety. *J Am Coll Radiol*. 2016 Jun 18. pii: S1546-1440(16)30315-5.
- Dinger SC, Fridjoh P, Rubin DM. Thermal Excitation of Gadolinium-Based Contrast Agents Using Spin Resonance. *PLoS One*. 2016 Jun 24; 11 (6): e0158194.
- Saito K, Yoshimura N, Shiota N, Saguchi T, Sugimoto K., Tokuyue K. Distinguishing liver haemangiomas from metastatic tumours using gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced diffusion-weighted imaging at 1.5T MRI. *J Med Imaging Radiat Oncol*. 2016 Jun 21. doi: 10.1111/1754-9485.12487. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27324436.
- Hu HH, Pokorney A, Towbin RB, Miller JH. Increased signal intensities in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evidence in children undergoing multiple gadolinium MRI exams. *Pediatr Radiol*. 2016 Jun 9. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27282825.
- Schnell S, Wu C, Ansari SA. Four-dimensional MRI flow examinations in cerebral and extracerebral vessels — ready for clinical routine? *Curr Opin Neurol*. 2016 Aug; 29 (4): 419–28. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27262148.
- Swoboda PP, McDiarmid AK, Erhayiem B, Haaf P, Kidambi A, Fent GJ, et al. A novel and practical screening tool for the detection of silent myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jun 14. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27300573.
- Kang MK, Lee GH, Jung KH, Jung JC, Kim HK, Kim YH, et al. Gadolinium Nanoparticles Conjugated with Therapeutic Bifunctional Chelate as a Potential T1 Theranostic Magnetic Resonance Imaging Agent. *J Biomed Nanotechnol*. 2016 May; 12 (5): 894–908.
- De León-Rodríguez LM, Martins AF, Pinho MC, Rofsky NM, Sherry AD. Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. *J Magn Reson Imaging*. 2015 Sep; 42 (3): 545–65.
- Yang CT, Chuang KH.  $Gd(III)$  chelates for MRI contrast agents: from high relaxivity to “smart”, from blood pool to blood–brain barrier permeable. *Medchemcomm*. 2012; 3: 552–65.
- Maximova N, Gregori M, Zennaro F, Sonzogni A, Simeone R, Zanon D. Hepatic gadolinium deposition and reversibility after contrast agent-enhanced MR imaging of pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Radiology*. 2016 Jun 8: 152846. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27276243.
- Vorobiov M, Basok A, Tovbin D, Shnaider A, Katchko L, Rogachev B. Iron-mobilizing properties of the gadolinium–DTPA complex: clinical and experimental observations. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 May; 18 (5): 884–7.
- Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Nov; 26 (5): 1190–7.
- Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol*. 2014; 5 (1): 4.
- Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev*. 2013 Dec 24; 66 (1): 222–307.
- Pröhl M, Schubert US, Weigand W, Gottschaldt M. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord Chem Rev*. 2016 Jan 15; 307 (Pt 1): 32–41.
- Carstens MG, Rijcken CJF, van Nostrum CF, Hennink WE. Pharmaceutical micelles: combining longevity, stability and stimuli sensitivity. In: *Fundamental Biomedical Technologies*. Vol. 4: Torchilin V, editor. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. New York: Springer; 2008. p. 263–308.
- Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijssen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*. 2010 Dec; 27 (12): 2569–89.
- Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 1995 Mar 10; 96 (1–2): 1–46.

19. Pozdniakova NV, Gorokhovets NV, Gukasova NV, Bereznikova AV, Severin ES. New protein vector ApE1 for targeted delivery of anticancer drugs. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 469756.

20. Ferrari E, Asti M, Benassi R, Pignedoli F, Saladini M. Metal binding ability of curcumin derivatives: a theoretical vs. experimental approach. *Dalton Trans.* 2013 Apr 21; 42 (15): 5304–13.

21. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol.* 1972; 25: 464–8.

22. Kurfürst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1992 Feb 1; 200 (2): 244–8.

23. Crabb NT, Persinger HE. The determination of polyoxyethylene nonionic surfactants in water at the parts per million level. *J Am Oil Chem Soc.* 1964; 41 (11): 752–5.

24. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct; 150 (1): 76–85.

25. Chen L, Sha X, Jiang X, Chen Y, Ren Q, Fang X. Pluronic P105/

F127 mixed micelles for the delivery of docetaxel against Taxol-resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8: 73–84.

26. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev.* 1999 Sep 8; 99 (9): 2293–352.

27. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14; 95 (8): 4607–12.

28. Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Mar 18; 63 (3): 161–9.

29. Patil R, Gangalum PR, Wagner S, Portilla-Arias J, Ding H, Rekechenetskiy A, et al. Curcumin targeted, polymeric acid-based MRI contrast agent for the detection of A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Macromol Biosci.* 2015 Sep; 15 (9): 1212–7.

30. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol.* 2014 Apr 25; 5: 77.

References

1. Goischke HK. MRI with gadolinium-based contrast agents: practical help to ensure patient safety. *J Am Coll Radiol.* 2016 Jun 18. pii: S1546–1440(16)30315–5.

2. Dinger SC, Fridjhon P, Rubin DM. Thermal Excitation of Gadolinium-Based Contrast Agents Using Spin Resonance. *PLoS One.* 2016 Jun 24; 11 (6): e0158194.

3. Saito K, Yoshimura N, Shiota N, Saguchi T, Sugimoto K., Tokuyue K. Distinguishing liver haemangiomas from metastatic tumours using gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine pentaacetic acid-enhanced diffusion-weighted imaging at 1.5T MRI. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2016 Jun 21. doi: 10.1111/1754-9485.12487. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27324436.

4. Hu HH, Pokorney A, Towbin RB, Miller JH. Increased signal intensities in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted images: evidence in children undergoing multiple gadolinium MRI exams. *Pediatr Radiol.* 2016 Jun 9. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27282825.

5. Schnell S, Wu C, Ansari SA. Four-dimensional MRI flow examinations in cerebral and extracerebral vessels — ready for clinical routine? *Curr Opin Neurol.* 2016 Aug; 29 (4): 419–28. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27262148.

6. Swoboda PP, McDiarmid AK, Erhayiem B, Haaf P, Kidambi A, Fent GJ, et al. A novel and practical screening tool for the detection of silent myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jun 14. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27300573.

7. Kang MK, Lee GH, Jung KH, Jung JC, Kim HK, Kim YH, et al. Gadolinium Nanoparticles Conjugated with Therapeutic Bifunctional Chelate as a Potential T1 Theranostic Magnetic Resonance Imaging Agent. *J Biomed Nanotechnol.* 2016 May; 12 (5): 894–908.

8. De León-Rodríguez LM, Martins AF, Pinho MC, Rofsky NM, Sherry AD. Basic MR relaxation mechanisms and contrast agent design. *J Magn Reson Imaging.* 2015 Sep; 42 (3): 545–65.

9. Yang CT, Chuang KH. Gd(III) chelates for MRI contrast agents: from high relaxivity to “smart”, from blood pool to blood–brain barrier permeable. *Medchemcomm.* 2012; 3: 552–65.

10. Maximova N, Gregori M, Zennaro F, Sonzogni A, Simeone R, Zanon D. Hepatic gadolinium deposition and reversibility after contrast agent-enhanced MR imaging of pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Radiology.* 2016 Jun 8: 152846. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 27276243.

11. Vorobiov M, Basok A, Tovbin D, Shnaider A, Katchko L, Rogachev B. Iron-mobilizing properties of the gadolinium–DTPA complex: clinical and experimental observations. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 May; 18 (5): 884–7.

12. Ersoy H, Rybicki FJ. Biochemical safety profiles of gadolinium-

based extracellular contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis. *J Magn Reson Imaging.* 2007 Nov; 26 (5): 1190–7.

13. Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, Dufort S, Brauer E, Marais A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* 2014; 5 (1): 4.

14. Heger M, van Golen RF, Broekgaarden M, Michel MC. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol Rev.* 2013 Dec 24; 66 (1): 222–307.

15. Pröhl M, Schubert US, Weigand W, Gottschaldt M. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord Chem Rev.* 2016 Jan 15; 307 (Pt 1): 32–41.

16. Carstens MG, Rijcken CJF, van Nostrum CF, Hennink WE. Pharmaceutical micelles: combining longevity, stability and stimuli sensitivity. In: *Fundamental Biomedical Technologies.* Vol. 4: Torchilin V, editor. Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers. New York: Springer; 2008. p. 263–308.

17. Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijsen JF, Hennink WE. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res.* 2010 Dec; 27 (12): 2569–89.

18. Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 1995 Mar 10; 96 (1–2): 1–46.

19. Pozdniakova NV, Gorokhovets NV, Gukasova NV, Bereznikova AV, Severin ES. New protein vector ApE1 for targeted delivery of anticancer drugs. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 469756.

20. Ferrari E, Asti M, Benassi R, Pignedoli F, Saladini M. Metal binding ability of curcumin derivatives: a theoretical vs. experimental approach. *Dalton Trans.* 2013 Apr 21; 42 (15): 5304–13.

21. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol.* 1972; 25: 464–8.

22. Kurfürst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1992 Feb 1; 200 (2): 244–8.

23. Crabb NT, Persinger HE. The determination of polyoxyethylene nonionic surfactants in water at the parts per million level. *J Am Oil Chem Soc.* 1964; 41 (11): 752–5.

24. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct; 150 (1): 76–85.

25. Chen L, Sha X, Jiang X, Chen Y, Ren Q, Fang X. Pluronic P105/ F127 mixed micelles for the delivery of docetaxel against Taxol-

- resistant non-small cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 73–84.
26. Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev*. 1999 Sep 8; 99 (9): 2293–352.
  27. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14; 95 (8): 4607–12.
  28. Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011 Mar 18; 63 (3): 161–9.
  29. Patil R, Gangalum PR, Wagner S, Portilla-Arias J, Ding H, Rekechenetskiy A, et al. Curcumin targeted, polymeric acid-based MRI contrast agent for the detection of A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Macromol Biosci*. 2015 Sep; 15 (9): 1212–7.
  30. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Front Pharmacol*. 2014 Apr 25; 5: 77.