

## МРТ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОПУХОЛЕЙ С КОНТРАСТНЫМ УСИЛЕНИЕМ ГАДОПЕНТЕТОВОЙ КИСЛОТЫ, СОЕДИНЕННОЙ С ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ СЛОЖНОЭФИРНОЙ СВЯЗЬЮ

В. Н. Кулаков<sup>1</sup>, А. А. Липенгольц<sup>1,2</sup>, Е. Ю. Григорьева<sup>2</sup>, А. В. Семейкин<sup>3</sup>, М. А. Абакумов<sup>3</sup>, Э. А. Караханов<sup>4</sup>, А. Б. Максимов<sup>4</sup>, Н. Л. Шимановский<sup>3</sup> ✉

<sup>1</sup> Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва

<sup>2</sup> Российский онкологический научный центр имени Н. Н. Блохина, Москва

<sup>3</sup> Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени акад. П. В. Сергеева, медико-биологический факультет, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

<sup>4</sup> Кафедра химии нефти и органического катализа, химический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

В настоящее время широко используют диагностическую процедуру на основе магнитно-резонансной томографии с применением контрастных средств, из которых наиболее часто применяют гадопентетовую кислоту (Gd-ДТПА, лекарственная форма — препарат «Магневист»). Данная работа посвящена изучению релаксирующей способности Gd-ДТПА, ковалентно соединенного с  $\beta$ -циклодекстрином, и сравнительной оценке визуализирующей способности изучаемого соединения и «Магневиста». Показано, что высокой релаксирующей способностью обладает комплекс Gd-ДТПА, состоящий из 80 % монопроизводного Gd-ДТПА- $\beta$ -циклодекстрина и содержащий по 10 % ди- и трипроизводного Gd-ДТПА циклического углевода. Остатки Gd-ДТПА соединены с  $\beta$ -циклодекстрином сложноэфирной связью, где  $-\text{COOH}$  относится к ДТПА, а  $\text{OH}$  — поверхностные гидроксилы  $\beta$ -циклодекстрина. Экспериментально доказано, что изучаемое соединение не обладает токсичностью в диагностических концентрациях. Визуализирующая способность аналогичная «Магневисту» может быть достигнута введением меньшего, до 50 %, количества препарата.

**Ключевые слова:** гадолиний, диэтиленetriаминопентауксусная кислота,  $\beta$ -циклодекстрин, опухолевые клетки, фибробласты, релаксивность, визуализация опухоли

**Финансирование:** работа выполнена в рамках Государственного контракта № 11411.1008700.13.081 от 13.09.2011 ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

✉ **Для корреспонденции:** Шимановский Николай Львович  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; shiman@rsmu.ru

Статья получена: 15.08.2016 Статья принята в печать: 25.08.2016

## CONTRAST ENHANCED MRI OF TUMORS USING GADOPENTETIC ACID LINKED TO CYCLODEXTRIN BY AN ESTER BOND

Kulakov VN<sup>1</sup>, Lipengolts AA<sup>1,2</sup>, Grigorieva EYu<sup>2</sup>, Semeikin AV<sup>3</sup>, Abakumov MA<sup>3</sup>, Karakhanov EA<sup>4</sup>, Maximov AB<sup>4</sup>, Shimanovsky NL<sup>3</sup> ✉

<sup>1</sup> Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

<sup>2</sup> N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

<sup>3</sup> P. V. Sergeev Molecular Pharmacology and Radiobiology Department, Biomedical Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Department of Petroleum Chemistry and Organic Catalysis, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Contrast-enhanced magnetic resonance imaging has become a routine diagnostic procedure. One of the most common contrast agents used for MRI is gadopentetic acid (Gd-DTPA, marketed as Magnevist). In this work, we studied the relaxivity of Gd-DTPA covalently bonded to  $\beta$ -cyclodextrin and compared enhancement properties of this compound and Magnevist. Our work demonstrated high relaxivity of Gd-DTPA complex containing 80 % of Gd-DTPA-modified  $\beta$ -cyclodextrin mono-derivative, 10 % of Gd-DTPA-modified  $\beta$ -cyclodextrin di-derivative and 10 % of Gd-DTPA-modified  $\beta$ -cyclodextrin tri-derivative. Gd-DTPA residues were linked to  $\beta$ -cyclodextrin by an ester bond, in which a  $\text{COOH}$  group belongs to DTPA and  $\text{OH}$  is a  $\beta$ -cyclodextrin surface hydroxyl group. It was proved experimentally that the studied compound is not toxic in concentrations necessary for diagnostic procedures. Compared to Magnevist, it can provide similar enhancement when used in just half of the equivalent amount.

**Keywords:** gadolinium, diethylenetriaminepentaacetic acid,  $\beta$ -cyclodextrin, tumor cells, fibroblasts, relaxivity, tumor visualization

**Funding:** this work was supported by Government Contract 11411.1008700.13.081 dated September 13, 2011 as part of the Federal Targeted Program for the Development of Pharmaceutical and Medical Industry of the Russian Federation until 2020.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikolay Shimanovsky  
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; shiman@rsmu.ru

Received: 15.08.2016 Accepted: 25.08.2016

При диагностике опухолевых заболеваний с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) обязательным условием является использование гадолинийсодержащих магнитно-резонансных контрастных средств, среди которых наиболее часто применяют гадопентетовую кислоту (Gd-ДТПА, лекарственная форма — препарат «Магневист»). МРТ с использованием Gd-ДТПА обладает большой диагностической информативностью, однако в ряде случаев применение Gd-ДТПА ограничено опасностью высвобождения гадолиния из хелатора при замедлении ее выделения из организма и возможностью развития нефрогенного системного фиброза [1]. Поэтому актуальным является поиск хелаторов гадолиния с повышенной релаксирующей (контрастирующей) способностью, что позволит снизить необходимую дозу контрастного средства и, следовательно, уменьшить риск развития нефрогенного системного фиброза. Для этого может быть перспективным использование циклических углеводов, главным образом  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов (ЦД) [2], которые уже нашли широкое применение в фармации для обеспечения растворимости труднорастворимых лекарственных средств, а также в иных отраслях науки и техники [3].

Наибольшая значимость ЦД как в исследовательских, так и в прикладных задачах заключается в его способности избирательно образовывать комплексы включения с другими молекулами, ионами и даже радикалами. Комплексы могут быть получены в растворе, а также в твердофазном состоянии. В частности, известны сенсоры на основе ЦД, и изучен механизм их действия [4].

В настоящее время в нашей стране отсутствуют отечественные гадолинийсодержащие контрастные препараты, что серьезно ограничивает визуализацию патологических очагов, главным образом онкологических, а также контроль за эффективностью мероприятий по их терапии.

Таким образом, циклодекстрины представляют интерес как основа для создания контрастных препаратов с гадолинием. Наличие доступных гидроксильных связей на поверхности молекулы и способность образовывать соединения включения делает циклодекстрины перспективной основой для создания контрастных препаратов. Неоднократные попытки модификации различных циклодекстринов гадолинием показали существенное увеличение релаксивности гадолиния в данных комплексах [5, 6], однако их визуализирующая способность *in vivo* изучена не была.

Основными требованиями к комплексному соединению на основе ЦД являются: размеры молекулы не более 5,0 нм; молекула должна быть нетоксичной и стабильной в физиологических условиях в течение нескольких часов; химическая связь между комплексным соединением  $Gd^{3+}$  и ЦД должна расщепляться в организме; комплекс  $Gd^{3+}$  должен быть стабильным в диапазоне величин pH водного раствора 6,0–8,0.

Главная цель работы — экспериментальная оценка релаксирующей активности Gd-ДТПА, соединенной с  $\beta$ -циклодекстрином сложноэфирной связью, и изучение визуализации опухолей с помощью нового комплекса по сравнению с «Магневистом».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использовали следующие реагенты: диэтилентриаминапентауксусная кислота квалификации ч. д. а., т. пл. не ниже 219 °С;  $\beta$ -циклодекстрин ( $\beta$ -ЦД, Aldrich, США), чи-

стота более 99 %;  $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$  (Aldrich, США), чистота 99,99 %; органические растворители квалификации ч. д. а. или х. ч. Синтез гадопентетовой кислоты, соединенной с  $\beta$ -ЦД, проводили в соответствии с патентом [7]. Всего было синтезировано 5 образцов, характеристики которых приведены в табл. 1. В качестве препарата сравнения использовали «Магневист» (Bayer, Германия). Полученные образцы в лекарственной форме (водный раствор с величиной pH  $7,2 \pm 0,2$ ) имели концентрацию гадолиния 0,3 М.

Содержание Gd в образцах определяли на рентгено-флуоресцентном анализаторе X-Арт М (ЗАО «Комита», Санкт-Петербург). Навеску вещества растворяли в дистиллированной воде объемом, необходимым для получения раствора с концентрацией субстанции 30 мг/мл. В специальную кювету вносили 1 мл приготовленного раствора вещества. К полученному раствору добавляли 1 мл дистиллированной воды для дальнейшего забора 1 мл полученного раствора, который помещали в кювету для рентгенофлуоресцентного анализа, затем проводили измерение. Такие объемы были выбраны для обеспечения полного смачивания поверхности кюветы и стандартизации измерений. Количественное содержание лигандов (хелаторов) и комплексов в синтезированных образцах проводили методом масс-спектрометрии. Спектры ESI-MS регистрировали на приборе Agilent LS/MS 1100 SL (Agilent Technologies, США) с ионизацией пробы электрораспылением (ESI) в режиме регистрации положительных и отрицательных ионов, масс-анализатор типа ионной ловушки. Полученные результаты приведены в табл. 1.

$T_1$ -релаксометрию проводили на МР-томографе ClinScan фирмы Bruker BioSpin, Германия (величина магнитной индукции 7 Тл, резонансная частота 300 МГц для  $^1H$ ). Пробирки с исследуемым веществом в разной концентрации помещали в воду для равномерной настройки поля в границах исследуемого объема, а затем производили сбор данных. В качестве контроля использовали водный раствор препарата «Магневист» с той же концентрацией, что и в полученных образцах. Значения времени релаксации (величину  $T_1$ ) находили с помощью последовательности Turbo Inversion Recovery [8]. Интенсивность сигнала от каждой пробирки измеряли с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США). Величины  $T_1$  исследуемых веществ рассчитывали с помощью уравнения

$$SI = k \cdot (1 - (1 - \cos\alpha) \cdot e^{-\frac{TI}{T_1}} - 2 \cdot \cos\alpha \cdot e^{-\frac{TR - TE}{T_1}} + \cos\alpha \cdot e^{-\frac{TR}{T_1}}),$$

где SI — интенсивность сигнала;  $T_1$  — время спин-решеточной релаксации; TI — время инверсии; TR — время повторения импульсной последовательности; TE — время появления эхо-сигнала;  $\alpha$  — угол отклонения импульса.

Расчеты производили с помощью программного пакета Mathcad (PTC, США). Визуализирующую способность полученных образцов оценивали по величинам  $T_1$  на МР-томографе ClinScan (Bruker BioSpin, Германия) с напряженностью поля 7 Тл (300 МГц для  $^1H$ ) с использованием двухсегментной поверхностной принимающей катушки. После получения быстрых ортогональных T1-взвешенных изображений (ВИ) получали T2-взвешенные изображения с частотным подавлением сигнала от жировой ткани во фронтальной плоскости с помощью импульсной последовательности Turbo Spin Echo с параметрами: TR = 2220 мс, TE = 49 мс, толщина среза 1 мм, 16 срезов, матрица 320 × 320, поле обзора 50 мм, траектория заполнения K-пространства — BLADE (охват 100 %). Получали также T2ВИ с частотным подавлением сигнала от

Таблица 1. T<sub>1</sub>-релаксивность и характеристика полученных образцов

Шифр образца	Состав	Содержание, %	Релаксивность, (ммоль/л) <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup>	Содержание Gd в образце, %
K12B-1	ЦД-ДТПА	20	5,13	10,0
	Gd-ДТПА	10		
	ЦД-Gd-ДТПА	20		
	ЦД-Gd-2ДТПА	10		
	ЦД-2(Gd-ДТПА)	15		
	ЦД-3-2Gd-ДТПА	25		
K12B-2	ЦД-ДТПА	7	5,54	9,0
	Gd-ДТПА	8		
	ЦД-Gd-ДТПА	40		
	ЦД-2-Gd-ДТПА	15		
	ЦД-2(Gd-ДТПА)	15		
	ЦД-3-Gd-ДТПА	15		
K13-1	ЦД-Gd-ДТПА	80	5,81	12,0
	ЦД-3(Gd-ДТПА)	20		
K13-2	ЦД-Gd-ДТПА	60	6,29	11,8
	ЦД-2(Gd-ДТПА)	30		
	ЦД-3(-Gd-ДТПА)	10		
K14-1	ЦД-Gd-ДТПА	80	6,08	12,3
	ЦД-2(-Gd-ДТПА)	10		
	ЦД-3(-Gd-ДТПА)	10		
«Магневист»	Gd-ДТПА	99	4,22	17,0
	ДТПА	1		

жировой ткани в аксиальной проекции: Turbo Spin Echo, TR = 3310 мс, TE = 51 мс, толщина среза 1 мм, 26 срезов, матрица 256 × 256, поле обзора 40 мм. Перед проведением МРТ животных наркотизировали хлоралгидратом натрия на физиологическом растворе в дозе 6 мг хлоралгидрата натрия на мышь. Время наступления наркотического сна варьировало от 4 до 10 мин. Снимали контрольные интактные картины МРТ в течение 20 мин в разных позициях. Далее животным вводили «Магневист» (препарат сравнения) или исследуемое соединение в количестве около 1 мг Gd/мышь (2·10<sup>-3</sup> ммоль «Магневиста»,

1,5·10<sup>-3</sup> ммоль исследуемого K14-1) ретроорбитально и проводили МРТ в динамике (рис. 1–4). По окончании эксперимента животных эвтаназировали.

Для сравнительной оценки накопления препарата анализировали интенсивность сигнала в области опухоли до и после введения вещества K14-1 или «Магневиста» в одинаковых дозах 2·10<sup>-3</sup> ммоль. Для этого на МР-снимках выделяли область опухоли и такую же область на контрлатеральной половине и считали среднюю интенсивность сигнала (SI<sub>c</sub> и SI<sub>n</sub> соответственно). Дополнительно также выделяли область вне лабораторного животного, чтобы

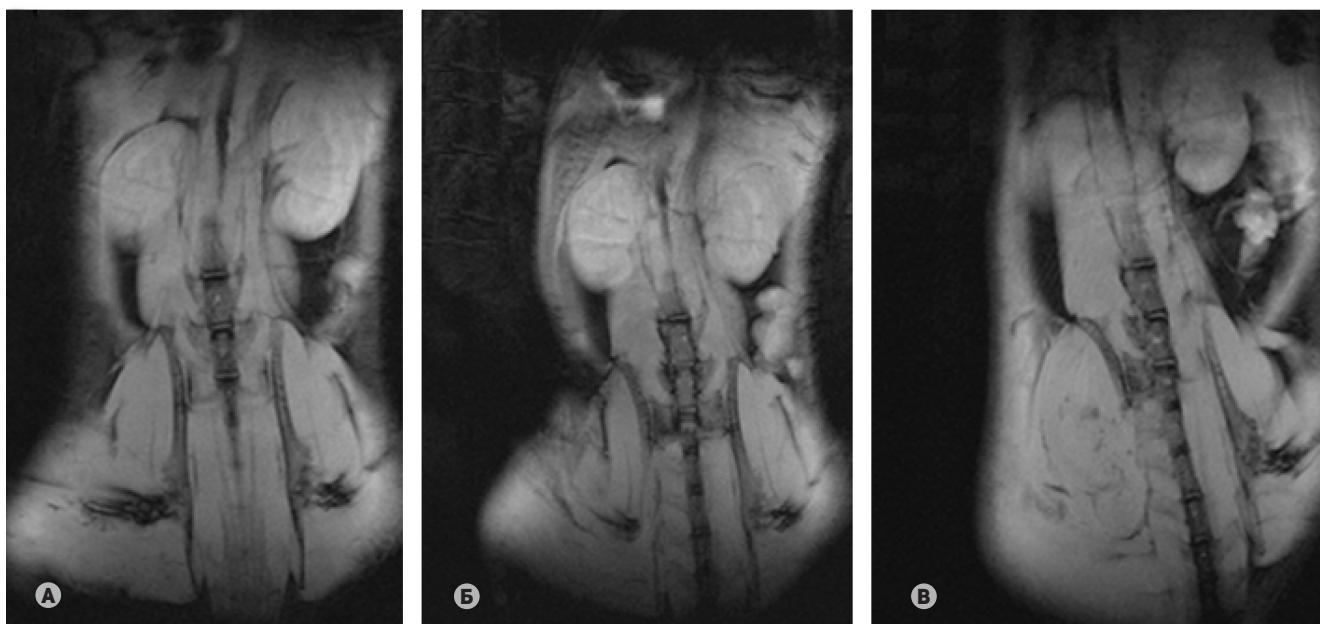
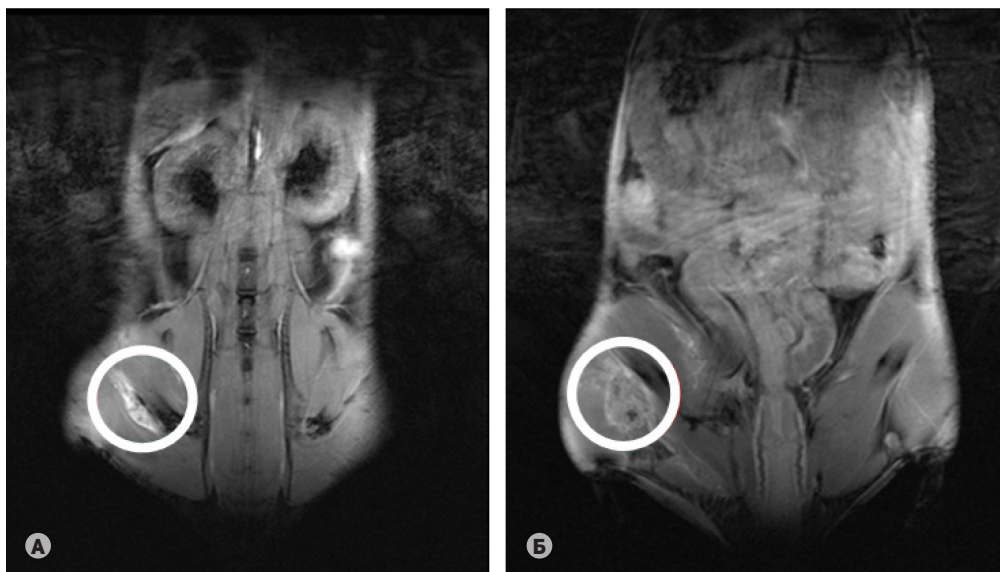
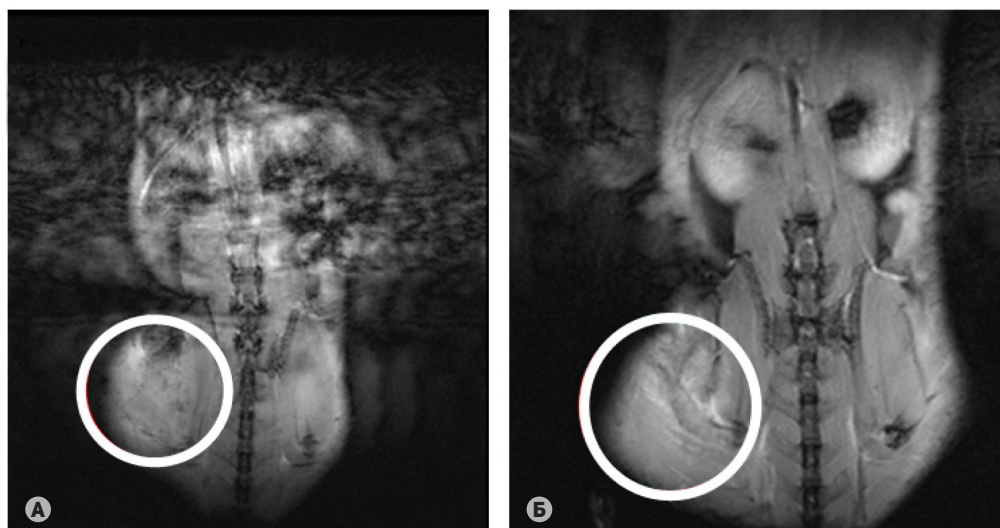


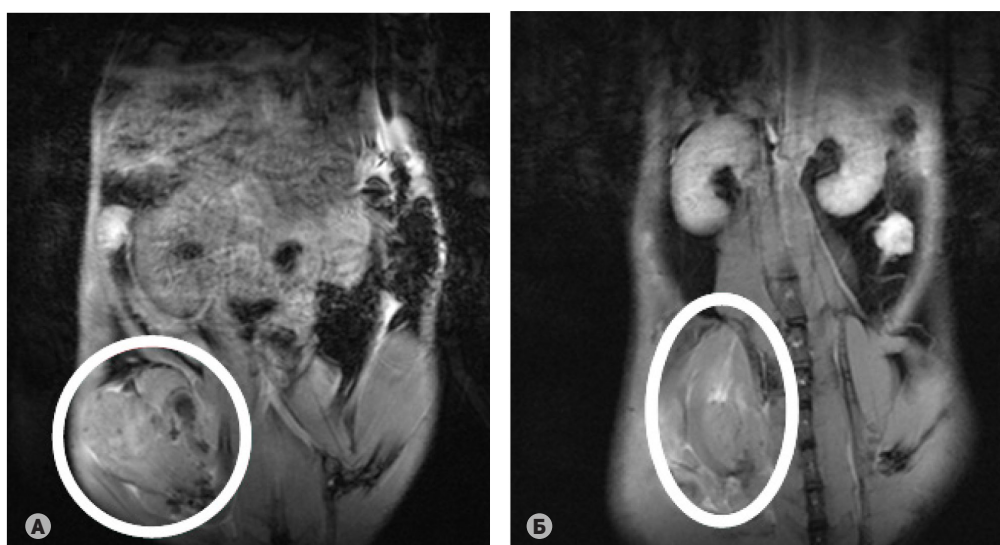
Рис. 1. МРТ-изображение мышей с трансплантированными опухолями (А — Ca755, Б — LLC и В — B16) до введения контрастных средств



**Рис. 2.** МРТ-визуализация мышечной аденокарциномы молочной железы Ca755 через 5 мин после введения (А) «Магневиста» и (Б) образца K14-1; белым выделена опухоль



**Рис. 3.** МРТ-визуализация мышечной карциномы легкого Льюиса LLC через 5 мин после введения (А) «Магневиста» и (Б) образца K14-1; белым выделена опухоль



**Рис. 4.** МРТ-визуализация мышечной меланомы B16 через 5 мин после введения (А) «Магневиста» и (Б) образца K14-1; белым выделена опухоль

оценить средний уровень шума (SN). Степень контрастирования (CNR) каждого препарата на определенный момент времени определяли по формуле

$$CNR = \frac{SI_c - SI_n}{SN}$$

Кроме того, проводили сравнительную оценку изменения уровня накопления гадолиния в опухоли и нормальной ткани. Для этого определяли нормированную по шуму интенсивность сигнала (SNR) от опухоли и от здоровой ткани в каждый момент времени:

$$SNR = \frac{SI}{SN}$$

График зависимости величины SNR от времени, прошедшего после внутривенного введения вещества K14-1 и «Магневиста» мышам с трансплантированной аденокарциномой молочной железы, приведен на рис. 5.

#### Биологические исследования

В работе использовали мышей линии C57BL/6 обоего пола массой 18–20 г и крыс линии Wistar обоего пола массой 150–200 г, полученных из питомника «Столбовая». Все животные имели ветеринарное свидетельство (форма № 1).

Выбор экспериментальных моделей проводили в соответствии с требованиями по экспериментальному изучению новых лекарственных средств [9, 10]. Для оценки визуализирующей способности синтезированных соединений методом МРТ были взяты три линии мышинных опухолевых клеток различного гистологического происхождения, полученные из банка клеточных культур РОНЦ им. Н. Н. Блохина: эпидермоидная карцинома легких Лююиса LLC1, аденокарцинома молочной железы Ca755 и меланома B16F10.

Трансплантацию опухолевых клеток животным проводили в соответствии с общепринятыми требованиями [9–11]. Суспензию опухолевых клеток ( $4 \cdot 10^6$  клеток на мышь) вводили под кожу бедра. После достижения опухолей одинакового размера (диаметр около 1 см) животных использовали в дальнейших экспериментах.

**Оценка острой токсичности.** Исследуемые комплексы вводили внутривенно в дозах 3 000, 6 000, 9 000, 12 000 и

15 000 мг/кг однократно. Срок наблюдения за животными составлял 30 сут. Критериями оценки острой токсичности служили число павших животных и сроки их гибели [9].

**Оценку цитотоксичности используемых веществ** проводили в соответствии с руководством [9] с применением МТТ-теста [12]. Развитие окраски регистрировали с помощью определения оптической плотности при длине волны 530 нм на планшетном фотометре (анализатор иммуноферментных реакций АИФР-01 УНИПЛАН, ЗАО «ПИ-КОН», Россия). Отношение средней оптической плотности для данной концентрации вещества к средней оптической плотности в контроле принималось как доля выживших клеток. Достоверность отличия образцов от контроля и друг от друга оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни при  $p < 0,05$ .

**Приготовление фибробластов.** Извлекали в асептических условиях теменную кость новорожденной крысы. После декапитации и стерилизации поверхности последовательно удаляли кожу и отделяли теменную кость, которая состоит из активно пролиферирующих клеток. Теменную кость площадью 1 см<sup>2</sup> переносили в бюкс со средой DMEM (НПП «ПанЭко», Россия) и измельчали на фрагменты 1–2 мм<sup>3</sup>. Затем среду с фрагментами ткани наносили на дно плоскодонных культуральных флаконов Costar (Corning, США) объемом 50 мл и площадью дна 25 см<sup>2</sup>, расположенных под наклоном 45°, инкубировали 30 мин при 37 °С. Прикрепление фрагментов первоначально происходит за счет их адгезии к наклонной поверхности. Через 30 мин среду удаляли, переводили флаконы в горизонтальное положение и вносили 10 мл питательной среды (DMEM с добавлением 20 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина сульфата).

**Культивирование фибробластов** осуществляли в стерильных условиях, клетки инкубировали при 37 °С в условиях 5 % CO<sub>2</sub>. Работа производилась в ламинарном боксе LC (ЗАО «Ламинарные системы», Россия). Через неделю наблюдали образование на поверхности флакона участков клеточного монослоя. Клетки для равномерного распределения подвергали обработке трипсином и еще через 1 нед. получали монослойную культуру.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

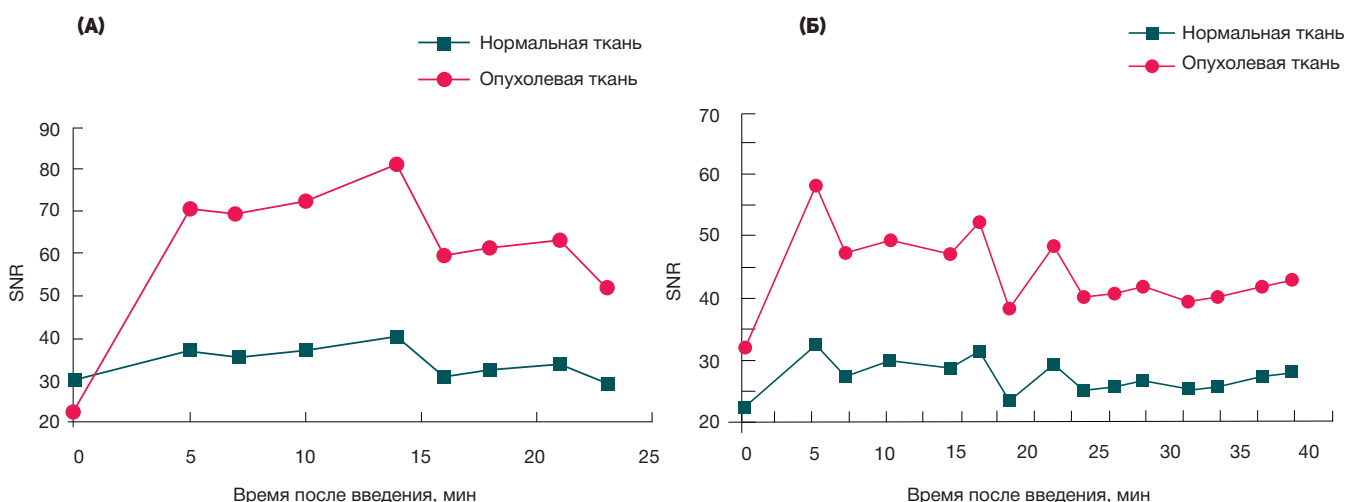


Рис. 5. Зависимость значений нормированной по шуму интенсивности сигнала от опухоли и здоровой ткани (SNR) от времени после инъекции изучаемых контрастных веществ (А — «Магневист»; Б — K14-1) в опухоли аденокарциномы Ca755 у мышей

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерения  $T_1$ -релаксивности полученных образцов Gd-ДТПА-ЦД и препарата «Магневист» приведены в табл. 1. Из них следует, что величина  $T_1$ -релаксивности у всех полученных образцов выше, чем у препарата «Магневист», однако наибольшая релаксивность была зафиксирована у образцов K14-1, K13-1 и K13-2. Синтезированное производное  $\beta$ -ЦД, шифр K14-1, обладает рядом преимуществ относительно препарата сравнения: его  $T_1$ -релаксивность почти на 50 % выше, чем у «Магневиста», а концентрация гадолиния в его лекарственной форме ниже таковой у «Магневиста» на 40 %. Это позволяет добиваться одинаковых результатов по визуализации опухолей при снижении необходимой дозы гадолиния и, соответственно, риска развития осложнений.

Работы с животными проводили в соответствии с международными рекомендациями [13]. Внутривенное введение исследуемых образцов крысам при оценке острой токсичности в дозах 3 000–6 000 мг/кг не оказывало токсического воздействия как на самцов, так и на самок. Летальный эффект наблюдали у самцов и самок, начиная с дозы 9 000 мг/кг массы тела. Гибель животных наступала не ранее первых суток после введения. У животных, получивших сублетальные дозы, на протяжении всего срока наблюдения не происходило потери массы тела. При аутопсии животных визуализированных изменений внутренних органов не отмечено. Самцы были более чувствительны к Gd-ДТПА-ЦД по сравнению с самками (в дозах 12 000, 15 000 мг/кг массы тела выжило 2 из 6 самок и 1 из 6 самцов). Величина  $LD_{50}$  составила  $(7 \pm 1)$  ммоль/кг.

Образец K14-1 не проявлял достоверной токсичности относительно фибробластов крысы во всех изученных концентрациях (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По основным критериям, определяющим визуализационную способность соединений в методе МРТ, таким как максимальное содержание парамагнитного иона  $Gd^{3+}$  и наибольшая величина релаксивности (табл. 1), для *in vivo* оценки диагностической способности в МРТ были отобраны образцы K13-1, K13-2, K14-1, K14-2. Наилучшие результаты получены при визуализации указанных экспериментальных опухолей при использовании соединения с шифром K14-1 (рис. 1–4). При сравнении диагностической информативности «Магневиста» и производного  $\beta$ -ЦД, шифр K14-1, видно, что качество визуализации патологического очага практически не отличается друг от друга, хотя вводимые количества гадолиния в составе Gd-ДТПА, соединенной с  $\beta$ -ЦД ковалентной связью, на 40 % меньше, чем в случае «Магневиста». Следует отметить, что при одинаковом введенном количестве Gd животным с трансплантированными опухолями производное  $\beta$ -ЦД, шифр K14-1, повышает магнитно-резонансный сигнал в хорошо васкуляризованных опухолях, например в аденокарциноме молочной железы Ca755, в большей степени, чем

## Литература

1. Буйлов В. М. Магнитно-резонансные контрастные средства и нефрогенные фиброзирующая дерматопатия и системный фиброз (обзор литературы). Мед. визуал. 2007; (2): 140–3.

Таблица 2. Сравнительное влияние «Магневиста» и производного  $\beta$ -ЦД (шифр K14-1) на жизнеспособность фибробластов крысы

Концентрация K14-1, % (мМ в 100 мл раствора)	Жизнеспособность клеток, % <sup>#</sup>	
	«Магневист»	K14-1
10 ( $2,55 \cdot 10^{-3}$ )	17*	124
1 ( $2,55 \cdot 10^{-4}$ )	73*	117
0,1 ( $2,55 \cdot 10^{-5}$ )	123	135*
0,01 ( $2,55 \cdot 10^{-6}$ )	127*	140*

Примечание: # — приведен % от контроля (контроль — 100 %); \* — различия с контролем достоверны ( $p < 0,05$ ).

«Магневист», что является существенным преимуществом производного  $\beta$ -ЦД (рис. 5).

Оценку цитотоксической активности проводили по жизнеспособности клеток в присутствии различных концентраций K14-1 и препарата сравнения «Магневист» на культурах опухолевых клеток: эпидермоидная карцинома легких Льюиса LLC1; меланома B16; аденокарцинома молочной железы Ca755. Результаты всех тестов по определению цитотоксической активности K14-1, проведенных на клеточных линиях B16F10, LLC1, Ca755, показали схожие результаты торможения роста клеток:  $IC_{50} = (1 \div 2) \cdot 10^{-4}$  М;  $IC_{90} = (0,2 \div 0,5) \cdot 10^{-4}$  М. Поскольку рассчитанное значение  $IC_{50}$  для K14-1 укладывается в принятые требования для цитотоксичности активных соединений ( $IC_{50} \leq 10^{-4}$  М), можно констатировать, что полученное соединение, шифр K14-1, не обладает выраженной цитотоксичностью.

Объектом для оценки биологической активности соединений гадолиния были также нормальные фибробласты теменной кости крысы. Они легко поддаются культивации *in vitro* и позволяют поддерживать культуру на протяжении длительного времени. Фибробласты являются тест-объектом при оценке токсичности различных соединений [10].

Образец K14-1 не проявлял достоверной токсичности относительно фибробластов крысы. Наибольшую токсичность на фибробластах показал «Магневист». В концентрации 10 и 1 % «Магневист» снижал жизнеспособность клеток на 83 и 27 % соответственно (табл. 2).

## ВЫВОДЫ

Контрастное средство для МРТ-исследований — препарат «Магневист» и модифицированный комплекс Gd-ДТПА-ЦД (образец K14-1) обладают близкой визуализационной способностью у мышей с экспериментальными опухолями.

Образец K14-1 отличается оригинальностью, имеет простую схему получения, обладает высокой релаксивностью, что позволяет вводить в организм гадолиния на 40–50 % меньше по сравнению с «Магневистом», и тем самым снижает вероятность проявления побочных эффектов, в частности, нефрогенного системного фиброза. Преимуществом Gd-ДТПА-ЦД перед «Магневистом» является более высокое контрастное усиление изображения высоковаскуляризованных опухолей.

analytical methods, applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2006. 489 p.

4. Ogoshi T, Harada A. Chemical Sensors Based on Cyclodextrin Derivatives. *Sensors*. 2008; 8: 4961–82.
5. Battistini E, Gianolio E, Gref R, Couvreur P, Fuzerova S, Othman M, et al. High-relaxivity magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent based on supramolecular assembly between a gadolinium chelate, a modified dextran, and poly-beta-cyclodextrin. *Chemistry*. 2008; 14 (15): 4551–61.
6. Bryson JM, Chu WJ, Lee JH, Reineke TM. A  $\beta$ -cyclodextrin “click cluster” decorated with seven paramagnetic chelates containing two water exchange sites. *Bioconjug Chem*. 2008 Aug; 19 (8): 1505–9.
7. Кулаков В. Н., Липенгольц А. А., Караханов Э. А., Максимов А. Л., Григорьева Е. Ю., Черепанов А. А. Модифицированные гадопентетатом производные бета-циклодекстрина. Патент РФ № 2541090. 28 ноября 2013 г.
8. Bernstein MA, King KF, Zhou XJ. Handbook of MRI pulse

sequences. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2004. 788 p.

9. Миронов А. Н., Бунатян Н. Д., Васильев А. Н., Верстакова О. Л., Журавлева М. В., Лепяхин В. К. и др., редакторы. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
10. Фисенко В. П., редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум; 2000. с. 18–25.
11. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург, 1985 г. *Ланималогия*. 1993; (1): 29.
12. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16; 65 (1–2): 55–63.
13. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Хроника ВОЗ. 1985; 39 (3): 7–9.

## References

1. Buylov VM. [Magnetic resonance contrast agents and nephrogenic fibrosing dermatosis and systemic fibrosis (review article)]. *Medical Visualization*. 2007; (2): 140–3. Russian.
2. Szejtli J. Cyclodextrin technology. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1988. 450 p.
3. Dodziuk H, editor. Cyclodextrins and their complexes: Chemistry, analytical methods, applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 2006. 489 p.
4. Ogoshi T, Harada A. Chemical Sensors Based on Cyclodextrin Derivatives. *Sensors*. 2008; 8: 4961–82.
5. Battistini E, Gianolio E, Gref R, Couvreur P, Fuzerova S, Othman M, et al. High-relaxivity magnetic resonance imaging (MRI) contrast agent based on supramolecular assembly between a gadolinium chelate, a modified dextran, and poly-beta-cyclodextrin. *Chemistry*. 2008; 14 (15): 4551–61.
6. Bryson JM, Chu WJ, Lee JH, Reineke TM. A  $\beta$ -cyclodextrin “click cluster” decorated with seven paramagnetic chelates containing two water exchange sites. *Bioconjug Chem*. 2008 Aug; 19 (8): 1505–9.
7. Kulakov VN, Lipengol'ts AA, Karakhanov EA, Maksimov AL, Grigor'eva EYu, Cherepanov AA, inventors. Modifitsirovannye gadopentetatom proizvodnye beta-tsiklodekstrina. Russian

Federation patent No. 2541090. 2013 Nov 28. Russian.

8. Bernstein MA, King KF, Zhou XJ. Handbook of MRI pulse sequences. Burlington, MA: Elsevier Academic Press; 2004. 788 p.
9. Mironov AN, Bunatyan ND, Vasil'ev AN, Verstakova OL, Zhuravleva MV, Lepakhin VK, et al, editors. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. Russian.
10. Fisenko VP, editor. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Moscow: Remedium; 2000. p. 18–25. Russian.
11. Evropeiskaya konventsiya po zashchite pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimental'nykh i drugikh nauchnykh tselei, EEC, Strasbourg, 1985. *Lanimalogiya*. 1993; (1): 29. Russian.
12. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16; 65 (1–2): 55–63.
13. Mezhdunarodnye rekomendatsii po provedeniyu mediko-biologicheskikh issledovaniy s ispol'zovaniem zhivotnykh. WHO Chron. 1985; 39 (3): 7–9. Russian.