



Оригинальная статья

Фотодинамическая терапия солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров

Шолина Н.В.^{1,2,3} • Акасов Р.А.^{2,3} • Хоченков Д.А.¹ • Генералова А.Н.^{3,4} • Семчишен В.А.³ • Хайдуков Е.В.^{2,3}

Шолина Наталья Валериевна – аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза¹, мл. науч. сотр. лаборатории фотонной биоинженерии отдела биомедицинской инженерии Института молекулярной медицины², мл. науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³; ORCID: 0000-0001-9866-2878
✉ 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация. Тел.: +7 (926) 957 96 63. E-mail: SholinaNV@gmail.com

Акасов Роман Александрович – PhD, науч. сотр. лаборатории фотонной биоинженерии отдела биомедицинской инженерии Института молекулярной медицины², науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³; ORCID: 0000-0001-6486-8114

Хоченков Дмитрий Александрович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза¹; ORCID: 0000-0002-5694-3492

Генералова Алла Николаевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³, ст. науч. сотр. лаборатории полимеров для биологии⁴; ORCID: 0000-0001-9646-1693

Семчишен Владимир Анатольевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. лаборатории лазерной биомедицины³; ORCID: 000-0003-1035-3013

Хайдуков Евгений Валерьевич – канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией фотонной биоинженерии отдела биомедицинской инженерии Института молекулярной медицины²; заведующий лабораторией лазерной биомедицины³; ORCID: 0000-0002-3900-2949

Обоснование. Рибофлавин (витамин В₂) считается одним из наиболее перспективных агентов для фотодинамической терапии. Однако его применение ограничено возбуждением в ультрафиолетовом (УФ) и синем диапазонах спектра и, как следствие, малой (не более нескольких миллиметров) глубиной проникновения в биоткань. Решением данной проблемы видится разработка подходов, обеспечивающих фотовозбуждение молекул рибофлавина под действием инфракрасного (ИК) света в глубине опухолевой ткани. В качестве посредника, способного эффективно преобразовывать возбуждающее излучение ближнего ИК диапазона, проникающее в биоткань на глубину до 3 см, в фотолюминесценцию УФ и видимого диапазона спектра, могут быть рассмотрены наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ). **Цель** – оценить эффективность использования НАФ для ИК-опосредованной активации рибофлавина в глубине опухолевой ткани при проведении фотодинамической терапии. **Материал и методы.** Водорастворимая форма рибофлавина – флавиномононуклеотид (ФМН) (Фармстандарт-УфаВИТА, Россия) – был использован в качестве фотосенсибилизатора в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты *in vitro* выполнены на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U-87 MG и глиомы крысы С6. Карцинома легкого Льюис, перевитая мышам-гибридам BDF1, была использована в качестве модели для демонстрации доставки ФМН в опухолевую ткань. Для фотоактивации ФМН *in vivo* применялись НАФ со структурой «ядро/оболочка» [NaYF₄:Yb³⁺, Tm³⁺/NaYF₄]. Фотодинамическая терапия на основе ФМН, НАФ и лазерного излучения 975 нм проводилась на ксенографтах мыши SK-BR-3. **Результаты.** Показано, что ФМН может выступать в качестве эффективного фотосенсибилизатора *in vitro* в отношении клеточных линий

SK-BR-3, U-87 MG и С6. Значения IC₅₀ для клеток глиомы составляли ~30 мкМ ФМН, а для клеток карциномы молочной железы SK-BR-3 ~50 мкМ ФМН (24 ч инкубации, облучение 4,2 Дж/см²). С использованием модели карциномы легкого Льюис установлено, что соответствующая концентрация ФМН (30 мкМ и выше) может быть достигнута в опухоли в результате системного введения ФМН (через 2 и 24 часа после введения). На ксенографтах мыши SK-BR-3 продемонстрирован эффект фотодинамической терапии с использованием света ближнего ИК диапазона для НАФ-опосредованного возбуждения ФМН, торможение роста опухоли при этом составило 90±5%. **Заключение.** Продемонстрирована возможность применения рибофлавина (витамина В₂) в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии. Использование подхода, основанного на фотовозбуждении ФМН через антистоксовую фотолюминесценцию НАФ, позволяет реализовать метод фотодинамической терапии с применением света из ближнего ИК диапазона спектра.

Ключевые слова: рибофлавин, наноразмерные апконвертирующие фосфоры, фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, свет ближнего инфракрасного диапазона

Для цитирования: Шолина НВ, Акасов РА, Хоченков ДА, Генералова АН, Семчишен ВА, Хайдуков ЕВ. Фотодинамическая терапия солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров. Альманах клинической медицины. 2019;47(7):647–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-057.

Поступила 05.07.2019; доработана 17.10.2019; принята к публикации 24.10.2019; опубликована онлайн 01.11.2019

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

² ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2, Российская Федерация

³ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН; 119333, г. Москва, Ленинский проспект, 59, Российская Федерация

⁴ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Российская Федерация

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – перспективный метод лечения онкологических заболеваний, который основан на способности фотосенсибилизаторов (ФС) селективно накапливаться в опухолевой ткани. Под действием энергии лазерного излучения в сенсibilизированных клетках и тканях развиваются фотохимические реакции с выделением синглетного кислорода и свободных радикалов, что приводит к гибели и разрушению опухолевых клеток без негативного влияния на здоровые ткани и органы. ФДТ не сопровождается токсическими эффектами, осложнениями и может быть повторно проведена в зоне предшествующего лечения. По сравнению с хирургическим вмешательством ФДТ менее инвазивна, восстановительный период более короткий и благоприятный [1]. Фототерапия существенно расширяет арсенал методов лечения опухолей различной локализации, она также рекомендована при опухолях, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [2].

В настоящее время в практике используются ФС, относящиеся к порфиринам (первое поколение), хлоринам (второе поколение) и фталоцианинам. Все они обладают низкой эффективностью и неравномерностью накопления в опухоли, требуется их повторное введение по причине быстрого фотообесцвечивания в ходе облучения, и, как следствие, препараты проявляют системную токсичность при небольшой результативности [3].

Поиск более эффективных и менее токсичных соединений, лишенных недостатков ФС первого и второго поколения, – одна из основных стратегий улучшения ФДТ. В качестве альтернативы органическим ФС может быть предложен природный рибофлавин, также обладающий фотосенсибилизирующими свойствами [4]. При высокой концентрации кислорода в среде он служит даже более эффективным продуцентом синглетного кислорода, чем порфирин, наиболее широко используемый в ФДТ [5]. В недавних работах рибофлавин использовался в качестве фотосенсибилизатора для лечения рака шейки матки HeLa [6] и меланомы V16 [7] *in vitro*. Основное ограничение использования водорастворимой формы рибофлавина – флавиномононуклеотида (ФМН) – в качестве ФС связано с тем, что синий свет, необходимый для его активации, наименее эффективно проникает в биоткань [8].

В качестве решения проблемы мы предлагаем использовать наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ), способные эффективно

преобразовывать возбуждающее излучение ближнего инфракрасного (ИК) диапазона, традиционно применяемое для ФДТ, в фотолуминесценцию видимого и ультрафиолетового (УФ) диапазонов спектра и таким образом активировать рибофлавин на глубине ткани [9, 10]. Целью данной работы была оценка эффективности использования НАФ для ИК-опосредованной активации рибофлавина в глубине опухолевой ткани при проведении ФДТ.

Материал и методы

Исследование фототоксичности флавиномононуклеотида *in vitro*

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U-87 MG и глиомы крысы C6 высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 /мл, 100 мкл на лунку) в полной среде RPMI-1640 (Thermo Fisher, США). Через 24 часа среду заменяли на свежую, содержащую 10–100 мкМ ФМН (Фармстандарт-УфаВИТА, Россия), и инкубировали в темноте 90 минут. Затем среду удаляли, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4) и облучали лазером (ООО «Полироник», Россия, мощность 7 мВт/см²) на длине волны 450 нм в течение 10 мин. Через 24 часа жизнеспособность клеток оценивали путем добавления 0,5 мг/мл МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид, Sigma, США) на 4 часа с последующей элюцией образовавшегося формазана в диметилсульфоксид. Результат оценивали спектрофотометрически на длине волны 540 нм (Multiscan FC, Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали по формуле: OD экспериментальной группы / OD контрольная $\times 100\%$. Всего было проведено три независимых эксперимента, каждый из которых включал в себя не менее трех повторов для каждой экспериментальной точки.

Накопление флавиномононуклеотида в мышинной модели карциномы легкого Льюис Мышам-гибридам BDF1 (C57Bl/6 \times DBA2) перевивали модель карциномы легкого Льюис (LLC) из банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. На 10-й день после перевивки мышам системно (через ретроорбитальный синус) вводили ФМН в объеме 150 мкл с концентрацией 10 мг/мл. Через 2 и 24 часа по 2 мыши выводили из эксперимента, кожный лоскут удаляли и сканировали открытую область непрерывным полупроводниковым лазером с длиной волны 450 нм при



помощи эпилюминесцентной имиджинговой системы, разработанной в Институте фотонных технологий РАН (г. Троицк) по предложенной ранее технологии [11]. Спектральная полоса регистрации флуоресценции составляла 500–570 нм. Полученные изображения были обработаны в программном обеспечении XCAP for Windows, версия 3.7.120907.083752, позволяющем перевести люминесцентные изображения в относительные единицы люминесценции ФМН для любой области изображения. Для каждого изображения в программе XCAP было сделано по 10 измерений в области опухоли и по 10 измерений в области нормальных тканей.

Синтез наноразмерных апконвертирующих фосфоров и их поверхностная модификация для биомедицинского применения

Синтез НАФ на основе фторидной матрицы NaYF_4 , допированной ионами лантаноидов (тулия Tm^{3+} , иттербия Yb^{3+}), и модификация их поверхности биосовместимым полимерным покрытием на основе гидроксида тетраметиламмония проводилась в соответствии с описанными ранее методиками [11, 12].

Фотодинамическая терапия *in vivo*

ФДТ проводили на модели ксенографтов аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 у мышей. Для этого клетки SK-BR-3 (5×10^5 клеток) имплантировали подкожно в правый бок иммунодефицитных мышей линии Balb nu/nu (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН, г. Пущино). Динамику роста оценивали по формуле: $V = (\text{длина} \times [\text{ширина}]^2) / 2$. Терапию проводили при достижении опухоли размеров $120 \pm 15 \text{ мм}^3$. Мышам перитуморально вводили комбинацию ФМН (50 мкл, 500 мкМ) и НАФ (25 мкг); через 1,5 часа после введения опухоль облучали лазером АТС-С4000-200-АМФ-975 (Semiconductor devices, Россия) на длине волны 975 нм (900 Дж/см^2 , импульсный режим). В качестве контроля использовали опухоли с аналогичной комбинацией веществ, но без последующего лазерного воздействия. Противоопухолевую активность определяли как торможение роста опухоли $[\text{ТРО, \%}] = (\text{контроль ТРО} - \text{экспериментальная группа ТРО}) / \text{Контроль ТРО} \times 100\%$, в течение 50 дней. Для оценки тканевой реакции на терапию по 2 мыши из каждой группы выводились из эксперимента через сутки после воздействия. Гистологические образцы исследовали путем окрашивания гематоксилином и эозином.

Этическая экспертиза. Работа выполнена в соответствии с этическими принципами проведения биомедицинских исследований, отраженными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, и утверждена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (номер документа 2018-034).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad, США). Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни, различия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Оценка токсичности фотоактивированного флавиномононуклеотида *in vitro*

Была оценена темновая и световая токсичность ФМН в отношении ряда опухолевых клеток *in vitro*, в том числе впервые был изучен цитотоксический эффект ФМН в отношении клеток глиомы U-87 MG и C6. Показано, что облучение синим светом (450 нм , $4,2 \text{ Дж/см}^2$) среды, содержащей 50 мкМ ФМН, через 24 ч приводило к снижению жизнеспособности клеток карциномы молочной железы человека SK-BR-3 до $52 \pm 8\%$ относительно контроля (среднее \pm SD), в то время как для

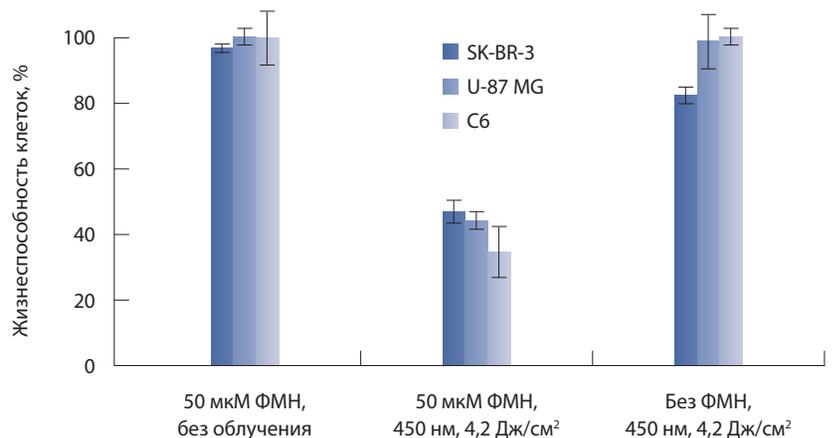


Рис. 1. Жизнеспособность клеток SK-BR-3, U-87 MG и C6. Клетки инкубировали в присутствии 50 мкМ ФМН в течение 90 мин и облучали синим светом (450 нм , $4,2 \text{ Дж/см}^2$), жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 24 часа (см. подробное описание в разделе статьи «Материал и методы»). Выживаемость интактных клеток (контроль) принимали за 100%. Оценивали также темновую токсичность 50 мкМ флавиномононуклеотида (ФМН) (без облучения) и выживаемость при облучении клеток в среде, не содержащей ФМН. На гистограмме приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни, была найдена статистически значимая ($p < 0,05$) разница между экспериментальной группой (50 мкМ ФМН + облучение) и контролем, а также между экспериментальной группой (50 мкМ ФМН + облучение) и двумя другими экспериментальными группами (50 мкМ ФМН без облучения; облучение без ФМН)

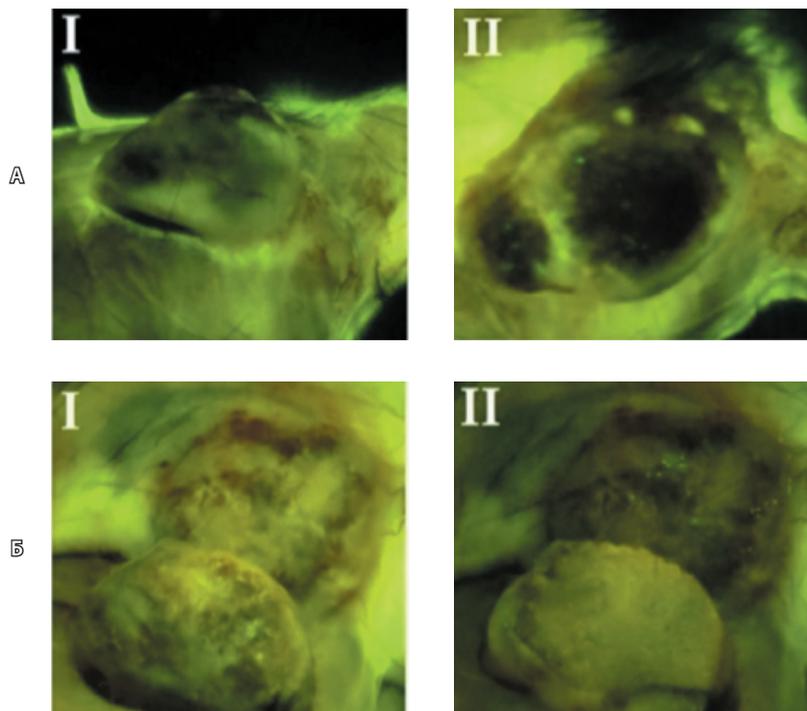


Рис. 2. Эпифлуоресцентные фотографии мыши BDF1 с карциномой легкого Льюис (LLC), привитой на дорсальной стороне животного с откинутым кожным лоскутом. Возбуждение 450 нм, спектральная полоса регистрации флуоресценции 500–570 нм. **А:** I. Поверхность опухоли через 2 часа после системного введения флавинмононуклеотида (ФМН); II. Та же область, срез через центр опухоли. **Б:** I. Поверхность опухоли через 24 часа после системного введения ФМН; II. Та же область, срез через центр опухоли

клеток глиомы U-87 MG и С6 снижение выживаемости составило 35 ± 7 и $40 \pm 4\%$ соответственно (среднее \pm SD) (рис. 1). При этом в темновых условиях инкубация с ФМН в течение тех же 24 ч не приводила к гибели клеток вплоть до концентрации 5 мМ.

Накопление флавинмононуклеотида в опухолевой ткани *in vivo*

Было показано, что ФМН способен накапливаться в перевитой карциноме легкого Льюис в результате системного введения. Так, через 24 ч после введения флуоресцентный сигнал ФМН в опухоли превышал сигнал прилегающих нормальных тканей, при этом визуальный контраст составлял 1:5 (рис. 2). Абсолютные значения флуоресценции были измерены в программе ХСАР. Для каждого животного ($n=2$) было сделано по 10 измерений в области опухоли и по 10 измерений в области нормальных тканей. На основе калибровочных измерений концентрация ФМН в опухоли при этом была оценена как 30 мкМ и выше. Важно также отметить, что в течение 2 часов с момента введения флуоресценция ФМН

была сосредоточена на периферии опухоли, в богатой кровеносными сосудами области, тогда как после 24 ч ФМН был распределен по всему объему опухоли.

Фотодинамическая терапия с использованием флавинмононуклеотида и наноразмерных апконвертирующих фосфоров *in vivo* ФДТ с использованием света ближнего ИК-диапазона (975 нм) для НАФ-опосредованного возбуждения ФМН приводила к значительному уменьшению объема опухоли по сравнению с контрольной группой, ТРО при этом составило $90 \pm 5\%$ (среднее \pm SD) через 50 дней после облучения (рис. 3) ($p < 0,05$). Через 24 ч после сеанса ФДТ по 2 животных из каждой группы выводились из эксперимента для патоморфологического анализа процессов, протекающих в опухолевой ткани. Результаты гистологического исследования опухолей в контрольной группе характеризовались наличием неповрежденных опухолевых клеток без каких-либо изменений. Напротив, опухоли, содержащие комбинацию ФМН и НАФ, продемонстрировали резкое снижение плотности ядро-содержащих клеток. Большинство из них имели вакуолизованную цитоплазму и разрушенные цитоплазматические мембраны. Ядра имели округлую или неправильную форму, были отекающими, с разрывами кариолеммы. Процедура ФДТ также вызывала разрыв кровеносных сосудов с обширными кровоизлияниями в интерстиций опухоли. Основываясь на гистологическом заключении, мы оцениваем диапазон глубины воздействия ФДТ с помощью комбинации «рибофлавин + НАФ» в 8–10 мм с учетом толщины опухолевого очага.

Обсуждение

ФМН вовлечен во многие патологические процессы, включая онкогенез, что приводит к повышенному накоплению его опухолевыми клетками. Например, установлено, что у женщин, страдающих раком молочной железы, концентрация белка-транспортера рибофлавина в крови заметно повышается [13]. Таргетные свойства молекулы ФМН были продемонстрированы ранее для различных типов опухолей, включая карциномы молочной железы, шейки матки или простаты [14–16]. ФМН выступает кофактором различных ферментативных реакций, вследствие чего не распознается белками лекарственной устойчивости как экзогенное вещество. Именно поэтому он может быть перспективным агентом для терапии опухолей, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [17]. Благодаря своим фотохимическим

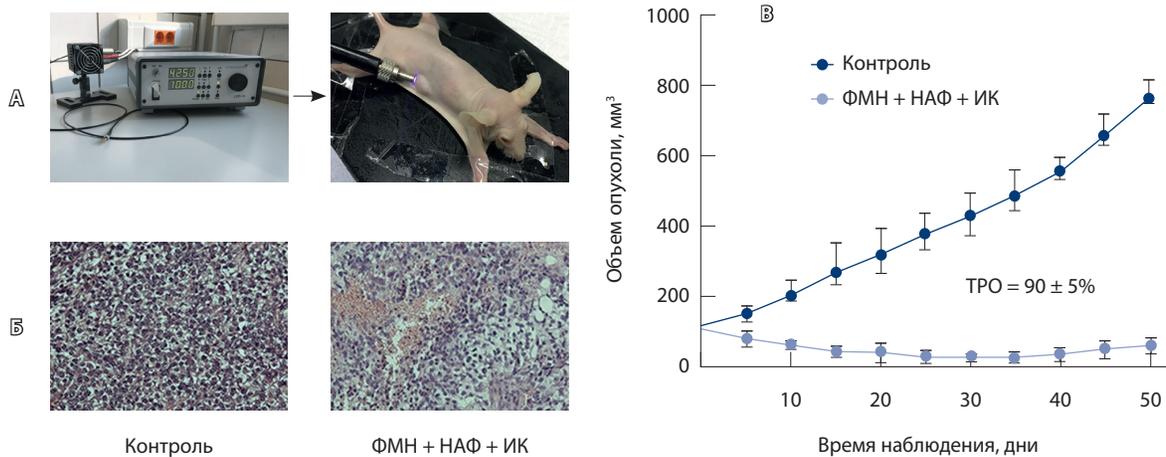


Рис. 3. Экспериментальная лазерная установка для проведения фотодинамической терапии (ФДТ) и мышиная модель аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 (А). Результаты гистологического исследования опухолевой ткани экспериментальной и контрольной групп через сутки после сеанса ФДТ, окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$ (Б). График торможения роста опухоли в экспериментальной и контрольной группах в течение 50 дней после однократного сеанса ФДТ, данные на графике отображены как среднее \pm SD (В); ФМН – флавинмононуклеотид, НАФ – наноразмерные апконвертирующие фосфоры, ИК – инфракрасное излучение, ТРО – торможение роста опухоли

свойствам и способности нарабатывать активные формы кислорода при облучении УФ и синим светом рибофлавин признан эффективным ФС для антибактериальной ФДТ [18]. В отличие от многих органических ФС, ФМН обладает крайне низкой темновой токсичностью и не оказывает ингибирующего эффекта на рост клеток до концентрации как минимум 5 мМ. Для сравнения, фотофрин обладает темновой токсичностью с IC_{50} около 5 мкМ [5, 13], то есть на три порядка выше. Это позволяет рассматривать ФМН как потенциально эффективный ФДТ-агент с минимальными побочными эффектами. При этом световая токсичность ФМН достигается в микромолярном диапазоне концентраций (30–50 мкМ, в зависимости от свойств клеточной линии). Мы показываем, что такая концентрация ФМН (30 мкМ и выше) может быть достигнута при системном введении ФМН в течение 2–24 ч. Полученные нами результаты коррелируют с опубликованными ранее работами, в которых свойства молекулы ФМН адресно накапливаться в опухолевой ткани были продемонстрированы для различных типов опухолей, включая карциному молочной железы, шейки матки, простаты [14–16].

К слабым сторонам ФМН в качестве ФС можно отнести недостаточную глубину проникновения активирующего УФ или синего света в биоткань в результате значительного поглощения света в этом спектральном диапазоне. Например, глубина проникновения на длине волны 360 нм была ранее оценена как 60 мкм, что позволяет достичь

лишь верхнего слоя эпидермиса кожи человека [19]. Напротив, проникновение света в ИК диапазоне может достигать 2–3 см, что делает ИК-опосредованное возбуждение ФС перспективным инструментом ФДТ. В данной работе мы предлагаем подход, основанный на использовании неорганических наночастиц (апконвертирующих нанофосфоров) с заданными оптическими свойствами для преобразования света ближнего ИК диапазона в свет УФ и видимого спектра, что позволяет активировать ФМН в глубине биоткани. Такой подход позволил нам добиться значительного торможения роста опухоли ($90 \pm 5\%$, среднее \pm SD, через 50 дней после облучения), при этом мы оцениваем глубину воздействия ФДТ в 8–10 мм с учетом толщины опухолевого очага. В результате ФДТ были повреждены не только опухолевые клетки, но и стенки кровеносных сосудов, что приводило к обширным кровоизлияниям в интерстиций опухоли. Известно, что именно сосудистые повреждения в результате фотодинамического воздействия обеспечивают наиболее быструю реакцию на проводимую терапию и иногда выявляются даже до завершения лечения [1]. Кроме того, необходимо отметить люминесцентные свойства ФМН и НАФ, которые позволяют использовать комбинацию этих препаратов не только для терапии опухоли, но и для визуализации опухолевого очага (так называемая тераностика). Перспективы применения НАФ в качестве контрастного агента для маркирования опухоли обсуждались нами ранее [20].



Заключение

В данной работе была оценена эффективность применения комбинации рибофлавина (витамина В₂) и НАФ для ФДТ *in vitro* и *in vivo*. Фотовозбуждение рибофлавина при этом осуществлялось с помощью света из ближнего ИК

диапазона спектра и было опосредовано антистоксовой фотолюминесценцией НАФ, что позволило реализовать метод ФДТ в глубине опухолевой ткани (до 3 мм). Описанный подход может быть предложен как перспективное направление в ФДТ солидных опухолей. ☞

Дополнительная информация

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части биоинженерии и Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 17-00-00122 (К) (17-00-00118) в части экспериментов с SK-BR-3 и LLC и № 18-29-01021 в части экспериментов с культурами глиомных клеток U-87 MG и C6.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

Н.В. Шолина и Р.А. Акасов – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; Д.А. Хоченков – сбор и обработка материалов, анализ полученных данных, написание текста; А.Н. Генералова – концепция и дизайн статьи, модификация образцов наноразмерных апконвертирующих фосфоров биосовместимым полимерным покрытием, анализ полученных данных; В.А. Семчишен – анализ экспериментальных результатов исследования; Е.В. Хайдуков – концепция и дизайн статьи, утверждение итогового варианта текста рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Литература / References

- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Grotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Mroz P, Nowis D, Piette J, Wilson BC, Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):250–81. doi: 10.3322/caac.20114.
- Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells *in vitro*. *Phys Med Biol.* 2005;50(11):2597–616. doi: 10.1088/0031-9155/50/11/011.
- Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7(2):61–75. doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001.
- Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food Funct.* 2012;3(5):487–502. doi: 10.1039/c2fo10246c.
- Baier J, Maisch T, Maier M, Engel E, Landthaler M, Bäuml W. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. *Biophys J.* 2006;91(4):1452–9. doi: 10.1529/biophysj.106.082388.
- Yang MY, Chang CJ, Chen LY. Blue light induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide on lethality of HeLa cells. *J Photochem Photobiol B.* 2017;173:325–32. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.06.014.
- Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H. Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin. *Int J Oncol.* 2003;22(6):1291–5. doi: 10.3892/ijo.22.6.1291.
- Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(6):443–56. doi: 10.1093/jnci/85.6.443.
- Nadort A, Sreenivasan VK, Song Z, Grebenik EA, Nechaev AV, Semchishen VA, Panchenko VY, Zvyagin AV. Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue. *PLoS One.* 2013;8(5):e63292. doi: 10.1371/journal.pone.0063292.
- Wang M, Abbineni G, Clevenger A, Mao C, Xu S. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine.* 2011;7(6):710–29. doi: 10.1016/j.nano.2011.02.013.
- Generalova AN, Rocheva VV, Nechaev AV, Khochenkov DA, Sholina NV, Semchishen VA, Zubov VP, Koroleva AV, Chichkova BN, Khaydukova EV. PEG-modified upconversion nanoparticles for *in vivo* optical imaging of tumors. *RSC Adv.* 2016;36(36):30089–97. doi: 10.1039/C5RA25304G.
- Guller AE, Generalova AN, Petersen EV, Nechaev AV, Trusova IA, Landyshev NN, Nadort A, Grebenik EA, Deyev SM, Shekhter AB, Zvyagin AV. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells. *Nano Res.* 2015;8(5):1546–62. doi: 10.1007/s12274-014-0641-6.
- Bareford LM, Avaritt BR, Ghandehari H, Nan A, Swaan PW. Riboflavin-targeted polymer conjugates for breast tumor delivery. *Pharm Res.* 2013;30(7):1799–812. doi: 10.1007/s11095-013-1024-5.
- Thomas TP, Choi SK, Li MH, Kotlyar A, Baker JR Jr. Design of riboflavin-presenting PAMAM dendrimers as a new nanoplatform for cancer-targeted delivery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(17):5191–4. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.07.005.
- Sau A, Sanyal S, Bera K, Sen S, Mitra AK, Pal U, Chakraborty PK, Ganguly S, Satpati B, Das C, Basu S. DNA Damage and apoptosis induction in cancer cells by chemically engineered thiolated riboflavin gold nanoassembly. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(5):4582–9. doi: 10.1021/acsami.7b18837.
- Jayapaul J, Arns S, Bunker M, Weiler M, Rutherford S, Comba P, Kiessling F. *In vivo* evaluation of riboflavin receptor targeted fluorescent USPIO in mice with prostate cancer xenografts. *Nano Res.* 2016;9(5):1319–33. doi: 10.1007/s12274-016-1028-7.
- Rao PN, Levine E, Myers MO, Prakash V, Watson J, Stolier A, Kopicko JJ, Kissinger P, Raj SG, Raj MH. Elevation of serum riboflavin carrier protein in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(11):985–90.
- Makdoui K, Goodrich R, Bäckman A. Photochemical eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by blue light activation of riboflavin. *Acta Ophthalmol.* 2017;95(5):498–502. doi: 10.1111/aos.13409.
- Meinhardt M, Krebs R, Anders A, Heinrich U, Tronnier H. Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. *J Biomed Opt.* 2008;13(4):044030. doi: 10.1117/1.2957970.
- Рочева ВВ, Шолина НВ, Деревяшкин СП, Генералова АН, Нечаев АВ, Хоченков ДА, Семчишен ВА, Хайдуков ЕВ, Степанова ЕВ, Панченко ВЯ. Люминесцентная диагностика опухолей с применением апконвертирующих наночастиц. *Альманах клинической медицины.* 2016;44(2):227–33. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-227-233. [Rocheva VV, Sholina NV, Derevyashkin SP, Generalova AN, Nechaev AV, Khochenkov DA, Semchishen VA, Khaydukov EV, Stepanova EV, Panchenko VYa. Luminescence diagnostics of tumors with upconversion nanoparticles. *Almanac of Clinical Medicine.* 2016;44(2):227–33. Russian. doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-227-233.]



In vitro and *in vivo* photodynamic therapy of solid tumors with a combination of riboflavin and upconversion nanoparticles

N.V. Sholina^{1,2,3} • R.A. Akasov^{2,3} • D.A. Khochenkov¹ • A.N. Generalova^{3,4} • V.A. Semchishen³ • E.V. Khaydukov^{2,3}

Rationale: Riboflavin (vitamin B₂) is one of the most promising agents for photodynamic therapy (PDT). However, its use is limited by the excitation in the ultraviolet (UV) and visible spectral ranges and, as a result, by a small penetration into biological tissue not exceeding a few millimeters. This problem could be solved by approaches ensuring excitation of riboflavin molecules within tumor tissues by infrared (IR) light. Upconversion nanoparticles (UCNPs) can be potentially considered as mediators able to effectively convert the exciting radiation of the near IR range, penetrating into biological tissue to a 3 cm depth, into the photoluminescence in the UV and visible spectral ranges. **Aim:** To evaluate the efficacy of UCNPs for IR-mediated riboflavin activation in the depth of tumor tissue during PDT. **Materials and methods:** The water-soluble riboflavin flavin mononucleotide (FMN, Pharmstandard-UfaVITA, Russia) was used as a photosensitizer in *in vitro* and *in vivo* experiments. The *in vitro* experiments were performed on human breast adenocarcinoma SK-BR-3, human glioblastoma U-87 MG, and rat glioma C6 cell lines. Lewis lung carcinoma (LLC) inoculated to hybrid BDF1 mice was used as a model to demonstrate the delivery of FMN to the tumor. UCNPs with a core/shell structure [NaYF₄:Yb³⁺, Tm³⁺/NaYF₄] were used for photoactivation of FMN *in vivo*. PDT based on FMN, UCNPs and laser radiation 975 nm (IR) was performed on mouse xenografts of human breast adenocarcinoma SK-BR-3. **Results:** We were able to show that FMN

could act as an effective *in vitro* photosensitizer for SK-BR-3, U-87 MG, and C6 cell lines. FMN IC₅₀ values for glioma cells were ~30 μM, and for SK-BR-3 cell line ~50 μM (24 h incubation, irradiation 4.2 J/cm²). In the LLC model, the appropriate concentration of FMN (30 μM and above) can be achieved in the tumor as a result of systemic administration of FMN (at 2 and 24 hours after injection). The effect of PDT using near IR light for UCNP-mediated excitation of FMN was demonstrated in mouse xenografts SK-BR-3, with the tumor growth inhibition of 90 ± 5%. **Conclusion:** The study has demonstrated the possibility to use riboflavin (vitamin B₂) as a photosensitizer for PDT. The photoexcitation of FMN via the anti-Stokes photoluminescence of UCNPs allows for implementation of the PDT technique with the near IR spectral range.

Key words: riboflavin, upconversion nanoparticles, photodynamic therapy, photosensitizer, near infrared light

For citation: Sholina NV, Akasov RA, Khochenkov DA, Generalova AN, Semchishen VA, Khaydukov EV. *In vitro* and *in vivo* photodynamic therapy of solid tumors with a combination of riboflavin and upconversion nanoparticles. Almanac of Clinical Medicine. 2019;47(7):647–53. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-057.

Received 5 July 2019; revised 17 October 2019; accepted 24 October 2019; published online 1 November 2019

Funding

The study was performed with the support from the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation as a part of the state research task for the Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of Russian Academy of Sciences (the bioimaging part of the study) and from the Russian Foundation for Fundamental Research as research projects #17-00-00122 (K) (17-00-00118) (the experiments with SK-BR-3 and LLC) and #18-29-01021 (the experiments with U-87 MG and C6 glioma cell cultures).

Conflict of interests

All the authors declare no potential conflict of interests that would necessitate any disclosure in this publication.

Authors' contributions

N.V. Sholina and R.A. Akasov, the study concept and design, data collection and management, analysis of the results, text writing; D.A. Khochenkov, data collection and managements, analysis of the results, text writing; A.N. Generalova, the study concept and design, modification of the upconversion nanoparticle phosphorus samples with a biocompatible polymer coating, analysis of the results; V.A. Semchishen, analysis of the experimental results; E.V. Khaydukov, the paper concept and design, approval of the final version of the manuscript. All the authors have significantly contributed to the study conduct and paper preparation, have read and approved the final version before submission.

Natal'ya V. Sholina – Postgraduate Student, Junior Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis¹; Laboratory of Photon Bioengineering, Institute of Molecular Medicine²; Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0001-9866-2878

✉ 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation. Tel.: + 7 (926) 957 96 63. E-mail: SholinaNV@gmail.com

Roman A. Akasov – PhD, Research Fellow, Laboratory of Photon Bioengineering, Institute of Molecular Medicine²; Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0001-6486-8114

Dmitry A. Khochenkov – PhD (in Biol.), Head of the Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis¹; ORCID: 0000-0002-5694-3492

Alla N. Generalova – PhD (in Chem.), Senior Research Fellow, Laboratory of Laser Biomedicine³; Laboratory “Polymers for Biology”⁴; ORCID: 0000-0001-9646-1693

Vladimir A. Semchishen – PhD (in Phys. and Math.), Leading Research Fellow, Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0003-1035-3013

Evgeny V. Khaydukov – PhD (in Phys. and Math.), Head of the Laboratory of Photon Bioengineering, Institute of Molecular Medicine²; Head of the Laboratory of Laser Biomedicine³; ORCID: 0000-0002-3900-2949

¹N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russian Federation

³Federal Scientific Research Centre “Crystallography and Photonics” of Russian Academy of Sciences; 59 Leninsky prospekt, Moscow, 119333, Russian Federation

⁴M.M. Shemyakin – Yu.A. Ovchinnikov Institute of Biorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences; 16/10 Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation