

На правах рукописи

ШОЛИНА НАТАЛЬЯ ВАЛЕРИЕВНА

**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ЭНДОГЕННОЙ
ПРИРОДЫ И НАНОРАЗМЕРНЫХ АПКОНВЕРТИРУЮЩИХ ФОСФОРОВ**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович)

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Степанова Евгения Владиславовна

кандидат физико-математических наук

Хайдуков Евгений Валерьевич

Официальные оппоненты:

Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор, профессор центра фотоники и квантовых материалов Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» (Сколтех)

Гельфонд Марк Львович, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник научного отделения торакальной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» июня 2021 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....»2021 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень ее разработанности

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - клинически одобренная минимально инвазивная терапевтическая процедура, основанная на селективном накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в ткани и сосудистой сети опухоли с последующим образованием активных форм кислорода (АФК) и продуктов фотораспада ФС при облучении светом, вызывающих гибель злокачественных клеток. ФДТ существенно расширяет арсенал имеющихся на сегодняшний день методов лечения опухолей различной локализации, а также рекомендована при опухолях, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. По сравнению с хирургическим вмешательством ФДТ является малоинвазивным методом с более коротким реабилитационным периодом. Клинически одобренные ФС гематопорфиринового (первое поколение) и хлоринового (второе поколение) ряда имеют некоторые недостатки, среди которых системная токсичность и длительный реабилитационный период после сеансов терапии, что существенно влияет на качество жизни пациентов. Поиск новых соединений, лишенных недостатков первого и второго поколения ФС, является одной из актуальных задач для повышения эффективности метода ФДТ.

Эффективные ФС не должны проявлять токсические свойства в отсутствие облучения, преимущественно накапливаться опухолевыми тканями, обладать коротким периодом полувыведения из организма, иметь высокую эффективность наработки АФК и желательно фотоактивироваться под действием фотонов из красной или ближней инфракрасной (ИК) области спектра, поскольку они способны глубоко проникать в биоткани. Одним из таких соединений, которое удовлетворяет этим требованиям является рибофлавин (витамин В2) и его дериватив - флавиномононуклеотид (ФМН). Рибофлавин является кофактором для различных ферментативных реакций и его можно рассматривать как эндогенный ФС, генерирующий больше синглетного кислорода (СК), чем синтетические ФС, такие как клинически используемый Фотофрин, Фотосенс, Радахлорин и др. Благодаря своим фотохимическим свойствам и способности образовывать АФК при облучении ультрафиолетовым (УФ) и синим светом рибофлавин был продемонстрирован как эффективный антибактериальный и противовирусный агент, а также рассматривался в качестве ФС для лечения рака шейки матки и меланомы в условиях *in vitro*. В отличие от применяемых ФС, рибофлавин считается безопасным, а для его водорастворимой формы – ФМН, темновая токсичность не установлена. Рибофлавин не распознается белками множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), поэтому может преодолевать резистентность, часто возникающую в опухолях.

Рибофлавин так же, как и его водорастворимая форма ФМН, имеет две линии поглощения с центром при 365 нм (УФ) и 450 нм (синий диапазон спектра), что является

сдерживающим фактором для его клинического применения, поскольку свет на длине волны 450 нм проникает в биоткань лишь на глубину 1,5–2 мм. Именно по этой причине требуются дополнительные способы его опосредованной фотоктивации на большей глубине биоткани. Решение этой проблемы стало возможным благодаря созданию новых неорганических наноматериалов – наночастиц с антистоксовой фотолюминесценцией (наноразмерные апконвертирующие фосфоры, НАФ), способных конвертировать глубоко проникающий ближний ИК свет на длине волны 975 нм в свет УФ и видимого диапазона спектра, необходимый для возбуждения рибофлавина и увеличения эффективности его фототерапевтического действия.

Таким образом, исследование возможности применения рибофлавина в качестве ФС как самостоятельно, так и в комбинации с НАФ является важной задачей, решение которой позволит разработать высокоэффективный метод ФДТ с минимальными побочными эффектами.

Цель исследования

Исследовать эффективность фотодинамической терапии солидных опухолей животных и человека с использованием флавиномононуклеотида в качестве фотосенсибилизатора как самостоятельно, так и в комбинации с наноразмерными апконвертирующими фосфорами.

Задачи исследования

1. Исследовать темновую цитотоксичность флавиномононуклеотида и эффективность его внутриклеточного накопления в отношении ряда опухолевых и нормальных клеточных линий.
2. Исследовать фототоксичность флавиномононуклеотида в отношении ряда опухолевых и нормальных клеток при его прямой фотоактивации светом синего диапазона спектра.
3. Продемонстрировать эффективность применения флавиномононуклеотида в качестве самостоятельного фотосенсибилизатора для ФДТ солидных опухолей животных и человека.
4. Исследовать опосредованную наноразмерными апконвертирующими фосфорами фотоактивацию флавиномононуклеотида светом ближнего ИК диапазона спектра и продемонстрировать эффективность их комбинации для ФДТ солидных опухолей.

Методы и методология исследования

В качестве модельной системы *in vitro* были использованы клетки меланомы человека Mel Z, Mel II и Mel MTP, полученные из опухолевого материала пациентов, проходящих лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Блохина» Минздрава России. Фибробласты человека BJ-5ta, кератиноциты кожи человека HaCaT, клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-

3, клетки глиобластомы человека U-87 MG, глиомы крысы C6, клетки меланомы кожи человека A375 и меланомы мыши B16-F10 были получены из Американской коллекции типированных культур (АТСС). Оценка антипролиферативного эффекта рибофлавина и НАФ осуществлялась с помощью МТТ-теста. Уровень клеточного накопления ФМН и механизм клеточной гибели определяли методом проточной цитофлуориметрии после окраски аннексином V и йодистым пропидием (PI). Исследование внутриклеточной локализации ФМН проведено методом конфокальной микроскопии на клеточном анализаторе InCell Analyzer 6000. Измерение уровня АФК исследовали с помощью платинированного нанозлектрода, а также с использованием флуоресцентного красителя CellROX Deep Red (Molecular Probes, Thermo). Накопление ФМН и НАФ в опухолевой ткани *in vivo* изучали на модели эпидермоидной карциномы легких Льюис (LLC) на мышах - гибридах BDF1 с использованием эпилюминесцентной имиджинговой системы, разработанной в Институте фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (ИФТ РАН, г. Троицк). ФДТ с использованием ФМН в качестве ФС изучена на модели ксенотрансплантатов меланомы кожи человека Mel IL и A375 на мышах линии Balb/c nu/nu. Содержание меланина *in vitro* оценивали путем измерения спектра поглощения в лизатах клеток ДМСО (106 кл/мл) с использованием спектрофотометра Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Длительность циркуляции НАФ в кровотоке малых животных исследована с помощью антистоксового флуоресцентного микроскопа (ИФТ РАН, г. Троицк). ФДТ солидной опухоли с применением ФМН и НАФ проведена на мышах линии Balb nu/nu и ксенотрансплантатах аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.

Научная новизна

Исследовано различие в накоплении ФМН опухолевыми и нормальными клеточными линиями, а также продемонстрировано его избирательное фототоксическое действие в отношении злокачественных клеток. Значение IC50 для опухолевых клеток (A375, Mel IL и Mel Z) находится в диапазоне концентраций 10–30 мкМ, достижимых в опухолевой ткани при системном введении ФМН. Выполнена дифференциальная оценка вклада в цитотоксичность АФК и продуктов фоторазложения ФМН, образующихся при облучении светом УФ и синего диапазона спектра. Показана регрессия ксенотрансплантата меланомы кожи в результате внутривенного введения ФМН с последующим облучением. Показано, что применение наночастиц, преобразующих кванты ближнего ИК диапазона спектра в УФ и синий свет позволяет фотоактивировать ФМН и, как следствие, реализовать ФДТ на большей глубине биоткани, что продемонстрировано на модели ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в том, что установлены концентрации препарата и дозы светового воздействия, необходимые для запуска механизмов клеточной гибели и подавления роста солидных опухолей животных и человека при проведении процедуры ФДТ. Результаты работы позволяют расширить спектр ФС, не проявляющих системных токсических свойств, селективно накапливающихся в опухолевой ткани и эффективно нарабатывающих АФК, в том числе под действием фотонов из ближней ИК области спектра.

Личный вклад

Автор самостоятельно провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимала непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология и области исследования п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

1. Флавинмононуклеотид не проявляет темновую токсичность в отношении опухолевых и нормальных клеточных линий человека и животных в концентрациях до 5 мМ.
2. Повышенное внутриклеточное накопление флавинмононуклеотида в опухолевых клетках, по сравнению с нормальными клеточными линиями, определяет перспективность его использования в качестве фотосенсибилизатора, а значение IC_{50} для опухолевых клеток (A375, Mel IL и Mel Z) находится в диапазоне концентраций 10–30 мкМ, достижимых в опухолевой ткани *in vivo* при системном введении ФМН.
3. Флавинмононуклеотид при его возбуждении светом синего диапазона спектра выступает в качестве эффективного фотосенсибилизатора для ФДТ меланомы человека и животных и при однократном воздействии тормозит рост опухоли, а его комбинированное применение с наноразмерными апконвертирующими фосфорами позволяет провести ФДТ светом ближнего ИК диапазона спектра.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в работе лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и лаборатории лазерной биомедицины ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Основные положения диссертации доложены на следующих конференциях: XIX Российский онкологический конгресс (Москва, 2015 г.), II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2016 г.), III Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017 г.), XXII Российский онкологический конгресс (Москва, 2018 г.), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2018 г.), The 43rd FEBS Congress (Прага, Чехия), Single-Molecule Sensors and NanoSystems International Conference 2020 (Мюнхен, 2019 г.), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2019 г.), IX Международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2020 г.).

Апробация

Апробация диссертационной работы состоялась 5 марта 2021 года с участием лабораторий и отделений ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России: лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ ЭДиТО и лаборатории лазерной биомедицины ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 15 научных работах, из них 8 статей в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных рнончгнм ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 127 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием использованных материалов и методов, глав «Результаты» и «Обсуждение результатов», заключения и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 265 отечественных и зарубежных источников, содержит 24 иллюстрации и 3 таблицы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Исследование фототоксичности ФМН и его фотопродуктов *in vitro*

Была изучена фототоксичность флавиномононуклеотида (ФМН) - основной формы рибофлавина, в которой данный витамин находится в живых клетках и тканях.

Было показано, что *в темновых условиях* ФМН не проявлял токсических свойств и не подавлял пролиферацию клеточных линий вплоть до концентрации 5 мМ (Рисунок 1, 2).

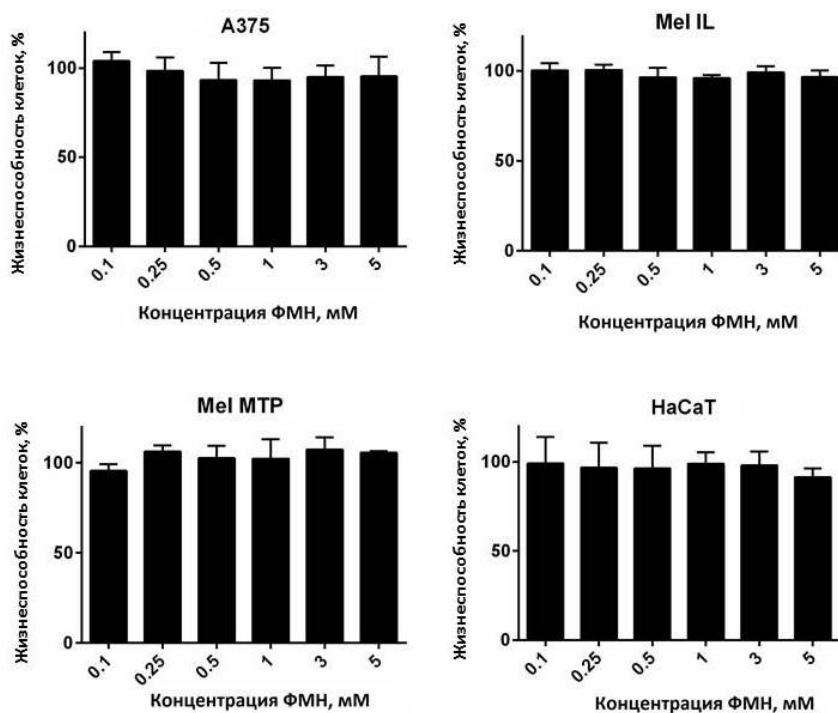


Рисунок 1 — Жизнеспособность клеток меланомы кожи человека A375, Mel IL, Mel MTP и кератиноцитов кожи человека HaCaT в присутствии ФМН в концентрациях до 5 мМ без облучения. На гистограммах приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

Облучение тех же клеточных линий, инкубированных с ФМН, приводило к клеточной гибели, выраженность которой зависела от концентрации ФМН и дозы облучения (Рисунок 2, 3).

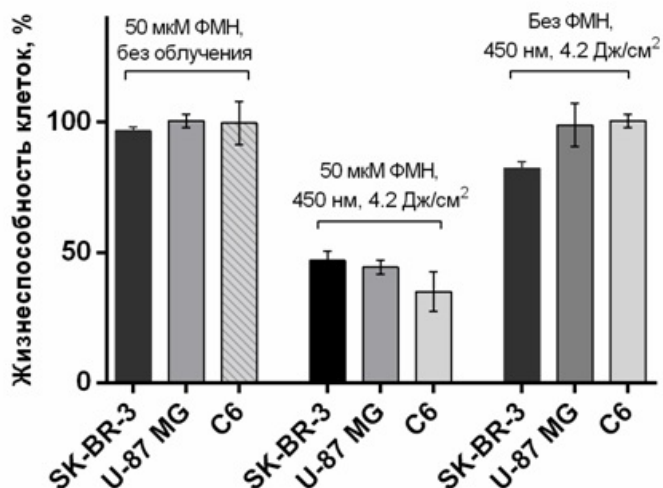


Рисунок 2 - Жизнеспособность клеток SK-BR-3, глиомы человека U87-MG и глиомы крысы C6 в присутствии 50 мкМ ФМН в течение 90 мин и облучения синим светом (450 нм, доза облучения 4,2 Дж/см²), $p < 0,05$

Для демонстрации зависимости токсичности ФМН от дозы облучения, выживаемость клеток меланомы человека A375, Mel IЛ и кератиноцитов кожи HaCaT оценивалась в течение 48 часов в диапазоне доз 0,2 Дж/см² - 7 Дж/см². Для всех линий клеток была обнаружена четкая зависимость от дозы облучения, при этом для линии HaCaT такая зависимость проявлялась лишь при 100 мкМ ФМН, в то время как концентрации 10 мкМ и 30 мкМ ФМН практически не подавляли рост клеток даже при высокой дозе облучения. Наоборот, для клеток меланомы A375 зависимые от дозы кривые облучения были продемонстрированы даже при 10 мкМ ФМН. Было обнаружено, что низкая доза облучения 2 Дж/см² достаточна для достижения максимального ингибирования роста опухолевых клеток, в то же время более высокие дозы света не увеличивали цитотоксичность ФМН (Рисунок 3).

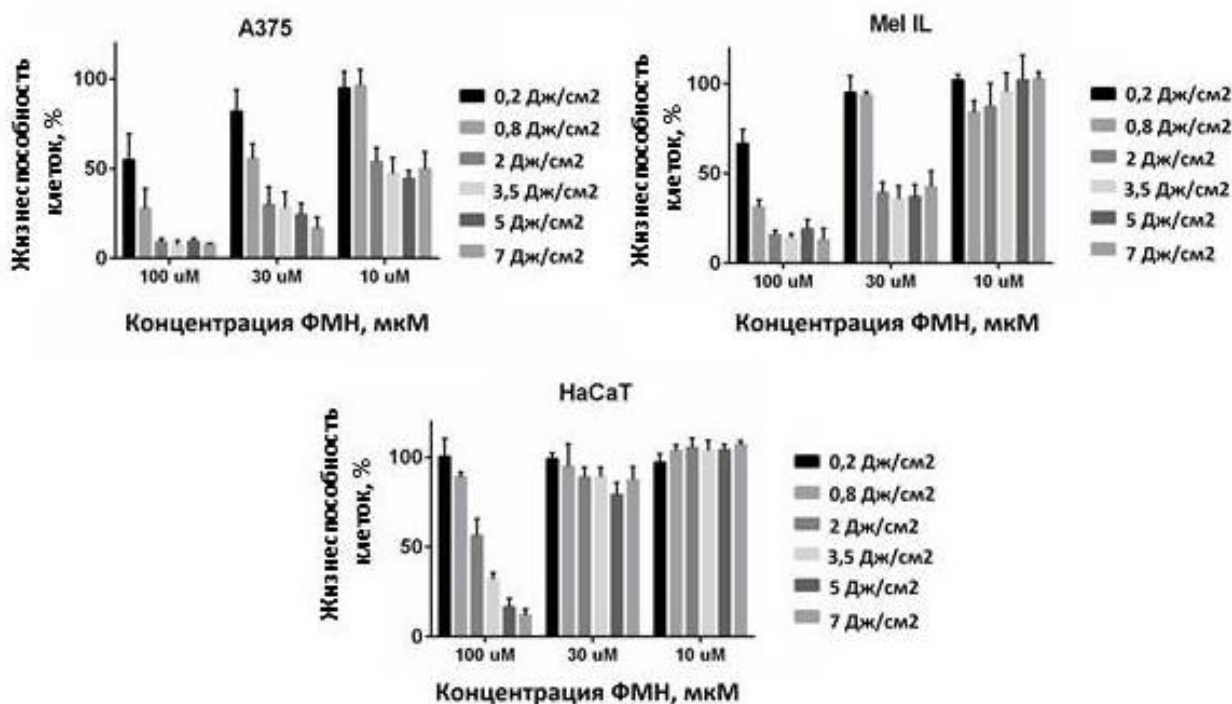


Рисунок 3 — Жизнеспособность клеток A375, Mel IL и HaCaT в присутствии ФМН в концентрациях 10 – 100 мкМ в зависимости от дозы облучения (от 0,2 до 7 Дж/см²), $p < 0,05$

Поскольку фототоксический эффект ФМН может быть связан как с токсичностью АФК, генерируемых в ходе облучения, так и с токсичностью продуктов фотораспада ФМН, мы оценили вклад каждого из этих компонентов отдельно. Для этого мы модифицировали стандартный протокол оценки выживаемости клеток. Так, для оценки вклада АФК с коротким временем жизни, среда, содержащая ФМН и продукты его фотораспада, удалялась сразу после завершения облучения (450 нм, 5 Дж/см²). Для оценки токсичности фотопродуктов раствор ФМН в бесклеточной питательной среде облучали при тех же условиях (450 нм, 5 Дж/см²), оставляли на 24 часа и затем этот раствор добавляли к культуре клеток для оценки токсичности. Показано, что воздействие каждого из этих компонентов (АФК, продукты фотораспада) уступает их комбинированной токсичности (Рисунок 4, 5).

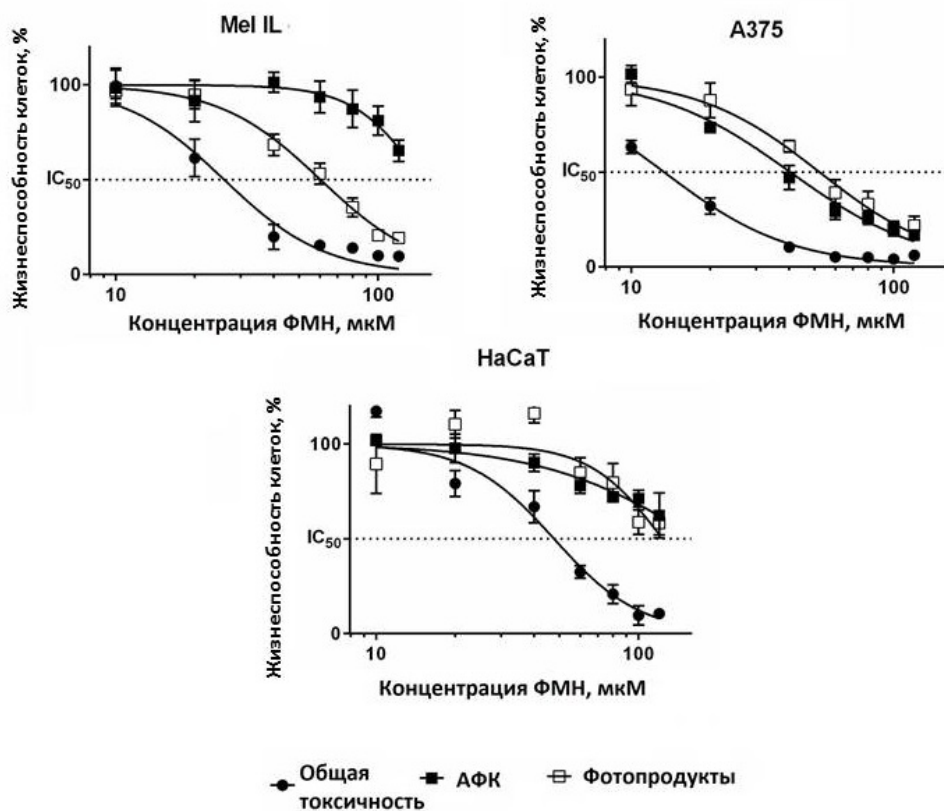


Рисунок 4 — Влияние АФК и продуктов фотораспада ФМН на жизнеспособность клеток Mel IL, A375 и HaCaT после фотоактивации ФМН (450 нм). Концентрации ФМН - 10 – 100 мкМ, доза облучения - 5 Дж/см², $p < 0,05$

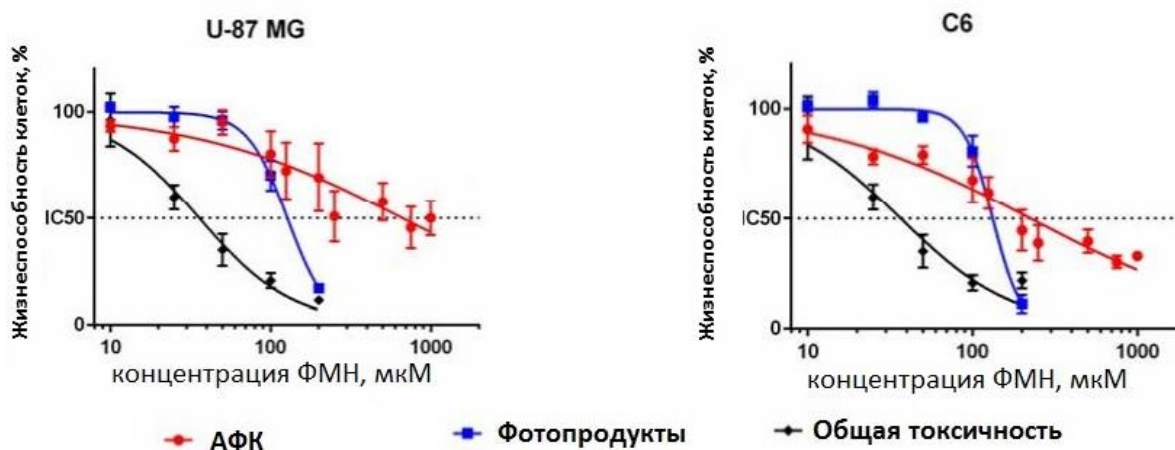


Рисунок 5 — Влияние АФК и продуктов фотораспада ФМН на жизнеспособность клеток U87-MG и C6 после фотоактивации ФМН (450 нм). Концентрации ФМН - 10 – 1000 мкМ, доза облучения - 5 Дж/см², $p < 0,05$

Одним из факторов защиты от токсического действия радикалов и синглетного кислорода может выступать антиоксидантная функция меланина в клетках. Уровень меланина был оценен путем измерения спектра поглощения в лизатах клеток и показано, что для клеток с высоким уровнем меланина (Mel IL, Mel Z) токсичность фотопродуктов была выше, чем токсичность АФК. Для клеток с низким уровнем меланина (A375) более токсичным был вклад АФК (Рисунок 6).

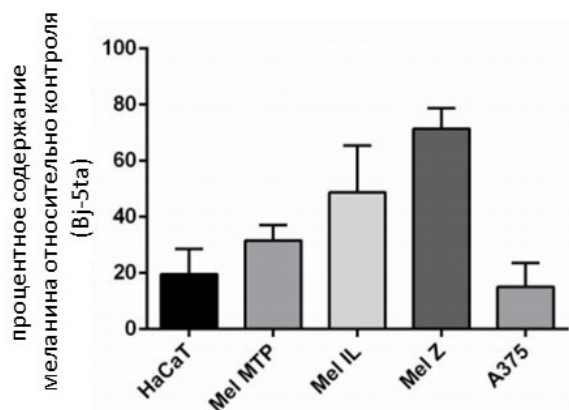


Рисунок 6 — Содержание меланина в клеточных линиях Mel MTP, Mel IL, Mel Z, A375 и HaCaT. Результаты выражены как среднее значение интенсивности поглощения, относительно содержания меланина в дермальных фибробластах человека Vj-5ta, $p < 0,05$

Исследование клеточного накопления ФМН

Накопление ФМН оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием опухолевых клеток и двух нормальных клеточных линий (кератиноциты человека HaCaT и фибробласты кожи человека VJ-5ta). Найдено, что опухолевые клетки демонстрируют более высокое накопление ФМН по сравнению с кератиноцитами кожи HaCaT. Более того, клеточные линии меланомы, а именно Mel MTP, Mel IL, M-3, накапливали больше ФМН, чем фибробласты VJ-5ta (в диапазоне концентраций ФМН 10-100 мкМ), тогда как накопление ФМН в клетках A375 было на уровне VJ-5ta. Клетки SK-BR-3 были предложены в качестве положительного контроля, поскольку по литературным данным эта линия клеток демонстрирует высокое накопление рибофлавина (Рисунок 7, 8).

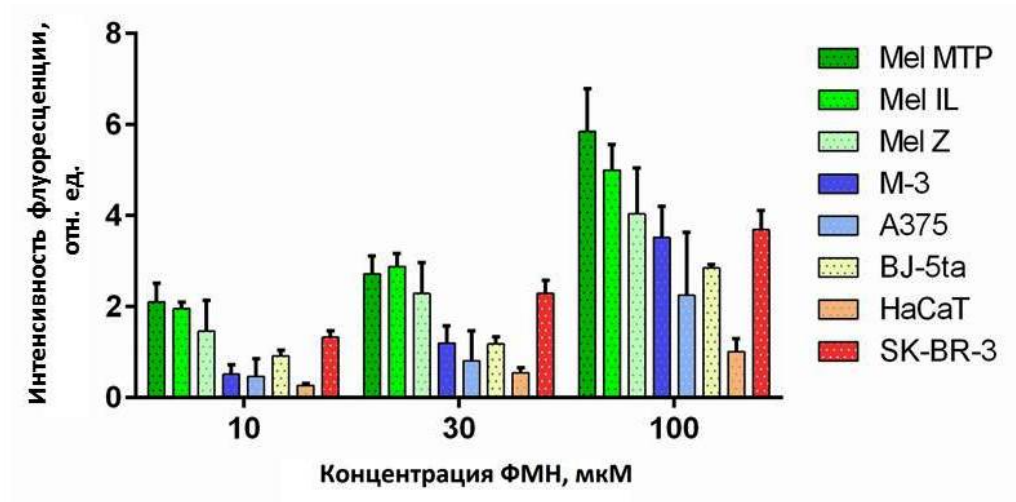


Рисунок 7 — Уровни накопления ФМН, исследованные методом проточной цитометрии, в опухолевых и нормальных клеточных линиях в диапазоне концентраций ФМН 10–100 мкМ. На гистограмме приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

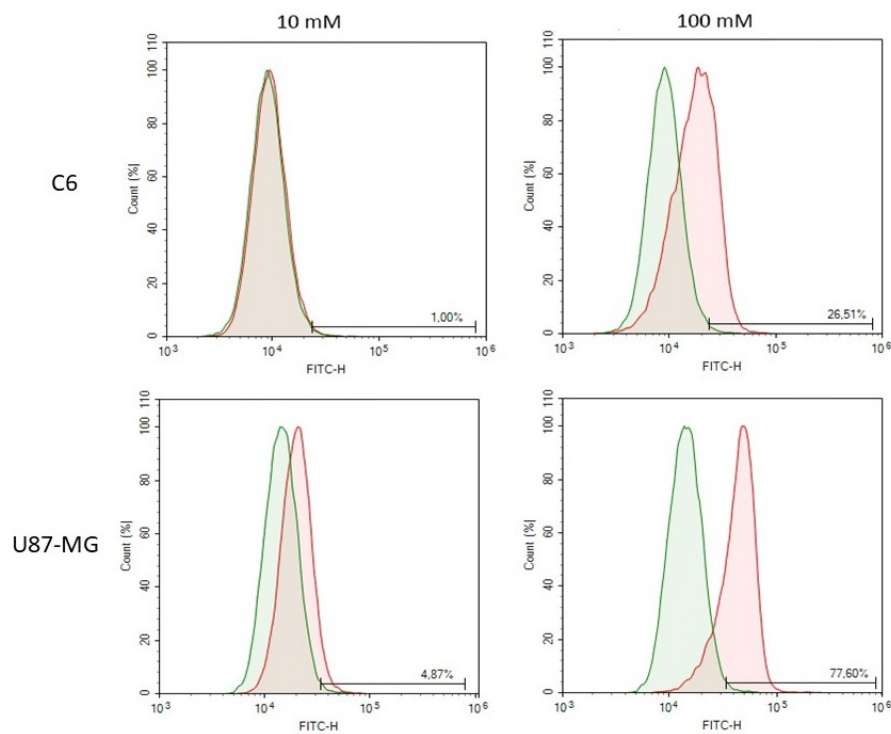


Рисунок 8 — Зависимость накопления ФМН клетками C6 и U87-MG от его концентрации, $p < 0,05$

Методом конфокальной микроскопии показано точечное накопление ФМН на клеточной мембране (Рисунок 9).

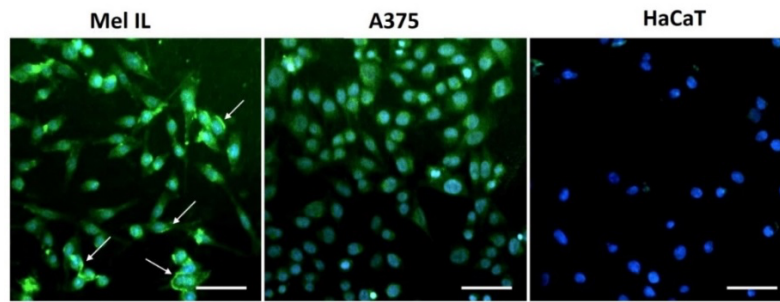


Рисунок 9 — Исследование накопления и внутриклеточной локализации ФМН в опухолевых клетках меланомы кожи. Клетки инкубировали с раствором ФМН (100 мкМ) в течение 30 мин. Ядра клеток окрашены синим цветом (Hoechst 33258), ФМН - зеленым. Стрелками показана локализация ФМН на клеточной мембране. Масштабная линейка 50 мкм

Исследование клеточной гибели

При исследовании механизмов клеточной гибели показано, что апоптоз был более характерен для низкой (10 мкМ) и средней (30 мкМ) концентрации ФМН, в свою очередь высокие концентрации ФМН (100 мкМ) значительно увеличивали популяцию мертвых клеток (Таблица 1).

Таблица 1 — Количество жизнеспособных клеток (%) после фотоактивации ФМН (30 мин инкубации, 450 нм, доза облучения 5 Дж/см²) в Mel MTP и Mel IL. Окрашивание аннексином V-FITC (An) и йодидом пропидия (PI), $p < 0,05$

	Mel MTP, %				Mel IL, %			
	An-PI-	An+PI-	An-PI+	An+PI+	An-PI-	An+PI-	An-PI+	An+PI+
100мкМ ФМН + свет	4.6±3.2	46.1±4.6	2.6±1.2	46.5±6.5	5.2±1.9	47.4±3.1	4.0±1.5	43.4±5.4
30мкМ ФМН + свет	15.7±2.3	66.7±5.0	1.5±0.2	16.1±5.8	32.3±1.8	46.2±6.3	1.8±0.2	19.8±5.2
10мкМ ФМН + свет	11.6±2.4	74.1±0.6	1.3±0.2	12.9±2.6	25.3±3.4	61.5±3.7	1.5±1.1	11.7±1.7
свет (контроль)	53.3±2.1	46.6±2.0	0.1±0.1	0.1±0.1	53.0±4.7	43.9±2.7	1.0±0.8	2.1±1.8
ФМН (контроль)	87.5±2.5	12.3±2.6	0.2±0.1	0.1±0.1	82.2±3.7	16.5±3.9	1.1±0.3	0.2±0.2

Измерение уровня АФК *in vitro*

Использование электрохимического зонда на основе платинированных углеродных наноэлектродов для измерения внутриклеточных АФК позволило в режиме реального времени отследить наработку АФК при фотоактивации ФМН *in vitro*.

Фотоактивация ФМН *in vitro* запускалась с помощью флуоресцентной светодиодной установки с длиной волны лазера 450 нм (Полироник, Россия). Измерения АФК, вызванные фотоактивацией ФМН, начинались, когда сигнал АФК достигал плато, которое можно считать фоновым уровнем, типичным для исследуемой клеточной линии. Выключение света приводило к возвращению к фоновому внутриклеточному уровню АФК вследствие короткого периода жизни. Этот подход позволил отслеживать выработку АФК путем электрохимического обнаружения в режиме реального времени до и во время облучения светом, что невозможно реализовать с помощью обычных флуоресцентных зондов (Рисунок 10).

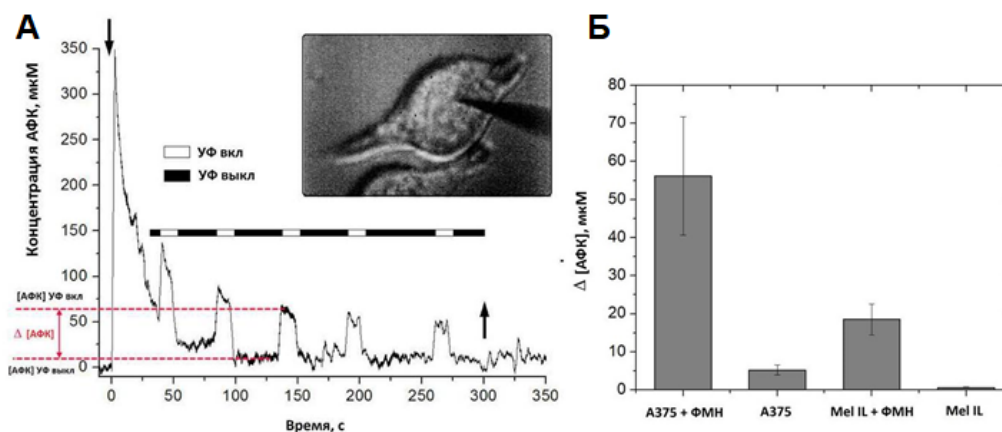


Рисунок 10 — Измерение АФК *in vitro* в режиме реального времени. **А.** Электрохимический платинированный наноэлектрод для измерения уровня АФК в клетках меланомы кожи человека А375 (фото на вставке) после предварительной инкубации с 100 мкМ ФМН. Темная шкала - выключение света (УФ выкл), белая шкала - включение света (УФ вкл). Моменты ввода электрода в клетку и выход из клетки показаны стрелками, направленными вниз и вверх, соответственно. Изменения уровня АФК при фотоактивации ФМН рассчитывали по следующей формуле: $\Delta[\text{АФК}] = [\text{АФК}]_{\text{УФ вкл}} - [\text{АФК}]_{\text{УФ выкл}}$; **Б.** Сравнение $\Delta[\text{АФК}]$ в клеточных линиях меланомы кожи человека А375 и Mel IL как в результате фотоактивации ФМН (100 мкМ, 450 нм), так и в контрольных клетках (облучение без инкубации с ФМН), $p < 0,05$

Было обнаружено, что облучение светом приводит к быстрому росту продукции АФК. Таким образом, клетки А375, предварительно инкубированные с 100 мкМ ФМН, были способны продуцировать 56 ± 15 мкМ АФК, тогда как клетки Mel IL продуцировали только $18,5 \pm 4$ мкМ АФК. Облучение контрольной группы клеток (не инкубированных с ФМН)

привело к незначительным изменениям уровней АФК (5 ± 1 мкМ для клеток A375 и $1 \pm 0,5$ мкМ для клеток Mel IL), подтверждая, что ФМН является источником АФК (Рисунок 10Б). Следует отметить, что измерение АФК с помощью электрохимического зонда имеет высокую чувствительность и позволяет определять уровни АФК ниже 1 мкМ.

Продукцию АФК в клетках меланомы после облучения ФМН также измеряли с помощью традиционно используемого полуколичественного метода определения АФК - окрашивание флуоресцентным красителем CellROX Deep Red (Thermo Fisher Scientific, США). Действительно, четкая корреляция между концентрацией ФМН и продуцированием АФК была подтверждена для клеток Mel IL и A375 (Рисунок 11А). Флуоресцентный сигнал АФК для 10 мкМ ФМН был примерно в 1,25 раза выше по сравнению с контролем, а для 100 мкМ ФМН он был примерно в 1,75 раза выше (Рисунок 11Б).

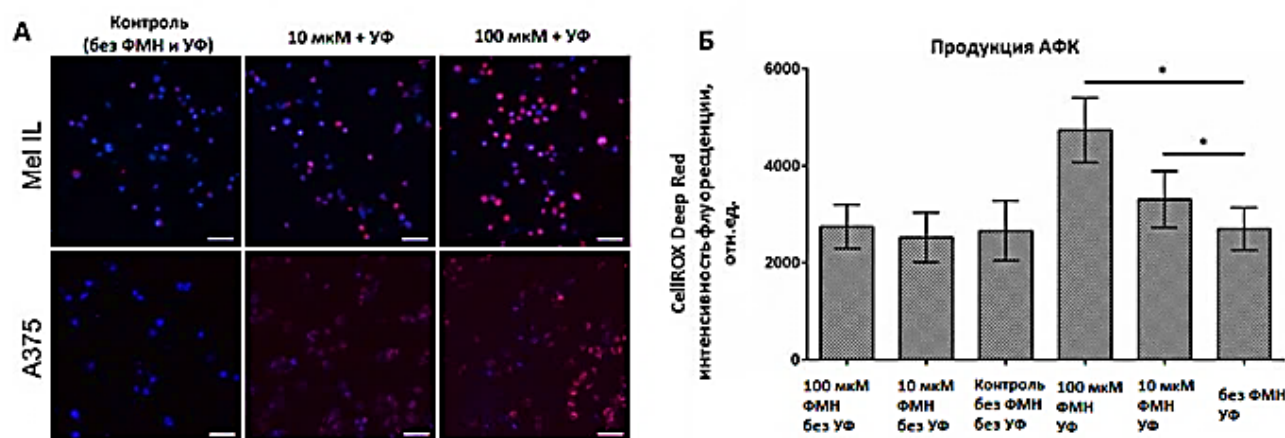


Рисунок 11 — Исследование генерации АФК с помощью флуоресцентного красителя CellROX Deep Red. Клетки подвергали облучению - 450 нм, 5 Дж/см² А. Продукция АФК в клетках Mel IL и A375, качественно показанная с помощью флуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии. Ядра клеток отмечены синим цветом (Hoechst 33258), CellROX Deep Red - красным. Масштабная линейка 50 мкм. Б. Полуколичественное измерение уровня АФК в клетках Mel IL в зависимости от концентрации ФМН (10 – 100 мкМ) на основании данных интенсивности флуоресценции красителя CellROX Deep Red, полученных методом конфокальной микроскопии, $p < 0,05$

В отличие от электрохимического обнаружения в режиме реального времени, флуоресцентный метод подходит для определения АФК во всех обработанных клетках во время цикла облучения, поэтому эти две техники дополняют друг друга.

Исследование накопления ФМН *in vivo*

В экспериментах *in vivo* показано, что концентрация ФМН, необходимая для проявления подтвержденных в *in vitro* цитотоксических свойств (30 мкМ и выше) может быть достигнута при системном введении ФМН в течение 2-24 часов.

Для оценки накопления ФМН *in vivo* была использована модель перевитой эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC, ATCC, CRL-1642TM). Через 2 часа после введения ФМН флуоресцентный сигнал регистрировался по периферии опухоли, при этом визуальный контраст составлял 1:10 (Рисунок 12А). Через 24 часа после введения ФМН визуально видно, что, несмотря на высокое интерстициальное давление, которое препятствует проникновению и распределению основного количества ФС, сигнал от ФМН регистрируется по всему объему опухоли (Рисунок 12Б). На основе калибровочных измерений программного обеспечения XCAP for Windows имиджинговой системы с отложенной регистрацией сигнала (ИФТ РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, г. Троицк), концентрация ФМН в опухоли через 24 часа оценена как 30 мкМ и выше (Рисунок 12В).

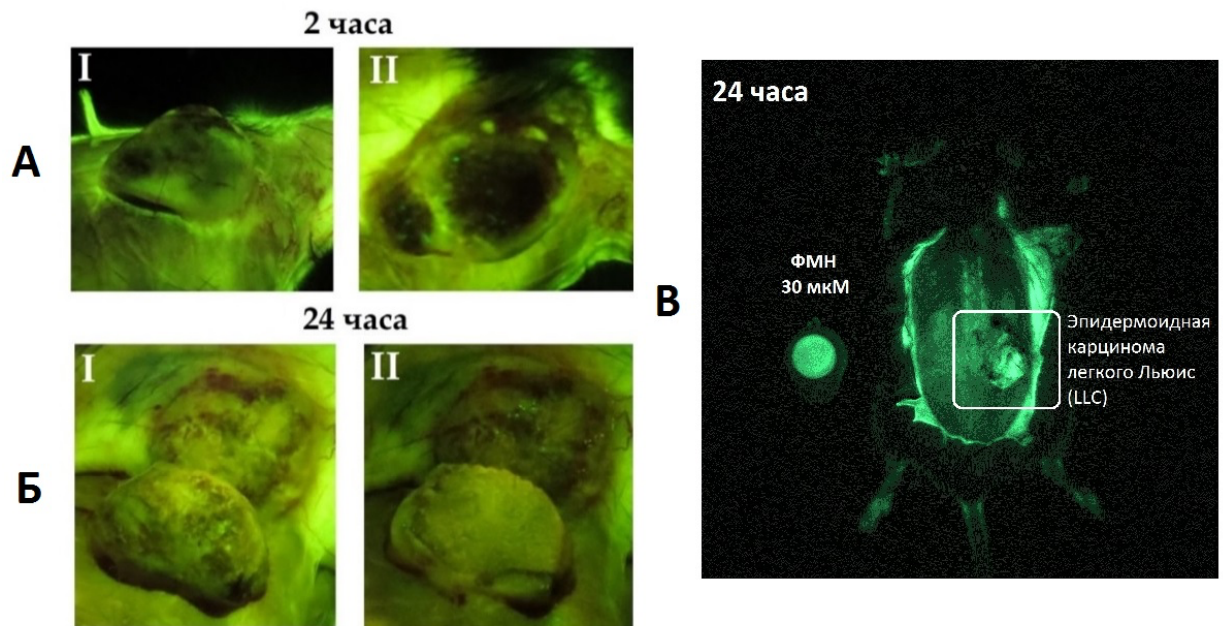


Рисунок 12 — Исследование накопления ФМН *in vivo*. Фотографии мыши BDF1 с карциномой легкого Льюис (LLC), привитой на дорсальной поверхности тела животного с откинутым кожным лоскутом. Возбуждение ФМН - 450 нм, спектральная полоса регистрации флуоресценции – 500 – 570 нм. **А.** I. Поверхность опухоли через 2 часа после системного введения 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. **В.** Эпифлуоресцентное изображение мыши BDF1 с перевитой опухолью LLC с откинутым кожным лоскутом через 24 часа после инъекции ФМН. Рядом с животным - пластиковая кювета, содержащая раствор ФМН с концентрацией ≈ 30 мкМ (зеленый - псевдоцвет)

ФДТ первичной опухоли

Для оценки эффективности ФМН в качестве ФС для ФДТ *in vivo*, проводили серию экспериментов на мышах с ксенотрансплантатом меланомы кожи человека Mel II (высокопигментированная) и A375 (низкопигментированная) (Рисунок 13А, Б). Торможение роста опухоли (ТРО) после однократной процедуры составило 85% для A375 и 89% для Mel II (Рисунок 13В). Таким образом, в условиях *in vivo* показано, что высокий уровень меланина в опухоли Mel II не является препятствием для эффективности ФДТ. Морфологическое исследование образцов опухолевой ткани через 24 часа после процедуры ФДТ показал повреждение не только опухолевых клеток, но и дистрофические изменения кровеносных сосудов (Рисунок 13Г, Д).

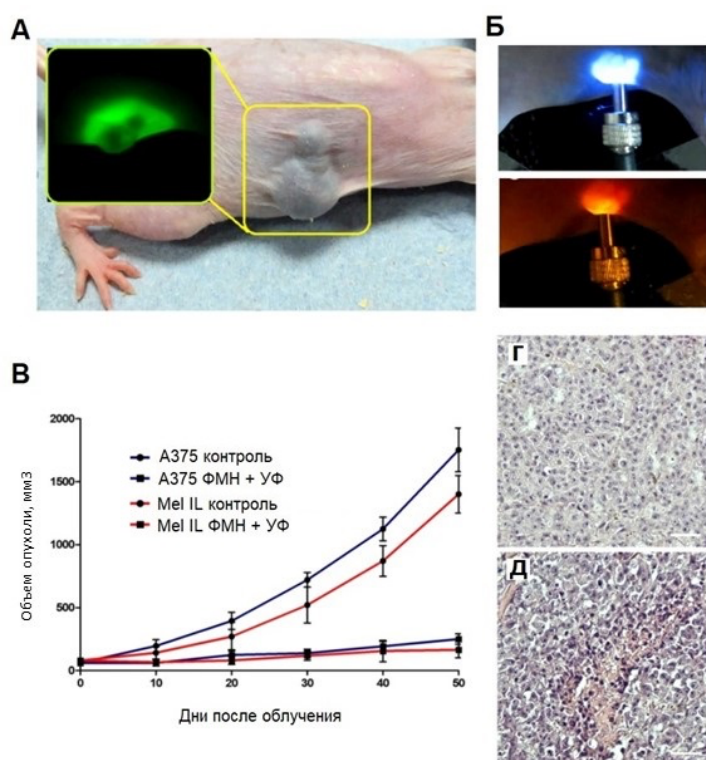


Рисунок 13 — ФДТ меланомы кожи человека *in vivo*. **А.** Фотография мыши с ксенотрансплантатом Mel II, на вставке - флуоресцентное изображение опухоли. **Б.** Верхнее фото — процесс облучения опухоли оптическим волокном (450 нм), нижнее фото — соответствующий участок опухоли через красный оптический фильтр (красное свечение, 620–670 нм). **В.** Кривые роста опухолей для ксенотрансплантатов меланомы кожи человека Mel II и A375 в течение 50 дней после проведения однократной процедуры ФДТ. **Г.** Гистологический анализ контрольного ксенотрансплантата Mel II, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм. **Д.** Гистологический анализ ксенотрансплантата Mel II после ФДТ (450 нм) с ФМН, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм

Исследование токсичности НАФ *in vitro*

Анализ с помощью МТТ-теста проводили для оценки жизнеспособности дермальных фибробластов человека Vj-5ta и кератиноцитов кожи HaCaT, инкубированных с образцами НАФ с полимерными покрытиями ПМАО и ПМАО-ПЭГ в концентрации 0,1-0,8 мг/мл в течение 24 часов при 37°C. Было показано, что жизнеспособность клеток Vj-5ta и HaCaT под действием максимальных концентраций 0,8 мг/мл исследуемых образцов практически не снижается (процент жизнеспособных клеток колеблется в пределах от 94 до 99 % независимо от легирующих ионов НАФ, полимерного покрытия и культуры клеток ($p < 0,05$)).

Исследование доставки НАФ в опухолевую ткань

При системном введении образцов НАФ, модифицированных полимерными покрытиями ПМАО и ПМАО-ПЭГ в кровотоки малых животных было обнаружено, что НАФ с покрытием ПМАО-ПЭГ регистрируются в образцах крови при помощи эпифлуоресцентной микроскопии с использованием антистоксового флуоресцентного микроскопа (ИФТ РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк) в течение трех часов, а покрытия ПМАО обеспечивает циркуляцию лишь в течение 10 минут (Рисунок 14).

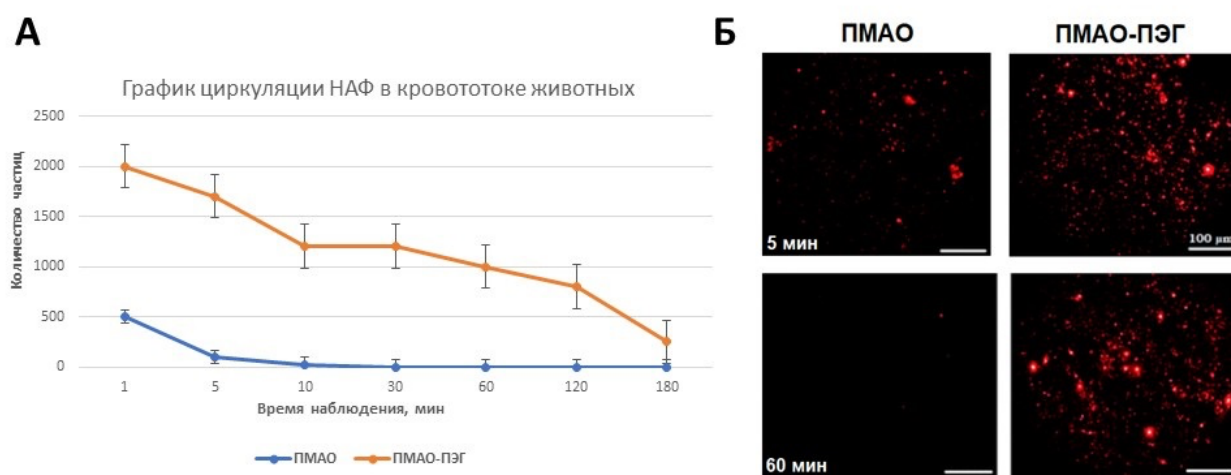


Рисунок 14 — Исследование циркуляции образцов НАФ в кровотоке животных. **А.** Зависимость изменения концентрации наночастиц от времени циркуляции наночастиц в кровотоке мыши начиная с 1-й минуты после введения препарата. **Б.** Микрофотографии с апконверсионного люминесцентного микроскопа, демонстрирующие люминесценцию апконвертирующих наночастиц в образцах крови на 5 и 60 минуте после введения. Исходная концентрация вводимых наночастиц одинакова. Размер наночастиц и их фотолюминесцентные свойства идентичны. Масштабная линейка 100 мкм

В результате полученных данных по пролонгированной циркуляции, частицы с покрытием ПМАО-ПЭГ в кровотоке животного были выбраны для демонстрации доставки в опухолевую ткань.

Оптическая визуализация опухоли *in vivo* была продемонстрирована на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис с использованием оптической имиджинговой системы с отложенной регистрацией сигнала. Эпилюминесцентные изображения были получены с интервалами времени от 1 до 180 мин после введения образцов. Наночастицы предпочтительно накапливались по периферии опухоли, где наблюдается повышенная плотность кровеносных сосудов и отсутствие лимфооттока, визуально подтверждая проявление ЭПР – эффекта (эффект усиленного проникновения и удержания - EPR (англ), enhanced permeability and retention) (Рисунок 15).

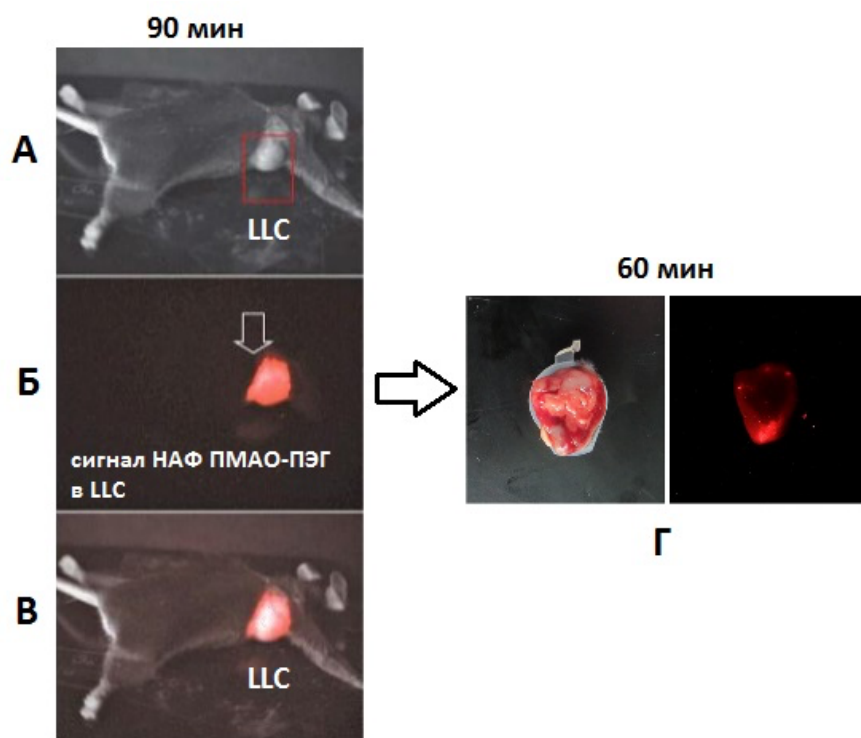


Рисунок 15 — Демонстрация эффективности маркирования опухоли НАФ с покрытием ПМАО-ПЭГ. Эпилюминесцентный сигнал от фотолуминесцентных наночастиц показан красным цветом (красный - псевдоцвет). **А.** Светлопольное изображение мыши с перевитой эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC). **Б.** Эпилюминесцентный сигнал от НАФ с покрытием ПМАО – ПЭГ в LLC. **В.** Наложение эпилюминесцентного сигнала со светлопольной фотографией. **Г.** Фотография среза опухоли LLC (слева) и соответствующее люминесцентное изображение (справа) через 60 мин после инъекции наночастиц

ФДТ солидных опухолей с применением ФМН в качестве ФС и НАФ

Фототоксическое действие пары НАФ + ФМН в условиях *in vitro* было продемонстрировано с помощью двухфазной процедуры инкубации клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 с образцами НАФ «УФ+» (возбуждающими ФМН) и «УФ-» (не возбуждающими ФМН) с полимерным покрытием ПМАО – ПЭГ, ФМН и облучением лазером с

длиной волны 975 нм (доза облучения 600 Дж/см²). Исходя из результатов предыдущих экспериментов в отношении ФМН, применение НАФ «УФ+» привело к фотоактивации ФМН и генерации АФК, в конечном итоге вызывающих гибель клеток. Через 30 мин после облучения клетки становятся проницаемыми для PI, который наблюдается в красном флуоресцентном канале и указывает на то, что гибель клеток произошла, вероятно, в результате нарушения целостности клеточной мембраны (Рисунок 16В).



Рисунок 16 — Опосредованная фотоактивация ФМН с помощью НАФ. **А.** Фотолюминесценция образцов НАФ «УФ+» и «УФ-» с покрытием ПМАО-ПЭГ под действием возбуждающего излучения 975 нм. **Б.** Фазово-контрасное изображение клеточной линии SK-BR-3. **В.** Эпилюминесцентное изображение, демонстрирующее отсутствие токсического действия комбинации ФМН и НАФ «УФ-» на клетки SK-BR-3 при возбуждении светом ближнего ИК диапазона спектра (слева) и эпилюминесцентное изображение, демонстрирующее разрушение клеточной мембраны под действием комбинации ФМН и НАФ «УФ+» при возбуждении светом ближнего ИК диапазона спектра (справа). Масштабная линейка 50 мкм

В экспериментах *in vivo* на иммунодефицитных мышах линии Balb nu/nu было показано, что 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 (Рисунок 17В). Через 24 часа после сеанса ФДТ по два животных из каждой группы выводились из эксперимента для патоморфологического анализа процессов, протекающих в опухолевой ткани. Результаты гистологии опухолей в контрольной группе характеризовались наличием неповрежденных опухолевых клеток без каких-либо изменений. Опухоли, содержащие комбинацию ФМН и НАФ, продемонстрировали резкое снижение плотности ядросодержащих клеток. Большинство из них имели вакуолизированную цитоплазму и разрушенные цитоплазматические мембраны. Ядра имели округлую или неправильную форму, были отекшими, с разрывами кариолеммы. Процедура ФДТ также вызывала разрыв

кровеносных сосудов с обширными кровоизлияниями в интерстиций опухоли (Рисунок 17Г). Такая оптимизированная методика позволила добиться значительного торможения роста опухоли ($90\% \pm 5$ через 50 дней после облучения), при этом глубина эффективного воздействия может достигать 1 см.

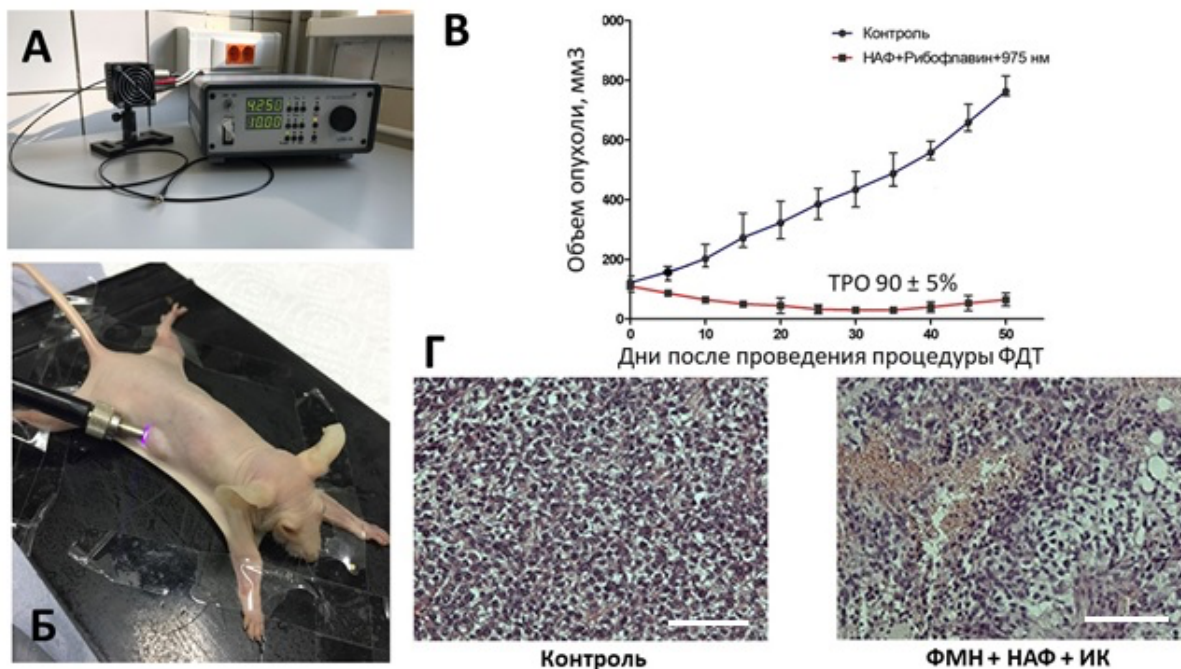


Рисунок 17 — ФДТ аденокарциномы молочной железы человека *in vivo*. **А.** Экспериментальная лазерная установка для проведения ФДТ. **Б.** Мышиная модель ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3. **В.** График торможения роста опухоли в экспериментальной и контрольной группах в течение 50 дней после однократного сеанса ФДТ. **Г.** Результаты гистологического исследования опухолевой ткани экспериментальной и контрольной групп через сутки после сеанса ФДТ, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФДТ является одним из малоинвазивных и высокоселективных методов лечения онкологических заболеваний. В основе метода лечения лежит фотогенерация в опухоли цитотоксических АФК, вызывающих окислительный стресс и гибель клеток. До настоящего времени широкое применение этого метода в клинической практике ограничивалось такими свойствами применяемых веществ, как системная токсичность, малая глубина проникновения возбуждающего света и быстрое фотообесцвечивание препарата, что требует введения повторных доз ФС для эффективности проводимой терапии. Производное рибофлавина (витамина В2), его водорастворимая форма – флавиномононуклеотид (ФМН), эффективно накапливаемый опухолевой тканью и не проявляющий системных токсических свойств,

идеально подходит в качестве кандидата для ФДТ, однако его применение имеет ограничения, связанные с глубиной проникновения возбуждающего света. Недавний существенный прогресс в разработке и синтезе нового класса наноматериалов – наноразмерных апконвертирующих фосфоров (НАФ), позволил в значительной мере преодолеть указанные недостатки и предложить новую стратегию эффективной ФДТ с увеличенной глубиной терапии. Кроме того, такие частицы считаются тераностическими агентами нового поколения – они могут одновременно применяться для высококонтрастной визуализации локализации опухолей с использованием современных методов флуоресцентного биоимиджинга в реальном времени и использоваться в терапевтических целях.

В целом, в результате выполнения настоящего исследования впервые показаны перспективы применения эндогенного вещества, производного рибофлавина (витамина В2) – флавинмононуклеотида в качестве нетоксичного и эффективного ФС, а комбинированное применение с наноразмерными апконвертирующими фосфорами для целей ФДТ увеличивает глубину его действия в опухолевой ткани.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что флавинмононуклеотид не проявляет токсичных свойств в отношении ряда опухолевых (меланома кожи человека Mel Z, Mel IL и Mel MTP, A375, меланомы мыши B16-F10, аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, глиобластомы человека U87-MG и глиомы крысы C6) и нормальных (дермальные фибробласты VJ-5ta и кератиноциты кожи человека HaCaT) клеток в концентрации до 5 мМ.

2. Показана четкая зависимость проявления цитотоксических свойств флавинмононуклеотида в концентрациях от 10 до 100 мкМ при его фотоактивации УФ и синим светом от дозы облучения. Доказано, что концентрации в 30 мкМ и дозы облучения 2 Дж/см² достаточно для достижения максимального ингибирования роста опухолевых клеток, а более высокие дозы (от 3,5 до 7 Дж/см²) не увеличивают его цитотоксичность.

3. Показано, что за проявление цитотоксических свойств флавинмононуклеотида отвечают АФК и продукты его фотораспада, образующиеся при активации его УФ и синим светом, а также что аддитивное действие АФК и фотопродуктов резко снижает концентрации ФМН, необходимые для достижения 50% жизнеспособности клеток.

4. Показано, что в *in vitro* исследованиях опухолевые клетки демонстрируют более высокий уровень накопления флавинмононуклеотида по сравнению с нормальными клеточными линиями, с преимущественной его локализацией на клеточной мембране, что подтверждено методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. В условиях *in vivo* на модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис показано, что концентрация

флавинмононуклеотида, необходимая для проявления цитотоксических свойств (30 мкМ и выше) может быть достигнута при его системном введении в течение 24 часов.

5. Показано, что применение флавинмононуклеотида в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ позволяет значительно затормозить рост опухоли (торможение роста оценивается как 85% и 89% через 50 дней после облучения для ксенотрансплантатов меланомы кожи человека A375 и Mel II, соответственно).

6. Показана возможность опосредованной фотоактивации флавинмононуклеотида с помощью наноразмерных апконвертирующих фосфоров, преобразующих глубоко проникающий в биоткань свет ближнего ИК диапазона спектра в УФ (365 нм) и синий свет (450 нм), в условиях *in vitro* и *in vivo*.

7. Показана возможность использования флавинмононуклеотида в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ солидных опухолей в комбинации с НАФ на модели ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3. Такая оптимизированная методика позволила добиться значительного торможения роста опухоли (90% ± 5 через 50 дней после облучения), при этом глубина эффективного воздействия может достигать 1 см.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рочева, В.В. Люминесцентная диагностика опухолей с применением апконвертирующих наночастиц / В.В. Рочева, **Н.В. Шолина**, С.П. Деревяшкин, А.Н. Генералова, А.В. Нечаев, Д.А. Хоченков, В.А. Семчишен, Е.В. Хайдуков, Е.В. Степанова, В.Я. Панченко // Альманах клинической медицины. – 2016. – № 44 (2). – С. 227–233.

2. Generalova, A.N. PEG-modified upconversion nanoparticles for *in vivo* optical imaging of tumors / A.N. Generalova, V.V. Rocheva, A.V. Nechaev, D.A. Khochenkov, N.V. **Sholina**, V.A. Semchishen, V.P. Zubov, A.V. Koroleva, B.N. Chichkov, E.V. Khaydukov // RSC Advances. – 2016. - № 6 (36.) – С. 30089-30097.

3. Mironova, K.E. Ultraviolet phototoxicity of upconversion nanoparticles illuminated with near-infrared light / K.E. Mironova, D.A. Khochenkov, A.N. Generalova, V.V. Rocheva, N.V. **Sholina**, A.V. Nechaev, V.A. Semchishen, S.M. Deyev, A.V. Zvyagin, E.V. Khaydukov // Nanoscale. – 2017. - № 9 (39). - С. 14921-14928.

4. Akasov, R.A. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide / R.A. Akasov, **N.V. Sholina**, D.A. Khochenkov, A.V. Alova, P.V. Gorelkin, A.S. Erofeev, A.N. Generalova, E.V. Khaydukov // Scientific Reports. – 2019. - № 9 (1). – С. 9679.

5. **Шолина, Н.В.** Фотодинамическая терапия солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* с применением комбинации рибофлавина и наноразмерных апконвертирующих фосфоров / Н. В. Шолина, Р. А. Акасов, Д. А. Хоченков, А. Н. Генералова, В. А. Семчишен, Е. В. Хайдуков // Альманах клинической медицины. – 2019. – № 47 (7). – С. 647–653.

6. Krylov, I.V. Local Overheating of Biotissue Labeled With Upconversion Nanoparticles Under Yb³⁺ Resonance Excitation / I. V. Krylov, R. A. Akasov, V. V. Rocheva, **N. V. Sholina**, D. A. Khochenkov, A. V. Nechaev, N. V. Melnikova, A. A. Dmitriev, A. V. Ivanov, A. N. Generalova, E. V. Khaydukov // *Frontiers in Chemistry*. – 2020. - № 8 (295). – C. 1-11.

7. Demina, P.A. A versatile platform for bioimaging based on colominic acid-decorated upconversion nanoparticles / P.A. Demina, **N.V. Sholina**, Akasov R.A., Khochenkov, D.A. Arkharova, N.A., Khaydukov, E.V., Generalova, A.N // *Biomaterials*. – 2020. - № 8 (16). – C. 4570-4580.

8. Akasov, R.A. Nanosized Anti-Stokes Phosphors for Antitumor Drug Delivery and Solid Tumor Theranostics // Akasov R.A., Demina P.A., V. V. Zasedateleva, **N.V. Sholina**, Khochenkov, D.A., Generalova, A.N., Selvan, J.S., Khaydukov, E.V., Panchenko, V.Y // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2020.-№ 494 (1). - C. 227-230.