



Люминесцентная диагностика опухолей с применением апконвертирующих наночастиц

Рочева В.В.¹ • Шолина Н.В.^{1,2} • Деревяшкин С.П.¹ • Генералова А.Н.^{1,3} • Нечаев А.В.^{1,4} • Хоченков Д.А.^{1,2} • Семчишен В.А.¹ • Хайдуков Е.В.¹ • Степанова Е.В.² • Панченко В.Я.¹

Актуальность. Для повышения качества онкологических операций необходимо полностью удалить опухоль, включая метастазы, свести к минимуму повреждения здоровых тканей и сократить время операции. Современные методы детектирования, в основе которых лежит рентгеновская компьютерная томография, а также магнитно-резонансная томография, определяют опухоль, когда ее объем становится достаточно большим (содержит более 10 миллиардов клеток). В этой связи актуальной задачей представляется повышение чувствительности и разрешающей способности методов диагностики для обнаружения злокачественных новообразований на ранних этапах развития. **Цель** – продемонстрировать возможности применения нового класса антистоксовых люминесцентных наночастиц для глубокой высококонтрастной оптической визуализации злокачественных опухолей. **Материал и методы.** В работе использовались узкодисперсные апконвертирующие наночастицы размером 70–80 нм, имеющие структуру ядро/оболочка $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$.

Наночастицы обладают интенсивной полосой антистоксовой фотолюминесценции на длине волны 800 нм при возбуждении излучением на длине волны 975 нм (обе длины волны попадают в окно прозрачности биологической ткани). Коэффициент конверсии возбуждающего излучения в антистоксовую люминесценцию составлял 9%. Для увеличения времени циркуляции частиц в кровотоке малых животных наночастицы покрывались биосовместимой амфифильной полимерной оболочкой. В качестве опухолевой модели использовалась перевитая мышам эпидермоидная карцинома Льюиса. **Результаты.** Получены стабильные водные коллоиды наночастиц, покрытых амфифильным полимером, способные сохранять первичные размеры в течение как минимум месяца. Применение апконвертирующих наночастиц с гидрофильной оболочкой из чередующегося сополимера малеинового ангидрида и октадецена с последующим покрытием с помощью диглицидилового эфира полиэтиленгликоля позволило снизить неспецифическое взаимодействие наночастиц с белками плазмы

крови, что, в свою очередь, привело к увеличению времени их циркуляции в кровотоке малых животных до 1 часа. На модели карциномы легкого Льюиса, перевитой мышам, продемонстрирована прижизненная доставка апконвертирующих наночастиц в опухоль с высокой степенью локализации за счет пассивного EPR-эффекта. Контраст люминесцентного сигнала в опухоли по отношению к окружающим тканям составил не менее 70%. Продемонстрирована возможность визуализации апконвертирующих наночастиц в глубине биоткани до 15 мм. **Заключение.** Методы оптической визуализации с применением антистоксовых фотолюминесцентных маркеров обеспечивают высокий контраст обнаружения опухолевых тканей в режиме реального времени, что позволяет использовать их для интраоперационной диагностики.

Ключевые слова: апконвертирующие наночастицы, оптическая люминесцентная визуализация, интраоперационная оценка границ опухоли

doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-2-227-233

Рочева Василина Васильевна – аспирант, мл. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹

Шолина Наталья Валериевна – мл. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹; мл. науч. сотр., лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей²

Деревяшкин Сергей Петрович – лаборант-исследователь, лаборатория нелинейной оптики поверхности

и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹

Генералова Алла Николаевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹; ст. науч. сотр., лаборатория полимеров для биологии³

Нечаев Андрей Валерьевич – канд. хим. наук, лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹; доцент кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского⁴

Хоченков Дмитрий Александрович – канд. биол. наук, науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹; науч. сотр., лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей²

Семчишен Владимир Анатольевич – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹

Хайдуков Евгений Валерьевич – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатория нелинейной оптики

поверхности и лазерно-плазменных процессов, отделение перспективных лазерных технологий¹

✉ 140700, Московская область, г. Шатура, ул. Святоозерская, 1, Российская Федерация.
Тел.: +7 (495) 851 08 40.
E-mail: khaydukov@mail.ru

Степанова Евгения Владиславовна – д-р мед. наук, вед. науч. сотр., лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей²

Панченко Владислав Яковлевич – д-р физ.-мат. наук, академик РАН, профессор, директор¹

¹ ФГБУН «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН; 140700, Московская область, г. Шатура, ул. Святоозерская, 1, Российская Федерация

² ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова»; 119571, г. Москва, проспект Вернадского, 86, Российская Федерация



Ранняя диагностика с последующим хирургическим удалением опухолевой ткани – один из наиболее эффективных методов лечения ряда онкологических заболеваний. Однако интраоперационная оценка границ хирургического вмешательства является субъективной, что может привести к неполной резекции опухоли и ее дальнейшему рецидивированию [1, 2]. В целях повышения качества операций необходимо полностью удалить опухоль, включая метастазы, свести к минимуму повреждения здоровых тканей и сократить время операции. Современные методы детектирования, в основе которых лежит рентгеновская компьютерная томография, а также магнитно-резонансная томография, определяют опухоль, когда ее объем становится достаточно большим (содержит более 10 миллиардов клеток). В этой связи актуальной задачей становится повышение чувствительности и разрешающей способности методов диагностики для обнаружения злокачественных новообразований на ранних этапах развития.

Апконвертирующие наночастицы (НАФ), обладающие уникальными оптическими свойствами, считаются перспективной платформой для создания опухолевых маркеров, обеспечивающих оптическую визуализацию тканей в режиме реального времени с высокой чувствительностью и контрастом, что позволяет использовать их для интраоперационной диагностики [3, 4, 5]. Наночастицы представляют собой неорганические кристаллы NaYF_4 , легированные ионами эрбия и тулия (Yb^{3+} и Tm^{3+}). Наночастицы нетоксичны, фотостабильны, а их поверхность позволяет создавать конъюгаты с нацеливающими модулями [6]. Длина волны возбуждения (975 нм) и пик фотолюминесценции НАФ (800 нм) находятся в ближней инфракрасной области спектра и попадают в окно прозрачности биоткани [7], а антистоксовый характер фотолюминесценции наночастиц позволяет спектрально подавить сигнал стоксовой автолюминесценции от хромофоров биоткани, что обеспечивает высокий контраст визуализации маркированных тканей [5].

Рост большинства злокачественных опухолей в значительной степени зависит от ангиогенеза – процесса образования новых опухолевых кровеносных сосудов из уже существующих. Кровеносная система опухолей имеет ряд особенностей, отличающих ее от нормальной сосудистой сети: гипervasкуляризация, патологическая нерегулярная архитектура сосудистой сети, избыточное производство опухолевыми клетками

проангиогенных факторов (VEGF, FGF2), а также нарушения лимфатического дренажа. Сосуды опухоли обладают «дефектным» эндотелием с широкими фенестрациями (до 4 мкм), не имеют развитого мышечного слоя, имеют относительно широкий просвет, а также недостаток рецепторов для ряда вазоактивных медиаторов (ангиотензин II) [8, 9]. Гиперэкспрессия ряда сосудистых медиаторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов, брадикинин, простагландины, оксиды азота и матричные металлопротеиназы [10, 11], в значительной степени способствует повышенной проницаемости сосудов в тканях опухоли. Особенность сосудов опухоли, характеризующихся повышенной проницаемостью и возможностью удерживать введенные препараты и наночастицы, получила название EPR-эффекта (англ. enhanced permeability and retention) [12]. Наночастицы с размерами от 10 до 100 нм способны эффективно аккумулироваться в солидных опухолях благодаря аномальной структуре кровеносных сосудов и отсутствию эффективного лимфодренажа [13, 14]. Избирательное накопление наночастиц в опухолях представляется эффективным механизмом для маркирования и последующей диагностики опухолевых очагов.

Материал и методы

Синтез и оптические свойства апконвертирующих наночастиц

Наночастицы синтезированы по технологии, описанной нами ранее [15]. Были получены нанокристаллы со структурой ядро/оболочка. Ядро – $\beta\text{-NaYF}_4$, солегирированное Yb^{3+} , Tm^{3+} в молярном соотношении 18%:2% соответственно, кристаллическая оболочка состояла из нелегированного NaYF_4 . Технология синтеза позволила получить узкодисперсные частицы размером 75 ± 5 нм, обладающие коэффициентом конверсии (отношение излученной мощности к поглощенной) 9% при интенсивности возбуждающего излучения 10 Вт/см^2 . На рис. 1 представлены характеристики синтезированных наночастиц.

Покрытие апконвертирующих наночастиц амфифильными полимерами

Синтез НАФ обычно проводится в среде органических растворителей, в результате формируются гидрофобные наночастицы, стабилизированные олеиновой кислотой [16]. В случае применения НАФ в качестве маркеров для оптической визуализации опухолей необходимо провести модификацию их поверхности с целью придания им гидрофильных свойств для сохранения коллоидных

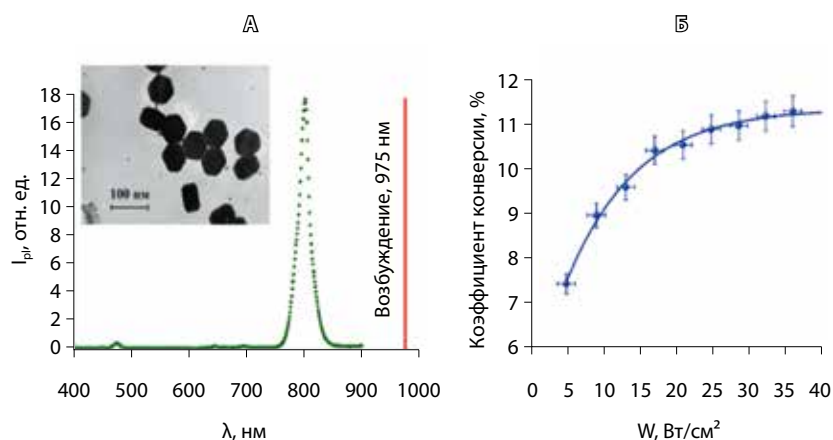


Рис. 1. Характеристики синтезированных наночастиц: **А** – спектр фотолюминесценции наночастиц со структурой ядро/оболочка $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ при возбуждении на длине волны 975 нм, на вставке: ТЕМ фотография; **Б** – зависимость коэффициента конверсии наночастиц от интенсивности возбуждающего излучения

свойств в живом организме. Гидрофилизацию наночастиц проводили путем формирования полимерной оболочки на поверхности НАФ за счет проникновения гидрофобных фрагментов амфифильного полимера (чередующегося сополимера малеинового ангидрида и октадецена, ПМАО) в оболочку олеиновой кислоты без ее удаления с поверхности наночастиц. Полимерная оболочка формируется без непосредственного воздействия агрессивных агентов (растворителей, щелочи и т.д.) на нанокристаллы и выполняет защитную функцию, предохраняя НАФ от воздействия биологической среды. Методика модификации НАФ амфифильными полимерами приведена в опубликованной нами работе [6]. Для снижения неспецифической сорбции белков крови на

поверхности полимер-модифицированных апконвертирующих наночастиц был использован сшивающий агент диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ), который позволил создать дополнительную внешнюю оболочку из цепей полиэтиленгликоля (рис. 2).

Оценка времени нахождения апконвертирующих наночастиц в кровотоке

Для оценки времени нахождения наночастиц в кровотоке экспериментальных животных были использованы мыши линии Balb/c (массой 20–25 г). Внутривенно (в ретроорбитальный синус) вводилось 0,15 мл 0,2% раствора наночастиц в фосфатно-солевом буфере. После внутривенной инъекции НАФ в течение 180 минут контролировалось содержание наночастиц в крови. Образцы крови для контроля брались из хвостовой вены мыши. Капля свежей крови наносилась на предметное стекло, отступая 1–2 см от края; когда она равномерно растекалась, быстрым движением шлифованного стекла под углом 35–40° делался мазок, который затем накрывался предметным стеклом. Подготовленные таким образом препараты крови исследовались с помощью разработанного нами апконверсионного люминесцентного микроскопа. Чувствительность регистрации позволяла детектировать единичные маркеры. Количество наночастиц в единице объема образца крови подсчитывалось по полученным с апконверсионного люминесцентного микроскопа микрофотографиям. Для уменьшения ошибки анализ каждого образца проводился в четырех различных точках.

Опухолевая модель

Прижизненная визуализация опухоли с применением НАФ была продемонстрирована на модели карциномы Льюиса (LLC) из банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки LLC получали от ранее перевитых мышей, измельчая ткань опухоли в среде DMEM (Gibco). 0,2 мл клеточной суспензии, содержащей 2×10^6 опухолевых клеток, прививали мышам линии BDF₁ (питомник «Столовая»). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. При достижении опухолью объема 200 мм³ животным вводили 0,15 мл 0,2% раствора наночастиц в фосфатно-солевом буфере. Для визуализации с исследуемой области удаляли волосяной покров. Эпилюминесцентные изображения регистрировались в течение 180 минут после инъекции наночастиц. Отдельные изображения

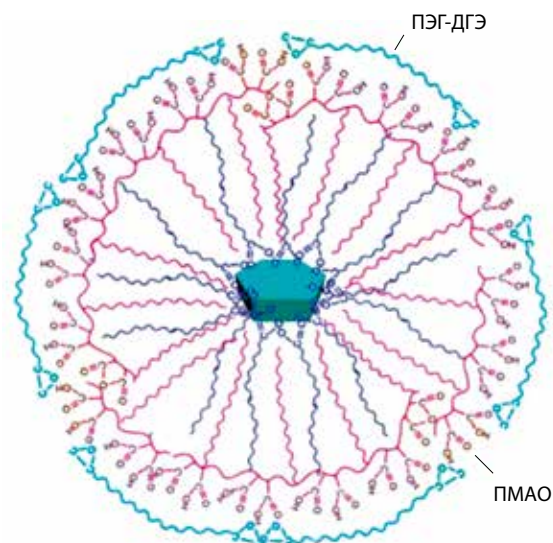


Рис. 2. Схематическое изображение полимер-модифицированной апконвертирующей наночастицы; ПЭГ-ДГЭ – диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля, ПМАО – чередующийся сополимер малеинового ангидрида и октадецена

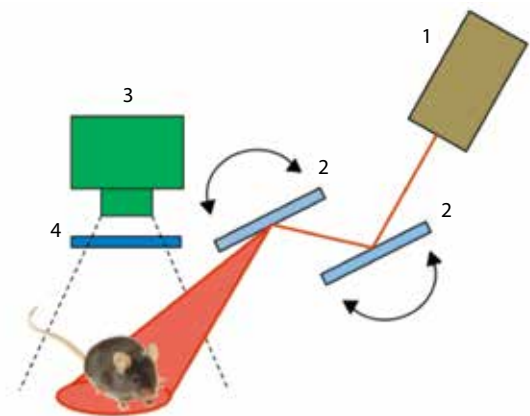


Рис. 3. Принципиальная схема системы визуализации апконвертирующих наночастиц в малых животных: 1 – лазер, 2 – зеркала сканирующей системы, 3 – EMCCD камера, 4 – фильтр. Луч от непрерывного полупроводникового лазера $\lambda=975$ нм сканирует исследуемый объект. Детектирование сигнала фотолюминесценции маркированной области осуществляется цифровой EMCCD камерой с использованием интерференционных фильтров для отсекающего возбуждающего излучения лазера

опухоли были получены *post mortem* через 2 часа после инъекции наночастиц.

Система визуализации апконвертирующих наночастиц в малых животных

Система визуализации апконвертирующих наночастиц в малых животных (рис. 3) разработана в ИПЛИТ РАН и описана в работе [16]. Луч от непрерывного полупроводникового лазера на длине волны 975 нм сканируется согласно заданной программе по поверхности исследуемого объекта. Сканирование реализовано с применением сканирующей головки с зеркалами на гальванических драйверах Miniscan-07 фирмы Raylase (Германия). Система позволяет программно задавать область и траекторию сканирования. Плотность мощности в лазерном луче ограничивалась физиологически разрешенным уровнем и не превышала 1 Вт/см². Экспериментально установлено, что данная плотность мощности лазерного излучения является приемлемой и не вызывает ожогов кожных покровов у малых животных. Детектирование сигнала фотолюминесценции маркированной НАФ области осуществлялось цифровой EMCCD камерой с электронным умножением Falcon фирмы Raptor (Ирландия), оснащенной объективом с числовой апертурой 0,95. Перед объективом устанавливались интерференционные светофильтры Semrock, отсекающие рассеянное излучение возбуждающего лазера.

Результаты и обсуждение

Получены стабильные водные коллоиды наночастиц, покрытых амфифильным полимером, способные сохранять первичные размеры в течение как минимум месяца. Измерения размеров наночастиц после реакции поверхностной модификации и по истечении месяца показали, что относительная фракция агрегатов остается

незначительной и не превышает 10%. На рис. 4 выборочно представлены микрофотографии образцов крови, полученные с помощью разработанного нами апконверсионного люминесцентного микроскопа, и экспериментальная зависимость, количественно описывающая изменение концентрации наночастиц в кровотоке, начиная с 1-й минуты после введения препаратов на основе НАФ с различным покрытием.

Согласно полученным данным, НАФ, не имеющие покрытия ПЭГ-ДГЭ, быстро удаляются из системы кровообращения (почти 15-кратные потери в первые 3 минуты). Наночастицы, как правило, удаляются из кровотока благодаря ретикуло-эндотелиальной системе – в основном клетками Купфера в печени, а также макрофагами селезенки и почек, что приводит к их накоплению в этих органах и, соответственно, снижению концентрации НАФ в крови [10]. Покрывая частицы ПЭГ-ДГЭ, мы снижаем их адсорбцию белками крови и фагоцитоз макрофагами, что продлевает их свободную циркуляцию [11]. Использование дополнительной оболочки из ПЭГ-ДГЭ позволило снизить неспецифическое взаимодействие наночастиц с белками крови и тем самым увеличить время их циркуляции в кровотоке малых животных до 1 часа. Увеличение времени циркуляции наночастиц в кровотоке способствует их накоплению в опухолях. НАФ с длительным временем пребывания в кровотоке пронизывают опухолевые сосуды и из-за отсутствия эффективного

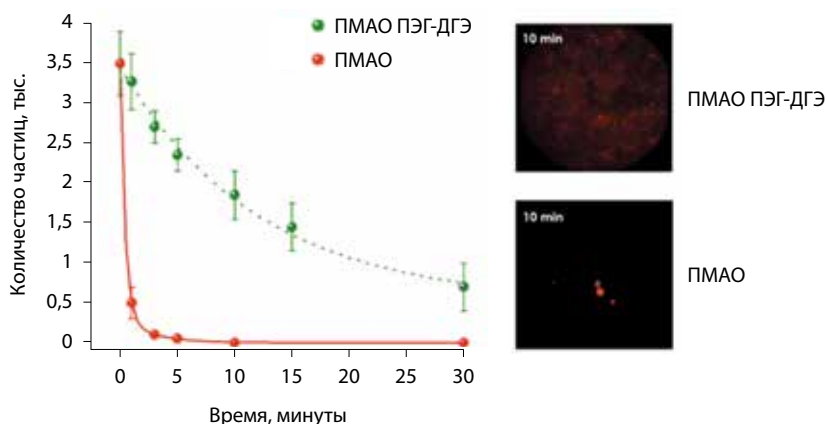


Рис. 4. Зависимость изменения концентрации наночастиц от времени циркуляции наночастиц в кровотоке мыши начиная с 1-й минуты после введения препарата. Сплошная кривая – наночастицы с покрытием чередующимся сополимером малеинового ангидрида и октадецена (PMAO), пунктирная кривая – наночастицы PMAO с дополнительной оболочкой диглицидилового эфира полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ). На вставке даны микрофотографии с апконверсионного люминесцентного микроскопа, демонстрирующие люминесценцию апконвертирующих наночастиц в образцах крови на 10-й минуте после введения. Исходная концентрация вводимых наночастиц одинакова. Размер наночастиц и их фотолюминесцентные свойства идентичны

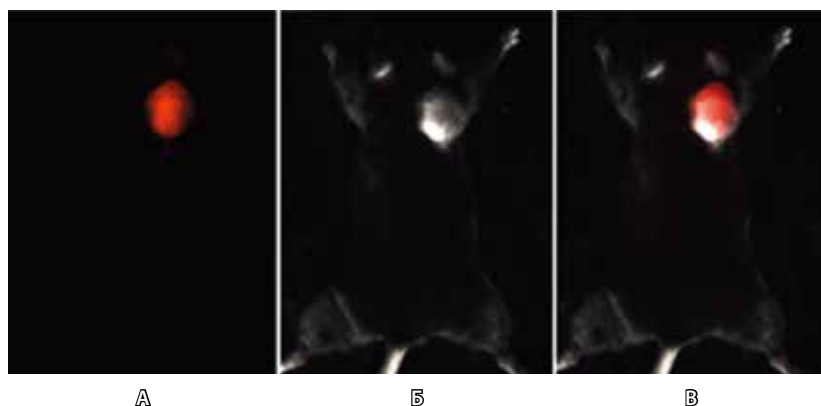


Рис. 5. Демонстрация эффективности маркирования опухоли апконвертирующими наночастицами. Изображения получены *in vivo* через 1 час после инъекции наночастиц. Эпилюминесцентный сигнал от апконвертирующих наночастиц (А), светлопольное изображение мыши (Б), наложение эпилюминесцентного сигнала со светлопольной фотографией (Б). Эпилюминесцентный сигнал от фотолуминесцентных апконвертирующих наночастиц показан красным цветом

лимфодренажа задерживаются в патологической ткани. На рис. 5 даны изображения мыши, полученные с использованием системы оптической визуализации малых животных, демонстрирующие эффективную прижизненную доставку НАФ в опухоль.

На рис. 6 представлена фотография среза опухоли. Распределение интенсивности по сечению опухоли показывает, что наночастицы преимущественно накапливаются на границе опухоли в непосредственной близости от сосудов. Центральная область опухоли с очагами некроза остается слабо промаркированной наночастицами. Контраст люминесцентного сигнала в опухоли по отношению к окружающим тканям составляет не менее 70%.

Заключение

В работе продемонстрирована возможность применения апконвертирующих наночастиц для диагностики злокачественных новообразований еще на стадии формирования сосудистой системы. Синтезированы апконвертирующие наночастицы с размером 70–80 нм, со структурой ядро/оболочка $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$. Наночастицы



Рис. 6. Фотография среза опухоли (А) и соответствующее люминесцентное изображение (Б). Показано, что накопление наночастиц идет на периферии опухоли, где более развита сосудистая система и меньше интерстициальное давление. Время выведения животного из эксперимента 180 минут

обладают интенсивной полосой фотолуминесценции на длине волны 800 нм при возбуждении излучением на длине волны 975 нм. Длина волны возбуждения и длина волны люминесценции попадают в окно прозрачности биоткани, что позволяет использовать наночастицы для оптической люминесцентной визуализации с глубины до 15 мм. Покрытие гидрофильной оболочкой ПМАО с последующим покрытием ПЭГ-ДГЭ позволило получить биосовместимые наноконструкции с низким неспецифическим взаимодействием частиц и белков плазмы крови. Длительное время нахождения наночастиц в кровотоке имеет решающее значение при пассивной доставке наночастиц в опухоль. На модели эпидермоидной карциномы легкого Льюиса, перевитой мышам, показана прижизненная доставка апконвертирующих наночастиц в опухоль за счет пассивного EPR-эффекта. Исследования, направленные на получение флуоресцентных изображений опухолей *in vivo* с использованием апконвертирующих наночастиц в качестве флуоресцентных меток, пока ограничиваются экспериментальными животными, однако очевидны перспективы их применения для диагностики опухолей человека. ©

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 14-13-01421.

Литература

1. Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R. The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1996;22(1):17–22.
2. Schiller DE, Le LW, Cho BC, Youngson BJ, McCready DR. Factors associated with negative margins of lumpectomy specimen: potential use in selecting patients for intraoperative radiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(3):833–42.
3. Hadjipavlou AG, Kambin P, Lander PH, Crow WN, Simmons JW. Imaging guided minimally invasive surgery for low back pain sciatica and spinal infection. *Journal of Interventional Radiology.* 1999;14(1):1–22.
4. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, Bart J, Low PS, Ntziachristos V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med.* 2011;17(10):1315–9. doi: 10.1038/nm.2472.



- 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.
- Grebenik EA, Nadort A, Generalova AN, Nechaev AV, Sreenivasan VK, Khaydukov EV, Semchishen VA, Popov AP, Sokolov VI, Akhmanov AS, Zubov VP, Klinov DV, Panchenko VY, Deyev SM, Zvyagin AV. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle bio-complexes. *J Biomed Opt*. 2013;18(7):76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
- Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*. 2000;2(1–2):26–40. doi: 10.1038/sj.neo.7900082.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):283–318.
- Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release*. 2012;164(2):138–44. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038.
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986;46(12 Pt 1):6387–92.
- Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res*. 1998;58(1):159–65.
- Cole AJ, David AE, Wang J, Galbán CJ, Yang VC. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(26):6291–301. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.024.
- Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohal J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89(3):307–14.
- Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(12):815–23. doi: 10.1038/nnano.2011.166.
- Khaydukov EV, Semchishen VA, Seminogov VN, Sokolov VI, Popov AP, Bykov AV, Nechaev AV, Akhmanov AS, Panchenko VYa, Zvyagin AV. Enhanced spatial resolution in optical imaging of biotissues labelled with upconversion nanoparticles using a fibre-optic probe scanning technique. *Laser Phys Lett*. 2014;11(9):095602. dx.doi.org/10.1088/1612-2011/11/9/095602.
- Хайдуков ЕВ, Рочева ВВ, Семчишен ВА, Семиногов ВН, Соколов ВИ, Звягин АВ, Ахманов АС, Панченко ВЯ, Нечаев АВ, Генералова АН, Шехтер АБ. Оптическая визуализация опухолевых тканей с применением антистоксовых наночастиц. *Вестник Российского фонда фундаментальных исследований*. 2014;(4):7–17.

References

- Renton SC, Gazet JC, Ford HT, Corbishley C, Sutcliffe R. The importance of the resection margin in conservative surgery for breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 1996;22(1):17–22.
- Schiller DE, Le LW, Cho BC, Youngson BJ, McCready DR. Factors associated with negative margins of lumpectomy specimen: potential use in selecting patients for intraoperative radiotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2008;15(3):833–42.
- Hadjipavlou AG, Kambin P, Lander PH, Crow WN, Simmons JW. Imaging guided minimally invasive surgery for low back pain sciatica and spinal infection. *Journal of Interventional Radiology*. 1999;14(1):1–22.
- van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, Sarantopoulos A, de Jong JS, Arts HJ, van der Zee AG, Bart J, Low PS, Ntziachristos V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011;17(10):1315–9. doi: 10.1038/nm.2472.
- 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.
- Grebenik EA, Nadort A, Generalova AN, Nechaev AV, Sreenivasan VK, Khaydukov EV, Semchishen VA, Popov AP, Sokolov VI, Akhmanov AS, Zubov VP, Klinov DV, Panchenko VY, Deyev SM, Zvyagin AV. Feasibility study of the optical imaging of a breast cancer lesion labeled with upconversion nanoparticle bio-complexes. *J Biomed Opt*. 2013;18(7):76004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004.
- Tromberg BJ, Shah N, Lanning R, Cerussi A, Espinoza J, Pham T, Svaasand L, Butler J. Non-invasive in vivo characterization of breast tumors using photon migration spectroscopy. *Neoplasia*. 2000;2(1–2):26–40. doi: 10.1038/sj.neo.7900082.
- Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):283–318.
- Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *J Control Release*. 2012;164(2):138–44. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038.
- Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*. 1986;46(12 Pt 1):6387–92.
- Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res*. 1998;58(1):159–65.
- Cole AJ, David AE, Wang J, Galbán CJ, Yang VC. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32(26):6291–301. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.024.
- Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohal J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H. Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89(3):307–14.
- Cabral H, Matsumoto Y, Mizuno K, Chen Q, Murakami M, Kimura M, Terada Y, Kano MR, Miyazono K, Uesaka M, Nishiyama N, Kataoka K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(12):815–23. doi: 10.1038/nnano.2011.166.
- Khaydukov EV, Semchishen VA, Seminogov VN, Sokolov VI, Popov AP, Bykov AV, Nechaev AV, Akhmanov AS, Panchenko VYa, Zvyagin AV. Enhanced spatial resolution in optical imaging of biotissues labelled with upconversion nanoparticles using a fibre-optic probe scanning technique. *Laser Phys Lett*. 2014;11(9):095602. dx.doi.org/10.1088/1612-2011/11/9/095602.
- Khaydukov EV, Rocheva VV, Semchishen VA, Seminogov VN, Sokolov VI, Zvyagin AV, Akhmanov AS, Panchenko VYa, Nechaev AV, Generalova AN, Shekhter AB. Opticheskaya vizualizatsiya opukholevykh tkaney s primeneniem antistoksovykh nanochastits [Applications of upconversion nanoparticles in optical bioimaging of the tumor tissue]. *Vestnik Rossiyskogo fonda fundamental'nykh issledovaniy [RFBR Journal]*. 2014;(4):7–17 (in Russian).



Luminescence diagnostics of tumors with upconversion nanoparticles

Rocheva V.V.¹ • Sholina N.V.^{1,2} • Derevyashkin S.P.¹ •
Generalova A.N.^{1,3} • Nechaev A.V.^{1,4} • Khochenkov D.A.^{1,2} •
Semchishen V.A.¹ • Khaydukov E.V.¹ • Stepanova E.V.² •
Panchenko V.Ya.¹

Background: To improve quality of surgery in oncology, it is necessary to completely remove the tumor, including its metastases, to minimize injury to normal tissues and to reduce duration of an intervention. Modern methods of detection based on radiological computerized tomography and magnetic resonance imaging can identify a tumor after its volume has become big enough, i.e. it contains more than 10 billion cells. Therefore, an improvement of sensitivity and resolution ability of diagnostic tools to identify early stages of malignant neoplasms seems of utmost importance. **Aim:** To demonstrate the potential of a new class of anti-Stokes luminescence nanoparticles for deep optical imaging with high contrast of malignant tumors. **Materials and methods:** Upconversion nanoparticles with narrow dispersion and a size of 70 to 80 nm, with a core/shell structure of NaYF₄:Yb³⁺:Tm³⁺/NaYF₄ were used in the study. The nanoparticles have an intensive band of anti-Stokes photoluminescence at a wavelength of 800 nm under irradiation with a wavelength of 975 nm (both wavelengths are within the transparency window for biological tissues). The conversion coefficient of the excitation radiation into the anti-Stokes luminescence was 9%. To increase the time during which nanoparticles can circulate in blood flow of small animals, the nanoparticles were covered by a biocompatible amphiphilic polymer shell. As a tumor model we used Lewis epidermoid carcinoma transfected

to mice. **Results:** We were able to obtain stable water colloids of nanoparticles covered with amphiphilic polymer that could preserve their initial size at least for one month. The use of upconversion nanoparticles with a hydrophilic shell made of intermittent maleic anhydride and octadecene co-polymer with subsequent coating with diglycidyl polyethylene glycol ether allowed for reduction of non-specific reaction of nanoparticles with plasma proteins. In its turn, it resulted in an increased time of their circulation in blood flow of small animals for up to 1 hour. With the Lewis lung carcinoma transfected to mice model we demonstrated an in-life transportation of upconversion nanoparticles into the tumor with a high degree of localization due to a passive EPR effect. The contrast of luminescent signal in the tumor compared to adjacent tissues was at least 70%. The possibility of visualization of upconverted nanoparticles up to 15 mm of biological tissue was shown. **Conclusion:** The optical imaging techniques with anti-Stokes photoluminescent markers ensure a high contrast real-time detection of tumor tissues that allows for their use for intra-operative diagnostics.

Key words: upconverted nanoparticles, optical luminescence imaging, intraoperative assessment of tumor borders

Rocheva Vasilina V. – PhD Student, Junior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹

Sholina Nataliya V. – Junior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹; Junior Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy²

Derevyashkin Sergey P. – Research Laboratorian, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹

Generalova Alla N. – PhD (in Chemistry), Senior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹; Senior Research Fellow, Polymers for Biology Laboratory³

Nechaev Andrey V. – PhD (in Chemistry), Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹; Associate Professor, Chair of Chemistry and Technology of Synthetic Biologically Active Substances⁴

Khochenkov Dmitriy A. – PhD (in Biology), Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹; Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy²

Semchishen Vladimir A. – PhD (in Physics and Mathematics), Leading Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹

Khaydukov Evgeniy V. – PhD (in Physics and Mathematics), Senior Research Fellow, Laboratory for Nonlinear Optics of Surface and Laser-Plasma Processes, Advanced Laser Technologies Division¹
✉ 1 Svyatoozerskaya ul., Shatura, Moskovskaya oblast', 140700, Russian Federation.
Tel.: +7 (495) 851 08 40. E-mail: khaydukov@mail.ru

Stepanova Evgeniya V. – MD, PhD, Leading Research Fellow, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Therapy²

Panchenko Vladislav Ya. – PhD (in Physics and Mathematics), Academician of Russian Academy of Sciences, Professor, Director¹

¹Institute of Laser and Information Technologies of the Russian Academy of Sciences;
1 Svyatoozerskaya ul., Shatura, Moskovskaya oblast', 140700, Russian Federation

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center;
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

³Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences;
16/10 Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117997, Russian Federation

⁴Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology; 86 Prospekt Vernadskogo, Moscow, 119571, Russian Federation