

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»



На правах рукописи

**КРЫЛОВА ЛЮБОВЬ ВЛАДИМИРОВНА**

**Конъюгаты металлокомплексов хлорина *еб* с ингибиторами тирозинкиназ  
как агенты для комбинированной фотодинамической терапии**

1.5.2. – Биофизика

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., доцент Балалаева Ирина Владимировна  
доцент кафедры биофизики ИББМ ННГУ

**Нижегород – 2025**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1 Основные классы фотосенсибилизаторов для ФДТ .....	14
1.2 Порфириновые фотосенсибилизаторы.....	19
1.2.1 Физико-химические свойства тетрапирролов.....	19
1.2.2 Фотодинамические реакции I и II типа.....	24
1.2.3 Механизмы селективности и внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов .....	27
1.3 Противоопухолевое действие ФДТ.....	29
1.4 Современное развитие ФДТ .....	33
1.4.1 Современные тенденции в разработке фотосенсибилизаторов .....	33
1.4.2 Обоснование подхода комбинированной ФДТ.....	37
1.4.3 Комбинация ФДТ и низкомолекулярных ингибиторов .....	41
1.5 Обоснование структуры исследуемых в работе мультимодальных фотосенсибилизаторов.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	49
2.1 Исследуемые соединения .....	49
2.2 Исследование оптических свойств соединений.....	52
2.3 Исследование фотохимических свойств соединений.....	53
2.4 Клеточные линии и условия их культивирования .....	54
2.5 Исследование динамики накопления и локализации соединений в клетках ....	55
2.6 Исследование фотодинамической активности соединений.....	57
2.7 Оценка сочетанного действия фотосенсибилизатора и ингибитора.....	58
2.8 Исследование внутриклеточной генерации активных форм кислорода.....	58
2.9 Ингибиторный анализ генерации активных форм кислорода .....	59
2.10 Оценка противоопухолевой эффективности <i>in vitro</i> на трехмерной модели опухолевого роста .....	60
2.11 Животные и опухолевая модель.....	61
2.12 Исследование биораспределения соединения.....	62
2.12.1 Спектрофлуориметрический анализ содержания соединения в плазме крови .....	62
2.12.2 Оценка распределения соединения в тканях животных с помощью поверхностного флуоресцентного имиджинга .....	63

2.12.3	Определение содержания индия в органах и опухоли животных методом масс-спектрометрии.....	63
2.13	Исследование противоопухолевой эффективности соединений на животных-опухоленосителях.....	64
2.14	Исследование острой токсичности <i>in vivo</i> .....	65
2.15	Гистологический анализ.....	67
2.16	Статистическая обработка данных.....	68
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....		69
3.1	Фотофизические и биологические свойства <i>in vitro</i> конъюгата металлокомплекса хлорина <i>еб</i> и вандетаниба.....	69
3.1.1	Спектральные свойства конъюгата InChl-Vnd.....	69
3.1.2	Фотохимические свойства конъюгата InChl-Vnd.....	70
3.1.3	Внутриклеточное распределение конъюгата InChl-Vnd.....	71
3.1.4	Исследование цитотоксичности конъюгата.....	74
3.1.5	Изучение механизма фотодинамического действия конъюгата.....	78
3.2	Противоопухолевая эффективность конъюгата цинкового комплекса хлорина <i>еб</i> и вандетаниба в отношении EGFR-положительных опухолей <i>in vivo</i> .....	81
3.2.1	Количественная оценка содержания индия в органах и опухоли.....	81
3.2.2	Фармакокинетическое исследование <i>in vivo</i> .....	82
3.2.3	Терапевтическая эффективность конъюгата <i>in vivo</i> .....	84
3.2.4	Анализ острой токсичности <i>in vivo</i> .....	88
3.3	Особенность фотофизических и биологических свойств <i>in vitro</i> ферментативно расщепляемого конъюгата цинкового комплекса хлорина <i>еб</i> и кабозантиниба.....	93
3.3.1	Спектральные и фотохимические свойства конъюгата ZnChl-Cbz.....	93
3.3.2	Накопление и локализация конъюгата ZnChl-Cbz в клетках.....	97
3.3.3	Фотодинамическая активность конъюгата <i>in vitro</i> .....	99
3.4	Противоопухолевая эффективность ферментативно расщепляемого конъюгата цинкового комплекса хлорина <i>еб</i> и кабозантиниба в отношении HGFR-положительной трехмерной модели опухолевого роста <i>in vitro</i> .....	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		106
ВЫВОДЫ.....		109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		111

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛК – 5-аминолевулиновая кислота

АФК – активные формы кислорода

АЛТ – аланинаминотрансферазы

АСТ – аспаргатаминотрансферазы

ДМСО – диметилсульфоксид

Коэффициент АПО – коэффициент абсолютного прироста опухоли

Коэффициент ТОР – коэффициент торможения опухолевого роста

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МТТ – микрокультуральный тетразолиновый тест

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ФДТ – фотодинамическая терапия

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

АВСВ1 – АТФ-связывающая кассета, подсемейство В, член 1 (от англ. ATP binding cassette subfamily В member 1)

АВСG2 – АТФ-связывающая кассета, подсемейство G, член 2 (от англ. ATP-binding cassette sub-family G member 2)

АIE – эмиссия, вызванная агрегацией (от англ. aggregation-induced emission)

Akt – протеинкиназа В (от англ. RAC-alpha serine/threonine-protein kinase)

АРАF-1 – фактор активации апоптоза 1 (от англ. apoptotic protease activating factor-1)

АРЕ1 – апуриновая/апиримдиновая эндонуклеаза 1 человека (от англ.apurinic/apurimidinic (AP) endonuclease 1)

АТМ – серин/треониновая протеинкиназа, которая рекрутируется и активируется двунитевыми разрывами ДНК (англ. ataxia telangiectasia mutated)

Вах – Bcl-2-ассоциированный белок X (от англ. Bcl-2-associated X protein)

Bcl-2 – белок В-клеточной лимфомы 2 (от англ. B-Cell leukemia/lymphoma 2)

BIRC5 – бакуловиральный ингибитор ответа апоптозных повторов 5, сурвивин (от англ. baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5)

CI – индекс комбинации (от англ. combination index)

DAMPs – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (от англ. damage-associated molecular patterns)

DCFH-DA – 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (от англ. 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)

DFFA – субъединица альфа фактора фрагментации ДНК (от англ. DNA fragmentation factor subunit alpha)

DFFB – субъединица бета фактора фрагментации ДНК (от англ. DNA fragmentation factor subunit beta)

DLI – лекарственно-световой интервал (от англ. drug-light interval)

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (от англ. epidermal growth factor receptor)

EPR-эффект – эффект повышенной проницаемости и удержания (от англ. enhanced permeability and retention)

FADD – Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (от англ. FAS-associated death domain protein)

Fas-рецептор - апоптозный антиген 1 (от англ. apoptosis antigen 1)

GFP – зеленый флуоресцентный белок (от англ. green fluorescent protein)

GSH – глутатион (от англ. glutathione)

GSTP1 – глутатион-S-трансфераза пи-1 (от англ. glutathione S-transferase P1)

HIF-1 $\alpha$  – гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа (от англ. hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HGF – фактор роста гепатоцитов (от англ. hepatocyte growth factor)

HGFR – рецептор фактора роста гепатоцитов (от англ. hepatocyte growth factor receptor)

НОМО – высшая занятая молекулярная орбиталь (от англ. highest occupied molecular orbital)

HrD – производные гематопорфирина (от англ. hematoporphyrin derivative)

HSP – белки теплового шока (от англ. heat shock proteins)

IL-1 $\beta$  – интерлейкин 1 бета (от англ. interleukin-1 beta)

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (от англ. inducible NO synthase)

IP3R – инозитолтрифосфатный рецептор (от англ. inositol trisphosphate receptor)

IC<sub>50</sub> – полумаксимальная ингибирующая концентрация (от англ. half-maximal inhibitory concentration)

ISC – интеркомбинационный переход (от англ. intersystem crossing)

LDLR – семейство рецепторов липопротеинов низкой плотности (от англ. low density lipoprotein receptor)

LOO – пероксидный радикал

LUMO – низшая незаполненная молекулярная орбиталь (от англ. lowest unoccupied molecular orbital)

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа (от англ. mitogen-activated protein kinase)

MnSOD – супероксиддисмутаза 2 (от англ. superoxide dismutase 2)

NRF2 – ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (англ. nuclear factor E2-related factor 2)

nTPM – нормализованное значение количества транскриптов гена на миллион (от англ. normalized transcripts per million)

PARP – поли(АДФ-рибоза)-полимераза (от англ. poly ADP ribose polymerase)

PeT – фотоиндуцированный перенос электронов (от англ. photoinduced electron transfer)

PGE-2 – простагландин E2 (от англ. prostaglandin E2)

PhGPx – фосфолипид гидропероксид глутатионпероксидаза (от англ. phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (от англ. phosphoinositide 3-kinases)

PPIX – протопорфирин IX (от англ. protoporphyrin IX)

RAS – последовательности ДНК, ассоциированные с ретровирусом (от англ. retrovirus associated DNA sequences)

RET – рецепторная тирозинкиназа, перестроенная во время трансфекции (от англ. rearranged during transfection)

SMAC – второй митохондриальный фактор, активирующий каспазы (от англ. second mitochondria-derived activator of caspases)

SOD – супероксид дисмутаза (от англ. superoxide dismutase)

STAT3 – активатор транскрипции из семейства белков STAT (от англ. signal transducer and activator of transcription 3)

TGF $\beta$ 1 – трансформирующий фактор роста бета 1 (от англ. transforming growth factor beta 1)

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли-альфа (от англ. tumor necrosis factor-alfa)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor)

VEGFR – рецептор к фактору роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor receptor)

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

В последние десятилетия одной из наиболее динамично развивающихся областей в создании противоопухолевых препаратов является разработка фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ). Фотосенсибилизаторы сами по себе являются низкотоксичными соединениями. Однако под воздействием света определенной длины волны они способны приводить к запуску серии фотохимических процессов, результатом которых является продукция цитотоксических активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. Противоопухолевая эффективность достигается за счет прямого цитотоксического воздействия АФК на опухолевые клетки [3]. Помимо этого, ФДТ способна приводить к повреждению сосудистой сети опухоли [4] и активации иммунного ответа после облучения [5].

ФДТ является клинически одобренным методом лечения ряда онкологических заболеваний, включая рак кожи, пищевода, головы и шеи, легких и мочевого пузыря [5, 6]. Помимо этого, ведутся доклинические и клинические исследования по внедрению ФДТ для лечения рака молочных желез, простаты и глиомы [7, 8]. Привлекательность данного метода лечения заключается в минимальной инвазивности, отсутствии серьезных побочных эффектов и локальности действия [9]. Однако применение ФДТ в качестве монотерапевтического подхода сталкивается с ограничениями эффективности. В частности, неоптимальное биораспределение фотосенсибилизатора и ослабление света при прохождении через ткани могут привести к недостаточной эффективности проводимой терапии [10].

Для решения данных проблем был предложен подход, основанный на использовании мультимодальных фотосенсибилизаторов для комбинированной ФДТ. Идея создания таких препаратов заключается в объединении эффективности фотосенсибилизатора и цитотоксического препарата для получения наибольшего терапевтического эффекта (аддитивного или синергического), а также преодоления резистентности. В качестве дополнительного цитотоксического модуля могут

выступать ДНК-интеркаляторы, металлосодержащие цитостатики, антимитотические препараты, модуляторы эстрогена и ингибиторы белков [11].

Перспективными кандидатами для создания мультимодальных фотосенсибилизаторов являются мультикиназные ингибиторы, специфичные в отношении рецепторных тирозинкиназ, например, вандетаниб и кабозантиниб. Механизм действия этих агентов основан на блокировке связывания АТФ с рецепторами факторов роста, что приводит к подавлению сигнальных каскадов, необходимых для выживания опухолевых клеток [12]. При этом мультикиназные ингибиторы воздействуют на несколько рецепторов, гиперэкспрессируемых в опухолях, что повышает их терапевтическую эффективность [13].

Было показано, что неоптимальные дозы ФДТ приводят к запуску сигнальных путей, приводящих к выживанию опухолевых клеток после терапии и развитию рецидива [14]. При этом основная роль в запуске этих молекулярных событий принадлежит именно рецепторным тирозинкиназам, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [15], рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) [16] и рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR) [17]. Имеются экспериментальные данные, что молекулярные события, происходящие в опухолевых клетках при действии сублетальных доз ФДТ, можно использовать для сенсibilизации к другим методам лечения [18]. Следовательно, объединение активности фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора в одной молекуле, способно предотвратить передачу сигналов о выживании, повысить избирательность действия в отношении опухолевых клеток и усилить общую противоопухолевую эффективность ФДТ за счет реализации сочетанного действия.

Таким образом, исследование эффективности применения мультимодальных агентов на основе фотосенсибилизатора и низкомолекулярного мультикиназного ингибитора является актуальной задачей для дальнейших разработок по улучшению эффективности ФДТ и преодолению существующих ограничений.

## Цели и задачи исследования

Целью данной работы было исследование фотофизических и биологических свойств конъюгатов металлокомплексов хлорина *еб* с различными ингибиторами тирозинкиназ для комбинированной фотодинамической терапии EGFR- и HGFR-положительных опухолей.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ фотофизических и биологических свойств *in vitro* конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и вандетаниба.

2. Оценить противоопухолевую эффективность конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и вандетаниба в экспериментах *in vivo* на лабораторных животных.

3. Исследовать особенности фотофизических свойств фермент-расщепляемого конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и кабозантиниба и его активность в отношении монослойной культуры опухолевых клеток.

4. Проанализировать эффективность конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и кабозантиниба в отношении трехмерной модели опухолевого роста *in vitro* в коллагеновом гидрогеле.

## Научная новизна

Впервые были исследованы свойства мультимодальных фотосенсибилизаторов, представляющих собой конъюгаты металлокомплексов хлорина *еб* и ингибиторов тирозинкиназ, в качестве агентов для комбинированной ФДТ.

Впервые показан синергический характер взаимодействия двух терапевтических модулей, производного хлорина и ингибитора киназ, при их включении в состав единой молекулы.

Показана терапевтическая эффективность соединения, в состав которого входят производное хлорина *еб* и вандетаниб, в отношении EGFR-положительных опухолей. Высокая противоопухолевая активность подтверждена как для культуры клеток *in vitro*, так и для экспериментальных опухолей на животных опухоленосителях.

Показана высокая активность соединения, в состав которого входят производное хлорина *еб* и кабозантиниб, в отношении HGFR-положительных опухолевых клеток при двумерном и трехмерном культивировании. При этом установлено, что применение ферментативно расщепляемого линкера приводит к усилению выраженности синергического эффекта компонентов соединения.

### **Научно-практическая значимость**

Получены новые знания об эффективности объединения в единой молекуле фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора тирозинкиназ с целью создания терапевтического агента с мультимодальным действием на клетки. Полученные данные могут быть использованы для создания новых противоопухолевых препаратов для комбинированной ФДТ.

Основные результаты и выводы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов ННГУ им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по биологическим, химическим и медицинским специальностям.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Мультимодальные фотосенсибилизаторы на основе металлокомплексов хлорина *еб* и мультикиназных ингибиторов тирозинкиназ являются перспективными соединениями для комбинированной ФДТ онкологических заболеваний за счет синергического противоопухолевого эффекта терапевтических модулей с разными механизмами действия.

2. Применение мультикиназных ингибиторов тирозинкиназ (вандетаниб и кабозантиниб) в качестве дополнительного терапевтического модуля, обеспечивает усиление эффективности фотодинамической терапии, проводимой с производным хлорина *еб*, в отношении EGFR- и HGFR-положительных опухолей.

3. Применение фермент-расщепляемого линкера при создании мультимодальных фотосенсибилизаторов обеспечивает расщепление конъюгата в присутствии специфического фермента, как следствие, его селективную активацию

и повышение эффективности за счет снятия стерического ограничения индивидуальных терапевтических модулей.

### **Личный вклад автора**

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

### **Достоверность научных результатов**

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, применением надежных методов исследования, широкой апробацией. Также аргументы и выводы согласуются с результатами независимых исследований в литературе.

### **Апробация**

Основные результаты работы представлялись на международных и российских научных мероприятиях: Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (г. Н. Новгород, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023); Международном научном форуме «Ломоносов-2019» (г. Москва, 2019); Международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2020, 2022); Молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (г. С.-Петербург, 2020, 2022); Нижегородской сессии молодых ученых (г. Н. Новгород, 2021, 2022); UK-Russia Conference “Advanced biomaterials to combat cancer” (Ланкастер, Великобритания, 2021); 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (виртуальный формат выступления, 2021); Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (г. Севастополь, 2022); The 3rd International Electronic Conference on Cancers: New Targets for Cancer Therapies (виртуальный

формат выступления, 2023); XXXV Зимней молодежной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2023); Международной школе-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (г. Н. Новгород, 2024); Российской конференции по медицинской химии с международным участием (2024); X съезде Российского фотобиологического общества Конференция «Современные проблемы фотобиологии» (пос. Шепси, 2023); 6-й Российской конференции по медицинской химии (г. Н. Новгород, 2024); I региональном собрании РФО и Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» (г. Нижний Новгород, 2024).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 34 работы, включая 7 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в список ВАК. Получен патент РФ на изобретение.

### **Структура и объем работы**

Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов, цитируемой литературы. Объем составляет 160 страниц машинописного текста, иллюстрированного 34 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 424 источника.

### **Благодарности**

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWR-2023-0032) и РФФ (проекты № 21-73-10230 и № 24-13-00179).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Основные классы фотосенсибилизаторов для ФДТ

Применение особых соединений и света для лечения различных заболеваний известно еще со времен древних цивилизаций. С помощью солнечного света и экстрактов некоторых растений (пастернак, петрушка и зверобой) лечили такие кожные заболевания, как витилиго и псориаз [19, 20]. Однако лишь спустя несколько веков появилась и начала активно исследоваться концепция фотоактивной молекулы (фотосенсибилизатора) и ее применения в клинической практике [21].

Одним из важнейших событий развития нового терапевтического подхода стало случайное наблюдение, сделанное Оскаром Раабом в 1898 году. Он отметил, что микроорганизмы *Paramecium caudatum*, инкубируемые с акридиновым красителем, погибали при дополнительном световом воздействии. В последующие годы было проведено множество исследований данного явления. В том числе Герман фон Таппейнер в своих работах подтвердил фотосенсибилизирующую природу ряда красителей и установил, что для протекания реакции необходимо присутствие кислорода [21]. Впоследствии реакции, наблюдаемые при взаимодействии молекулы фотосенсибилизатора и света, были названы «фотодинамическими» и легли в основу фотодинамической терапии (ФДТ) [22, 23].

В настоящее время ФДТ является клинически одобренным терапевтическим подходом для лечения различных дерматологических, офтальмологических, стоматологических, сердечно-сосудистых, гинекологических, инфекционных и онкологических заболеваний [6, 24]. ФДТ основана на применении фотосенсибилизатора в сочетании со световым облучением определенной длины волны. Активированный светом фотосенсибилизатор запускает серию фотохимических реакций в клетках. При этом происходит локальное образование активных форм кислорода (АФК), которые участвуют в деструкции важных структур клеток и в итоге приводят к их гибели [1, 25]. Основными преимуществами ФДТ являются локальность воздействия, неинвазивность, низкая

токсичность применяемых агентов и отсутствие серьезных побочных эффектов [9]. В связи с этим в последние три десятилетия ФДТ активно развивается в качестве терапевтического подхода для лечения онкологических заболеваний.

Как и более 100 лет назад ключевым элементом ФДТ является фотосенсибилизатор, который способен конвертировать энергию поглощенного светового излучения в энергию химических превращений. За время развития и становления ФДТ было идентифицировано более 400 фотоактивных веществ, которые можно разделить на непорфириновые синтетические, природные соединения и порфириновые (тетрапиррольные) [26, 27].

*Непорфириновые синтетические соединения* представляют собой синтетические красители и включают фенотиазины, цианины, ксантены, акридиновый оранжевый, сквараиновые и аминоскваариновые красители [28]. Следует отметить, что открытие фотосенсибилизирующих свойств эозина и метиленового синего способствовали становлению и развитию ФДТ [29]. Однако в настоящее время применение этой группы соединений значительно ограничено из-за высокой темновой токсичности и метаболической инактивации.

Наиболее изученными синтетическими красителями являются фенотиозиновые красители (метиленовый синий, толуидиновый синий и нильский синий), которые эффективно генерируют синглетный кислород, оказывают цитотоксическое действие на клетки в наномолярном диапазоне концентраций и имеют максимум поглощения при длинах волн более 600 нм с высоким молярным коэффициентом экстинкции (более  $10^4 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) [30].

*Природные непорфириновые соединения* получают путем выделения активных компонентов из лекарственных растений. Примерами являются куркумин, антрахиноны, толипорфин, гиперидин, тиофены и гипокреллин [31]. Природные фотосенсибилизаторы имеют разнообразную химическую структуру и обладают рядом преимуществ для применения их в качестве агентов для ФДТ, включая отсутствие токсичности для нормальных клеток, эффективное поглощение света в области 400-700 нм и доступность [32]. Однако существуют и трудности их

применения, такие как выраженная реакция иммунной системы, быстрое выведение из кровотока, ограниченное накопление в целевых тканях [33].

Наиболее известным соединением из данной группы является гиперин, получаемый из растения *Hypericum perforatum L.* В клинической практике гиперин продемонстрировал многообещающие результаты при лечении различных злокачественных новообразований, включая плоскоклеточный и базальноклеточный рак кожи и носоклотки, а также рак поджелудочной железы, мочевого пузыря [31, 34].

*Порфириновые соединения* представляют собой природные макроциклы, встречающиеся в таких важных биомолекулах, как гем, хлорофилл и бактериохлорофилл. Способность этих соединений проявлять фотоактивность позволила использовать их тетрапиррольный каркас для разработок фотосенсибилизаторов. В настоящее время тетрапиррольные структуры составляют самую большую группу веществ для ФДТ онкологических заболеваний. Основными представителями являются порфирины, хлорины, бактериохлорины и фталоцианины [3, 35]. Традиционно порфириновые фотосенсибилизаторы разделяют на три поколения [30].

К первому поколению относят производные гематопорфирина (HrD), выделенные Сэмюэлем Шварцем в 1955 году и представляющие собой сложную смесь порфириновых соединений [36]. Активное исследование данных агентов продемонстрировало их способность накапливаться в опухолевой ткани и производить противоопухолевый эффект при проведении ФДТ [36, 37]. Однако также были показаны и значительные побочные эффекты, включающие эритему, отек и некроз тканей [38]. В последующих работах было установлено, что необходимыми фотосенсибилизирующими свойствами обладают только олигомерные компоненты. Благодаря разработке методов очищения удалось получить обогащенную смесь олигомеров порфирина, которая впоследствии была названа «Фракция D» и использовалась в качестве основы для первого коммерческого препарата Photofrin® (Concordia Laboratories Inc., США) [39]. Однако несмотря на клиническую значимость, Фотофрин обладает рядом

недостатков, включая неоднородный состав, короткую длину волны активации (630 нм), длительную кожную фотосенсибилизацию до 6 недель [3, 40]. Эти недостатки стимулировали активные исследования, направленные на создание фотосенсибилизаторов второго поколения.

Ко второму поколению относятся такие порфириновые фотосенсибилизаторы как расширенные порфирины, фталоцианины, нафталоцианины, хлорины и бактериохлорины [39]. Данные агенты продемонстрировали улучшенные фотофизические свойства, тропность к опухолевой ткани, повышенную генерацию синглетного кислорода, низкую темновую токсичность и фотостабильность [2, 40]. К клиническому применению разрешено более десятка хлориновых фотосенсибилизаторов, включая Foscan<sup>®</sup> (Scotia QuantaNova plc, Великобритания), Photochlor<sup>®</sup> (Rosewell Park Cancer Institute, США), Tookad<sup>®</sup> (Negma Lerads/Steba Biotech, Франция), Фотосенс<sup>®</sup> (ГНЦ "НИОПИК", ФГУП, Россия), Радахлорин<sup>®</sup> (Рада-Фарма, Россия), Фотодитазин<sup>®</sup> (Вета-Гранд, Россия).

Помимо этого, важным открытием оказалось применение экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК). Сама АЛК не является фотосенсибилизатором, а представляет собой пролекарственную форму протопорфирина IX (PPIX). При избыточной концентрации экзогенной АЛК в клетке, происходит выработка PPIX, который в свою очередь является эффективным фотосенсибилизатором [2, 41]. АЛК, известная под торговыми марками Levulan<sup>®</sup> (DUSA Pharmaceuticals Incorporated, Торонто, Канада) и Аласенс<sup>®</sup> (НИОПИК ГНЦ, ФГУП, Россия) используется в клинической практике для лечения и визуализации ряда поверхностных опухолей и опухолей полых органов [41, 42].

Существенным недостатком фотосенсибилизаторов второго поколения является плохая растворимость в физиологических средах, что не только ограничивает их внутривенное применение, но также приводит к снижению биодоступности и эффективности [2]. Это привело к разработке подходов для улучшения эффективности ФДТ путем применения инновационных технологий.

Третье поколение фотосенсибилизаторов основано на модификации тетрапиррольной структуры фотосенсибилизаторов первого и второго поколения для достижения желаемых свойств. Главной целью разработки этого класса веществ является повышение селективности накопления препаратов в опухолевой ткани [43]. При этом выделяют две стратегии по нацеливанию, основанных на молекулярных и физиологических особенностях опухоли.

Первый подход основан на инкапсуляции или иммобилизации фотосенсибилизаторов на наноплатформах с помощью ковалентных и нековалентных взаимодействий [2, 43]. Применение наноматериалов увеличивает биодоступность, а также повышает селективность за счет пассивной доставки посредством, так называемого EPR-эффекта<sup>1</sup>, заключающегося в повышенной проницаемости и удержании макромолекул и наночастиц в опухолях [44]. В связи с этим было разработано большое число липосомальных форм клинически применяемого препарата Foscan<sup>®</sup> [45]. Кроме этого, был разработан препарат Photolon<sup>™</sup> (РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь), представляющий собой молекулярный комплекс соли хлорина *еб* и поливинилпирролидона, и используемый для лечения меланомы кожи, головы и шеи [46].

Второй подход заключается в конъюгации фотосенсибилизаторов с биологически активными молекулами (углеводы, витамины, гормоны, белки, лиганды к специфическим рецепторам, моноклональные антитела и др.), которые обеспечивают таргетную доставку путем специфического связывания с клетками-мишенями [2, 43]. Первым препаратом из данной группы фотосенсибилизаторов стал Akalux<sup>®</sup> (Япония), представляющий собой конъюгат производного фталоцианина кремния с цетуксимабом, являющимся моноклональным антителом специфичным к EGFR<sup>2</sup>. Препарат был одобрен в Японии в 2020 году для лечения неоперабельного местно-распространенного или рецидивирующего рака головы и шеи. Терапевтическая эффективность данного конъюгата основана на селективности накопления фотосенсибилизатора в опухолевых клетках с высокой

---

<sup>1</sup> эффект повышенной проницаемости и удержания (от англ. enhanced permeability and retention)

<sup>2</sup> рецептор эпидермального фактора роста (от англ. epidermal growth factor receptor)

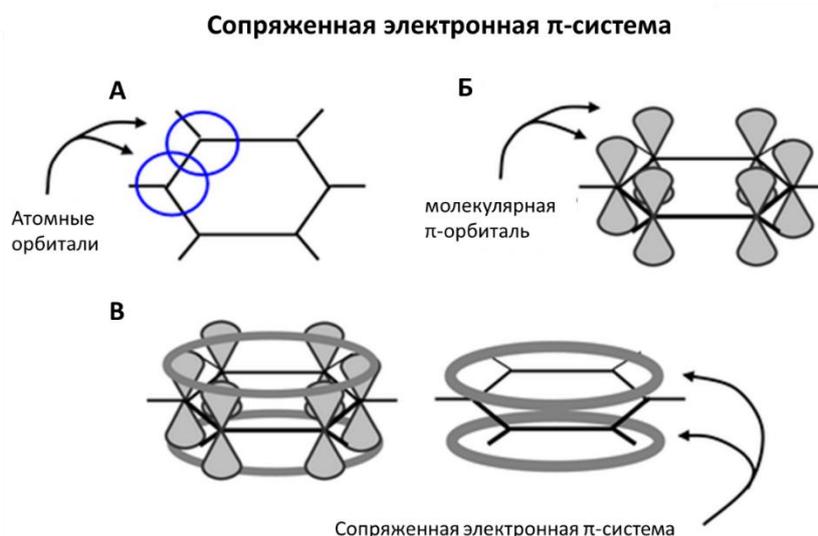
экспрессией рецептора. Дальнейшая фотоактивация происходит селективно в опухолевых клетках, не затрагивая окружающие нормальные ткани [47].

В настоящее время продолжается разработка фотосенсибилизаторов с улучшенными терапевтическими свойствами. Из множества химических структур, которые были описаны в качестве агентов для ФДТ, наиболее привлекательными являются порфириновые соединения. Их терапевтический потенциал обусловлен структурными, фотофизическими и фотохимическими характеристиками.

## 1.2 Порфириновые фотосенсибилизаторы

### 1.2.1 Физико-химические свойства тетрапирролов

Химическая структура тетрапиррольных соединений представляет собой макроцикл, состоящий из четырех пиррольных колец, объединенных метиновыми группами ( $-\text{CH}=\text{}$ ) [48]. Перекрывание атомных орбиталей макроцикла формирует сопряженное кольцевое пространство – делокализованную  $\pi$ -электронную систему, которая способна поглощать, преобразовывать и переносить энергию (рис.1). Также существенным свойством тетрапирролов является ароматичность, придающая высокую термическую и фотохимическую стабильность молекулам [49].



**Рис. 1.** Энергетические конформации тетрапиррольного макроцикла: (А) перекрывание атомных орбиталей (вид сверху); (Б) форма молекулярной  $\pi$ -орбитали (вид сбоку); (В) делокализованное электронное пространство внутри макроцикла [49]

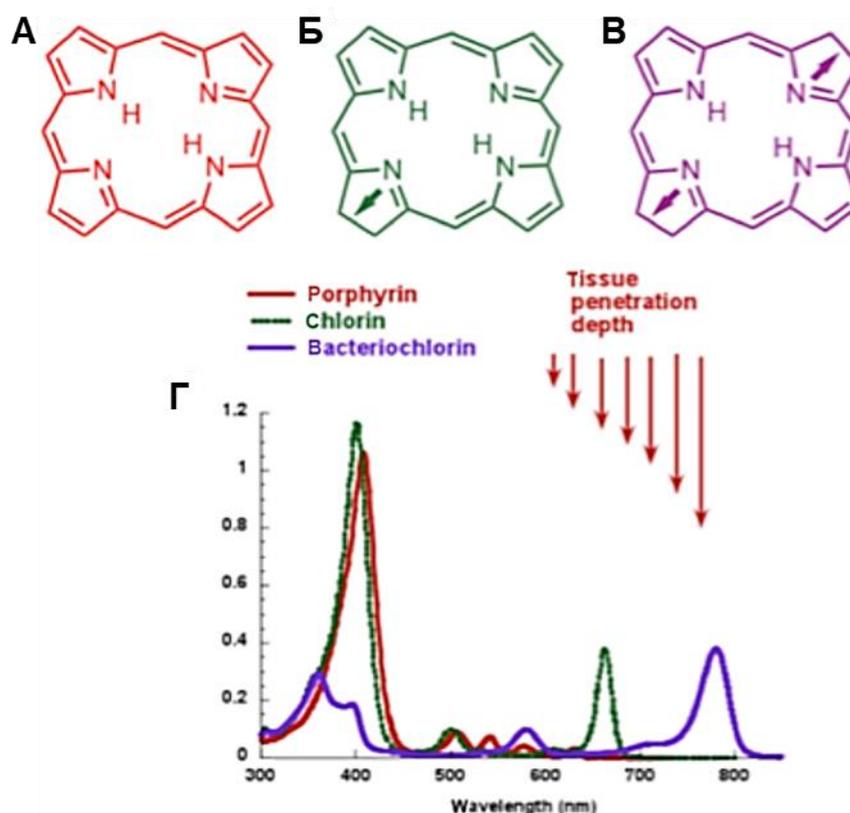
Благодаря своему электронному строению, тетрапиррольные соединения обладают уникальными спектральными свойствами. Согласно четырехорбитальной модели Гоутермана, поглощение видимого света  $\pi$ -системой тетрапирролов вызывает перенос электронов от высших занятых молекулярных орбиталей (HOMO и HOMO-1) к низшим незанятым молекулярным орбиталям (LUMO и LUMO+1) [50, 51]. Эти электронные переходы соответствуют поглощению порфириновых фотосенсибилизаторов в двух областях видимого спектра. Высокоинтенсивная полоса поглощения в коротковолновой области (полоса Core,  $\sim 400$  нм) связана с переходом HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO. Низкоинтенсивная полоса поглощения в длинноволновой области (Q-полоса,  $\sim 600-800$  нм) соответствует переходу HOMO  $\rightarrow$  LUMO [52].

В рамках применения тетрапиррольных соединений в ФДТ их важной особенностью является интенсивное поглощение в красной области спектра. Это в первую очередь обусловлено наличием терапевтического окна прозрачности биологических тканей. Благодаря ему свет в диапазоне 600-850 нм обладает большей проникающей способностью в биологических тканях и обеспечивает возможность лечения глубоко локализованных опухолей [53]. Стоит отметить, что применение света с большей длиной волны ( $>850$  нм) будет неэффективным вследствие недостаточной энергии для возбуждения кислорода ( $<94$  кДж/моль) и производства достаточного количества АФК [5].

Положение пика поглощения в красной области спектра напрямую зависит от структуры макроцикла тетрапирролов. Порфирины с полностью сопряжённой системой, например, гематопорфирин, имеют низкоинтенсивную Q-полосу в области  $\sim 630$  нм [54], что ограничивает их применение в ФДТ. Поэтому для настройки и оптимизации спектральных характеристик проводят структурную модификацию тетрапиррольного ядра.

Замена одного пиррольного кольца на фенильное приводит к нарушению симметрии макроцикла и расширению  $\pi$ -системы. Так, тексафирины представляющие собой первые модифицированные порфирины, обладают интенсивным поглощением в области 730-770 нм [41]. Присоединение бензольных

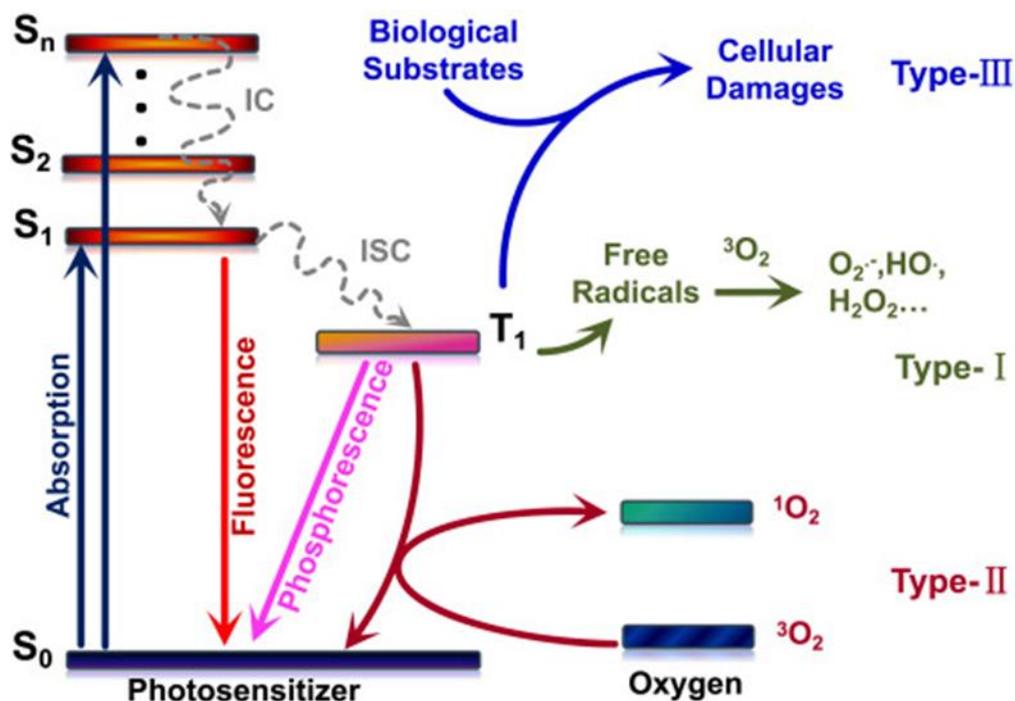
или нафталиновых колец к  $\beta$ -положениям пирролов увеличивает плоскость сопряжения, в результате чего фталоцианины и нафталоцианины характеризуются интенсивным поглощением в области 700 нм. Восстановление одной двойной связи в пиррольном кольце снижает симметрию при сохранении сопряжения и обеспечивает поглощение хлоринов при 650-690 нм. Восстановление двух двойных связей также приводит к смещению Q-полосы у бактериохлоринов в ближний ИК-диапазон (750-800 нм) (рис. 2) [48].



**Рис. 2.** Химические структуры (А) порфирина, (Б) хлорина, (В) бактериохлорина и (Г) их спектры поглощения [48]

Возбудимая  $\pi$ -система тетрапиррольных соединений в основном состоянии ( $S_0$ ) характеризуется присутствием двух антипараллельных электронов на НОМО. Поглощение кванта света молекулой переводит общую  $\pi$ -систему макроцикла в электронно-возбужденное синглетное состояние ( $S_1$ ), продвигая один из электронов к LUMO [49]. При этом энергетический уровень, которого достигает электрон, зависит от поглощенной энергии и, следовательно, от длины волны света. Так ультрафиолетовый и синий свет (300-450 нм) несут больше энергии и поэтому

вызывают переходы на более высокоэнергетические уровни ( $S_n, n \geq 2$ ). Высокие колебательные уровни  $S_n$  состояния быстро релаксируют до энергетически самого низкого уровня возбужденного синглетного состояния ( $S_1$ ). Этот процесс называется колебательной релаксацией и сопровождается рассеиванием энергии в виде тепла. В то же время красный и ближний инфракрасный свет (600-800 нм) хоть и обладают меньшей энергией, также обеспечивают переход молекулы в возбужденное  $S_1$  состояние (рис. 3) [49, 55].



**Рис. 3.** Модифицированная диаграмма Яблонского для описания механизма фотодинамических реакций [56]

Возбужденное синглетного состояния ( $S_1$ ) нестабильно, имеет короткое время жизни ( $10^{-9} - 10^{-6}$  с) и за счет разрешенного по спину перехода быстро теряет энергию. Потеря избытка энергии может происходить посредством испускания кванта света – флуоресценции, при этом молекула возвращается в  $S_0$  состояние [49, 57]. Также возможен интеркомбинационный переход (ISC) молекулы в низшее возбуждённое триплетное состояние ( $T_1$ ). ISC является безизлучательным переходом и приводит к изменению спинового состояния электрона. Стоит отметить, что флуоресценция и ISC являются конкурирующими путями

деактивации возбужденного синглетного состояния ( $S_1$ ) фотосенсибилизатора и конкретный путь релаксации определяется структурой молекулы [55, 56].

Возбужденное триплетное состояние ( $T_1$ ) фотосенсибилизатора является более стабильным и долгоживущим (время жизни  $\sim 1$  мс) [49, 57]. Переход молекулы в основное синглетное состояние сопровождается потерей энергии и может происходить в результате испускания кванта света – фосфоресценции, вступления в фотохимические реакции (фотодинамическая реакция I типа) или передачи энергии на молекулярный кислород ( $^3O_2$ ) через неизлучательный переход (фотодинамическая реакция II типа) [57]. Результатом протекания фотодинамических реакций обоих типов является образование высокотоксичных АФК, которые являются основными цитотоксическими агентами при проведении ФДТ.

Для ФДТ предпочтительным является переход молекулы фотосенсибилизатора в возбужденное триплетное состояние, из которого возможно образование АФК. В связи с этим распространенным подходом является модификация тетрапиррольной структуры посредством введения центрального металла, что обеспечивает эффект «тяжелого» атома. Среди металлов, которые были исследованы при разработке фотосенсибилизаторов для ФДТ, особое внимание привлекли диамагнитные металлы (Zn, Pd, In, Sn, Lu) [58, 59]. Показано, что такие металлокомплексы характеризуются сниженным квантовым выходом флуоресценции и более высоким квантовым выходом триплетного состояния по сравнению с тетрапирролами со свободным основанием [60]. Помимо этого, замена двух протонов свободного основания на двухвалентный ион металла приводит к изменению окислительно-восстановительных свойств металлокомплексов, что улучшает взаимодействие молекулы фотосенсибилизатора с кислородом [58].

Таким образом, понимание основ механизма взаимодействия молекулы фотосенсибилизатора и света позволяет проводить целенаправленные структурные модификации тетрапиррольного каркаса для оптимизации ключевых фотофизических характеристик агентов.

### 1.2.2 Фотодинамические реакции I и II типа

Способность фотосенсибилизаторов генерировать АФК лежит в основе терапевтической эффективности ФДТ. При этом образование АФК происходит в результате фотодинамических реакций I или II типа [61]. Данные реакций могут протекать одновременно, а соотношение вклада каждой реакции будет определяться структурой фотосенсибилизатора, концентрацией кислорода и особенностям микроокружения [62]. В частности, при низкой концентрации кислорода или в более полярной среде доминирует фотодинамическая реакция I типа, в то время как фотодинамическая реакция II типа преобладает в гидрофобных средах в присутствии относительно высоких концентраций кислорода [63, 64].

Фотодинамическая реакция I типа опосредована переносом электронов или протонов между молекулой фотосенсибилизатора в возбужденном триплетном состоянии и молекулами субстрата. В качестве субстрата могут выступать липиды, белки или вода. В результате такого неспецифического переноса происходит образование анион- или катион-радикалов, которые впоследствии могут реагировать с кислородом, образуя вторичные АФК [61, 62].

Ключевым продуктом фотодинамической реакции I типа является супероксидный анион-радикал ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), образующийся в реакциях одновалентного восстановления кислорода [65]. При этом молекула фотосенсибилизатора окисляется, образуя катионные радикалы, которые способны участвовать в дополнительных окислительных реакциях [66]. Несмотря на то, что супероксидный анион-радикал не обладает высокой реактивной способностью в биологических системах, он участвует в образовании более реактивных АФК, включая пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) в реакции дисмутации, гидроксильный радикал ( $\text{HO}\cdot$ ) в процессе восстановления и пероксинитрит ( $\text{OONO}^-$ ) в процессе реакции с оксидом азота ( $\text{NO}^-$ ) [61, 65].

Гидроксильный радикал является одним из наиболее высокореактивных типов АФК, способен вызывать окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот, инициируя цепные реакции окисления. Время жизни гидроксильного радикала

составляет менее 1 нс, вследствие чего радиус действия ограничен местом его генерации [61, 65].

Фотодинамическая реакция II типа протекает в результате прямой передачи энергии от фотосенсибилизатора в возбужденном триплетном состоянии к молекулярному кислороду. Данное взаимодействие представляет собой спин-разрешенный перенос энергии, в результате которого происходит триплет-триплетная аннигиляция и генерация синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ) [61, 64]. Этот тип реакций наиболее характерен для порфириновых фотосенсибилизаторов, что связано с низким энергетическим зазором между триплетными состояниями молекул [67]. После передачи энергии молекула фотосенсибилизатора возвращается в основное синглетное состояние и способна повторно участвовать в фотохимических реакциях. Синглетный кислород является высокореактивным типом АФК и способен напрямую реагировать со многими биологическими молекулами. Однако из-за короткого времени жизни (менее 40 нс) радиус действия синглетного кислорода ограничен местом локализации самого фотосенсибилизатора [68].

Наиболее предпочтительными для ФДТ считаются фотодинамические реакции II типа. Это обусловлено высокой скоростью генерации синглетного кислорода и отсутствием ферментативных систем его нейтрализации в клетках [69].

Основным эффектом АФК, генерируемых в ходе фотодинамических реакций, является перекисное окисление липидов (ПОЛ). Чувствительность клеточных мембран к фотоповреждению обусловлена присутствием полиненасыщенных жирных кислот [70]. В результате взаимодействия свободных радикалов и ненасыщенных липидных цепей происходит накопление гидропероксидов липидов (LOOH). Эти молекулы способны распадаться с образованием алкоксильного ( $\text{LO}\cdot$ ) или пероксидного ( $\text{LOO}\cdot$ ) радикалов под действием металлов переменной валентности ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ), что приводит к разветвлению и интенсификации цепных реакций окисления [71]. В результате ПОЛ происходит изменение химической и физической структуры клеточных мембран, в частности повышение ионной

проницаемости, потеря текучести, инактивация мембранных ферментов и рецепторов [71, 72].

Воздействие АФК на белки может осуществляться за счет окисления аминокислотных остатков, агрегации белков и расщепления пептидных связей. При этом характер повреждения будет определяться аминокислотным составом. Так, серосодержание (метионин, цистеин) и ароматические аминокислоты (гистидин, тирозин, триптофан, фенилаланин) наиболее подвержены реакциям фотоокисления, в результате которых происходит их модификация с образованием сульфоксидов, гидропероксидов и эндопероксидов [65, 73]. Окисление метионина приводит к нарушению конформации белков и снижению их активности, необратимое фотоокисление цистеина вызывает разрушение дисульфидных мостиков, участвующих в стабилизации структуры белков, реакция тирозина с синглетным кислородом способна приводить к разрыву пептидных связей [74, 75].

Окислительное повреждение ДНК сопровождается физико-химическими изменениями в самой молекуле. АФК реагируют с азотистыми основаниями и дезоксирибозой, вызывая одно- или двуцепочечные разрывы нити ДНК или модификации оснований [71, 75].

Помимо этого, фотоокислению подвержены и некоторые другие биологически важные молекулы, как, например, аскорбиновая кислота, биотин, глутатион, фолиевая и липоевая кислота. В тоже время гликозаминогликаны, спирты и простые сахара фотоокисляются с достаточно низкой эффективностью [65, 75].

Таким образом, АФК, образующиеся в ходе фотодинамических реакций, являются сильными окислителями и могут напрямую реагировать со многими биологическими молекулами, вызывая их повреждение. Однако из-за небольшого радиуса действия, первичная мишень фотоокисления в значительной степени определяется как тканевым распределением фотосенсибилизатора, так и его внутриклеточной локализацией.

### 1.2.3 Механизмы селективности и внутриклеточного распределения фотосенсибилизаторов

Тетрапиррольные соединения, применяемые в качестве агентов для ФДТ онкологических заболеваний, в основном являются экзогенными фотосенсибилизаторами, которые вводятся в организм системно, местно или перорально. Дальнейший фармакокинетический и фармакодинамический профиль соединений во многом будет определяться химической структурой тетрапиррола и, как следствие, молекулярными свойствами молекулы [76]. При этом важнейшей особенностью биораспределения порфириновых фотосенсибилизаторов является их уникальное сродство к опухолевой ткани [75, 77].

Ключевым механизмом, опосредующим селективность накопления фотосенсибилизаторов в опухолях, считается их связывание с белками сыворотки крови, включая альбумины, глобулины, липопротеины низкой (ЛПНП) и высокой (ЛПВП) плотности [78, 79]. При этом распределение фотосенсибилизаторов между белками во многом зависит от степени их липофильности и заряда. Так амфифильные и гидрофильные фотосенсибилизаторы чаще всего взаимодействуют с альбумином, в то время как гидрофобные фотосенсибилизаторы связываются с ЛПНП [76, 80].

Среди других механизмов, объясняющих избирательность накопления, выделяют особенности опухолевого микроокружения. В частности, низкие значения pH опухоли, вследствие избыточного производства лактата, могут способствовать лучшему растворению и накоплению анионных фотосенсибилизаторов в клетках [81]. Агрегированные комплексы фотосенсибилизаторов могут захватываться макрофагами, число которых увеличено в опухолевой ткани [82]. Кроме этого, существует предположение, что повышенная выработка коллагена в опухолевой ткани, также способствует селективному связыванию порфиринов [79, 83].

Внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов оказывает важное влияние на механизм действия и эффективность ФДТ. В свою очередь, место локализации определяется рядом факторов, к которым относят параметры

структуры фотосенсибилизатора (полярность, заряд, размер, асимметрия), его концентрация, путь поступления молекулы в клетку, а также структурные и метаболические особенности самих клеток [84, 85, 86].

Порфириновые фотосенсибилизаторы способны поступать в клетку в виде мономеров или небольших агрегатов через плазматическую мембрану. Известно, что гидрофильные фотосенсибилизаторы накапливаются в клетках посредством эндоцитоза и локализуются в лизосомах и эндосомах. В частности, сорбционный эндоцитоз характерен для N-моноаспартилхлорина *еб* [87], лизилхлорина *рб* [88] и сульфированных фталоцианинов алюминия [89]. Накопление гидрофобных электронейтральных молекул в клетках может происходить посредством диффузии через плазматическую мембрану, как в случае производных гематопорфирина [90] и фталоцианина цинка [91]. При этом локализуются гидрофобные фотосенсибилизаторы преимущественно в плазматической мембране, а также в мембранах митохондрий [87, 92], эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [93] и аппарата Гольджи [94]. Амфифильные фотосенсибилизаторы благодаря наличию полярных и неполярных групп в структуре молекулы наиболее эффективно проникают в клетки с локализацией в митохондриях [95]. Для фотосенсибилизаторов, связанных с ЛПНП, показано нацеливание на поверхностные рецепторы этих белков, в первую очередь семейства LDLR<sup>3</sup>, экспрессия которых повышена в опухолевых клетках [96, 97]. Показана их способность интернализироваться в опухолевые клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза с последующей локализацией в лизосомах. Агрегированные молекулы захватываются фагоцитозом [98, 99, 100].

Необходимо отметить, что избирательное накопление фотосенсибилизатора в опухолевой ткани не гарантирует успех проведения ФДТ. В экспериментах с использованием сульфированных *мезо*-тетрафенилпорфинов было установлено, что фотосенсибилизаторы, локализованные внутри клеток человеческой карциномы ННК-3025, показали большую эффективность по сравнению с

---

<sup>3</sup> семейство рецепторов липопротеинов низкой плотности (от англ. low density lipoprotein receptor)

соединениями, связанными с поверхностью мембраны [101].

В целом, внутриклеточная локализация фотосенсибилизаторов является важным параметром, оцениваемым при разработке новых препаратов для ФДТ. Во многом это обусловлено тем, что фотоповреждение конкретных компартментов клетки имеет решающее значение в клеточном ответе на фотодинамическое воздействие.

### 1.3 Противоопухолевое действие ФДТ

Клиническая процедура ФДТ начинается с введения фотосенсибилизатора. Способ введения препарата может варьироваться в зависимости от локализации опухоли и фармакокинетики фотосенсибилизатора. Так, наиболее распространенным способом является *внутривенное введение*, применяемое для глубоко локализованных опухолей. *Местное применение* чаще всего используется для поверхностных опухолей [102, 103]. Обычно фотосенсибилизатор вводится за несколько часов или дней до светового воздействия. За это время происходит его накопление в опухолевой ткани и распределение между внутриклеточными компартментами. Данный промежуток времени называется лекарственно-световой интервал (DLI) и является одним из параметров, контролирующими нацеливание и эффективность ФДТ [103]. Использование короткого DLI в основном направлено на сосудистую сеть опухоли (сосудистый протокол ФДТ), в то время как более длительный DLI способствует лучшему нацеливанию на клетки (клеточный протокол ФДТ) [104]. Избирательность накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани и локальное световое облучение обеспечивают двойную специфичность воздействия ФДТ. В качестве источника света можно использовать лазеры или светодиоды в зависимости от типа и локализации опухоли [53, 105].

Противоопухолевый эффект ФДТ достигается за счет трех взаимосвязанных механизмов действия: прямого цитотоксического воздействия АФК на опухолевые клетки, повреждения сосудистой сети опухоли и активации иммунного ответа [1, 5, 106]. Результаты ФДТ во многом будут определяться концентрацией фотосенсибилизатора в облучаемой области, плотностью энергии светового потока

(флюенсом), длительностью облучения, а также оксигенацией целевой ткани [107, 108]. Для достижения наилучшей эффективности проводимого лечения необходима комбинация трех механизмов.

*Прямое цитотоксическое воздействие* ФДТ на опухолевые клетки осуществляется посредством АФК, образовавшихся в ходе фотодинамических реакций. В результате чрезмерное повреждение важнейших биомолекул и длительный окислительный стресс приводят к гибели клеток. На протяжении многих лет преобладала точка зрения, согласно которой ФДТ способна запускать клеточную гибель по механизму апоптоза, некроза или аутофагии [62, 109]. Однако исследования последних лет позволили выявить новые механизмы фотоиндуцируемой гибели клеток, такие как некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, митотическая катастрофа [110].

Некроз представляет собой быструю и неконтролируемую клеточную гибель при применении очень высоких концентраций фотосенсибилизатора и/или крайне высоких доз облучения при ФДТ, наблюдается при быстрой фотодеструкции плазматической мембраны [72]. В основном данный тип клеточной гибели сопровождается повышением ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в цитозоле, истощением запасов клеточного АТФ, нарушением барьерной функции мембраны и высвобождением содержимого клетки во внеклеточное пространство. Данные изменения являются необратимыми и ведут к возникновению воспалительных процессов [111].

Апоптоз представляет собой регулируемую гибель клетки, связанную как с внеклеточными, так и внутриклеточными сигналами. Данный тип гибели характеризуется конденсацией хроматина, фрагментацией ядра и сегрегацией клетки в апоптотические тельца, что в отличие от некроза не сопровождается воспалительными процессами [111, 112]. В контексте ФДТ основную роль играет внутренний, или митохондриальный, путь апоптоза. При этом предшествующими событиями могут быть как прямое фотодинамическое повреждение митохондрий, так и фотоповреждение других клеточных структур. В обоих случаях происходит повышение проницаемости митохондриальной мембраны, влекущее за собой высвобождение в цитозоль клетки митохондриальных белков, в частности

цитохрома *C* и активатора каспаз SMAC<sup>4</sup> [113, 114]. Дальнейшие события включают активацию эффекторных каспаз 3 и 7, конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК [115].

Аутофагия представляет собой двойственный процесс, который способен как запускать гибель клетки, так и обеспечивать ее выживание. В обоих случаях происходит образование аутофагосомы, содержащей поврежденный материал клетки. В дальнейшем аутофагосома сливается с лизосомами с образованием аутолизосомы, в которой происходит разрушение макромолекул посредством гидролиза, а продукты расщепления могут быть использованы для репарационных процессов [115]. Перевес функции аутофагии в сторону механизма выживания или гибели зависит от степени фотоповреждения клетки. Цитопротекторная роль аутофагии была показана при проведении ФДТ с гиперацином (локализация в ЭПР) и ингибиторами аутофагии. Было показано, что подавление аутофагии приводило к увеличению гибели клеток [116, 117]. Кроме того, цитопротекторная функция аутофагии может быть подавлена при фотоповреждении лизосом. Гибель по пути аутофагии после ФДТ в основном происходит в клетках с устойчивостью к апоптозу [118].

Партанатос является регулируемой некротической формой гибели клеток, вызываемой в ответ на гиперактивацию PARP<sup>5</sup>, участвующей в репарации ДНК. Данный путь характеризуется фрагментацией ядра, разрывом плазматической мембраны, деполяризацией митохондрий [119, 120].

Ферроптоз является регулируемой некротической формой гибели клеток, характеризующейся сверхактивацией окислительной модификации фосфолипидов мембран посредством железозависимого механизма [121]. Ферроптоз в первую очередь действует на митохондрии, приводя к повышению мембранного потенциала, разрыву внешней мембраны и уменьшению их объема [122]. Особенностью данного процесса является стимуляция иммунного ответа,

---

<sup>4</sup> второй митохондриальный фактор, активирующий каспазы (от англ. second mitochondria-derived activator of caspases)

<sup>5</sup> поли(АДФ-рибоза)-полимераза (от англ. poly ADP ribose polymerase)

отсутствующая при некрозе [110].

Параптоз характеризуется появлением множества вакуолей, которые в конечном итоге заполняют цитоплазму [123]. Этот путь регулируемой клеточной гибели активируется в ответ на фотоповреждение ЭПР и является альтернативным путем гибели клеток с нарушенной программой апоптоза. В результате окислительного повреждения происходит накопление неправильно свернутых белков в ЭПР, повышение осмотического давления и активация кальциевого канала IP3R<sup>6</sup> [124]. Эти события способствуют высвобождению кальция (Ca<sup>2+</sup>) и перегрузке им митохондрий [122, 1125]. Параптоз наблюдался при ФДТ в клетках, обработанных полипиридилным комплексом Ru(II) [126].

В дополнение к прямому цитотоксическому воздействию на клетки, ФДТ способна вызывать сосудистое повреждение опухоли и активацию иммунного ответа. Оба этих механизма, возникающие после процедуры, способствуют более долгосрочному контролю опухоли [127].

*Сосудистый эффект* ФДТ заключается в повреждении эндотелиальных клеток, что запускает каскад реакций, включая агрегацию тромбоцитов, высвобождение вазоактивных молекул, адгезию лейкоцитов, увеличение проницаемости сосудов и их сужение. Микрососудистый коллапс, стаз кровотока и тканевые кровоизлияния могут привести к стойкой гипоксии, депривации питательных веществ, задержке роста опухоли и в конечном итоге ее гибели [128, 129].

*Активация иммунного ответа* после ФДТ обусловлена высвобождением множества воспалительных медиаторов и молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs), к которым относят кальретикулин, амфотерин, белки теплового шока (HSP) кальгранулин А, В и С, а также цитокины и хемокины, в частности интерлейкин-1 и -6 [130, 131]. DAMPs обычно секвестрируются внутри живых клеток, однако гибель опухолевых клеток приводит к высвобождению и распознаванию антигенпрезентирующими клетками иммунной

---

<sup>6</sup> инозитолтрифосфатный рецептор (от англ. inositol trisphosphate receptor)

системы. DAMPs выполняют роль адьювантов, и в совокупности с опухолевыми неоантигенами запускают их созревание. Презентация опухолевых антигенов приводит к активации хелперных и цитотоксических Т-клеток. При этом их активность не ограничивается исходным местом и может включать диссеминированные и метастатические поражения. Следовательно, благодаря индукции иммунного ответа, ФДТ может оказывать системный эффект [131, 132].

ФДТ показала свою клиническую эффективность при лечении различных типов опухолей, включая рак легких [133, 134], кожи [135], пищевода [136], желчных протоков [137], шейки матки [138], молочных желез [139], мочевого пузыря [140], носоглотки [141], головы и шеи [142], колоректального рака [143].

Тем не менее, некоторые опухоли могут демонстрировать низкие показатели ответа на проводимое лечение ввиду ряда существующих ограничений, к которым относят неоптимальное биораспределение фотосенсибилизатора, сильное ослабление света при прохождении через ткани, гипоксию в опухоли, выживание опухолевых клеток после ФДТ [10, 144]. В связи с этим существует потребность разработки новых подходов для повышения общей эффективности ФДТ, а также расширения ее применения.

## **1.4 Современное развитие ФДТ**

### **1.4.1 Современные тенденции в разработке фотосенсибилизаторов**

За последние десятилетия был достигнут значительный прогресс в области разработки фотосенсибилизаторов. Анализ и понимание механизмов взаимодействия фотосенсибилизатора, света и кислорода на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях позволили выявить ключевые факторы, ограничивающие терапевтический потенциал ФДТ, и разработать стратегии для их преодоления (таблица 1).

Таблица 1.

## Современные подходы для повышения противоопухолевой эффективности ФДТ

Направления	Подходы	Примеры
<b><i>Неоптимальное биораспределение фотосенсибилизатора</i></b>		
Модификация структуры	Конъюгаты с биомолекулами	Углеводы [145, 146, 147], пептиды [148], нуклеотиды [149]
	Наноматериалы	Частицы ватерита [150, 151], золотые наностержни [152], фуллерены [153]
Разработка систем доставки	Внеклеточные везикулы	Эндотелиальные везикулы [154], опухолевые везикулы [155], экзосомы [156]
	Клеточные конструкции	Цитотоксические Т-клетки [157], макрофаги [158], эритроциты [159], мезенхимальные стволовые клетки [160]
	Полимерные материалы	Микроиглы [161, 162]
Создание активируемых фотосенсибилизаторов	Включение в структуру биореактивных элементов	Биочувствительные линкеры [163, 164], конъюгация с биочувствительным агентом [165, 166], биочувствительные супрамолекулярные структуры [167, 168]
	Модуляция генерации АФК	Резонансный перенос энергии (FRET) [172], фотоиндуцированный перенос электронов (PeT) [173], эмиссия, вызванная агрегацией (AIE) [174]
	Биортогональные реакции	Искусственный рецептор [169], модульная пептидная платформа [170], сайт-специфическая активация [171]
<b><i>Ослабление света при прохождении через ткани</i></b>		
Разработка и модификация структур фотосенсибилизаторов	Смещение поглощения в ближний ИК-диапазон	Наноматериалы [175, 176], скварены [177, 178] расширенные ароматические герероциклы [179, 180]
	Двухфотонное возбуждение	Наночастицы с апконверсией [181, 182], введение заместителей [183, 184]

**Продолжение таблицы 1.**

Модификация источников излучения	Применение других типов излучения	Ультразвуковое излучение [185, 186], рентгеновское излучение [187, 188], излучение Черенкова [189]
	Разработка устройств доставки света	Интраоперационная ФДТ [190], интерстициальная доставка света [191], имплантируемые источники света [192]
<i><b>Гипоксия опухоли</b></i>		
Изменение микроокружения опухоли	Системы доставки кислорода в опухоль	Нанокompозиты [193, 194], перфторуглерод [195, 196, 197], металлоорганические каркасы [198, 199], эритроциты [200, 201, 202], кислородный двигатель на основе фотосинтетических зеленых водорослей [203]
	Нормализация сосудов опухоли	Гиалуронидаза [204, 205], фототермический эффект [206, 207, 208]
	Ингибирование антиоксидантной защиты	Металлы Cu, Mn, Fe, Au для истощения GSH [209, 210], усилители окислительного стресса [211, 212]
Повышение эффективности генерации АФК	Комплексы переходных металлов	Ru(II) [213], Pt(II) [214], Ir(III) [215], Re(I) [216]
	Кислород независимая фотодинамическая реакция	Акцепторы электронов [217], одноатомные катализаторы [218, 219]

На протяжении многих лет одной из основных стратегий в повышение селективности соединений являлась конъюгация фотосенсибилизаторов с высокоаффинными лигандами или создание наноразмерных и липосомальных форм препаратов для адресной доставки [220]. Однако прогресс и развитие методик синтеза позволили разработать новый подход, а именно создание активируемых фотосенсибилизаторов. В отличие от классических фотосенсибилизаторов, которые производят АФК под действием света, активируемые молекулы в своем исходном состоянии «выключены» и даже при облучении не способны вызывать фотодинамические реакции, что позволяет им оставаться неактивными в нецелевых тканях. Однако после воздействия специфических внешних стимулов такие молекулы восстанавливают свои фотосенсибилизаторные способности [221, 222]. Способность к переключению свойств обусловлена двумя особенностями

конструкции активируемых молекул. Во-первых, наличием механизма тушения (FRET, PeT, AIE и т.д.), который способствует стабильному тушению триплетного состояния молекулы за счет рассеивания энергии. Во-вторых, наличием биореактивного элемента, который в ответ на внешний стимул запускает активацию фотосенсибилизатора и тем самым обеспечивает селективность [221]. К стимулам, которые могут быть использованы для создания активируемых фотосенсибилизаторов, относят низкие значения pH, гипоксические условия, ферментативную активность, окислительно-восстановительный медиатор [223]. Кроме этого, для активации фотосенсибилизатора возможно применение биоортогональных химических реакций. Данный тип реакций характеризуется высокими скоростями протекания, селективностью и биосовместимостью. Они способны протекать в физиологических условиях, при этом не воздействуя на биохимические процессы в клетках [224].

Многочисленные исследования были сосредоточены на разработке новых химических структур, применении наноматериалов и усовершенствовании источников света. Однако несмотря на то, что инновационные подходы продемонстрировали многообещающие результаты повышения эффективности ФДТ, существует еще одно ограничение терапевтического потенциала – *развитие резистентности опухолевыми клетками* [225, 226, 227].

На протяжении многих лет считалось, что ФДТ не способна вызывать резистентность опухолевых клеток. Однако в последние годы появились клинические данные об устойчивости некоторых опухолей к повторным процедурам фотодинамического воздействия, в частности при базальноклеточной карциноме [228, 229]. Путем индукции были получены устойчивые клеточные линии *in vitro* [230 – 235], а также описаны механизмы выживания в ответ на сублетальные дозы ФДТ [14, 236, 237].

В связи с этим была предложена стратегия комбинированной ФДТ, заключающаяся в применении фармакологических адъювантов, которые могут вводиться совместно с фотосенсибилизатором, для дополнительного воздействия на молекулярные пути опухолевых клеток.

### 1.4.2 Обоснование подхода комбинированной ФДТ

Комбинированная терапия подразумевает применение двух или более терапевтических методов лечения, которые принципиально различны по механизму действия и нацелены на независимые молекулярные пути [238]. В результате применения комбинированной схемы может наблюдаться четыре типа взаимодействия между применяемыми агентами. *Синергизм* – значительное увеличение эффекта при использовании комбинации по сравнению с эффектами от отдельных компонентов комбинации. Частным случаем синергизма является потенцирование, заключающееся в усилении терапевтической активности одного препарата посредством другого препарата. *Аддитивность* – суммирование эффектов используемых препаратов. *Антагонизм* – уменьшение эффекта при применении комбинации [239, 240]. С клинической точки зрения, желательными эффектами являются синергизм и аддитивность.

Обоснованием успешного применения комбинации противоопухолевых агентов в первую очередь является повышение восприимчивости опухоли за счет блокировки сразу нескольких путей выживания. Это приводит к нарушению адаптивных реакций клеток и, следовательно, повышению эффективности проводимого лечения и снижению вероятности возникновения лекарственной устойчивости [241, 242]. Помимо этого, возможно уменьшение побочных эффектов ввиду снижения дозировок отдельных компонентов [243].

Опухолевые клетки способны развивать устойчивость к ФДТ, иницируя пути выживания в ответ на сублетальные дозы воздействия. При этом могут активироваться сразу несколько путей, включающие экспрессию генов раннего ответа, синтез антиоксидантов *de novo*, ответ на гипоксию, провоспалительный сигнальный ответ, ответ на накопление поврежденных белковых молекул в ЭПР, а также запуск цитопротекторной функции аутофагии. Помимо этого, устойчивость опухолевых клеток к ФДТ также может зависеть и от внутренних особенностей самих клеток (таблица 2) [14, 244, 245, 246].

Таблица 2.

## Механизмы резистентности к ФДТ

Механизм	Влияние	Ссылки
Повышенная экспрессия АТФ-связывающих транспортных белков ABC	Снижение накопления фотосенсибилизатора в клетках и активация путей его выведения	ABCB1 <sup>7</sup> [247], ABCG2 <sup>8</sup> [248, 249]
Высокая активность антиоксидантной системы	Снижение уровня окислительного стресса, вызванного ФДТ	NRF2 <sup>9</sup> [250], GSH <sup>10</sup> [251, 252], PhGPx <sup>11</sup> [253], GSTP1 <sup>12</sup> [254], MnSOD <sup>13</sup> [255]
Конститутивная активация онкогенов	Уход от апоптоза	Bcl-2 <sup>14</sup> [256, 257], Ras <sup>15</sup> [258, 259, 260], PI3K <sup>16</sup> [261, 262], Bax <sup>17</sup> [263]
Активация механизмов репарации ДНК	Восстановление окислительных повреждений ДНК	APE1 <sup>18</sup> и ATM <sup>19</sup> [264]
Стромальный компонент микроокружения опухоли	Антиоксидантная защита	Секретируемый опухоль-ассоциированными фибробластами TGFβ1 <sup>20</sup> [265, 266]
Активация сигнальных путей	Запуск цитопротекторной функции аутофагии	p38MAPK [267, 268], ERK1/2, JNK и Ras [269]
Активация экспрессии HSP и других защитных белков	Снижение апоптоза	HSP27 [270, 271], HSP70 [272, 273], HSP60 [274], Сурвинин [275]
Вторичная гипоксия, вызванная ФДТ	Усиление гипоксии из-за повреждения сосудов	HIF-1α <sup>21</sup> [276, 277], VEGF <sup>22</sup> , PGE-2 <sup>23</sup> , TNF-α <sup>24</sup> и IL-1β <sup>25</sup> [278]
Активация других белков в ответ на ФДТ	Снижение окислительного стресса	iNOS <sup>26</sup> [279, 280]

<sup>7</sup> АТФ-связывающая кассета, подсемейство В, член 1 (от англ. ATP binding cassette subfamily B member 1)

<sup>8</sup> АТФ-связывающая кассета, подсемейство G, член 2 (от англ. ATP-binding cassette sub-family G member 2)

<sup>9</sup> ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (англ. nuclear factor E2-related factor 2)

<sup>10</sup> глутатион (от англ. glutathione)

<sup>11</sup> фосфолипид гидропероксид глутатионпероксидаза (от англ. phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase)

<sup>12</sup> глутатион-S-трансфераза пи-1 (от англ. glutathione S-transferase P1)

<sup>13</sup> супероксиддисмутаза 2 (от англ. superoxide dismutase 2)

<sup>14</sup> белок В-клеточной лимфомы 2 (от англ. B-Cell leukemia/lymphoma 2)

<sup>15</sup> последовательности ДНК, ассоциированные с ретровирусом (от англ. Retrovirus Associated DNA Sequences)

<sup>16</sup> фосфоинозитид-3-киназа (от англ. Phosphoinositide 3-kinases)

<sup>17</sup> Bcl-2-ассоциированный белок X (от англ. Bcl-2-associated X protein)

<sup>18</sup> апуриновая/апиридинавая эндонуклеаза 1 человека (от англ. apurinic/apirimidinic (AP) endonuclease 1)

<sup>19</sup> серин/треониновая протеинкиназа, которая рекрутируется и активируется двунитевыми разрывами ДНК (англ. ataxia telangiectasia mutated)

<sup>20</sup> трансформирующий фактор роста бета 1 (от англ. transforming growth factor beta 1)

<sup>21</sup> гипоксия-индуцируемый фактор 1-альфа (от англ. hypoxia-inducible factor 1-alpha)

<sup>22</sup> факторов роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor)

<sup>23</sup> простагландин E2 (от англ. prostaglandin E2)

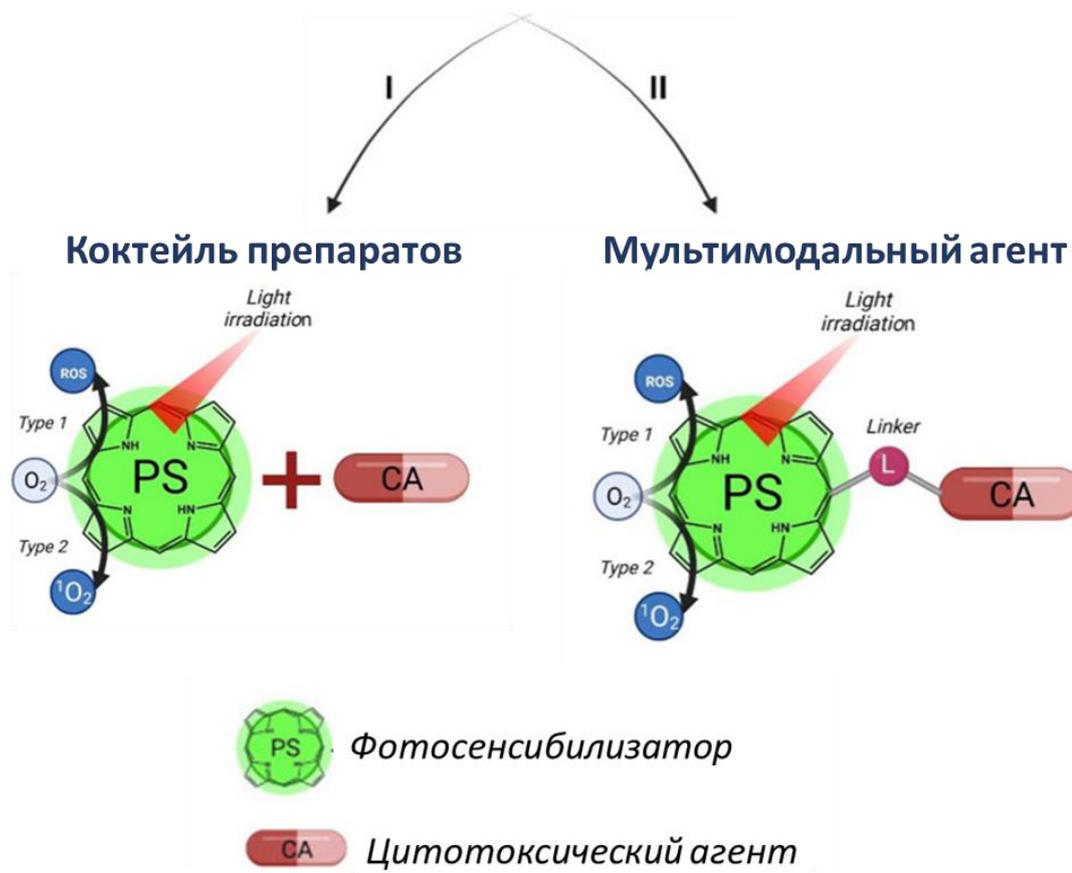
<sup>24</sup> фактор некроза опухоли-альфа (от англ. tumor necrosis factor-alfa)

<sup>25</sup> интерлейкин 1 бета (от англ. interleukin-1 beta)

<sup>26</sup> индуцибельная синтаза оксида азота (от англ. inducible NO synthase)

К настоящему времени получены результаты, свидетельствующие о высоком потенциале сочетания ФДТ с иммунотерапией [281], химиотерапией [9, 282], радиотерапией [283], фототермической терапией [284], ультразвуковой терапией [285], хирургией [286], а также таргетной терапией [11].

Выделяют две стратегии для реализации комбинированного воздействия ФДТ (рис. 4). Первый подход заключается в последовательном применении двух терапевтических агентов. Традиционно в комбинированной терапии применяются «коктейли» препаратов, заключающиеся в совместном введении комбинации препаратов пациенту. Однако одновременное введение лекарственных агентов с разными механизмами действия не всегда является эффективным, что связано с низкой биодоступностью лекарственных комбинаций на клеточном уровне [239]. Также препараты в такой схеме обычно применяют в максимально переносимой дозе, что может приводить к развитию множественной лекарственной устойчивости и повышению общей токсичности [287].



**Рис. 4.** Подходы к реализации комбинированной ФДТ [9]

Второй подход основан на разработке мультимодальных фотосенсибилизаторов. Данная стратегия основана на прямом слиянии двух препаратов в одну молекулу [288]. Объединение препаратов может происходить за счет ковалентных связей, реализуемых через расщепляемый или нерасщепляемый линкер [289]. Одновременная доставка фотосенсибилизатора и лекарственного агента предполагает повышение терапевтической эффективности за счет реализации сочетанного действия, улучшение фармакокинетики лекарственной комбинации и преодоление лекарственной резистентности [9, 287, 288]. Помимо этого, создание мультимодальных фотосенсибилизаторов предполагает повышение избирательности накопления цитотоксического агента за счет тропности порфириновых соединений к опухоли, а также возможность отслеживания накопления мультимодального агента за счет флуоресценции фотосенсибилизатора [9]. К настоящему времени опубликованы результаты ряда исследований, направленных на создание таких мультимодальных агентов для комбинированной ФДТ. В качестве дополнительного цитотоксического модуля в этих соединениях выступают ДНК-интеркаляторы, металлосоодержащие цитостатики, антимиотические препараты, модуляторы эстрогена и ингибиторы белков [11].

Первые синтезированные мультимодальные фотосенсибилизаторы включали в свой состав металлосоодержащие противоопухолевые соединения. Комплексы переходных металлов (платины, золота, олова) широко известны в качестве химиотерапевтических агентов с момента открытия цисплатина в 1965 году. Их противоопухолевое действие основано на ингибировании репарации и репликации ДНК в быстро пролиферирующих клетках. Однако отсутствие селективности по отношению к опухолевым клеткам приводит к серьезным побочным эффектам, таким как нефротоксичность, ототоксичность и т.д. [290]. Для повышения селективности действия было предложено объединить комплексы Pt(II) с порфиринами [291–293]. Было показано, что данная конъюгация способствовала повышению эффективности терапии как в темноте, так и на свету. Сочетание платинового фрагмента и порфириновой группы в одной молекуле продемонстрировало аддитивный противоопухолевый ответ. Однако низкая

поглощающая способность порфиринов в диапазоне 650-850 нм ограничивала эффективность терапии. В связи с этим были созданы конъюгаты комплексов металлов с бактериохлорином [294, 295] и фталоцианином цинка [296]. Новые мультимодальные агенты продемонстрировали высокую селективную цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам за счет тропности этих ФС к опухоли.

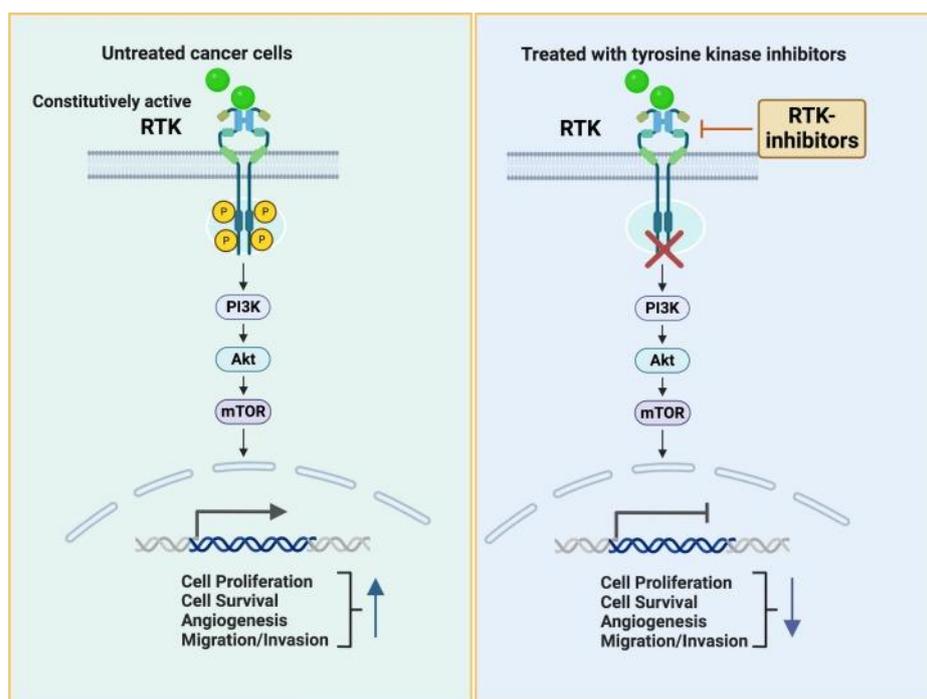
Антрациклиновые антибиотики являются одними из наиболее эффективных химиотерапевтических препаратов. Противоопухолевая активность антрациклинов основана на комбинации нескольких механизмов, а именно интеркаляции ДНК, генерации окислительного стресса и ингибировании активности топоизомеразы II [297]. Однако, несмотря на свою эффективность, данный класс веществ имеет недостатки, к которым относятся не специфичность действия, высокая токсичность и развитие резистентности [200]. Для решения этих проблем, были разработаны конъюгаты ФС с антрациклиновыми антибиотиками, в частности с доксорубицином. Данные агенты показали двойную противоопухолевую эффективность [298, 299]. Исследования, проведенные Плотниковой Е.А. и соавторами, указывают на перспективность применения конъюгатов фотосенсибилизаторов и химиотерапевтических агентов по сравнению не только с монотерапевтическим подходом, но также и по сравнению с последовательным применением агентов [300]. Дальнейшие разработки мультимодальных агентов основаны на комбинации ФДТ и молекулярно-таргетной терапии.

### **1.4.3 Комбинация ФДТ и низкомолекулярных ингибиторов**

Несмотря на то, что основной механизм действия ФДТ основан на запуске окислительного стресса, возможна также активация в клетке различных сигнальных событий в ответ на повреждение. С одной стороны, передача молекулярных сигналов, опосредованная секретируемыми факторами роста, рецепторными тирозинкиназами и внутриклеточными модуляторами, может привести к формированию устойчивости опухолевых клеток. С другой стороны, молекулярные пути, активированные ФДТ, можно использовать в качестве

мишеней при комбинированном подходе. В связи с этим, комбинация фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора представляет собой перспективную стратегию повышения противоопухолевой эффективности ФДТ [301, 302].

Низкомолекулярные ингибиторы представляют собой органические соединения, которые связываются с внеклеточными или внутриклеточными опухолевыми мишенями тем самым блокируя их функции [303]. Подавляющее большинство препаратов на основе данных агентов представляют собой ингибиторы тирозинкиназной активности рецепторов, участвующих в передаче сигналов от растворимых внеклеточных факторов роста [304]. Эти рецепторы обычно активируются специфическими лигандами, связывание с которыми приводит к их димеризации или олигомеризации, что обеспечивает аутофосфорилирование внутриклеточного домена. Впоследствии происходит открытие активных сайтов киназ за счет изменения конформации и активация нижележащих белков сигнального каскада [305]. Воздействие низкомолекулярных ингибиторов обусловлено их способностью взаимодействовать с сайтом связывания АТФ, предотвращает аутофосфорилирование рецептора и приводит к блокировке сигнального каскада (рис. 5) [303, 304].



**Рис. 5.** Общий механизм действия ингибиторов тирозинкиназ [306]

В зависимости от механизма действия, выделяют шесть основных типов низкомолекулярных ингибиторов. *Ингибиторы I типа* являются АТФ-конкурентными ингибиторами, нацелены на активное состояние тирозинкиназных рецепторов и напрямую взаимодействуют с сайтами связывания АТФ. К ним относятся кабозантиниб, гефитиниб, тофацитиниб, вандетаниб [306, 307]. *Ингибиторы II типа* обратимо связываются с неактивной конформацией рецептора, что приводит к нарушению общей ориентации киназы. Представителями данного типа являются квизартиниб, пиртобрутиним и репотректиниб [306, 307]. *Ингибиторы III типа* являются аллостерическими ингибиторами, не конкурируют с АТФ, и их связывание происходит рядом с АТФ-связывающим сайтом. Примерами являются траметиниб, эверолимус, сиролимус, темсиролимус [306]. *Ингибиторы IV типа* также относятся к аллостерическим ингибиторам, но не связываются с участками связывания АТФ или пептидного субстрата. *Ингибиторы V типа* являются ковалентными ингибиторами, образуют обратимую или необратимую связь с цистеином или лизином в сайте связывания АТФ. К ним относятся футибатиниб, мобоцертиниб, занубрутиниб и дакомитиниб [306, 308]. *Ингибиторы VI типа* представляют собой двухвалентные ингибиторы, обратимо связываются сразу с двумя сайтами – аллостерическим и АТФ-связывающим. Например, ленватиниб [306, 308].

В зависимости от профиля селективности низкомолекулярные ингибиторы делят на селективные и мультикиназные. Мультикиназные ингибиторы одновременно оказывают свое действие в отношении нескольких опухолевых мишеней, в то время как селективные ингибируют только одну [304]. Возможность некоторых ингибиторов воздействовать сразу на несколько мишеней обусловлена структурной гомологией АТФ-связывающих участков киназ. С терапевтической точки зрения, мультикиназные ингибиторы обладают рядом преимуществ, включая снижение риска резистентности и повышение эффективности в условиях гетерогенной природы опухолей, а также универсальность воздействия на опухоли различного патогенеза [309].

Первой из реализованных комбинаций фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора стало сочетанное применение ФДТ и производного гелданамицина – 17-аллиламино-17-деметоксигелданамицин (17-ААG), являющегося ингибитором HSP-90 [308]. Известно, что в выживании опухолевых клеток после ФДТ большую роль играет HSP-90. В частности, этот белок связывается с BIRC5<sup>27</sup>, членом семейства ингибиторов апоптоза (IAP), свехэкспрессируемым в большинстве типов опухолей и играющим роль супрессора апоптоза [310]. Образование комплекса HSP-90-BIRC5 приводит к иницированию клеточной сигнализации выживания и пролиферации. [311]. Однако применение 17-ААG во время проведения ФДТ приводит к нарушению функций HSP-90 и способствует повышению эффективности проводимой терапии [308].

Также было сообщено еще о нескольких полученных мультимодальных фотосенсибилизаторах с ингибиторами белков теплового шока. Конъюгат фталоцианина цинка с ганетеспибом (Gan-ZnPc) продемонстрировал двойное воздействие на опухолевые клетки за счет фотодинамических свойств и ингибирования активности HSP-90 [312]. Конъюгат вертепорфина с HS201, еще одним ингибитором HSP-90 также обеспечил повышенную противоопухолевую эффективность ФДТ [313].

Важным молекулярным событием, запускаемым после ФДТ и участвующим в выживании опухолевых клеток, является стимуляция ангиогенеза. Это процесс образования новых кровеносных сосудов, контролируемый связыванием факторов VEGF со специфическими рецепторными тирозинкиназами на поверхности опухолевых клеток и эндотелиоцитов, такими как VEGFR<sup>28</sup>-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 [219]. Первоначальное фотоповреждение опухоли сопровождается повреждением сосудов и может приводить к гипоксии ткани. Эти условия вызывают HIF-1 $\alpha$ , входящего в состав транскрипционного комплекса HIF-1. Одним из генов ответа на гипоксию, контролируемым HIF-1, является *VEGF*. Высвобождение в среду VEGF

---

<sup>27</sup> бакуловирусный ингибитор ответа апоптозных повторов 5, сурвивин (от англ. baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5)

<sup>28</sup> рецептор к фактору роста эндотелия сосудов (от англ. vascular endothelial growth factor receptor)

запускает ангиогенез, который играет важную роль в росте опухоли и способен приводить к рецидиву [16, 314, 315]. До настоящего времени концепция объединения в единой молекуле фотосенсибилизатора и ингибитора VEGFR не была реализована. Тем не менее, совместное применение Фотофрина и низкомолекулярного VEGFR-специфичного ингибитора ЕМАР-II продемонстрировало усиление чувствительности опухоли к ФДТ [315]. Это позволяет предположить перспективность создания фотосенсибилизатора с комбинированным действием, специфичного в отношении данного вида рецепторов.

Известно, что ФДТ способна инициировать также и сигнальные пути выживания, опосредованные EGFR [15, 316–318]. После активации EGFR может интернализироваться и транслоцироваться в ядро, где он связывается с фактором транскрипции STAT3<sup>29</sup>, запуская EGFR-STAT3 сигнальный путь [15, 319], который обеспечивает устойчивость к апоптозу и формирование резистентности [320]. В ряде работ было продемонстрировано, что сочетанное применение фотосенсибилизатора и низкомолекулярных ингибитор EGFR приводило к повышению эффективности ФДТ за счет нарушения аутофосфорилирования рецептора и/или его транслокации в ядро [317, 318, 321]. Это послужило основой для разработок конъюгированным мультимодальными агентами.

Наиболее изученными являются конъюгаты фотосенсибилизатора с эрлотинибом. Эрлотиниб представляет собой низкомолекулярный селективный ингибитор EGFR II типа [322, 323]. В качестве фотосенсибилизаторов в данных конъюгатах выступали производные фталоцианина цинка [324], феофорбида [325], хлорина [326] и бактериохлорина [327]. Для всех синтезированных конъюгатов отмечается повышение селективности в отношении EGFR-положительных клеточных культур по сравнению с EGFR-негативными. Помимо селективности, конъюгаты продемонстрировали высокую фотоиндуцированную фотодинамическую активность соединений.

---

<sup>29</sup> активатор транскрипции (от англ. Signal transducer and activator of transcription 3)

Еще одной рецепторной тирозинкиназой, участвующей в выживании опухолевых клеток, ангиогенезе и развитии лекарственной резистентности является HGFR<sup>30</sup> (известная также, как c-Met), широко экспрессируемый при раке мозга, желудка, мочевого пузыря, а также опухолях головы и шеи [328]. При связывании фактора роста гепатоцитов (HGF) со своим рецептором может происходить инициация многочисленных сигнальных путей, направленных на пролиферацию и выживание клеток. В частности, могут активироваться такие сигнальные молекулы как ERK1/2/ MAPK, PI3K/ Akt, STAT и NF-κB [329]. Основным источником продукции HGF являются стромальные клетки, в первую очередь опухоль-ассоциированные фибробласты, и активация сигналинга c-Met в опухолевых клетках чаще всего происходит через паракринный путь. Было установлено, что ФДТ способствует секреции HGF из погибающих апоптотическим путем фибробластов [330] и опухолевых клеток [331]. Вероятно, повышение экспрессии HGF представляет собой реакцию на окислительный стресс и гипоксию, индуцированные ФДТ. По-видимому, высвобождение HGF происходит не только погибающими апоптотически, но и выжившими клетками [331].

Таким образом, к настоящему времени синтезирован ряд мультимодальных фотосенсибилизаторов, в которых в качестве дополнительного цитотоксического модуля выступают низкомолекулярные ингибиторы. Однако стоит отметить, что в данных работах преимущественно использовались монокиназные ингибиторы.

### **1.5 Обоснование структуры исследуемых в работе мультимодальных фотосенсибилизаторов**

Сама идея разработки мультимодальных фотосенсибилизаторов заключается в создании терапевтических конъюгатов двойного действия для синергического повышения противоопухолевой терапии [9, 11]. Такой агент представляет собой конъюгат фотосенсибилизатора с терапевтическим агентом с другим механизмом действия.

---

<sup>30</sup> рецептор фактора роста гепатоцитов (от англ. hepatocyte growth factor receptor)

Наиболее востребованным соединением при разработке фотосенсибилизаторов двойного действия является хлорин *еб* [332]. Он представляет собой фотосенсибилизатор второго поколения, одобренный для клинического применения во многих странах, и обладающий хорошим сочетанием свойств для ФДТ. В частности, хлорин *еб* характеризуется низкой темновой токсичностью, высокой способностью эффективно генерировать АФК (квантовый выход 0,65) и оптимальными оптическими свойствами (поглощение при 660 нм). Однако, основным недостатком хлорина *еб* является гидрофобность [333]. Это ограничение решается путем его структурной модификации и введения в тетрапиррольную структуру периферических заместителей [334].

В качестве дополнительного модуля наибольший интерес представляют мультикиназные низкомолекулярные ингибиторы. Важным преимуществом данного типа ингибиторов является то, что за счет многоцелевого воздействия на клетку обеспечивается увеличение противоопухолевой эффективности [304, 335]. Также важно отметить, что согласно международным рекомендациям, мультикиназные ингибиторы относятся к первой линии лечения при ряде онкологических заболеваний [336]. Среди недостатков этой группы соединений необходимо упомянуть высокие терапевтические дозы препаратов, гидрофобность и развитие лекарственной устойчивости [335].

Подходящими кандидатами для включения в состав мультимодальных молекул являются мультикиназные ингибиторы вандетаниб и кабозантиниб. Вандетаниб ингибирует пути передачи сигнала, опосредованные VEGFR-2, EGFR и RET. Он одобрен для лечения прогрессирующего медуллярного рака щитовидной железы [337]. Доклинические исследования применения вандетаниба в качестве адъюванта при проведении химиотерапии, радиотерапии [338, 339] и ФДТ [317] в отношении моделей опухолей головы и шеи продемонстрировали усиление противоопухолевой эффективности проводимого лечения. Кабозантиниб является ингибитором VEGFR2, HGFR и RET [340]. Одобрен для лечения прогрессирующего медуллярного рака щитовидной железы, гепатоцеллюлярной карциномы и почечноклеточной карциномы [341]. Также кабозантиниб

продемонстрировал иммуномодулирующее действие на микроокружение опухоли, в результате которого опухолевые клетки становятся более восприимчивыми к иммуноопосредованному разрушению [342, 343].

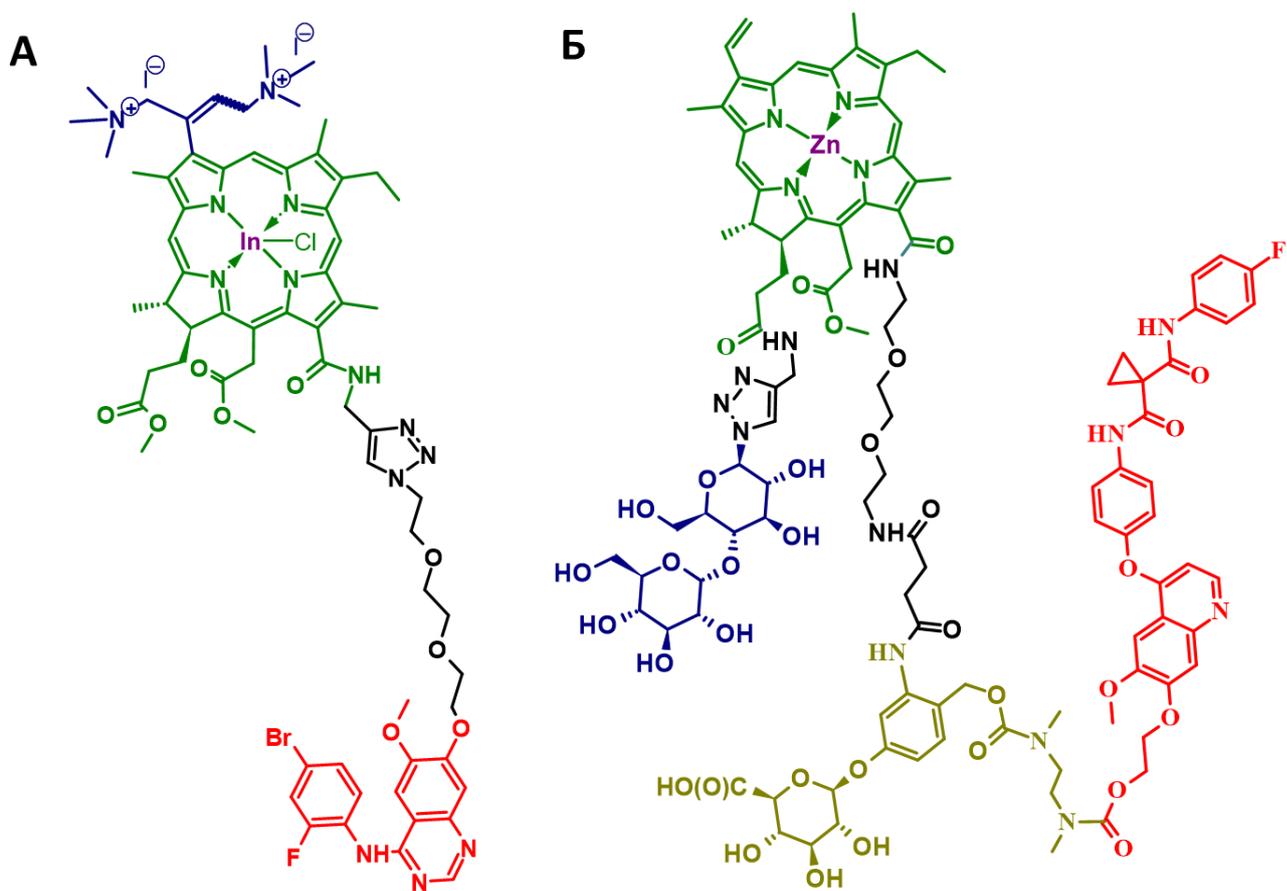
Можно предположить, что, объединение хлорина *еб* и мультикиназного низкомолекулярного ингибитора в одну молекулу может привести не только к синергическому повышению эффективности проводимой терапии, но и поспособствует преодолению недостатков каждого агента. Объединение двух частей может происходить за счет расщепляемого или нерасщепляемого линкера. При этом при выборе длины и типа линкера необходимо учитывать несколько фактов. Во-первых, низкомолекулярный ингибитор обладает высокой чувствительностью к стерическим препятствиям, что может ограничить действие агента. Во-вторых, массивное образование АФК во время проведения ФДТ способно привести к окислению ингибитора и тем самым снизить его эффективность [11].

Таким образом создание мультимодальных препаратов на основе фотосенсибилизатора и мультикиназного низкомолекулярного ингибитора представляет собой перспективное направление в области комбинированной ФДТ. В качестве терапевтических модулей целесообразно использовать производные хлорина *еб* и такие ингибиторы, как вандетаниб и кабозантиниб. Сочетание эффективности фотосенсибилизатора и прецизионности действия таргетных препаратов подразумевает синергический противоопухолевый эффект наряду с преодолением устойчивости опухолевых клеток, снижением терапевтических доз препаратов, а также уменьшением побочных эффектов и снижением риска рецидивов.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Исследуемые соединения

В работе исследовались новые мультимодальные фотосенсибилизаторы для комбинированной ФДТ онкологических заболеваний. Данные соединения представляют собой два различных варианта реализации концепции объединения в одном агенте фотодинамической и таргетной противоопухолевой активности. Структурно исследуемые соединения представляют собой конъюгаты производных хлорина *еб* и мультикиназных низкомолекулярных ингибиторов, соединенных между собой с помощью различных по химизму линкеров (рис. 6).



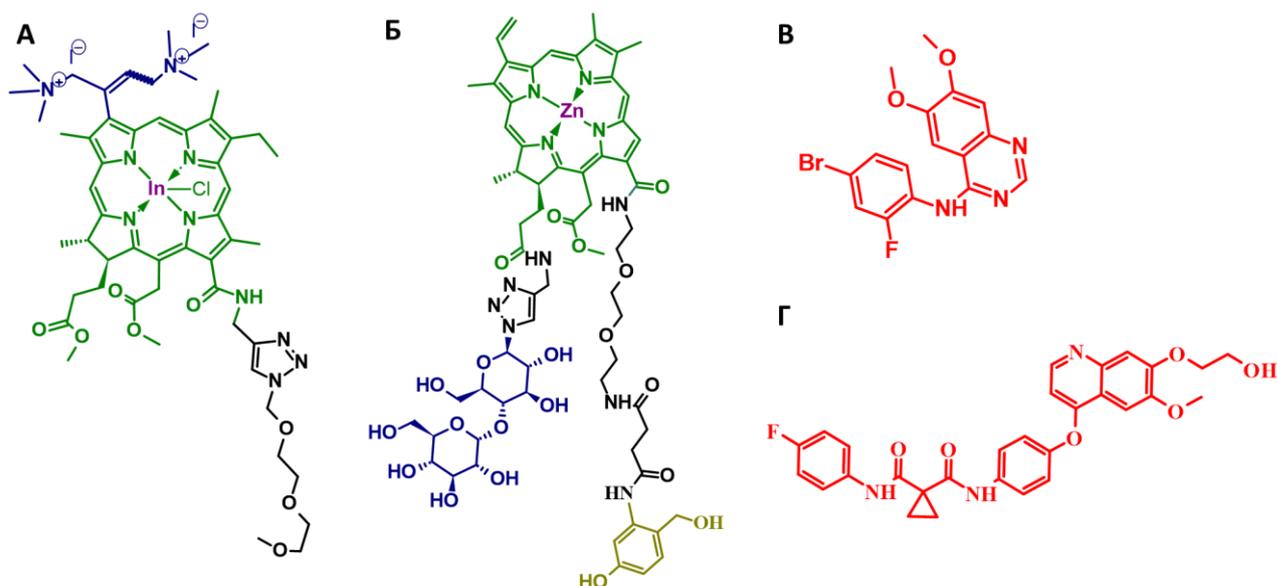
**Рис. 6.** Структурные формулы исследуемых мультимодальных фотосенсибилизаторов: (А) **InChl-Vnd**; (Б) **ZnChl-Cbz**. Цветом обозначены составляющие модули конъюгатов: зеленый – производное хлорина *еб*, фиолетовый – центральный атом металла, синий – заместительные группы, красный – низкомолекулярный ингибитор, черный – нерасщепляемый линкер, желтый – расщепляемый линкер (глюкуроноидный фрагмент)

Производное хлорина *еб* под действием света запускает фотодинамическую реакцию в опухолевой клетке. Внедрение металла (In или Zn) в тетрапиррольную структуру предполагает улучшение фотофизических характеристик, включая поглощение света в длинноволновой области спектра и генерацию активных форм кислорода. В качестве дополнительного цитотоксического агента выступали мультикиназные низкомолекулярные ингибиторы для таргетной терапии онкологических заболеваний: вандетаниб и кабозантиниб. Помимо этого, в тетрапиррольную структуру хлорина были введены заместительные группы (тетраалкиламмониевые группы или углеводный фрагмент) для повышения гидрофильности молекул. Все соединения были синтезированы в Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского на кафедре органической химии [344, 345].

**InChl-Vnd** – конъюгат дикатионного индиевого комплекса хлорина *еб* и вандетаниба. Присоединение вандетаниба к хлориновому ядру осуществлено за счет полиэтиленгликолевого линкера. Вандетаниб является обратимым мультикиназным ингибитором тирозинкиназной активности EGFR, VEGFR-2 и VEGFR-3. В качестве заместительных групп выступают тетраалкиламмониевые группы, представляющие собой два катиона.

**ZnChl-Cbz** – ферментативно расщепляемый конъюгат цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба. Присоединение кабозантиниба к хлориновому ядру осуществлено за счет  $\beta$ -глюкуроидного линкера, чувствительного воздействию  $\beta$ -глюкуронидазы. Кабозантиниб представляет собой обратимый мультикиназный ингибитор тирозинкиназной активности HGFR, VEGFR-2 и VEGFR-3. В качестве заместительной группы выступает углеводный остаток мальтозы.

В ряде экспериментов использовались соединения сравнения, представляющие собой неконъюгированные металлокомплексы производного хлорина *еб* (рис. 7А, 7Б) и ингибиторы тирозинкиназ (рис. 7В, 7Г).



**Рис. 7.** Структурные формулы некоъюгированных соединений сравнения: (А) InChl; (Б) ZnChl; (В) Vnd; (Г) Cbz

Сухие навески соединений растворяли до стоковой концентрации в системах растворителей на основе деионизированной воды (dH<sub>2</sub>O), этанола, диметилсульфоксида (ДМСО) и полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые приведены в таблице 3.

**Таблица 3.**

Системы растворения для приготовления стоковых растворов

Соединение	Проводимые исследования		
	Фотофизические свойства	Биологические свойства <i>in vitro</i>	Биологические свойства <i>in vivo</i>
InChl-Vnd InChl Vnd	Стоковая концентрация 1 мМ [dH <sub>2</sub> O, содержащая 5% ДМСО]		Концентрация 0,8 мМ [50% dH <sub>2</sub> O, 20% этанол, 30% ПЭГ]
ZnChl-Cbz ZnChl Cbz	Стоковая концентрация 1 мМ [85% dH <sub>2</sub> O, 5% ДМСО, 10% ПЭГ]		

Применяемые системы растворителей являются нетоксичными для биологических объектов. Это подтверждается применением смеси на основе воды, этанола и ПЭГ в качестве стандартного растворителя для клинически применяемого препарата Foscan® [346, 347]. Помимо этого, нами было проведено исследование влияния ДМСО и ПЭГ на жизнеспособность клеточных культур,

которое показало отсутствие негативного влияния в диапазоне концентраций, применяемых в биологических экспериментах *in vitro*.

## 2.2 Исследование оптических свойств соединений

Регистрацию спектров поглощения и флуоресценции производили с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek, США). Для анализа стоковые растворы соединений разбавляли dH<sub>2</sub>O до концентрации 5 мкМ. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн 300-700 нм с шагом 2 нм. Спектры флуоресценции регистрировали при возбуждении на 410 нм, диапазон регистрации – 550-850 нм, шаг – 2 нм.

Для оценки интенсивности поглощения использовали расчетный коэффициент молярной экстинкции ( $\varepsilon$ ), определяемый по формуле [348]:

$$\varepsilon = \frac{D}{c \times l}, \quad (1)$$

где  $D$  – оптическая плотность,  $c$  – концентрация вещества,  $l$  – длина пути.

Квантовый выход флуоресценции ( $\Phi_f$ ) определяли методом эталонного красителя. В качестве стандарта использовали родамин В (Sigma, США) в воде (квантовый выход 0,31 [349]). Исходные растворы исследуемых соединений и эталона разбавляли dH<sub>2</sub>O до получения растворов с оптической плотностью 0,01-0,1. Измерения производили с помощью спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx. Оптическую плотность измеряли на длине волны 410 нм. Регистрацию спектров флуоресценции проводили при возбуждении на 410 нм, диапазон регистрации 550-850 нм, шаг – 1 нм. Расчеты производили по формуле [350]:

$$\Phi_{fl1} = \frac{\Phi_{fl2} \times F_1 \times D_2}{F_2 \times D_1}, \quad (2)$$

где  $\Phi_{fl1}$  – квантовый выход исследуемого соединения,  $\Phi_{fl2}$  – квантовый выход стандартного соединения;  $F_1$  и  $F_2$  – интенсивность флуоресценции исследуемого и стандартного растворов;  $D_1$  и  $D_2$  – оптические плотности исследуемого и стандартного растворов.

### 2.3 Исследование фотохимических свойств соединений

Квантовый выход синглетного кислорода ( $\Phi_{ROS}$ ) определяли методом химических ловушек. В качестве ловушки использовали 1,3-дифенилизобензофуран (ДФИБФ) [351]. Данный метод основан на изменении оптической плотности раствора, содержащей 80 мкМ ДФИБФ и 0,1 мкМ исследуемого соединения в ДМСО, до и после облучения. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx на длине волны 420 нм. Для облучения растворов использовали светодиодный облучатель с длиной волны 655-675 нм и мощностью 32 мВт/см<sup>2</sup> [352]. В качестве эталона использовался Фотодитазин® (Вета-Гранд ООО, Россия) в ДМСО (квантовый выход генерации синглетного кислорода 0,56 [353]). Расчеты производили по формуле:

$$\Phi_{ROS \Delta 1} = \Phi_{ROS \Delta 2} \times \frac{(D_0 - D)_1}{(D_0 - D)_2}, \quad (3)$$

где  $\Phi_{ROS \Delta 1}$  и  $\Phi_{ROS \Delta 2}$  – квантовый выход анализируемого и стандартного соединения,  $(D_0 - D)_1$  и  $(D_0 - D)_2$  – разница оптической плотности при 420 нм до и после облучения исследуемого и стандартного соединения, соответственно.

Кинетику фотовыгорания определяли по изменению интенсивности флуоресценции 5 мкМ растворов исследуемых соединений в воде во время облучения. Регистрацию спектров флуоресценции производили с помощью спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx до и после облучения в различных дозах. Для облучения растворов использовали светодиодный облучатель, как указано выше [352]. Квантовый выход фотовыгорания ( $\Phi_{Pb}$ ) рассчитывали по формуле [354]:

$$\Phi_{Pb} = \frac{\frac{D_0 - D}{D_0} \times C \times N_A \times V}{N_q}, \quad (4)$$

где  $D_0$  и  $D$  – интенсивность флуоресценции до и после облучения,  $C$  – концентрация исследуемого соединения,  $N_A$  – постоянная Авогадро ( $6,02214 \times 10^{23}$  моль<sup>-1</sup>),  $V$  – объем раствора,  $N_q$  – количество поглощенных раствором квантов света, рассчитанное по формуле:

$$N_q = \frac{(1 - 10^{-D}) \times I \times \lambda \times t}{\hbar \times c}, \quad (5)$$

где  $I$  – плотность мощности светового потока,  $\lambda$  – длина волны света, применяемого для облучения раствора,  $t$  – время облучения в секундах,  $c$  – скорость света ( $299\,792\,458\text{ м/с}$ ),  $\hbar$  – постоянная Планка ( $6,63 \times 10^{-34}\text{ Дж}\cdot\text{с}$ ).

## 2.4 Клеточные линии и условия их культивирования

Оценку биологической эффективности *in vitro*, а именно исследование динамики накопления, внутриклеточной локализации, а также фотодинамической активности исследуемых конъюгатов, проводили на адгезионных культурах клеток опухолевой и неопухолевой природы (таблица 4).

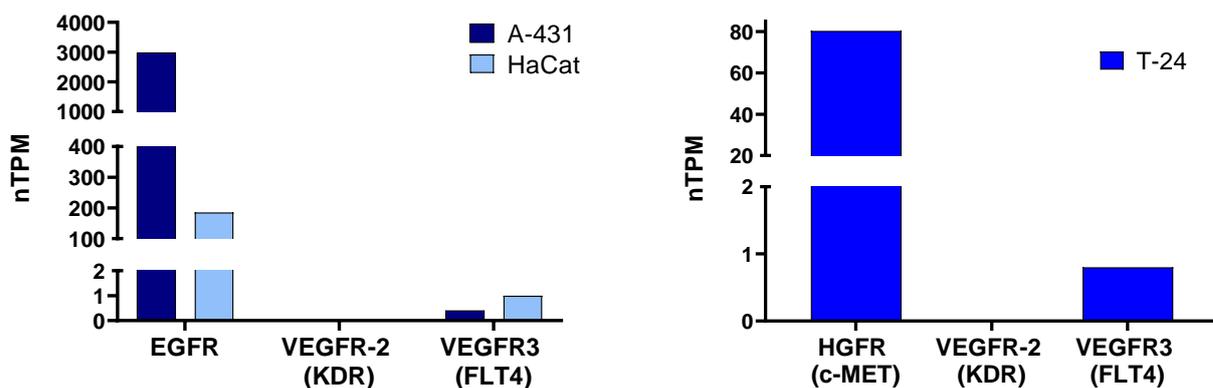
**Таблица 4.**

Клеточные культуры, используемые в работе

Соединение	Клеточная культура
<b>InChl-Vnd</b> <b>InChl</b> <b>Vnd</b>	A-431 – эпидермоидная карцинома кожи человека
	HaCat - неканцерогенные кератиноциты человека
<b>ZnChl-Cbz</b> <b>ZnChl</b> <b>Cbz</b>	T-24 – карцинома мочевого пузыря человека
	СНО – овариальные клетки китайского хомячка
	T-24-GFPcyto – трансфицированная линия T-24 со стабильной экспрессией флуоресцентного белка GFP <sup>31</sup> в цитоплазме клеток

Выбор клеточных культур обусловлен тем, что основной областью применения ФДТ являются поверхностные опухоли (рак кожи), а также опухоли полых органов (рак мочевого пузыря) [5, 6]. Помимо этого, подбор клеток осуществлялся на основании данных об экспрессии целевых рецепторов EGFR, VEGFR и HGFR, являющихся мишенями действия таргетных агентов, входящих в состав исследуемых конъюгатов (рис. 8). Данные об экспрессии были взяты из базы данных Human Protein Atlas [355], доступную по ссылке: <https://www.proteinatlas.org/>.

<sup>31</sup> зеленый флуоресцентный белок (от англ. Green fluorescent protein)



**Рис. 8.** Данные об экспрессии целевых рецепторов в клетках, используемых в работе для для оценки биологических свойств (А) **InChl-Vnd** и (Б) **ZnChl-Cbz**. Показано нормализованное значение количества транскриптов гена на миллион (nTPM)

Клеточные культуры А-431, HaCat, Т-24 и СНО были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Клеточная линия Т-24-GFPcyto была получена на кафедре биофизики ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Процедура получения линии подробно описана в статье [345].

Культивирование клеток проводилось в культуральных флаконах площадью 25см<sup>2</sup> (Corning, США) на среде ИГЛА MEM (ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (HiMedia, Индия) и 1 мМ L-глутамином (ПанЭко, Россия) при 37°C и атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Субкультивирование выполняли через 2-3 суток. На каждом этапе пассирования клетки обрабатывались 0,25% раствором трипсин:ЭДТА (ПанЭко, Россия), для отмывки использовали 10 мМ фосфатно-солевой буфер. Центрифугирование клеток проводилось на центрифуге 5410R (Elmi, Латвия) при 1000 об/мин, 5 минут. Оценку состояния культуры клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа AxioVert A1 (Carl Zeiss, Германия).

## 2.5 Исследование динамики накопления и локализации соединений в клетках

Для исследования динамики накопления конъюгатов и соединений контроля в клетках, а также установления места их внутриклеточно локализации применяли метод конфокальной флуоресцентной микроскопии. Перед исследованием

производили высадку клеток в количестве  $5 \times 10^3$  клеток на лунку и инкубировали при 37°C и атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи. Далее производили замену питательной среды на бессывороточную среду, содержащую 5 мкМ исследуемого соединения (200 мкл на лунку) и инкубировали 4, 6 и 24 часа в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. По завершении инкубации, производили замену среды, содержащей соединение на свежую бессывороточную среду. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия), оснащенного объективом C-Apochromat 63× с водной иммерсией, числовая апертура 1,2. Флуоресценцию исследуемых соединений возбуждали при 633 нм и регистрировали в диапазоне 650-735 нм.

Для анализа внутриклеточной локализации исследуемых соединений, производили дополнительное окрашивание клеток красителями, представленными в таблице 5, в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Флуоресценцию окрашенных органелл возбуждали при 488 нм и регистрировали в диапазоне 500-550 нм.

**Таблица 5.**

**Красители органелл, используемые в исследовании**

<b>Органелла</b>	<b>Название красителя</b>	<b>Концентрация</b>
Лизосомы	LysoTracker Green DND-26	0,5 мкМ
Митохондрии	MitoTracker Green FM	0,5 мкМ
ЭПР	ER-Tracker	0,5 мкМ
Аппарат Гольджи	BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA for the Golgi apparatus	5 мкМ
Плазматическая мембрана	CellMask Plasma Membrane Green Stain	0,1 мкМ

На основании полученных изображений проводилась полуколичественная оценка интенсивности флуоресценции клеток с использованием программы ZEN 2012 (Carl Zeiss, Германия). Анализировалось не менее 10 клеток в трех полях зрения. Статистическое сравнение средних значений осуществлялось в программе GraphPad Prism 6 по *t*-критерию Уэлча. Анализ внутриклеточного распределения исследуемых агентов проводили путем построения профилей интенсивности сигнала в двух каналах флуоресценции вдоль выделенного отрезка на изображении.

## 2.6 Исследование фотодинамической активности соединений

Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток оценивали с помощью микрокультурального тетразолинового теста (МТТ-тест) [356]. Клетки высаживали на 96-луночный планшет в количестве  $4 \times 10^3$  на лунку и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  и атмосфере 5%  $\text{CO}_2$  в течение ночи. Далее производили замену питательной среды на бессывороточную среду, содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях (200 мкл на лунку), и инкубировали 24 часа в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. По завершении инкубации производили замену среды с исследуемыми соединениями на соответствующую ростовую питательную среду. На всех этапах клетки были защищены от воздействия светом.

Для исследования фотодинамической активности исследуемых конъюгатов проводили облучение клеток с помощью светодиодного излучателя [352] в термостатируемых условиях ( $37^\circ\text{C}$ ) на TermoStat plus (Eppendorf, Германия). Доза облучения составляла  $20 \text{ Дж/см}^2$  в спектральном диапазоне 655-675 нм, интенсивность светового потока –  $32 \text{ мВт/см}^2$ , время облучения – 10 минут 25 секунд. Для оценки темновой цитотоксичности клетки находились в тех же условиях, но не подвергались облучению. Перед измерением жизнеспособности клетки помещались в  $\text{CO}_2$ -инкубатор на 24 часа.

Для оценки жизнеспособности клеточных культур производили замену ростовой питательной среды на бессывороточную среду, содержащую 0,5 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2-тетразолиума (МТТ-реагент) и инкубировали 4 часа в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. Добавление МТТ-реагента к живым клеткам приводит к образованию окрашенных кристаллов формазана за счет действия митохондриальных дегидрогеназ [356]. По завершении инкубации отбирали среду с МТТ-реагентом и добавляли по 0,2 мл ДМСО в лунку для растворения кристаллов формазана. Полученные растворы в лунках планшета характеризуются различной оптической плотностью и отражают количество живых клеток в образце. Измерение оптической плотности полученных растворов проводили на планшетном спектрофотометре Synergy MX на длине волны 570 нм. Относительную жизнеспособность клеток (CV) рассчитывали по формуле:

$$CV = \frac{D_o}{D_k} \times 100\%, \quad (6)$$

где  $D_o$  – оптическая плотность в лунке с обработанными клетками (за вычетом фонового значения поглощения ДМСО);  $D_k$  – оптическая плотность в лунках с необработанными клетками (за вычетом фонового значения поглощения ДМСО).

По полученным результатам в трех независимых экспериментах были построены кривые зависимости «доза-эффект» и рассчитаны значения полуингибирующей концентрации  $IC_{50}$  для каждого соединения (концентрация соединения, снижающая жизнеспособность клеток на 50%) с использованием четырехпараметрической аппроксимации в программе GraphPad Prizm 6.

## 2.7 Оценка сочетанного действия фотосенсибилизатора и ингибитора

Для выяснения типа лекарственного взаимодействия при комбинации действующих агентов существует множество методологических подходов. Одним из широко используемых методов является определение индекса комбинации (CI) [357]. Для расчета использовались полученные значения  $IC_{50}$  для конъюгата и отдельных терапевтических модулей. Расчет производился по формуле:

$$CI = \frac{IC_{50AB}}{IC_{50A}} + \frac{IC_{50AB}}{IC_{50B}}, \quad (7)$$

где  $IC_{50AB}$  – полумаксимальная ингибирующая концентрация для исследуемого конъюгата;  $IC_{50A}$  и  $IC_{50B}$  – полумаксимальная ингибирующая концентрация для отдельных его компонентов (производного хлорина *еб* и низкомолекулярного ингибитора, соответственно).

CI применяется для количественной оценки типа лекарственного взаимодействия: синергическое ( $CI < 1$ ), аддитивный эффект ( $CI = 1$ ) или антагонизм ( $CI > 1$ ).

## 2.8 Исследование внутриклеточной генерации активных форм кислорода

Для измерения генерации внутриклеточных АФК в живых клетках после фотодинамического воздействия была использована неспецифическая химическая

ловушка 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) [358]. Клетки А-431 высаживали на 96-луночный планшет в концентрации  $10^4$  на лунку и инкубировали в течение ночи. Далее производили замену полной ростовой среды на среду без сыворотки, содержащую исследуемые соединения в концентрациях равных  $IC_{50}$ . После 24 часовой инкубации с исследуемыми соединениями, производили замену среды на среду без сыворотки, содержащую 10 мкМ DCFH-DA, и дополнительно инкубировали в течение 30 минут ( $37^{\circ}C$ ). По завершении инкубации производили замену среды на фосфатно-солевой буфер и измеряли интенсивность флуоресценции клеток с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy MX. Флуоресценцию возбуждали на 488 нм, регистрировали при 525 нм в режиме чтения «Endpoint». После этого производили облучение клеток в дозе 5 Дж/см<sup>2</sup> с помощью светодиодного излучателя [352] (655–675 нм, 32 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 2 минуты 3 секунды), и производили регистрацию интенсивности флуоресценции с теми же настройками сразу и через 30 и 120 минут после облучения. Для точки «120 минут» дополнительно произвели регистрацию флуоресценции в режиме чтения «Area scan», при котором сигнал измерялся в 16 точках по всей площади лунки.

Для нормирования уровня флуоресценции на количество клеток производили дополнительную инкубацию всех образцов через 120 минут после облучения с ДНК-интеркалирующим флуоресцентным красителем Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия) (1 мкг/мл, 30 минут). После инкубации производили замену среды на фосфатно-солевой буфер и регистрировали уровень флуоресценции от ядер клеток с помощью спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy MX. Флуоресценцию возбуждали на 351 нм, регистрировали при 463 нм в режиме чтения «Endpoint».

## **2.9 Ингибиторный анализ генерации активных форм кислорода**

Для определения типа АФК, генерируемых при фотодинамическом воздействии исследуемыми соединениями в живых клетках, использовали специфические ловушки АФК. В качестве ингибитора синглетного кислорода применяли азид натрия ( $NaN_3$ ) [359], гидроксильного радикала - D-маннитол [360],

а супероксидного анион-радикала – тирон [361]. Для этого к клеткам совместно с исследуемыми соединениями добавляли 10 мкМ ингибиторов и производили совместную инкубацию в течение 24 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. По завершении инкубации производили окрашивание клеток 10 мкМ DCFH-DA и измеряли интенсивности флуоресценции клеток аналогично с исследованием внутриклеточной генерации АФК.

## **2.10 Оценка противоопухолевой эффективности *in vitro* на трехмерной модели опухолевого роста**

Линия карциномы мочевого пузыря человека T-24 не является туморогенной у иммунодефицитных мышей и не может быть использована в моделях ксенотрансплантатов [362]. В связи с этим, для анализа противоопухолевой эффективности конъюгата **ZnChl-Cbz** была использована трехмерная модель опухолевого роста *in vitro* на основе коллагена I типа, а в качестве клеточной компоненты использованы флуоресцентные клетки T-24-GFPcyto.

Создание трехмерной модели опухолевого роста проводили в прозрачном 6-луночном планшете (Corning, США), высотой 0,5 см. Для этого предварительно были подготовлены стерильные растворы: *раствор 1*, содержащий 10× DMEM (Biowest, Франция), 5 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), 1М HEPES (ПанЭко, Россия) и 50% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США); *раствор 2*, представляющий собой раствор коллагена типа I в стерильной 0,1% уксусной кислоте (концентрация 1,2 мг/мл); *раствор 3*, клетки T-24-GFPcyto в количестве 2×10<sup>5</sup> клеток на мл в полной ростовой среде.

Далее производили добавление в лунки планшета 450 мкл *раствора 1*, 1600 мкл *раствора 2*, 200 мкл *раствора 3* и 34 мкл 0,34 М гидроксид натрия (NaOH) и тщательно перемещивали. Полученные гели инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 15–20 мин до полного затвердевания. После этого добавляли 2 мл полной ростовой среды DMEM без фенольного красного (Gibco, США) и осторожно отделяли гидрогели от стенок лунок для равномерного распределения среды.

Полученные гидрогели инкубировали при температуре 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, замену среды на свежую проводили ежедневно.

На третьи сутки роста клеток в гелях производили добавление исследуемых соединений в культуральную среду в концентрациях равных IC<sub>50</sub>, 5×IC<sub>50</sub> и 10×IC<sub>50</sub>, полученных для монослойной культуры в ходе МТТ-теста. После 24-часовой инкубации с исследуемыми соединениями, заменяли среду на свежую, и проводили облучение в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> с помощью светодиодного излучателя [352] (655–675 нм, 32 мВт/см<sup>2</sup>, время облучения 10 минут 25 секунд). Рост культуры клеток и ее ответ на обработку анализировали ежедневно путем регистрации интегральной флуоресценции от гелей с клетками с помощью флуоресцентного макроимиджера DVS-03 (Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия). Флуоресцентные изображения гелей были получены с возбуждением при 490 нм и регистрацией испускания при 513–556 нм. Последующий количественный анализ интегрального флуоресцентного сигнала, который коррелирует с количеством клеток [363], проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.50i, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США). В качестве бланка измерялась автофлуоресценция самого геля (без инкапсуляции клеток), с последующим вычитанием из значений, полученных для гелей с клетками.

## 2.11 Животные и опухолевая модель

Исследования биологических свойств *in vivo*, а именно оценки биораспределения, противоопухолевой эффективности и оценки острой токсичности проводили с использованием лабораторных животных. Животных получали из SPF вивария Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (ННГУ). Все исследования были одобрены Комиссией по биоэтике ННГУ (таблица 6). Животных содержали в стандартных условиях вивария с обеспечением 12-ти часового светового дня, доступа к еде и воде *ad libitum*. Температура воздуха в помещении временного содержания составляла 20-23°C, относительная влажность 60-65% [364].

Таблица 6.

## Используемые в работе лабораторные животные

Проводимое исследование	Животные	Общая характеристика животных	№ протокола
Биораспределение конъюгата	иммунодефицитные мыши линии Balb/c nude	самки, возраст 1-2 месяца, количество животных 79	№ 85 29.07.2024
Противоопухолевая эффективность			
Острая токсичность	мыши линии Balb/c	самки и самцы, возраст 1-2 месяца, количество животных 38	№ 86 17.09.2024

Получение экспериментальных опухолей проводили на мышах Balb/c nude путем подкожного привития суспензии опухолевых клеток А-431 ( $3 \times 10^6$  клеток в 0,1 мл фосфатно-солевого буфера) в область правого бедра. Исследования начинали на 10 день после инокуляции клеток, размер опухолей составил  $\sim 0,1 \text{ см}^3$ .

## 2.12 Исследование биораспределения соединения

### 2.12.1 Спектрофлуометрический анализ содержания соединения в плазме крови

Для проведения исследований на животных-опухоленосителях исследуемые соединения вводили внутривенно в хвостовую вену в дозе 8 мкмоль/кг, эквивалентной дозе Фотодитазина® (Вета-Гранд ООО, Россия) 8 мг/кг. Данная доза для мышей соответствует минимально применяемой дозе препарата для человека при внутривенном введении (0.7 мг/кг массы тела) с учетом общепринятых коэффициентов пересчета [365].

Для фармакокинетического исследования кровь в объеме  $\sim 100$  мкл забиралась из ретроорбитального синуса до введения, через 15 и 30 минут, а также через 1 и 4 часа после инъекции в эппендорф с гепарином в объемном соотношении кровь:гепарин 5:3. С помощью центрифугирования получали плазму крови (12000 об/мин в течение 5 минут) и производили регистрацию спектров флуоресценции с помощью спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy MX. Флуоресценцию возбуждали при 410 нм, диапазон регистрации – 550-850 нм, шаг – 2 нм.

### **2.12.2 Оценка распределения соединения в тканях животных с помощью поверхностного флуоресцентного имиджинга**

Мониторинг распределения конъюгата в организме животных-опухоленосителей производили методом флуоресцентного имиджинга на установке DVS-03. Флуоресценцию возбуждали на длине волны 590 нм и регистрировали в диапазоне 600-700 нм. Изображения получали до введения конъюгата, а также через различные временные промежутки времени после введения в течение 96 часов. Полученные изображения анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ. Для каждого изображения определяли усредненный по площади опухоли сигнал флуоресценции для двух областей интереса (ROI): область опухоли на правом бедре и аналогичная по площади область нормальной ткани на левом бедре. Полученные данные использовали для анализа динамики накопления исследуемого соединения в опухоли.

### **2.12.3 Определение содержания индия в органах и опухоли животных методом масс-спектрометрии**

Через 4 и 24 часа после внутривенного введения конъюгата производили эвтаназию животных методом цервикальной дислокации, извлекали, взвешивали и замораживали основные органы (мозг, сердце, легкие, печень, селезенку, почки, желудок, кишечник, мышцы, кожу) и опухоли. Оценка содержания индия в образцах была проведена методом масс-спектрометрии в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Москва).

Масс-спектрометрия – это метод идентификации и количественного определения веществ в пробе, основанный на ионизации атомов и молекул вещества с последующим разделением и регистрацией образующихся ионов [366]. Измерения концентрации проводилось с использованием масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой PerkinElmer NexION 2000 (Массачусетс, США).

Фоновые значения индия в образцах контрольных животных вычитались из измеренных концентраций. Количественный анализ содержания индия в основных органах и опухолях трех экспериментальных животных проводился по расчетам концентрации металла в каждом образце, нормированной на содержание индия в мышце.

### 2.13 Исследование противоопухолевой эффективности соединений на животных-опухоленосителях

Для исследования терапевтической эффективности *in vivo* на животных-опухоленосителях было сформировано пять групп:

- ❖ группа «*Контроль*» – внутривенное введение растворителя (50% dH<sub>2</sub>O, 20% этанол, 30% ПЭГ) (n=5);
- ❖ группа «*InChl-Vnd*» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг без проведения ФДТ (n=4);
- ❖ группа «*InChl-Vnd + ФДТ*» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг с проведением ФДТ (n=5);
- ❖ группа «*InChl + ФДТ*» – внутривенное введение соединения сравнения в дозе 8 мкмоль/кг с проведением ФДТ (n=5);
- ❖ группа «*Вандетаниб*» – внутривенное введение вандетаниба в дозе 8 мкмоль/кг без проведения ФДТ (n=4).

Дозы исследуемых соединений эквимольны и соответствуют дозе Фотодитазина® (Вета-Гранд ООО, Россия) 8 мг/кг.

ФДТ проводили через 8 часов после инъекции с помощью светодиодного источника излучения с излучением в диапазоне длин волн 620-655 нм, интенсивность светового потока 100 мВт/см<sup>2</sup>, доза облучения 50 Дж/см<sup>2</sup>. Облучение проводили локально, в 2 сеанса по 4 мин 10 сек, перерыв между сессиями 4 мин 10 сек. Фракционирование облучения производили для исключения термического эффекта при проведении ФДТ. Контроль температуры поверхности облучаемой зоны осуществляли с помощью пирометра Aceline DIN35 (Aceline, Китай). Максимально зарегистрированная температура составляла 37,8°C.

Динамику объема ( $V$ ) опухолевых узлов после терапии оценивали с помощью измерений штангенциркулем и рассчитывали по формуле [367]:

$$V = \pi \frac{x \times y \times z}{6}, \quad (8)$$

где  $x, y, z$  – размеры опухолевого узла в трех измерениях.

Коэффициент торможения опухолевого роста (ТОР) рассчитывали по формуле [368]:

$$\text{ТОР} = \frac{V_K - V_{\text{эксп}}}{V_K} \times 100, \quad (9)$$

где  $V_K$  и  $V_{\text{эксп}}$  – усредненные значения объема опухолей в контрольной и экспериментальной группах соответственно.

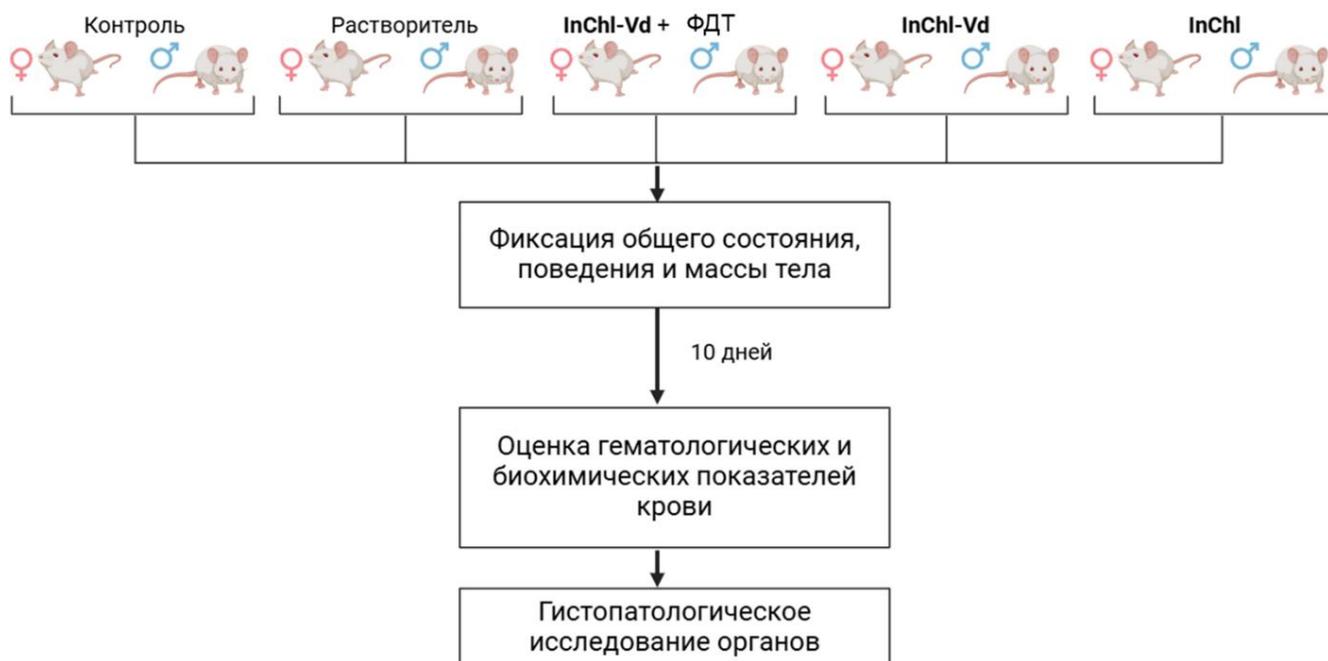
Коэффициент абсолютного прироста опухоли (АПО) рассчитывали по формуле [368]:

$$\text{АПО} = \frac{V_t - V_0}{V_0}, \quad (10)$$

где  $V_0$  – исходный объем опухоли до начала терапии,  $V_t$  – объем опухоли в любой из дней после терапии.

#### 2.14 Исследование острой токсичности *in vivo*

Оценка безопасности применения конъюгата **InChl-Vnd** и соединения сравнения **InChl** проводилась на мышах линии Balb/c обоих полов (всего 38 животных: ♀ – 19, ♂ – 19). Животные были разделены на 10 групп, согласно схеме исследования (Рис. 9): группа «Контроль» – внутривенное введение физиологического раствора ( $n_{\text{♀}}=3$ ;  $n_{\text{♂}}=3$ ); группа «Растворитель» – внутривенное введение растворителя (50% dH<sub>2</sub>O, 20% этанол, 30% ПЭГ) ( $n_{\text{♀}}=3$ ;  $n_{\text{♂}}=3$ ); группа «**InChl-Vnd** + ФДТ» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг с локальным облучением ( $n_{\text{♀}}=5$ ;  $n_{\text{♂}}=5$ ); группа «**InChl-Vnd**» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг без облучения ( $n_{\text{♀}}=5$ ;  $n_{\text{♂}}=5$ ); группа «**InChl**» – внутривенное введение соединения сравнения в дозе 8 мкмоль/кг без облучения ( $n_{\text{♀}}=3$ ;  $n_{\text{♂}}=3$ ).



**Рис. 9.** Схема проведения эксперимента по оценке острой токсичности *in vivo* InChI-Vnd

За сутки до начала эксперимента животные подвергались световой депривации и находились в этих условиях до окончания эксперимента. Оценка состояния животных проводилась перед началом эксперимента, сразу после внутривенного введения веществ и в течение последующих 10 дней (каждые 2-3 дня). Выбор критериев оценки основан на рекомендациях Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей. [369]. В ходе оценки состояния регистрировались показатели, описанные в таблице 7.

На 10 сутки эксперимента производили умерщвление животных путем декапитации с последующим забором крови для оценки гематологических и биохимических показателей, а также основных органов (печени, селезенки, кишечника, почек, легких, сердца) для последующего гистологического исследования.

## Критерии оценки состояния животных

	Состояние тела (масса, ожирение/истощение)
Внешний вид животных	Состояние шерсти и слизистых (ухоженность/отсутствие шерсти, пилоэрекция, язвы, цвет слизистых и кожи)
	Выделения (из глаз, носа, рта, уrogenитального тракта)
	Глаза (птоз, экзофтальм)
	Поведенческие признаки боли (судороги, тремор, саливация, самотравмирование)
Неспровоцированное поведение животных	Признаки аномального поведения (отступление вглубь клетки, чрезмерное сопротивление и вокализация)
	Поза и движения (активность/неподвижность, неестественная поза, нескоординированность движения, хромота)
Поведение животных в ответ на раздражители	Реакция на человека
	Реакция на резкий звук
	Болевой ответ
	Хватательная способность
Отдельные наблюдения	Спонтанная смерть

Образцы крови для анализа (в объем ~0,5-0,7 мл) собирали в пробирку с гепарином в объемном соотношении кровь:гепарин 5:3. Гематологические показатели определяли с помощью автоматического гематологического анализатора Abacus Junior 30 (Diatron, Венгрия). Для определения биохимических показателей производили предварительное получение сыворотки крови путем центрифугирования (600 g, 5 мин) крови. Анализ биохимических показателей, а именно аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинина и мочевины, проводили с помощью набора реагентов производства АО «ДИАКОН-ДС» (Пушино, Россия) с использованием автоматического анализатора cs-t240 (Dirui Industrial Co., Ltd., Китай).

### 2.15 Гистологический анализ

Подготовку образцов основных органов (печени, селезенки, кишечника, почек, легких, сердца) и опухолей (извлеченных на 3 сутки после начала терапии) для последующего гистологического исследования проводили в лаборатории

оптической тераностики Центра биофизики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Срезы окрашивали гематоксилин–эозином. Полученные препараты анализировали на микроскопе Zeiss Vert.A1 (Zeiss, Германия) с объективами Zeiss LD A-Plan  $\times 10$  и  $\times 20$  (Zeiss, Германия).

### **2.16 Статистическая обработка данных**

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2007, GraphPad Prism (v. 6.01, GraphPad Software, Inc, США) и ImageJ (National Institutes of Health, США). Используются методы параметрической и непараметрической статистики (t-критерий для сравнения двух групп, дисперсионный анализ, методы множественных сравнений).

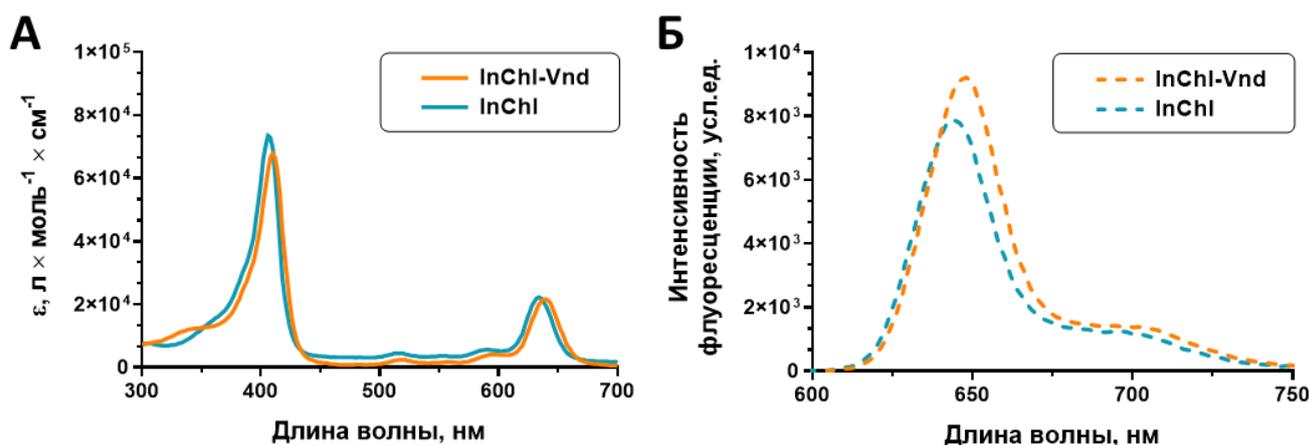
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Фотофизические и биологические свойства *in vitro* конъюгата металлокомплекса хлорина *eb* и вандетаниба

#### 3.1.1 Спектральные свойства конъюгата InChl-Vnd

Одним из основных требований, предъявляемых к агентам для ФДТ, является интенсивное поглощение в длинноволновой области спектра (650-800 нм). Это связано с тем, что в данном диапазоне собственное поглощение биологической ткани минимально, при этом энергии кванта света достаточно для последующей генерации синглетного кислорода [27].

Установлено, что конъюгат **InChl-Vnd** и соединение сравнения **InChl** имеют несколько полос поглощения в коротковолновой области (полоса Soret) и в длинноволновой области (Q-полоса) (рис. 10А). При этом более интенсивное поглощение наблюдается в коротковолновой области спектра, что является типичным для хлориновых соединений [370]. Наличие пика поглощения в длинноволновой области спектра может свидетельствовать о способности фотосенсибилизатора обеспечивать лечение глубоко локализованных опухолей [371].



**Рис. 10.** Спектры (А) поглощения и (Б) флуоресценции (возбуждение на длине волны 410 нм) конъюгата **InChl-Vnd** и соединения сравнения **InChl** в воде, концентрация соединений 5 мкМ

Флуоресценция соединений наблюдается в длинноволновой области спектра при 620-730 нм (Рис. 10Б). Квантовый выход флуоресценции ( $\Phi_f$ ) для обоих соединений не превышает 2% (таблица 8).

**Таблица 8.**

Фотофизические характеристики исследуемых соединений

Соединение	$\lambda_{abs}$ (нм) ( $\log \epsilon$ )	$\lambda_{em}$ (нм)	$\Phi_f$ (%)	$\Phi_{ROS}$ (%)
<b>InChl-Vnd</b>	410 (4,8)	648	1,3	51
	640 (4,3)			
<b>InChl</b>	406 (4,9)	644	0,9	53,8
	634 (4,3)			

Сравнительный анализ спектральных характеристик конъюгата **InChl-Vnd** и соединения-сравнения **InChl** показал, что присоединение к тетрапиррольной структуре дополнительного терапевтического фрагмента – **Vnd**, по-видимому, привело к изменению общего электронного строения молекулы. При этом отмечается батохромный сдвиг Q-полосы и увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с неконъюгированным **InChl**.

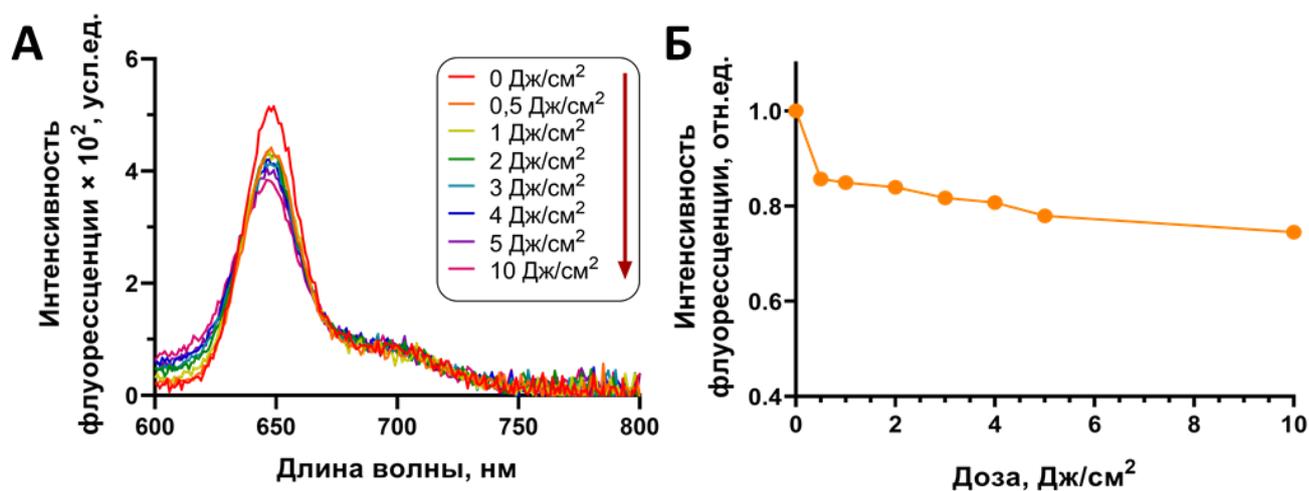
### 3.1.2 Фотохимические свойства конъюгата **InChl-Vnd**

Важнейшей характеристикой фотосенсибилизатора для ФДТ является способность эффективно генерировать АФК [5]. Установлено, что оба соединения способны производить АФК с квантовым выходом ( $\Phi_{ROS}$ ) 53,8% для **InChl** и 51% для **InChl-Vnd** (таблица 8). Данные значения приближены к значениям применяемого в настоящее время в клинической практике фотодитазина (квантовый выход 0,56) [353].

Необходимо отметить, что образующиеся в ходе фотодинамических реакций АФК способны привести к деструкции самих молекул фотосенсибилизатора в результате окисления образующихся в ходе фотодинамической реакции АФК. В результате фотосенсибилизатор теряет способность вступать в новые фотохимические реакции, что может препятствовать эффективности проводимой

терапии [372]. В связи с этим, еще одним желаемым свойством агентов для ФДТ является фотостабильность.

Показано, что исследуемый конъюгат **InChl-Vnd** характеризуется достаточно высокой фотостабильностью с квантовым выходом фотовыгорания ( $\Phi_{ph}$ )  $2,6 \times 10^{-9}$ . Потеря излучательной способности при облучении в дозе 10 Дж/см<sup>2</sup> составила менее 30% (рис. 11).



**Рис. 11.** Фотовыгорание **InChl-Vnd** в воде при облучении: (А) изменение спектра флуоресценции после облучения в различных дозах; (Б) дозозависимое снижение максимума флуоресценции при 648 нм. Спектры флуоресценции регистрировали при возбуждении на 410 нм

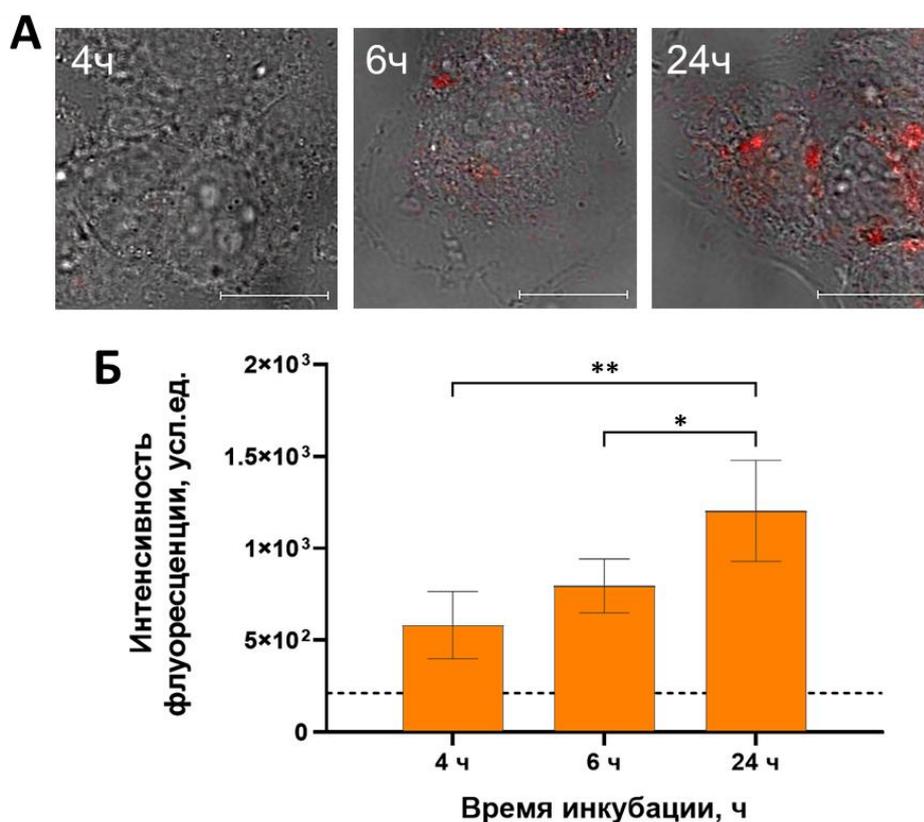
Таким образом, в ходе исследования, конъюгат **InChl-Vnd** продемонстрировал перспективные фотофизические свойства в качестве агента для ФДТ. Это позволило продолжить дальнейшее исследование его биологических свойств.

### 3.1.3 Внутриклеточное распределение конъюгата **InChl-Vnd**

Поскольку основной областью применения ФДТ являются поверхностные опухоли, в частности немеланомный рак кожи [6], эксперименты по оценке биологических свойств *in vitro* конъюгата **InChl-Vnd** проводились на клетках эпидермоидной карциномы человека А-431. Помимо этого, данная линия характеризуется высоким уровнем экспрессии рецептора EGFR, играющим ключевую роль в развитии и прогрессии плоскоклеточного рака кожи [373] и являющимся мишенью действия вандетаниба [339]. В недавно опубликованных

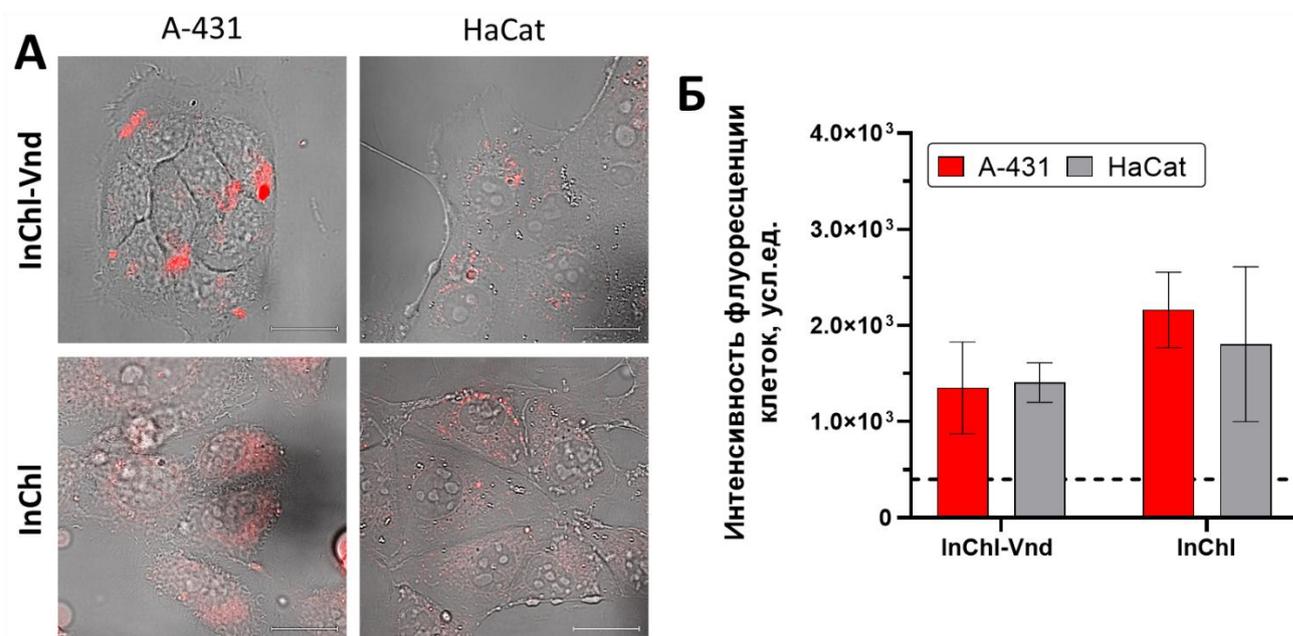
исследованиях было показано, что вандетаниб является потенциальным терапевтическим агентом для лечения плоскоклеточного рака головы и шеи [373], а также кожи [374].

Ключевыми факторами, определяющими успех проведения ФДТ, являются способностью фотосенсибилизатора накапливаться в опухолевых клетках, а также подбор оптимального времени для облучения [103]. С целью установления данных параметров было проведено исследование динамики накопления исследуемого конъюгата в опухолевых клетках А-431. Показано, что **InChl-Vnd** способен проникать через клеточную мембрану и накапливаться в живых клетках, культивируемых *in vitro*, в течение 24 часов наблюдения (рис. 12).



**Рис. 12.** Исследование динамики накопления конъюгата **InChl-Vnd** в опухолевых клетках А-431: (А) конфокальные изображения клеток через 4ч, 6ч и 24ч инкубации с исследуемым соединением в концентрации 5 мкМ, наложение светопольного и флуоресцентного каналов, масштабная линейка 20 мкм; (Б) сравнительный анализ интенсивности флуоресценции клеток, уровень автофлуоресценции обозначен пунктирной линией; показаны средние значения ± стандартное отклонение (n=10). \*, \*\* – статистически значимые отличия от группы 24 ч (\* –  $p < 0,001$ ; \*\* –  $p < 0,0001$ ; двухфакторный дисперсионный анализ с критерием Тьюки множественных сравнений)

Дополнительное исследование показало сопоставимые уровни накопления конъюгата **InChl-Vnd** и соединения сравнения **InChl** в клетках A-431 и неопухолевых кератиноцитах человека линии HaCat (рис. 13).

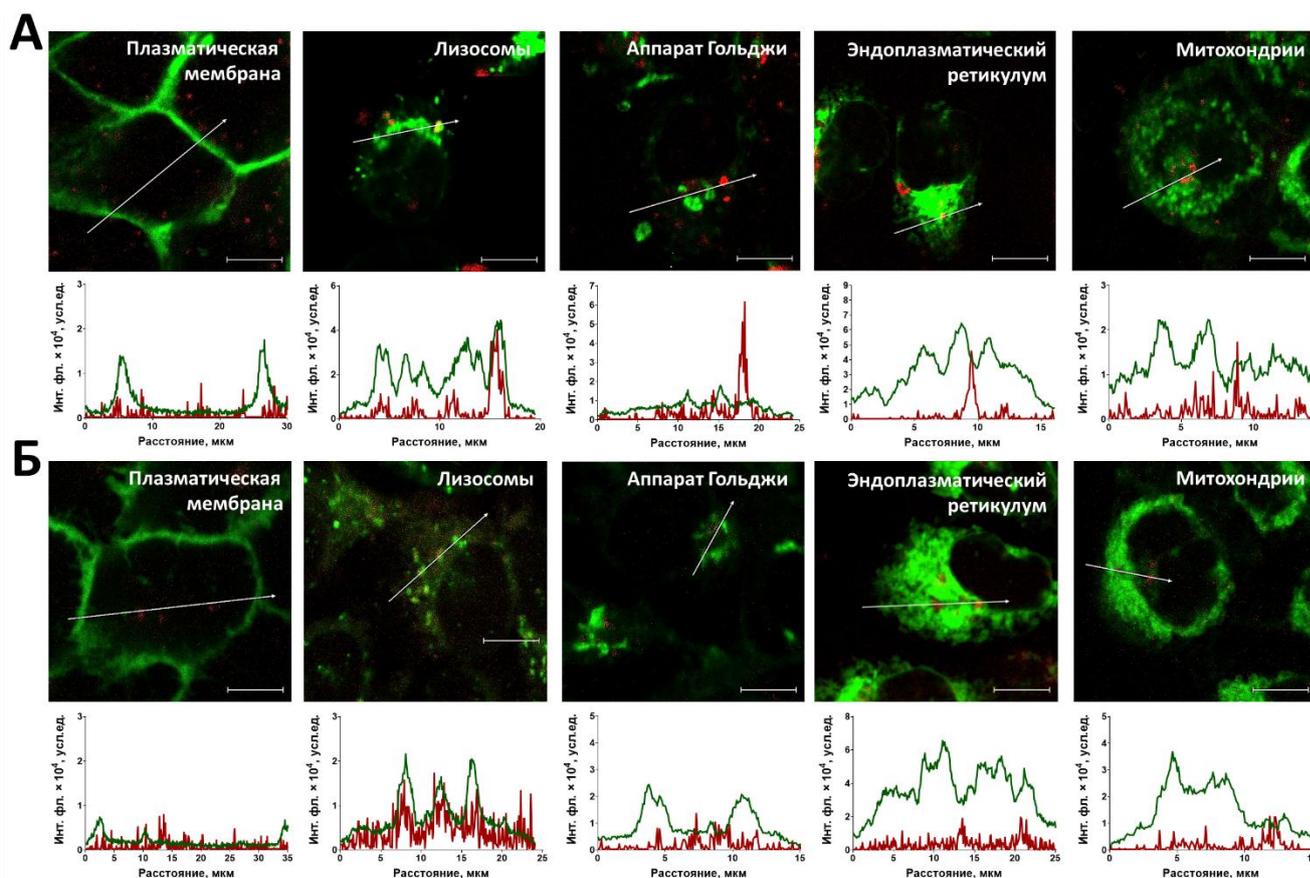


**Рис. 13.** Накопление конъюгата **InChl-Vnd** и соединения-сравнения **InChl** в клетках A-431 и HaCat: (А) конфокальные изображения клеток после 24 часовой инкубации с исследуемыми соединениями в концентрации 5 мкМ, наложение светопольного и флуоресцентного каналов, масштабная линейка 20 мкм; (Б) сравнительный анализ интенсивности флуоресценции клеток, уровень автофлуоресценции обозначен пунктирной линией; показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (n=10)

Локализация фотосенсибилизатора внутри клетки определяет мишени, которые в первую очередь будут подвергнуты фотодинамическому воздействию [84, 85, 86]. Место локализации исследуемых **InChl-Vnd** и **InChl** в клетках A-431 было установлено в результате анализа сококализации сигнала флуоресценции соединений с сигналом красителей, специфичных для клеточных органелл.

Показано, что **InChl-Vnd** в основном локализуется в лизосомах и других везикулах (рис.14). Данная локализация характерна для фотосенсибилизаторов, поступающих в клетку преимущественно посредством эндоцитоза [375]. Последующее фотоповреждение лизосом при использовании фотосенсибилизаторов с такой локализацией может приводить к

высвобождению лизосомальных гидролитических ферментов, вызывая клеточную гибель по пути апоптоза [376].



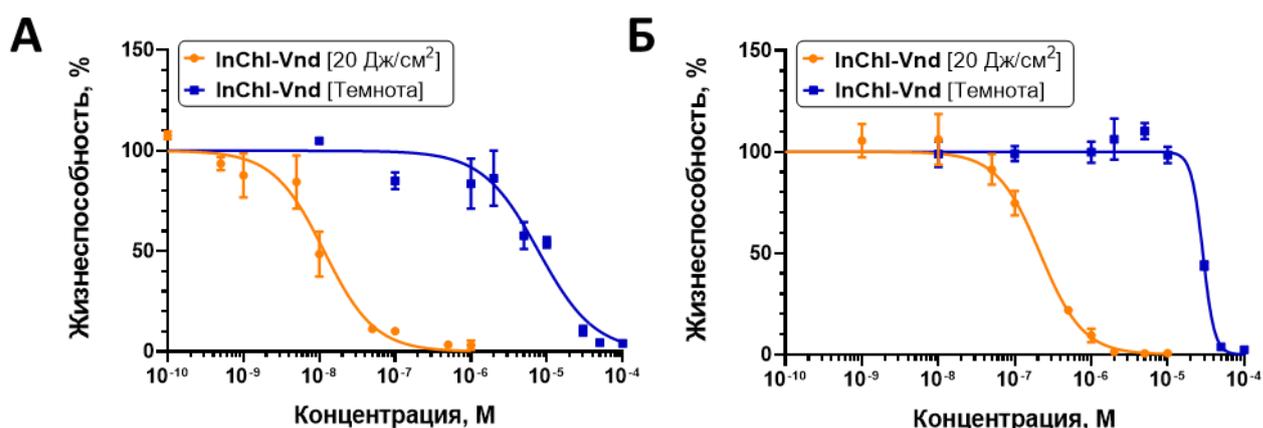
**Рис. 14.** Внутриклеточная локализация (А) конъюгата **InChl-Vnd** и (Б) соединения-сравнения **InChl** в клетках А-431. Для анализа локализации окрашены плазматическая мембрана клеток (CellMask), лизосомы (LysoTracker), аппарат Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA), митохондрии (MitoTracker), ЭПР (ER-Tracker). Зеленый канал – флуоресценция красителей, красный канал – флуоресценция исследуемых соединений. Масштабная линейка 10 мкм. Профили флуоресцентного сигнала показаны вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях клеток

### 3.1.4 Исследование цитотоксичности конъюгата

Важнейшими свойствами агента для ФДТ являются фотодинамическая активность ( $IC_{50}$  при облучении) и фотодинамический индекс, определяемый как отношение  $IC_{50}$  в темноте к  $IC_{50}$  при облучении [377]. Данный индекс напрямую зависит от способности фотосенсибилизатора вызывать фотоиндуцированную клеточную гибель.

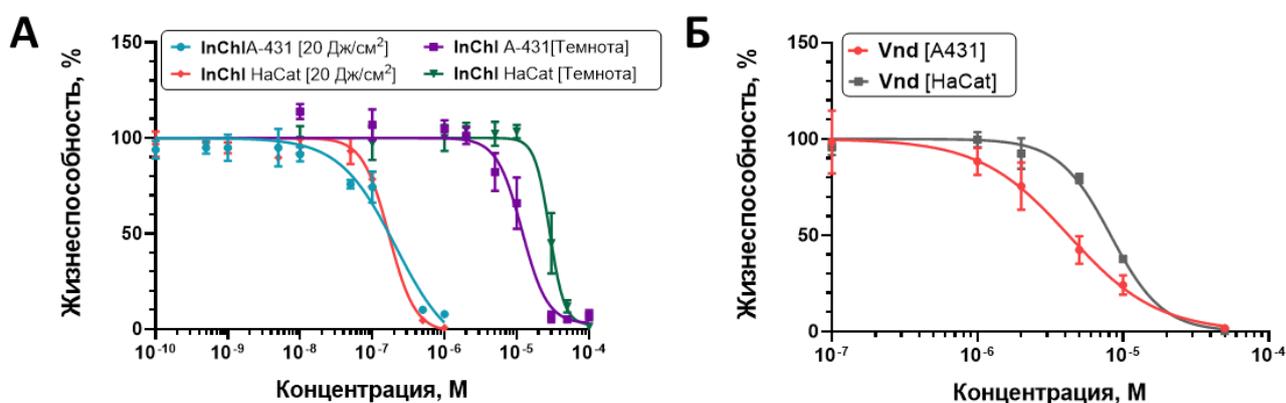
Данные об экспрессии целевых рецепторов, являющихся мишенью действия вандетаниба, были получены из открытой базы данных Human Protein Atlas. В результате сопоставления количественных данных транскриптомного профилирования (RNA-seq) клеточных линий A-431 и HaCat были выявлены высокие показатели уровня транскриптов гена, кодирующего EGFR, в опухолевых клетках, в то время как для неопухолевых клеток данный показатель был значительно ниже. Уровень экспрессии генов, кодирующих VEGFR-2 и -3, в обеих клеточных культурах оказался крайне низким.

С учетом результатов оценки скорости поступления исследуемых соединений в клетки (п. 3.1.3), время инкубации с ними было выбрано 24 часа. Облучение клеток проводили в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. Установлено, что **InChI-Vnd** способен вызывать фотоиндуцированную гибель клеток (рис. 15). Фотодинамический индекс, для клеток A-431 составил более 1000, что свидетельствует о значительном возрастании цитотоксичности в отношении EGFR-положительных опухолевых клеток при облучении. В отношении неопухолевых клеток HaCat с низким уровнем экспрессии целевых мишеней вандетаниба конъюгат **InChI-Vnd** продемонстрировал более низкие показатели токсичности как на свету, так и в темноте. Значения ингибирующих концентраций IC<sub>50</sub> представлены в таблице 9.



**Рис. 15.** Репрезентативные графики зависимости жизнеспособности культур клеток A-431(А) и HaCat (Б) от концентрации **InChI-Vnd** при облучении в дозе в 20 Дж/см<sup>2</sup> и в темноте; показаны средние значения ± стандартное отклонение (n=3)

Для выяснения, является ли наблюдаемый эффект результатом сочетания фотодинамического и таргетного воздействия, было проведено исследование соединений сравнения **InChI** и **Vnd** при их монотерапевтическом применении в отношении тех же линий (рис. 16).



**Рис. 16.** Рис. 6. Зависимость жизнеспособности культур клеток А-431 и HaCat от концентрации **InChI** при облучении в дозе в 20 Дж/см<sup>2</sup> и в темноте (А) и **Vnd** (Б); показаны средние значения ± стандартное отклонение (n=3)

Показано, что клетки А-431 и HaCat обладают равной чувствительностью к фотодинамическому воздействию неконъюгированного производного хлорина *еб* **InChI** при облучении в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> (рис. 16А). При этом значения IC<sub>50</sub> оказались выше по сравнению с таковыми для конъюгированного хлорина **InChI-Vnd** (таблица 9). Оценка цитотоксичности **Vnd** показала, что EGFR-положительные клетки А-431 примерно в два раза более чувствительны к действию низкомолекулярного ингибитора (рис.16Б).

Таким образом, полученные данные указывают на реализацию комбинированного взаимодействия производного хлорина *еб* и вандетаниба в составе конъюгата **InChI-Vnd**. Для определения типа взаимодействия терапевтических агентов был рассчитан индекс комбинации, который составил 0,5, что свидетельствует о реализации сильного синергического взаимодействия производного хлорина *еб* и вандетаниба.

Таблица 9.

Значения  $IC_{50}$  для исследуемых соединений<sup>32</sup>, мкМ

Соединение	A-431		HaCat	
	20 Дж/см <sup>2</sup>	Темнота	20 Дж/см <sup>2</sup>	Темнота
<b>InChI-Vnd</b>	0,0097** [0,007- 0,012]	10,76* [5,1-22,7]	0,2 [0,17-0,26]	28,8 [26,9-30,88]
<b>InChI</b>	0,21 [0,09-0,48]	11,81** [9,4-14,7]	0,2 [0,13-0,23]	28,47 [25,9-31,2]
<b>Vnd</b>		4,3** [2,9-6,2]		8,3 [7,2-9,6]

<sup>32</sup> значение  $IC_{50}$  рассчитано с применением модели логнормального распределения с четырехпараметрической аппроксимацией, показаны средние значения и границы 95% доверительного интервала (n=9) \*, \*\* – статистически значимое отличие от клеток HaCat (\* – p<0,01; \*\* – p<0,0001; t-тест)

Наиболее обширные сведения по определению типа лекарственного взаимодействия представлены для комбинации фотосенсибилизаторов с различными химиотерапевтическими препаратами. В зависимости от типа и концентрации препаратов диапазон значений индекса комбинации может варьироваться от 0,2 до 1,3, что соответствует синергическим, аддитивным и даже антагонистическим эффектам [378, 379]. При этом, одним из предполагаемых механизмов синергического эффекта является повреждение плазматической мембраны опухолевых клеток и повреждение сосудистой сети с участием АФК, генерация которых обусловлена действием препаратов [380].

Немногочисленные литературные данные о взаимодействии фотосенсибилизаторов и агентов для таргетной терапии также свидетельствуют о возможности синергического эффекта при их сочетанном применении. Так, в одном из наших исследований показано, что предварительная обработка опухолевых клеток молочной железы человека SK-BR-3 таргетным токсином DARPIn-LoPE приводит к значительному усилению противоопухолевой эффективности последующей ФДТ за счет реализации синергического взаимодействия препаратов, индекс комбинации составил 0,07 [381]. Кроме этого, в ряде работ показано, что при комбинации ФДТ и мультикиназного ингибитора I типа сорафениба, значения расчетного индекса могут варьироваться от 0,2 до 0,8 [382]. При этом было

отмечено, что синергический характер взаимодействия ФДТ и низкомолекулярного ингибитора обусловлен активацией иммунного ответа [383]. Также в некоторых исследованиях была показана способность сорафениба оказывать синергический эффект за счет индукции ферроптоза [384, 385]. Проведение комбинированной ФДТ с применением АЛК и гевитиниба показало дозозависимое усиление эффективности комбинации при варьировании концентрации ингибитора. Большинство значений индекса комбинации были меньше 1, что свидетельствует о синергическом взаимодействии препаратов [386].

Одной из основных идей объединения двух препаратов в одну молекулу является повышение биодоступности применяемых агентов на клеточном уровне. Вследствие этого закономерным является ожидать повышение эффективности мультимодального конъюгата по сравнению с комбинацией индивидуальных агентов. Однако, на сегодняшний день не было проведено сравнительных исследований эффективности применения фотосенсибилизатора и ингибиторов как в составе конъюгата, так и при их сочетании. Существует единичное сообщение об определении типа взаимодействия фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора в составе конъюгата. Так, конъюгат фталоцианина цинка и левантиниба продемонстрировал синергическое взаимодействие препаратов со значением индекса комбинации 0,8. Также важно отметить, что в случае применения данного конъюгата в отношении клеточной культуры с устойчивым к лекарственным препаратам фенотипом было продемонстрировано сильное синергическое повышение эффективности, индекс комбинации составил 0,4 [387].

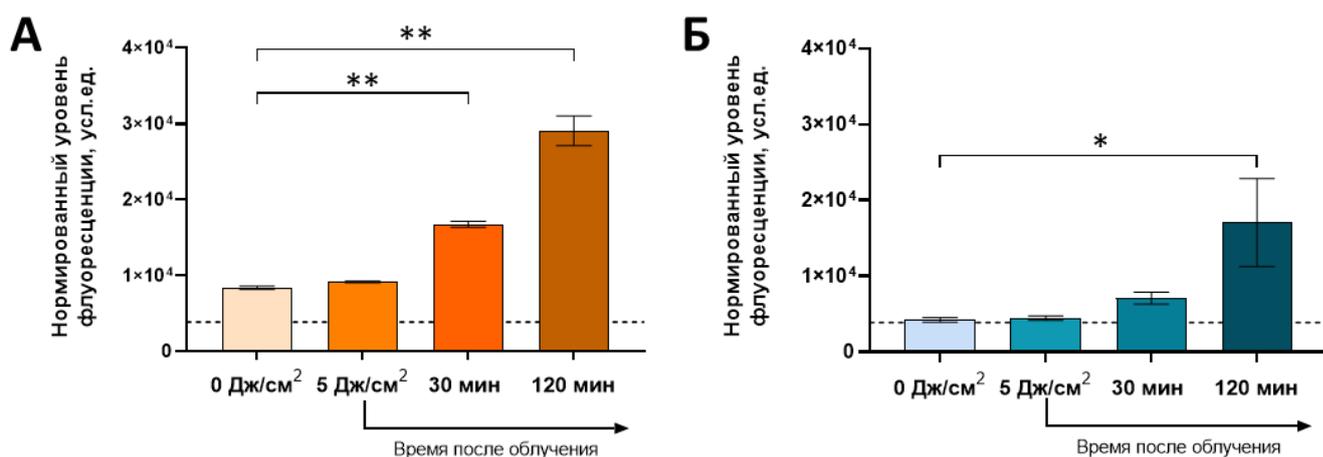
Таким образом, полученный нами результат согласуется с опубликованными на сегодняшний день данными об эффективности комбинации ФДТ с другими терапевтическими агентами, в том числе и низкомолекулярными ингибиторами.

### **3.1.5 Изучение механизма фотодинамического действия конъюгата**

Для исследования механизма фотоиндуцированной гибели, опосредованной исследуемыми соединениями, был проведен мониторинг внутриклеточной генерации АФК в клетках А-431 с помощью флуоресцентного зонда DCFH-DA.

Клетки инкубировали 24 часа с конъюгатом **InChl-Vnd** или соединением сравнения **InChl** в концентрациях, равных  $IC_{50}$ . По завершении инкубации в среду вносили зонд и облучали клетки в дозе  $5 \text{ Дж/см}^2$ . Нефлуоресцентный DCFH-DA свободно проникает в клетки, где под действием эстераз гидролизуется до 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH). Впоследствии DCFH может окисляться внутриклеточными АФК до флуоресцентного 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF) [388].

Показано, что и конъюгат **InChl-Vnd**, и соединение сравнения **InChl** приводят к генерации внутриклеточных АФК, однако её эффективность различна. Так, **InChl-Vnd** вызывает значимое накопление DCF через 30 минут после облучения, в то время как в случае обработки **InChl** сопоставимые количества окисленного зонда накопились в клетках только через 120 минут (рис. 17).

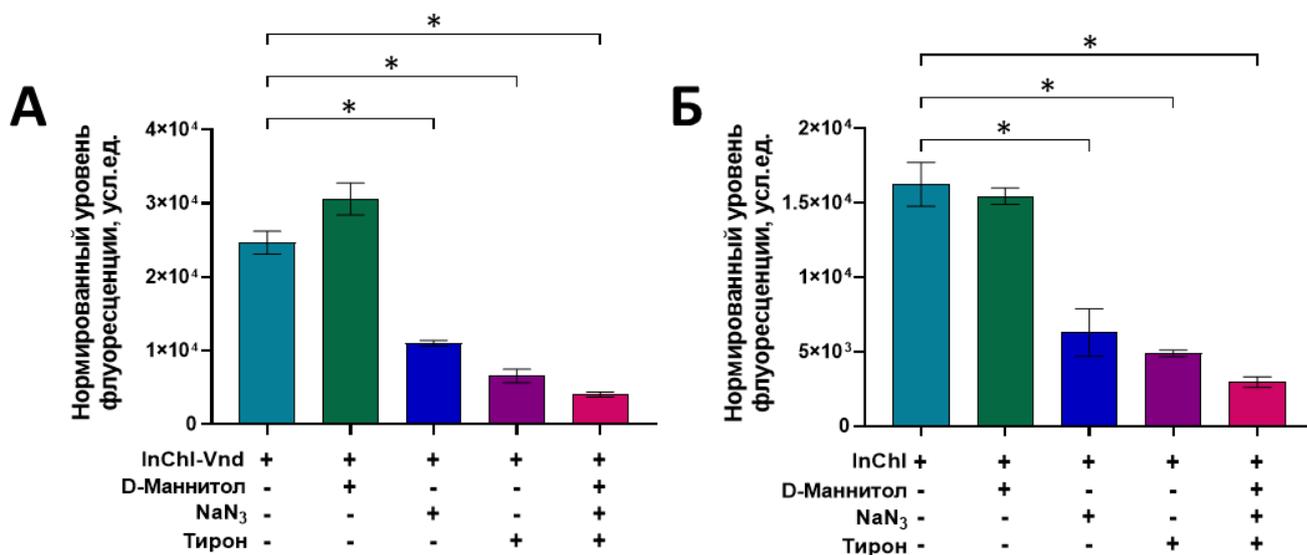


**Рис. 17.** Динамика генерации внутриклеточных АФК в клетках А-431 после фотодинамического воздействия, опосредованного (А) **InChl-Vnd** и (Б) **InChl**. Уровень флуоресценции контрольных клеток (без добавления соединений) показан пунктирной линией; показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $n=3$ ). \*, \*\* – статистически значимое отличие от клеток до облучения (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,0001$ ; однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета)

Для определения типа АФК, участвующих в окислительном стрессе, были использованы селективные ингибиторы. В качестве ингибитора синглетного кислорода применяли азид натрия ( $NaN_3$ ) [359], гидроксильного радикала - D-маннитол [360], а супероксидного анион-радикала – тирон [361]. С помощью ингибиторного анализа было установлено, что основными генерируемыми типами

АФК являются синглетный кислород и супероксидный анион-радикал (рис.18). Генерация данных типов АФК также наблюдается и при фотодинамическом воздействии клинически применяемого фотодитазина [344].

Поскольку ингибиторы присутствовали в среде в течение всего эксперимента, а измерения проводили через относительно длительный промежуток времени после облучения, то был зарегистрирован вклад как первично образуемых АФК, генерируемых в ходе фотохимических реакций, так и вклад вторично продуцируемых АФК. В частности, известно, что фотосенсибилизаторы хлоринового ряда способны вызывать вторичную продукцию АФК [389] вследствие повреждения митохондриальных электрон-транспортных цепей и истощения системы антиоксидантной защиты [390, 391].



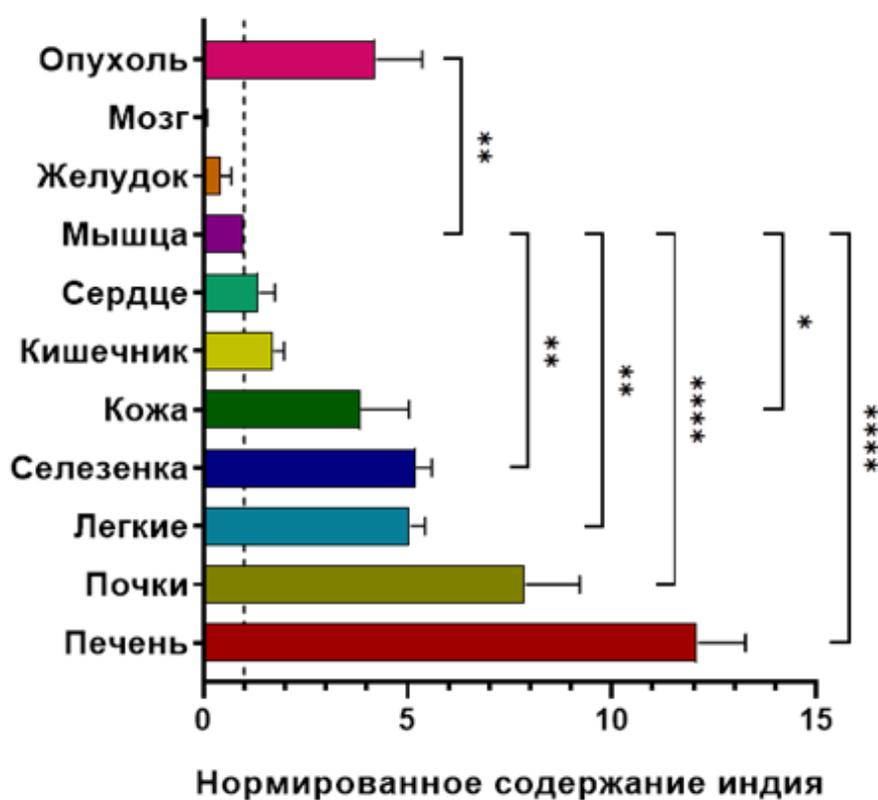
**Рис. 18.** Ингибиторный анализ генерации внутриклеточных АФК в клетках А-431 через 120 минут после фотодинамического воздействия, опосредованного (А) **InChI-Vnd** и (Б) **InChI** в концентрациях равных  $IC_{50}$ ; показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $n=3$ ). \* - статистически значимое отличие от клеток без ингибиторов (\* –  $p < 0,0001$ ; однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета)

В ходе исследования биологических свойств *in vitro* конъюгат **InChI-Vnd** продемонстрировал высокую селективную активность в отношении EGFR-положительных опухолевых клеток. Полученные результаты стали основанием для его дальнейшего исследования в экспериментах *in vivo*.

## 3.2 Противоопухолевая эффективность конъюгата цинкового комплекса хлорина *eb* и вандетаниба в отношении EGFR-положительных опухолей *in vivo*

### 3.2.1 Количественная оценка содержания индия в органах и опухоли

Наличие центрального атома металла в тетрапиррольной структуре **InChl-Vnd** позволило провести количественную оценку содержания индия (In) в органах и опухоли, которое рассматривалось как показатель накопления исследуемого соединения. Анализ был выполнен на мышах линии Balb/c-nude с подкожно привитой опухолью A-431 через 4 часа после однократного внутривенного введения конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг (рис. 19).



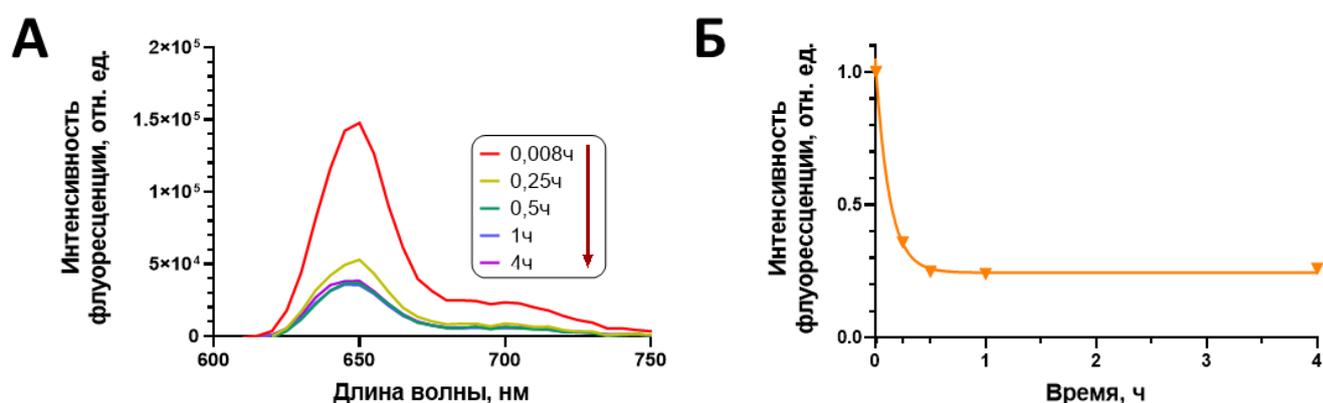
**Рис. 19.** Масс-спектрометрический анализ содержания In в органах и опухолях животных через 4 часа после внутривенного введения **InChl-Vnd** в дозе 8 мкмоль/кг. Значения нормированы на концентрацию In в мышце (показана пунктирной линией); показаны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение (n=3). \*, \*\*, \*\*\*\* - статистически значимые отличия от содержания индия в мышцах (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ ; двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным сравнением, тест Даннета)

Было обнаружено выраженное накопление In в опухоли, контраст между опухолью и мышцей составил около 3,5. Стоит отметить, что другие исследователи

также сообщали о селективном накоплении в опухоли фотосенсибилизаторов на основе хлорина еб [392, 393, 394]. Кроме этого, наблюдалось накопление In в печени и почках, ответственных за выведение, а также в легких и селезенке, что согласно данным литературы, может быть следствием применения ПЭГ в качестве растворителя [395].

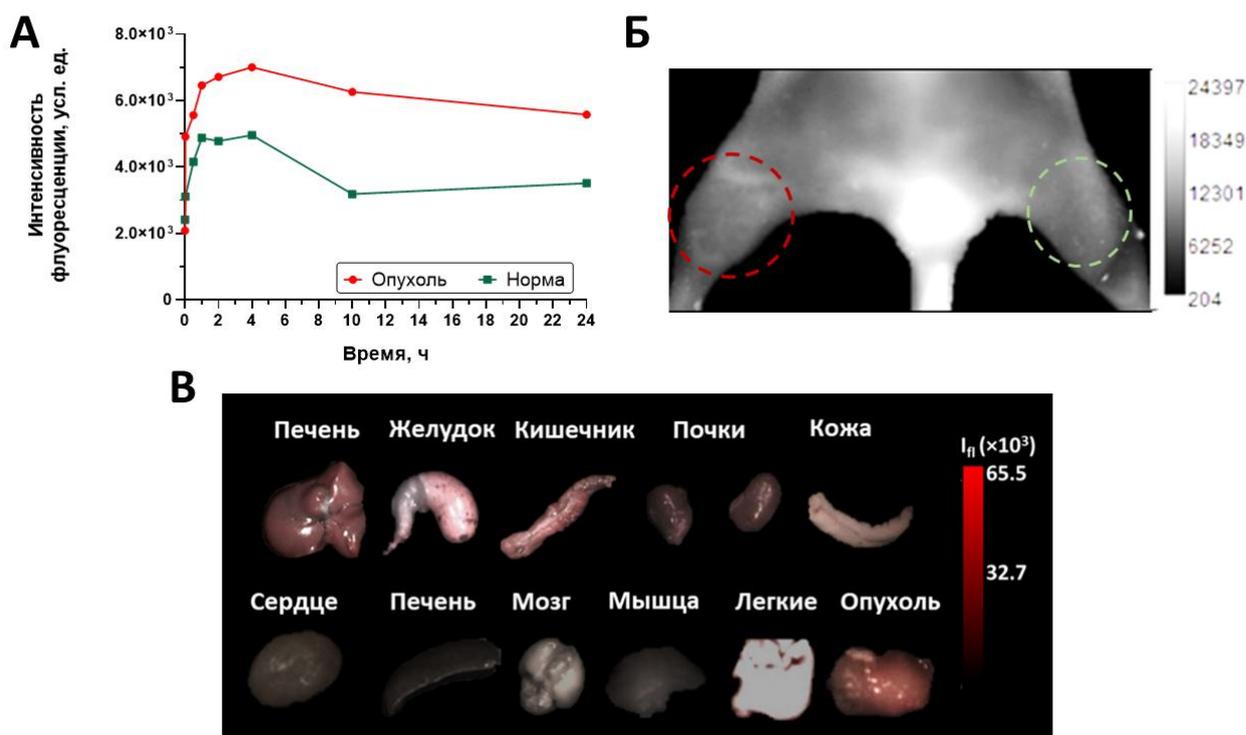
### 3.2.2 Фармакокинетическое исследование *in vivo*

Способность **InChl-Vnd** флуоресцировать позволила провести предварительную оценку биораспределения конъюгата в животных-опухоленосителях с использованием спектрометрических методов. Фармакокинетический профиль был изучен методом спектрофлуориметрического анализа плазмы крови после однократного внутривенного введения конъюгата **InChl-Vnd** в дозе 8 мкмоль/кг. Максимальный уровень флуоресценции зафиксирован сразу после инъекции с регистрацией пика флуоресценции на длине волны 648 нм, что соответствует максимуму флуоресценции **InChl-Vnd** в воде. В дальнейшем наблюдалось экспоненциальное снижение уровня флуоресценции плазмы крови в зависимости от времени после введения. Через 15 минут уровень флуоресценции снизился примерно в 3 раза, что свидетельствует о быстром перераспределении конъюгата в ткани (рис. 20).



**Рис. 20.** Репрезентативный фармакокинетический профиль **InChl-Vnd**: (А) спектры флуоресценции плазмы крови и (Б) экспоненциальная зависимость интенсивности флуоресценции плазмы крови от времени после однократного внутривенного конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг

Для подтверждения данных о биораспределении исследуемого соединения, полученных при анализе количественного содержания In в тканях, была проведена дополнительная оценка накопления конъюгата путем регистрации уровня его флуоресценции. Мониторинг распределения **InChl-Vnd** в организме животных-опухоленосителей *in vivo* проводили методом флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма. Отмечено превышение уровня флуоресцентного сигнала в опухоли по сравнению с окружающими тканями через 1 час после внутривенной инъекции. Через 4 часа контраст флуоресцентного сигнала опухоль/мышца достигал 1,4. Выведение соединения из всех тканей было довольно медленным: через 24 часа после инъекции наблюдалось сохранение уровня флуоресценции выше исходного, при этом сигнал флуоресценции в опухоли существенно превышал таковой в нормальных тканях (рис. 21).



**Рис. 21.** Репрезентативный профиль биораспределения **InChl-Vnd** в опухолевой и нормальной ткани животных-опухоленосителях после однократной внутривенной инъекции конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг: (А) кинетика флуоресцентного сигнала в опухолевой и нормальной ткани; (Б) флуоресцентное изображение животного через 4 часа после инъекции часа ( $\lambda_{ex} = 590$  нм,  $\lambda_{em} = 600-700$  нм, опухоль обозначена красным пунктиром, норма – зеленым); (В) репрезентативные изображения основных органов и опухоли *ex vivo*, наложение светопольного и флуоресцентного изображения

Необходимо отметить, что при измерении флуоресценции с поверхности тела, кожа экранирует сигнал от более глубоко расположенных структур, что приводит к заниженным значениям контраста между разными тканями. Это обуславливает различия со значениями контраста, измеренными методом масс-спектрометрического анализа.

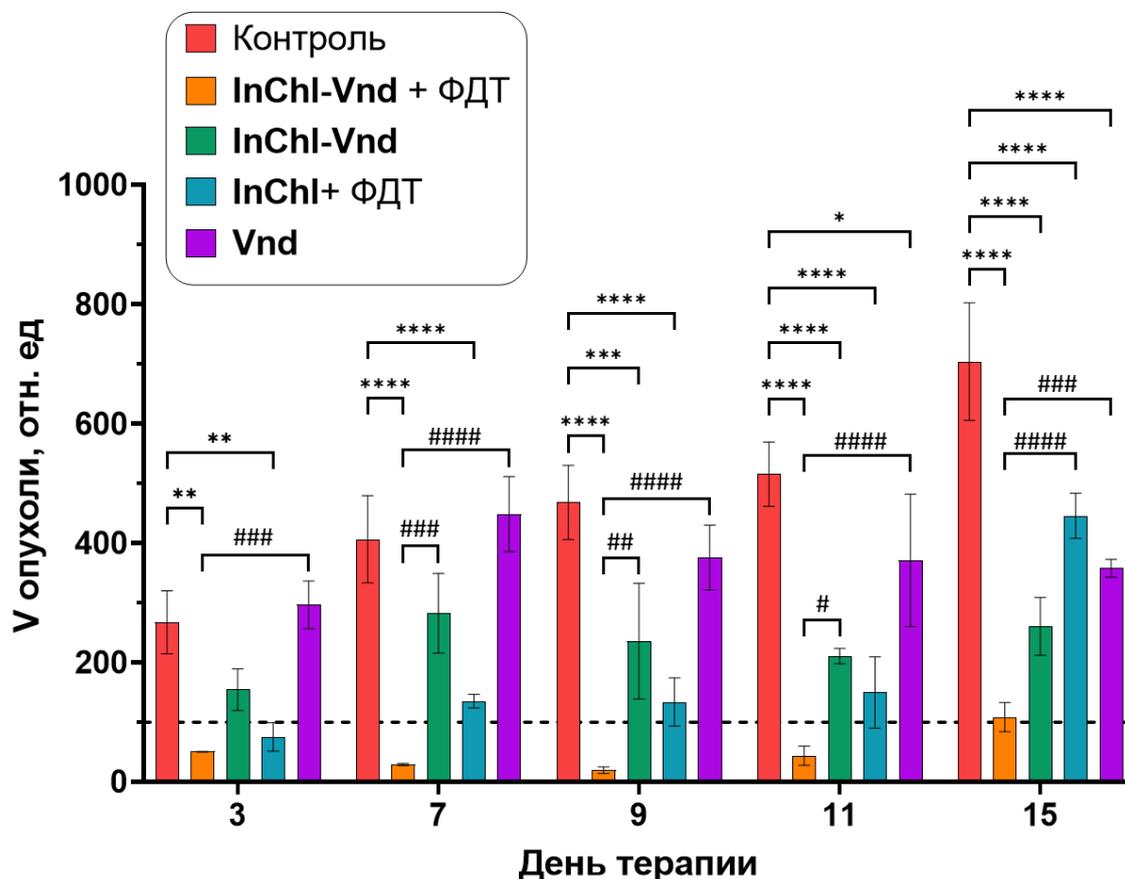
Анализ флуоресцентных изображений органов и опухоли *ex vivo*, извлеченных через 4 часа после внутривенного введения конъюгата, также показали высокий уровень флуоресцентного сигнала от печени, кишечника, легких и опухоли (Рис. 21Б), что характерно для соединений хлоринового ряда [396]. В целом, данные флуоресцентного метода подтвердили результаты, полученные при исследовании биораспределения **InChl-Vnd** с помощью элементного анализа.

### 3.2.3 Терапевтическая эффективность конъюгата *in vivo*

Оценку терапевтической эффективности конъюгата **InChl-Vnd** проводили на иммунодефицитных мышах Balb/c-nude с подкожно привитой ксенографтной опухолью А-431. Мониторинг размеров опухолевых узлов в контрольной и экспериментальных группах животных показал, что различные варианты лечения вызывают торможение роста опухолей, однако степень выраженности терапевтического эффекта различна.

После введения конъюгата **InChl-Vnd** без проведения ФДТ наблюдалось умеренное торможение роста опухолевого узла, значение коэффициента TOP на 9 сутки составило около 40%. Основываясь на результатах исследования биораспределения конъюгата **InChl-Vnd** (п. 3.2.1 и 3.2.2), для проведения ФДТ был выбран 8-ми часовой лекарственно-временной интервал с целью оптимизации баланса между эффективностью лечения и минимизацией побочных эффектов. При проведении ФДТ через 8 часов после инъекции в дозе 50 Дж/см<sup>2</sup> с данным соединением терапевтический эффект был наиболее выражен.

Наблюдалось уменьшение объема опухоли в сравнении с исходными, на 9 сутки коэффициент TOP составил более 90% (рис. 22). Однако необходимо отметить, что впоследствии рост опухоли возобновился, что связано с особенностями используемой опухолевой модели.



**Рис. 22.** Динамика размеров опухолевых узлов в контрольной и экспериментальных группах. За 100% принят размер опухолей в 1-й день терапии. Показаны статистически значимые отличия от контрольной группы: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,005$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ , и статистически значимые отличия от группы «InChI-Vnd + ФДТ»: # –  $p < 0,05$ ; ## –  $p < 0,005$ ; ### –  $p < 0,001$ ; #### –  $p < 0,0001$  (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки)

Модель ксенотрансплантата эктопической опухоли, получаемая в результате подкожного привития человеческих опухолевых клеток иммунодефицитным мышам, является стандартной моделью рака, используемой в скрининге и оценке новых противоопухолевых препаратов [397, 398]. Данная опухолевая модель имеет ряд преимуществ, включая воспроизводимость, простоту получения, имитацию исходных характеристик опухоли [399]. С другой стороны, вследствие того, что для

ее создания используются иммуносупрессированные мыши, в частности мыши линии Balb/c nude с отсутствием функционально активных Т-клеток [400], активация иммунной системы в ответ на проведение ФДТ и поддержание долгосрочной эффективности после лечения в данной опухолевой модели может быть ограничено [401, 402]. Следовательно, наблюдаемый повторный рост может быть связан именно с обобщенностями модели.

Для подтверждения, что наблюдаемый эффект является результатом сочетанного действия производного хлорина *еб* и вандетаниба в составе конъюгата **InChl-Vnd**, была проведена оценка противоопухолевой активности соединений сравнения **InCh** и **Vnd** при их монотерапевтическом применении. Установлено, что оба соединения вызывают торможение роста опухоли, однако наблюдаемый эффект ниже по сравнению группой «**InChl-Vnd** + ФДТ» (Рис. 22).

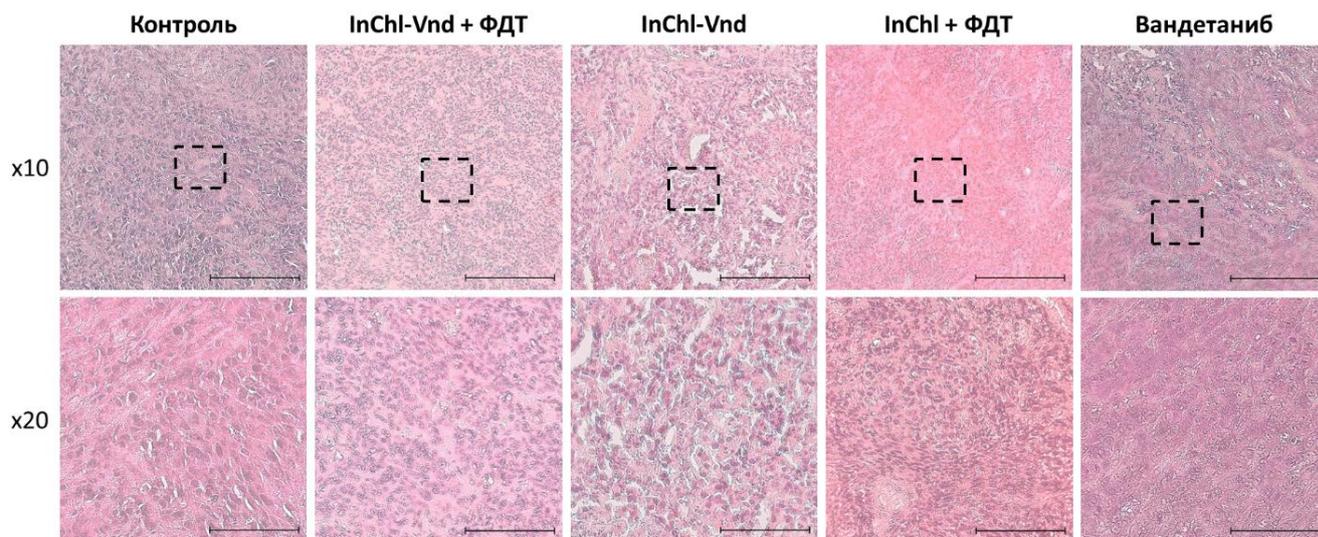
Проведение ФДТ с применением **InChl** также вызывает торможение роста опухоли, однако наблюдаемый эффект значительно ниже по сравнению с конъюгатом **InChl-Vnd**. Так, на 9 сутки после проведения терапии, значение коэффициента TOP составило около 60%. Применение **Vnd** в качестве монотерапевтического лечения оказало незначительное влияние на рост опухоли, значение коэффициента TOP на 9 сутки не превышало 15%.

Коэффициент абсолютного прироста опухоли у животных во всех экспериментальных группах был ниже по сравнению с контрольной группой. Максимальный ингибирующий эффект наблюдался при применении конъюгата **InChl-Vnd** в условиях проведения ФДТ. Значение коэффициента на 9 сутки составило -0,8, что свидетельствует о регрессе опухоли по сравнению с исходным объемом (рис. 23).



**Рис. 23.** Репрезентативные изображения опухолевых узлов индивидуальных животных из различных экспериментальных групп через различное время после проведения терапии

Гистологический анализ опухолей на 3 сутки после начала терапии выявил значительное уменьшение количества клеток в опухолях животных в экспериментальных группах (рис. 24). При этом морфология клеток была нечеткая, ядра фрагментированные.



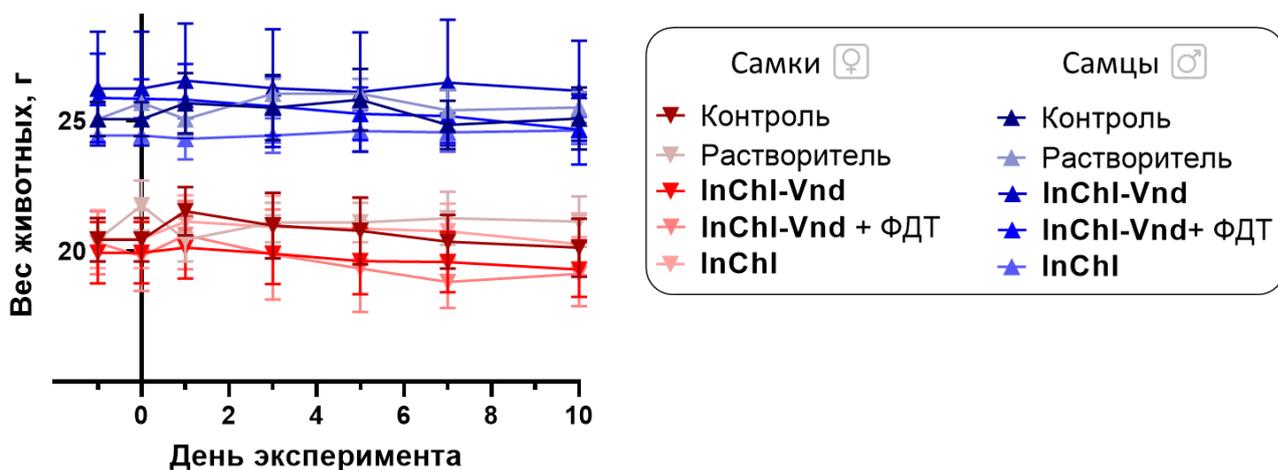
**Рис. 24.** Гистологическое исследование опухолей в контрольной и экспериментальных группах на 3 сутки после начала терапии. Окрашивание гематоксилином-эозином, масштабная линейка 100 мкм

Таким образом, полученные нами данные подтверждают, что наблюдаемый терапевтический эффект действительно связан с реализацией сочетанного фотодинамического и таргетного воздействия.

### 3.2.4 Анализ острой токсичности *in vivo*

Для оценки возможных токсических эффектов конъюгата **InChI-Vnd** в дозе 8 мкмоль/кг был проведен анализ острой токсичности. Исследование проводилось на мышах обоих полов линии Balb/c при однократном введении исследуемых соединений в терапевтической дозе, используемой в п. 3.2.3.

В ходе исследования не наблюдалось каких-либо видимых признаков системной токсичности, включая тремор, судороги, изменение общего поведения животных и летальные исходы на протяжении 10 дней. Также не было отмечено изменений веса животных во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем (рис. 25). Для выявления возможных скрытых признаков системной токсичности, на 10 сутки эксперимента производили умерщвление животных путем декапитации с дальнейшим забором крови и основных органов.



**Рис. 25.** Изменение веса животных в контрольной и экспериментальных группах до введения (-1 день), в день введения (0 день) и на протяжении 10 дней после внутривенной инъекции исследуемых соединений

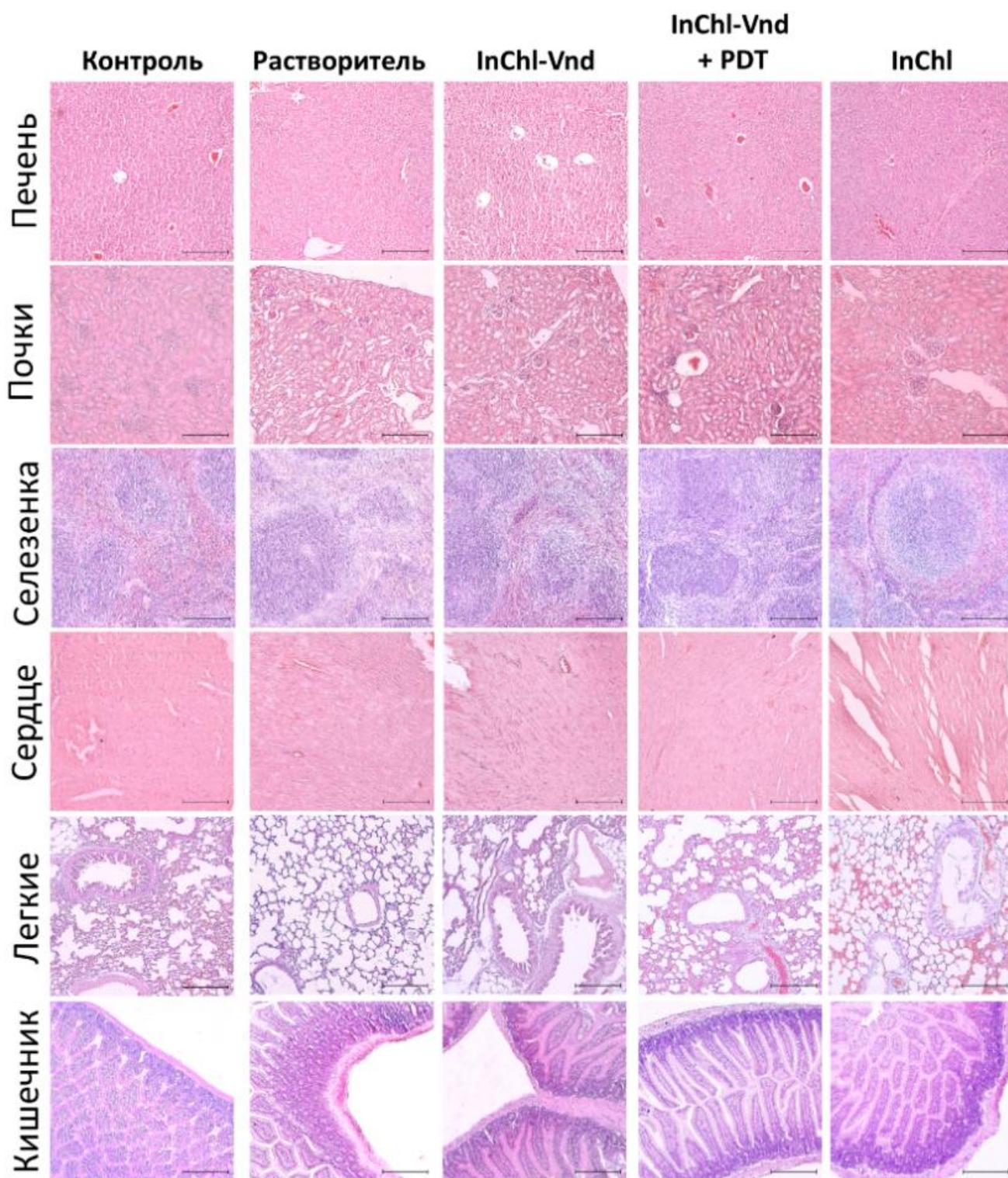
Оценка изменений функций жизненно важных органов (печень, почки, сердце) проводилась с помощью анализа биохимических показателей крови – активности АЛТ, АСТ, содержания креатинина, мочевины (таблица 10). Ни в одной из групп не было отмечено аномально сниженных или повышенных значений, что указывает на отсутствие клинической картины острой интоксикации. Однако стоит отметить незначительно изменение показателей АЛТ и АСТ, что может быть связано с применением спиртосодержащего растворителя. Гематологические показатели также не выходили за пределы референсных значений. Гистопатологическое исследование основных органов животных на 10 сутки исследования не выявило каких-либо изменений в структуре тканей (рис. 26, 27).

Таблица 10.

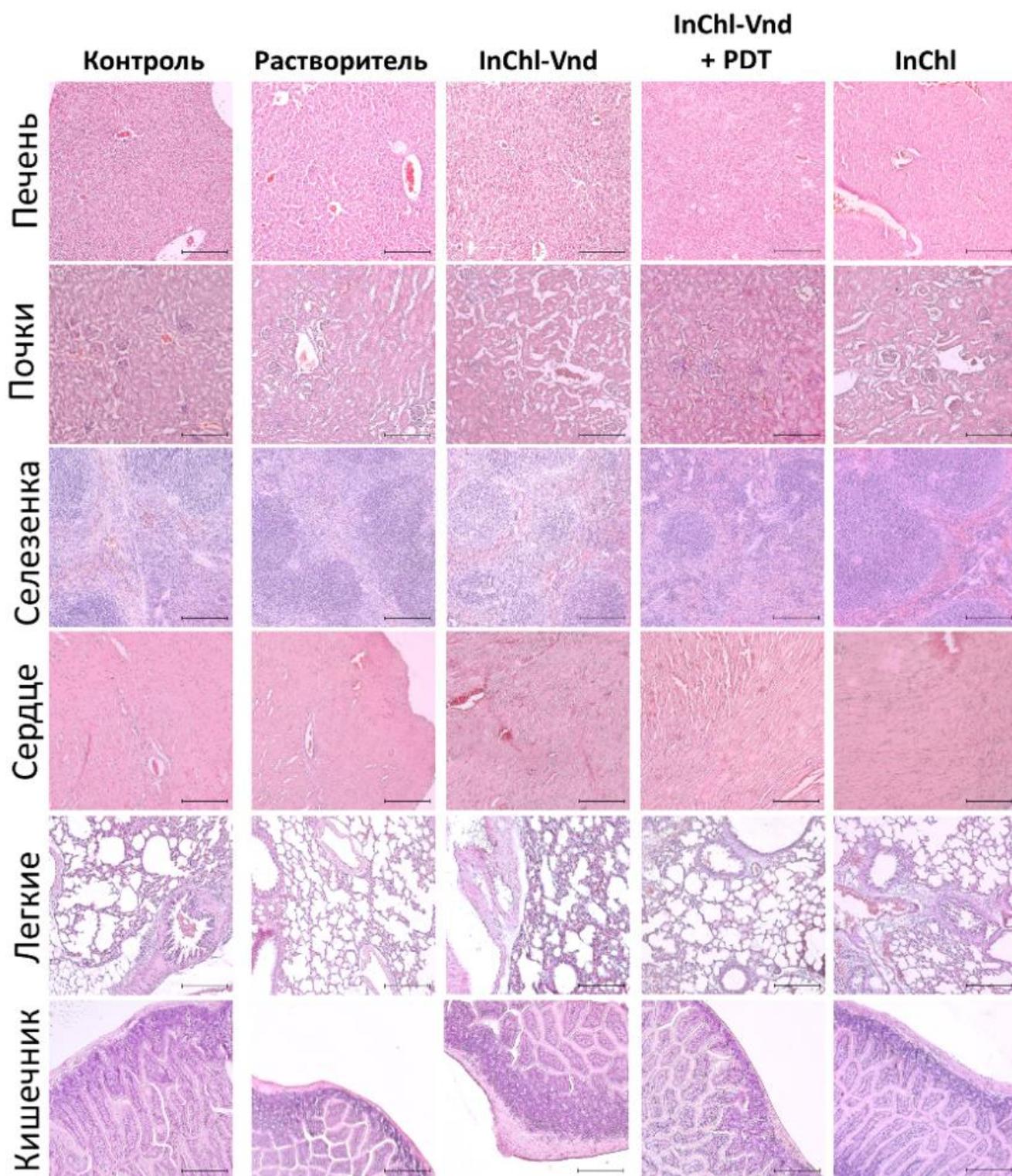
## Биохимические показатели крови животных на 10 сутки эксперимента

Биохимические показатели	Референсные значения <sup>33</sup>		Контроль		InChl-Vnd		InChl-Vnd + PDT		InChl	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
АЛТ (Ед/л)	99.44 ± 39.61	239.50 ± 141.20	60,1 ± 9,05	58,5 ± 0,9	53.84 ± 9,79	39,72 ± 6,03	46.76 ± 18.04	55.4 ± 12.3	111.8 ± 104.002	54.5
АСТ (Ед/л)	135.20 ± 26.53	156.70 ± 57.20	245,1 ± 72,69	284,5 ± 22,91	251,075 ± 43,05	192,08 ± 4,3	221.32 ± 132.5	252.6 ± 67.6	141.7 ± 131.1	240.7
Креатинин (мкМ/л)	19,8 ± 8,5	19,8 ± 8,5	48 ± 7,07	44,3 ± 5,77	41 ± 4,63	35,8 ± 4,27	44.8 ± 4.08	96 ± 68.6	46 ± 4	43
Мочевина (мм/л)	7,2 ± 4	8,75 ± 2,75	7,5 ± 1,76	7,4 ± 1,96	6.4 ± 0.62	6.5 ± 0.72	7.21 ± 0.58	8.09 ± 1.7	8.9 ± 0,37	10.17

<sup>33</sup> Сведения о референсных значениях АЛТ и АСТ взяты из [403], а креатинина и мочевины – [404]



**Рис. 26.** Гистопатологическое исследование основных органов самок после введения исследуемых соединений: «контроль» – внутривенное введение физиологического раствора; «растворитель» – внутривенное введение растворителя (85% вода + 20% этанола + 30% ПЭГ); «**InChl-Vnd + PDT**» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг с локальным облучением; «**InChl-Vnd**» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг без облучения; «**InChl**» – внутривенное введение соединения-сравнения в дозе 8 мкмоль/кг без облучения



**Рис. 27.** Гистопатологическое исследование основных органов самцов после введения исследуемых соединений: «контроль» – внутривенное введение физиологического раствора; «растворитель» – внутривенное введение растворителя (85% вода + 20% этанола + 30% ПЭГ); «**InChl-Vnd + PDT**» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг с локальным облучением; «**InChl-Vnd**» – внутривенное введение конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг без облучения; «**InChl**» – внутривенное введение соединения-сравнения в дозе 8 мкмоль/кг без облучения

Полученные результаты показали отсутствие каких-либо признаков системной токсичности однократного применения конъюгата **InChl-Vnd** в дозе 8 мкмоль/кг. Таким образом, показана противоопухолевая эффективность и безопасность конъюгата **InChl-Vnd**, что позволяет рассматривать его в качестве потенциального агента для комбинированной ФДТ EGFR-положительных опухолей.

### **3.3 Особенность фотофизических и биологических свойств *in vitro* ферментативно расщепляемого конъюгата цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба**

#### **3.3.1 Спектральные и фотохимические свойства конъюгата **ZnChl-Cbz****

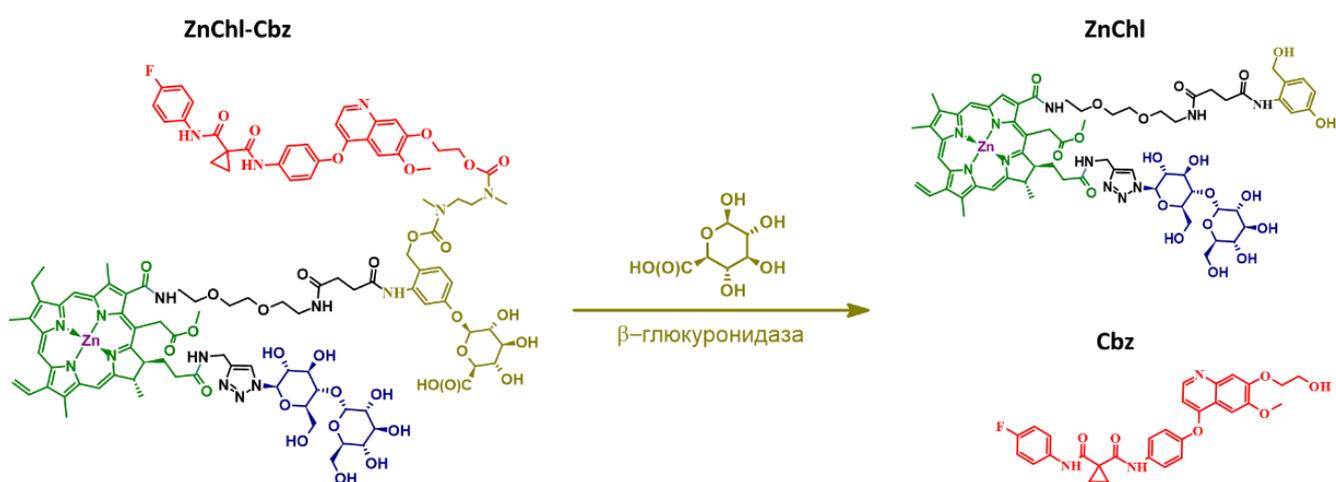
Конъюгат **InChl-Vnd** стал первым реализованным нами вариантом мультимодального фотосенсибилизатора для комбинированной ФДТ. В проведенных исследованиях он продемонстрировал сочетание уникальных фотофизических и биологических свойств, свидетельствующих о его перспективности. Данный успех послужил поводом для создания другого варианта мультимодального агента, нацеленного на другие молекулярные пути, активирующиеся после сублетального воздействия ФДТ. Кроме того, дизайн второго конъюгата основан на концепции «активируемого фотосенсибилизатора».

Одним из возможных ограничений эффективности конъюгированных соединений, может быть, снижение активности терапевтических модулей вследствие стерических ограничений, вызванных конъюгацией [11]. В связи с этим нами была реализована концепция пролекарственной формы мультимодальных фотосенсибилизаторов. Идея создания данных агентов заключается в высвобождении терапевтических модулей в опухолевой ткани под действием различных стимулов (света, изменения pH, воздействия ферментов и т.д.) [405, 406].

В рамках нашего исследования пролекарственная форма была реализована в расщепляемом конъюгате цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба (**ZnChl-Cbz**). В этом конъюгате происходит расщепление гликозидной связи в

линкере под действием  $\beta$ -глюкуронидазы, что приводит к высвобождению терапевтических модулей конъюгата (рис. 28).

$\beta$ -глюкуронидаза относится к классу лизосомальных гидролитических ферментов. Уровень активности данного фермента является потенциальным биомаркером для диагностики рака и пролекарственной терапии некоторых патологических состояний, в том числе и онкологических [407]. Повышенная активность  $\beta$ -глюкуронидазы была обнаружена в широком спектре злокачественных новообразований, включая карциномы молочной железы, легких, яичников, мочевого пузыря, желудочно-кишечного тракта и меланомы [408].

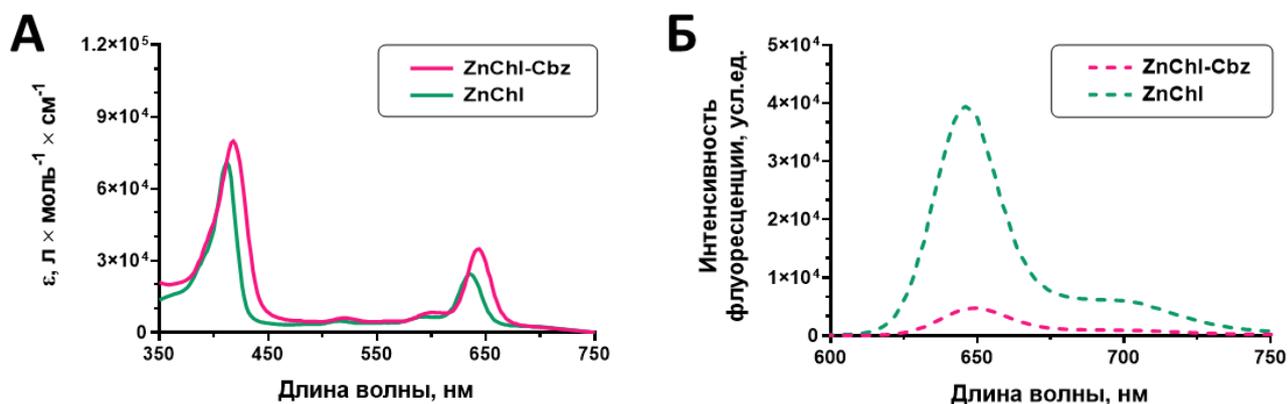


**Рис. 28.** Расщепление **ZnChl-Cbz**, опосредованное  $\beta$ -глюкуронидазой, приводит к высвобождению **ZnChl** и **Cbz**

На первом этапе исследований были зарегистрированы фотофизические характеристики конъюгата **ZnChl-Cbz** и соединения сравнения **ZnChl**. Показано, что оба соединения характеризуются наличием двух пиков поглощения в коротковолновой (410-420 нм) и длинноволновой (630-650 нм) области и способностью флуоресцировать (рис. 29). Флуоресценция **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** наблюдалась в красной области спектра с пиком на 648/646 нм.

Однако отмечено существенное различие в спектральных характеристиках соединений. Так, для конъюгата **ZnChl-Cbz** показан батохромный сдвиг полос поглощения (на 4-6 нм) с увеличением коэффициента молярной экстинкции по сравнению с неконъюгированным соединением, также наблюдается значительное уменьшение эмиссии, квантовый выход флуоресценции составил 0,1%. В тоже

время, для **ZnChl** отмечена высокая способность флуоресцировать, квантовый выход составил 1,2% (таблица 11). Мы предполагаем, что снижение квантового выхода флуоресценции конъюгата обусловлено тушением флуоресценции хлоринового фрагмента за счет взаимодействия с присоединенным **Cbz**.



**Рис. 29.** Спектры (А) поглощения и (Б) флуоресценции (при возбуждении на длине волны 410 нм) исследуемого конъюгата **ZnChl-Cbz** и соединения сравнения **ZnChl** в воде, концентрация соединений 5 мкМ

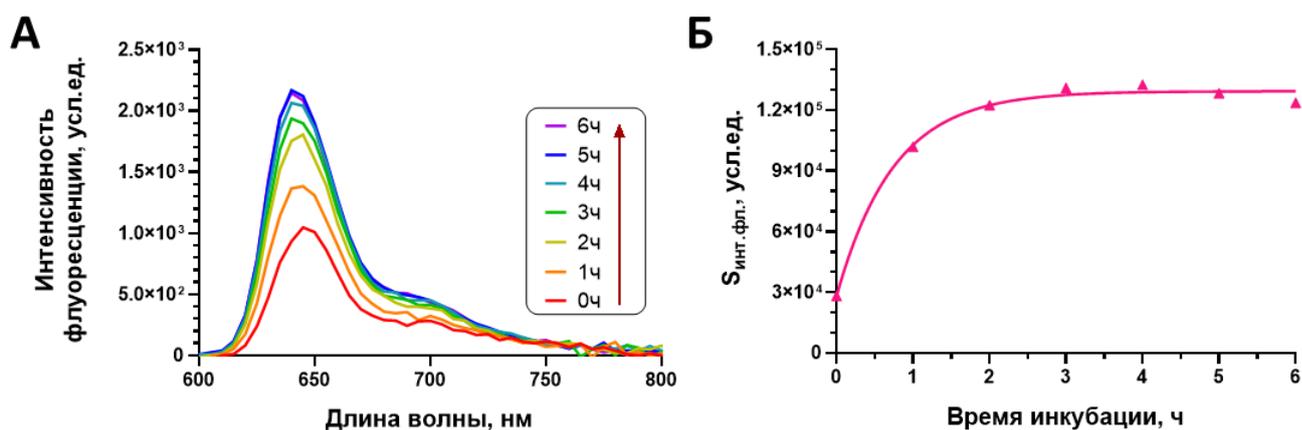
**Таблица 11.**

Фотофизические характеристики исследуемых соединений

Соединение	$\lambda_{\text{abs}}$ (нм) ( $\log \epsilon$ )	$\lambda_{\text{em}}$ (нм)	$\Phi_{\text{fl}}$ (%)	$\Phi_{\text{ROS}}$ (%)
<b>ZnChl-Cbz</b>	416 (4,7)	648	0,1	5
	642 (4,3)			14 (+ $\beta$ -глюкуронидаза) <sup>34</sup>
<b>ZnChl</b>	412 (4,5)	646	1,2	5
	636 (3,9)			29 (+ $\beta$ -глюкуронидаза) <sup>34</sup>

<sup>34</sup> — измерение квантового выхода синглетного кислорода после предварительной инкубации соединений в концентрации 0,1 мкМ с  $\beta$ -глюкуронидазы (40 ЕД/мл) в фосфатно-солевом буфере при 37°C

Для проверки этого предположения было проведено дополнительное исследование по определению способности  $\beta$ -глюкуронидазы влиять на флуоресценцию исследуемого конъюгата. К раствору **ZnChl-Cbz** в фосфатно-солевом буфере производили добавление  $\beta$ -глюкуронидазы и осуществляли регистрацию изменения спектра флуоресценции в зависимости от времени инкубации (рис. 30).



**Рис. 30.** Изменение интенсивности флуоресценции **ZnChl-Cbz** (5 мкМ) при инкубации с β-глюкуронидазой (40 ЕД/мл) в фосфатно-солевом буфере при 37°C: (А) изменение спектра флуоресценции на протяжении 6 ч инкубации, при возбуждении на длине волны 410 нм; (Б) кинетическая кривая изменения площади под пиком флуоресценции ( $S_{\text{инт.фл.}}$ ) от времени инкубации, модель однофазного распада

Показан рост флуоресценции **ZnChl-Cbz** при его инкубации с β-глюкуронидазой, что, по-видимому, связано с расщеплением линкера и последующим высвобождением **ZnChl**. Ферментативное расщепление исследуемого конъюгата в присутствии β-глюкуронидазы было подтверждено с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии [345]. Такое «разгорание» соединения при его ферментативном расщеплении дает принципиальную возможность отслеживать активацию конъюгата в организме в режиме реального времени с использованием методов флуоресцентной диагностики.

Квантовый выход генерации АФК для обоих соединений составил 5%. Однако при инкубации **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** с β-глюкуронидазой происходит увеличение значения ФРОС, до 14% и 29% соответственно (таблица 11).

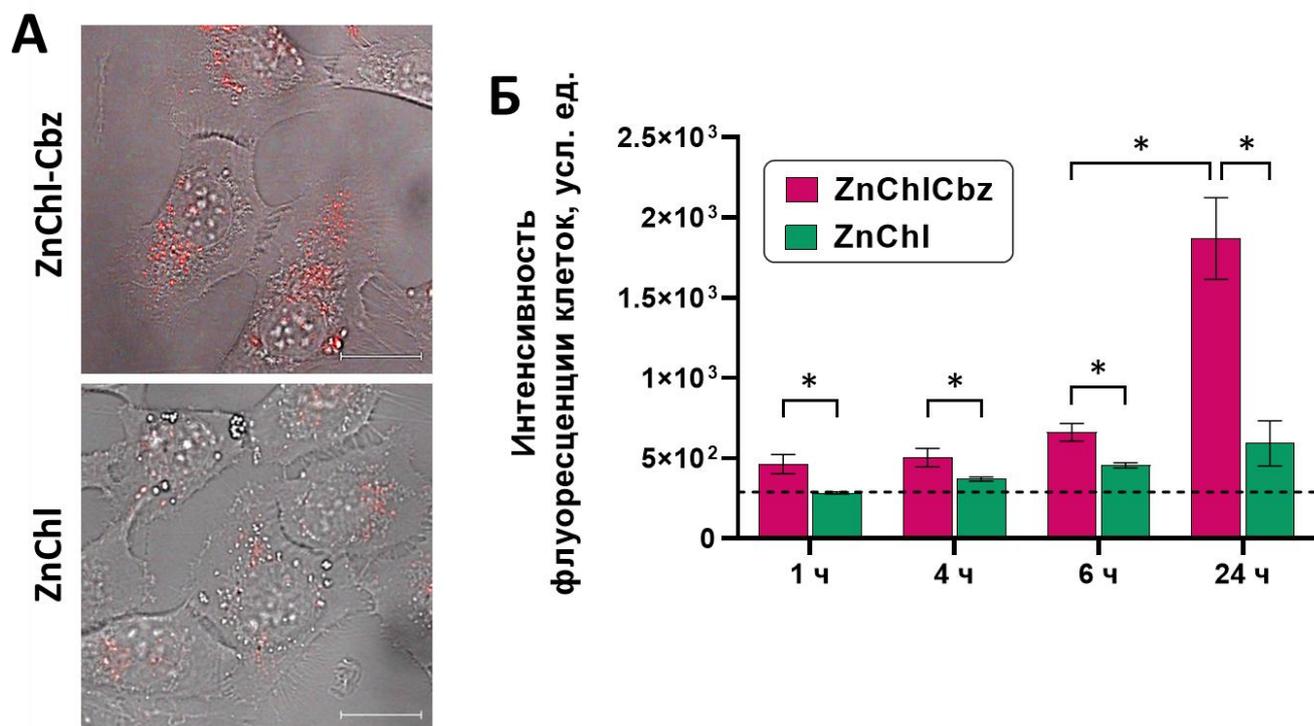
Таким образом, при расщеплении **ZnChl-Cbz** не только увеличивается интенсивность его флуоресценции, но и возрастает фотодинамическая эффективность. Это позволяет рассматривать **ZnChl-Cbz** как пролекарственный агент, активность которого существенно увеличивается при активации за счет селективного расщепления линкера с участием β-глюкуронидазы.

### 3.3.2 Накопление и локализация конъюгата **ZnChl-Cbz** в клетках

Наряду с поверхностными опухолями, ФДТ показана также для лечения опухолей полых органов, в частности мочевого пузыря [140]. В связи с этим, исследование биологических свойств *in vitro* конъюгата **ZnChl-Cbz** проводили на клеточной культуре карциномы мочевого пузыря T-24. Данная клеточная культура характеризуется высоким уровнем экспрессии рецептора HGFR, участвующего в запуске сигнальных путей выживания [409] и являющегося мишенью для кабозантиниба [342]. Важно отметить, что кабозантиниб продемонстрировал клиническую эффективность у пациентов с рефрактерным метастатическим раком мочевого пузыря во II фазе клинических исследований [410], что позволяет рассматривать данную локализацию рака как потенциальную область его применения.

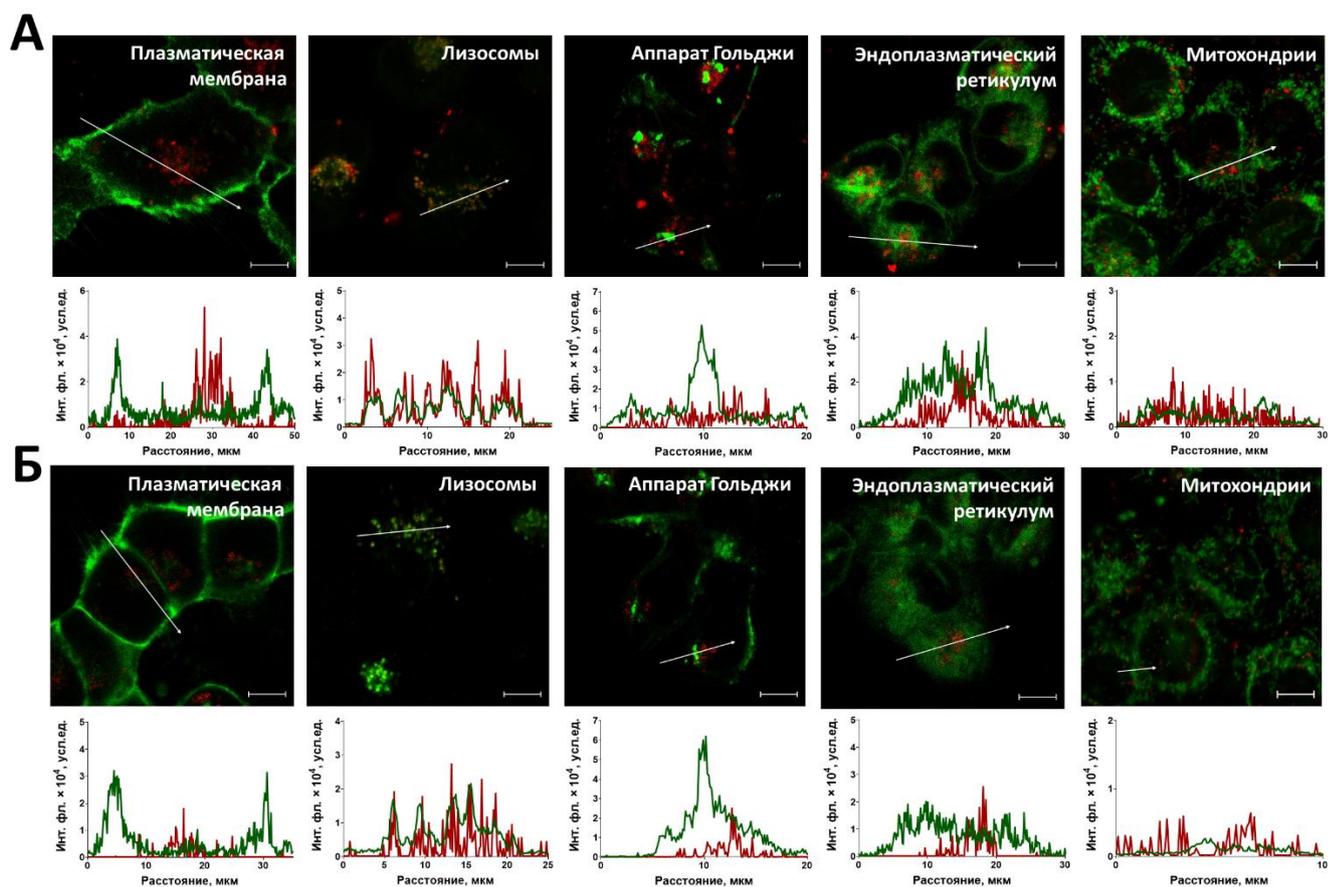
Установлено, что исследуемые соединения накапливаются в клетках в течение 24 часов наблюдения (рис. 31). При этом отмечен более высокий флуоресцентный сигнал от клеток, инкубируемых с **ZnChl-Cbz**, по сравнению с соединением контроля **ZnChl** через сутки зарегистрировано превышение сигнала примерно в 5 раз.

Разница накопления между соединениями может быть следствием большей липофильностью **ZnChl-Cbz**, что облегчает транспорт конъюгата через липидный бислой. Кроме того, дополнительно присоединенный кабозантиниб способен противодействовать оттоку лекарственных средств в результате нацеливания на АТФ-связывающий кассетный транспортер ABCG2 [411]. Стоит отметить, что фотосенсибилизаторы хлоринового ряда являются известными субстратами для ABCG2 [286].



**Рис. 31.** Исследование динамики накопления **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** в живых клетках карциномы мочевого пузыря человека T-24: (А) конфокальные изображения клеток после 24-х часовой инкубации с исследуемыми соединениями в концентрации 5 мкМ, наложение светопольного и флуоресцентного каналов, масштабная линейка 20 мкм; (Б) анализ динамики накопления исследуемых соединений в клетках, уровень автофлуоресценции обозначен пунктирной линией; среднее значение ± стандартное отклонение (n=10). \* – статистически значимое различие между группами  $p < 0,0001$ , двухфакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки

Для уточнения места локализации исследуемых соединений, была произведена окраска клеток красителями, специфичными для органелл. Показано, что **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** локализуются в основном в лизосомах и других везикулах в живых клетках (рис. 32). Основываясь на полученных результатах, можно предположить, что исследуемые соединения поступают в клетки посредством АТФ-зависимого эндоцитоза.

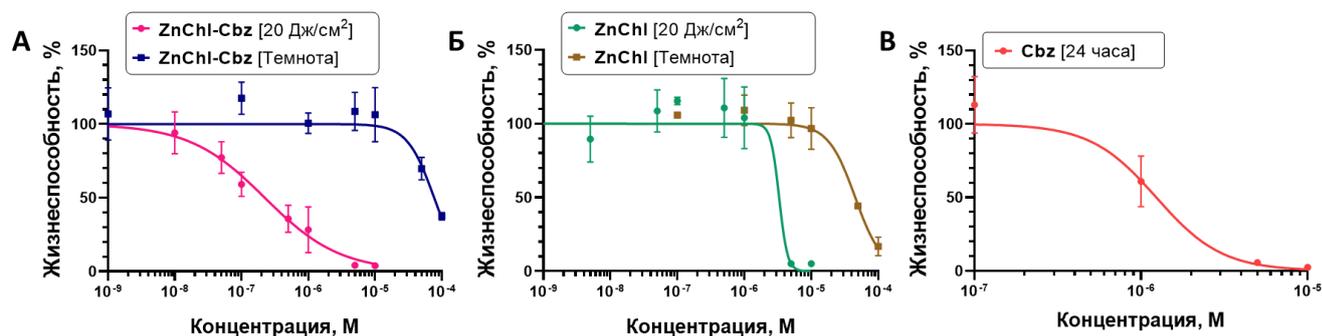


**Рис. 32.** Внутриклеточная локализация (А) конъюгата **ZnChl-Cbz** и (Б) соединения сравнения **ZnChl** в клетках Т-24. Для анализа соллокализации окрашены плазматическая мембрана клеток (CellMask), лизосомы (LysoTracker), аппарат Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA), митохондрии (MitoTracker), ЭПР (ER-Tracker). Зеленый канал – флуоресценция красителей, красный канал – флуоресценция исследуемых соединений. Масштабная линейка 10 мкм. Профили флуоресцентного сигнала показаны вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях клеток

### 3.3.3 Фотодинамическая активность конъюгата *in vitro*

При инкубации клеток Т-24 с **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** в темноте показано отсутствие выраженной темновой токсичности соединений (более 10 мкМ). Облучение клеток в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> приводило к увеличению цитотоксичности, как конъюгата, так и соединения сравнения, однако фотодинамическая активность соединений различалась. Фотодинамический индекс для **ZnChl-Cbz** составил более 380, в то время как для **ZnChl** не превышал 15 (рис. 33). При монотерапевтическом применении **Cbz**, установлено, что клетки Т-24

чувствительны к воздействию низкомолекулярного ингибитора, значение  $IC_{50}$  составило около 1 мкМ (таблица 10).



**Рис. 33.** Зависимость жизнеспособности клеток Т-24 от концентрации **ZnChl-Cbz** (А) и **ZnChl**(Б) при облучении в дозе в 20 Дж/см<sup>2</sup> и в темноте, а также от концентрации **Cbz** (В)

Помимо этого, показано, что экзогенное добавление β-глюкуронидазы к клеткам Т-24, инкубируемым с **ZnChl-Cbz**, также приводит к расщеплению конъюгата и повышению его терапевтической активности по сравнению с монотерапевтическим воздействием **ZnChl** (таблица 10).

Поскольку уровень β-глюкуронидазы обычно повышен в опухолевых клетках [408], то в качестве контрольной клеточной культуры были выбраны неопухолевые овариальные клетки китайского хомячка СНО, которые также характеризуются отсутствием экспрессии **HGFR**.

При инкубации клеток СНО с **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** с последующем облучением в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup> оба соединения вызывали фотоиндуцированную гибель клеток в практически одинаковой концентрации (~2 мкМ), при этом значение  $IC_{50}$  **ZnChl-Cbz** для клеток СНО было на порядок выше такового для опухолевых клеток Т-24. При фотодинамическом воздействии **ZnChl** отмечена сопоставимая чувствительность с клетками Т-24. Помимо этого наблюдалось уменьшение чувствительности СНО к действию низкомолекулярного ингибитора **Cbz** (таблица 12).

Таблица 12.

Значения IC<sub>50</sub> для исследуемых соединений<sup>35</sup>, мкМ

Соединение	T-24		СНО	
	20 Дж/см <sup>2</sup>	Темнота	20 Дж/см <sup>2</sup>	Темнота
<b>ZnChl-Cbz</b>	0,2 [0,13-0,33]	> 10	2,2 <sup>#</sup> [0,4-11,94]	> 10
<b>ZnChl-Cbz</b> + β-глюкуронидаза	0,19 [0,14-0,26]	> 10		
<b>ZnChl</b>	3,3* [1,04-4,89]	> 10	2,05 [1,1-3,8]	> 10
<b>Cbz</b>		1,2 [0,97-1,6]		3,3 <sup>#</sup> [1,8-4,5]

<sup>35</sup> значение IC<sub>50</sub> рассчитано с применением модели логнормального распределения с четырехпараметрической аппроксимацией, показаны средние значения и границы 95% доверительного интервала (n=9); Статистические отличия от клеток T-24 в каждой группе (# – p<0,0001; t-test) и от конъюгата (\* – p<0,01; t-test)

Таким образом показана селективность действия **ZnChl-Cbz** по отношению к HGFR-положительным опухолевым клеткам. Для определения типа взаимодействия терапевтических агентов был рассчитан индекс комбинации, который составил 0,23, что свидетельствует о реализации сильного синергического взаимодействия производного хлорина *еб* и кабозантиниба. Стоит отметить, что значение индекса комбинации существенно превосходило таковое для нерасщепляемого конъюгата **InChl-Vnd**. Этот факт согласуется с предположением о более высокой эффективности расщепляемых соединений, в которых нет стерических препятствий для реализации своих свойств отдельными терапевтическими модулями.

### 3.4 Противоопухолевая эффективность ферментативно расщепляемого конъюгата цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба в отношении HGFR-положительной трехмерной модели опухолевого роста *in vitro*

Для всесторонней оценки эффективности **ZnChl-Cbz** необходимо исследование на моделях опухолевого роста, более релевантных по отношению к опухолям человека в сравнении с простыми монослойными адгезионными культурами клеток. Наиболее часто в качестве таких моделей используют

экспериментальные опухоли на животных, в том числе ксенографтные. Однако использованная в работе линия клеток карциномы мочевого пузыря человека T-24 не способна вызывать формирование опухоли *de novo* у иммунодефицитных мышей [412]. В связи с этим, было принято решение провести исследование противоопухолевой эффективности на трехмерной модели клеточного роста *in vitro*.

Известно, что терапевтическая эффективность проводимого лечения во многом определяется микроокружением опухоли. При этом особый интерес представляет внеклеточный матрикс (ВКМ), состоящий из большого количества различных белков. ВКМ выполняет не только структурную и механическую роль, но также участвует в регуляции большого количества внутриклеточных процессов [412]. В частности, компоненты ВКМ выступают в роли модуляторов внутриклеточных сигнальных путей [413].

Несмотря на то, что стандартные двухмерные модели опухолевого роста *in vitro* широко распространены для исследований эффективности лекарственных препаратов, зачастую выдающиеся результаты, полученные в монослойных культурах не могут быть аналогичным образом перенесены в условия *in vivo*. Во многом это связано с тем, что трехмерная организация опухоли оказывает большое влияние как на сами клетки, так и на профиль распределения лекарственных препаратов [414]. Более того, клетки в 3D-моделях обычно проявляют пониженную чувствительность к терапевтическому воздействию по сравнению с 2D-монослойными культурами [415]. Поэтому при разработке новых противоопухолевых агентов важно учитывать не только клеточную компоненту, но и особенности микроокружения опухолей. Перспективной методикой для тестирования экспериментального лечения являются 3D-модели *in vitro* на основе искусственных или природных полимеров. Они способны имитировать архитектуру опухоли, межклеточное взаимодействие, взаимодействие клетка-матрикс, особенности химизма микроокружения опухоли [416].

Для исследования была выбрана трехмерная модель на основе коллагенового гидрогеля. Коллаген является преобладающим компонентом естественного ВКМ.

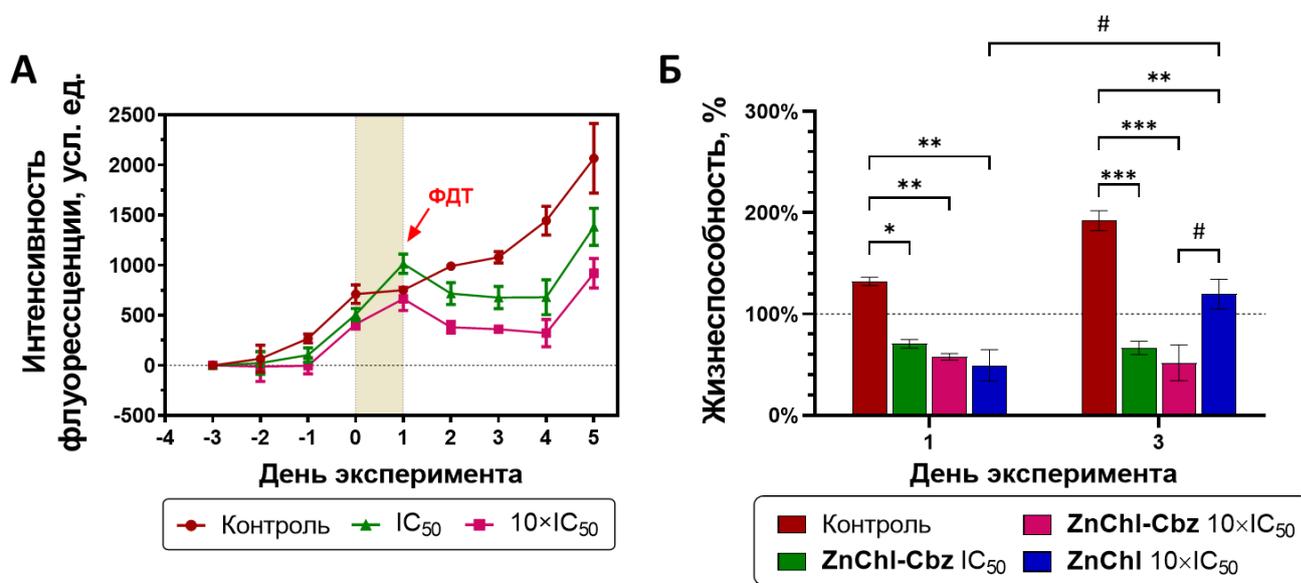
Он обладает низкой антигенностью и высокой биосовместимостью [416]. В качестве клеточной компоненты были использованы клетки T-24-GFPcyto со стабильной экспрессией зеленого флуоресцентного белка GFP. Выбор флуоресцентной клеточной линии обусловлен потребностью регистрации ответа клеток в 3D-модели на терапевтическое воздействие в режиме реального времени с помощью флуоресцентной макровизуализации [362].

Заключение клеток T-24-GFPcyto в гидрогель происходило на этапе их высадки путем равномерного распределения клеточной суспензии в растворе коллагена I типа и последующей полимеризации геля. Регистрацию интегрального флуоресцентного сигнала гидрогелей проводили ежедневно. Особенностью данного метода исследования является измерение общего флуоресцентного сигнала клеток благодаря оптической прозрачности коллагенового матрикса. Ранее было показано, что такой подход хорошо коррелирует с методами, требующими деструкции геля [362].

Исследование противоопухолевой эффективности **ZnChl-Cbz** начинали на 3 день роста клеток в геле. После 24 часовой инкубации гелей в среде, содержащей  $IC_{50}$  и  $10 \times IC_{50}$  исследуемого агента, гели с клетками облучали в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>. На следующий день после светового воздействия с **ZnChl-Cbz** наблюдалось выраженное дозозависимое ингибирование роста клеток. Однако через 4 дня после проведения ФДТ рост клеток в геле восстановился (рис. 34А), что, вероятно, является следствием их большей устойчивости к проводимой терапии при культивировании в трехмерной модели.

Так, при применении **ZnChl-Cbz** на монослойной культуре в концентрациях  $IC_{50}$  (0,2 мкМ) и  $10 \times IC_{50}$  (2 мкМ) выживаемость клеток на следующий день после ФДТ не превышала 50% и 10-15%, соответственно. В тоже время наблюдался существенно больший процент жизнеспособных клеток в трехмерной модели на 1-й после проведения ФДТ при тех же концентрациях **ZnChl-Cbz**, и составил 70,5% и 57,7% соответственно (рис. 34Б). Помимо этого, схожие результаты были получены и для неконъюгированного **ZnChl**, применение которого в концентрации  $10 \times IC_{50}$  (33 мкМ) приводило к выживанию около 50% клеток в геле на следующий

день после ФДТ (рис. 34Б), в то время как для монослойной культуры схожий процент ингибирования был показан для концентрации в 10 раз меньше ( $IC_{50} = 3$  мкМ). Таким образом, наблюдаемые эффекты согласуется с ранее опубликованными многочисленными данными о повышении устойчивости опухолевых клеток при культивировании в условиях, приближенных к опухолям *in vivo* [417, 418].



**Рис. 34.** Противоопухолевая активность **ZnChl-Cbz** в трехмерной модели опухолевого роста *in vitro*: (А) динамика изменения флуоресцентного сигнала от клеток T-24-GFPcyto, заключенных в коллагеновый гель, при 24-х часовой инкубации с **ZnChl-Cbz** в концентрациях равных  $IC_{50}$  и  $10 \times IC_{50}$  (обозначено желтой полосой) и последующим облучением в дозе 20 Дж/см<sup>2</sup>; (Б) зависимость жизнеспособности клеток T-24-GFPcyto в коллагеновом геле на 1-й и 3-й день после проведения ФДТ с **ZnChl-Cbz** в концентрациях  $IC_{50}$  и  $10 \times IC_{50}$  и **ZnChl** в концентрации  $10 \times IC_{50}$ . Показаны статистически значимые отличия от контрольной группы: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,005$ ; \*\*\* –  $p < 0,0001$ , и статистически значимые отличия от группы «InChl  $10 \times IC_{50}$ »: # –  $p < 0,005$  (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки)

Для оценки роли кабозантиниба в противоопухолевой активности конъюгата, было проведено сравнительное исследование ингибирующей способности **ZnChl-Cbz** и соединения сравнения **ZnChl**. Установлено, что на следующий день после проведения ФДТ с **ZnChl-Cbz** в концентрациях  $IC_{50}$  и  $10 \times IC_{50}$ , а также с **ZnChl** в концентрации  $10 \times IC_{50}$ , наблюдается значимое ингибирование роста клеток в обработанных гелях, процент ингибирования составил более 30% (рис.34Б).

Однако на 3-й день после проведения ФДТ с соединением сравнения был зафиксирован рост флуоресцентного сигнала от гелей с клетками, обработанных **ZnChl**, превысив значения, установленные до начала исследования. Мы полагаем, что этот рост связан с пролиферацией клеток, выживших после облучения.

В тоже время, для конъюгата был показан более продолжительный ингибирующий эффект. На 3 сутки после проведения ФДТ в гелях с клетками, обработанных **ZnChl-Cbz**, как в концентрации  $IC_{50}$ , так и в концентрации  $10 \times IC_{50}$ , рост флуоресцентного сигнала зафиксирован не был. Процент ингибирования роста клеток в геле составил около 40%. Значительная разница ответа клеток на терапевтическое воздействие конъюгата **ZnChl-Cbz** и соединения сравнения **ZnChl**, вероятно обусловлена дополнительной ингибирующей активностью кабозантиниба, входящего в состав конъюгата.

Таким образом, **ZnChl-Cbz** представляет собой мультимодальный фотосенсибилизатор в виде пролекарства с низкой исходной активностью. Активация соединения происходит за счет расщепления линкера, чувствительного к действию  $\beta$ -глюкуронидазы, уровень которой часто повышен в опухолевых клетках. Высвобождение производного хлорина *eb* и кабозантиниба приводит к усилению флуоресценции, что может использоваться в диагностических целях, а также к комбинированному терапевтическому воздействию на клетки-мишени за счет фотодинамического действия и последующего ингибирования клеточной сигнализации, опосредованной рецепторами HGFR и VEGFR.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Потребность в инновационных подходах к лечению онкологических заболеваний вызвана ограниченной эффективностью существующих методов лечения. Перспективным направлением для повышения эффективности противоопухолевой терапии является разработка мультимодальных терапевтических агентов, объединяющих два или более способа воздействия на опухолевые клетки [9, 238, 288]. В условиях высокой гетерогенности опухолей такой подход обеспечивает достижение максимального эффекта, а кроме того, снижает вероятность формирования приобретенной лекарственной устойчивости [419, 420]. Важной задачей при создании мультимодальных агентов является достижение синергического взаимодействия входящих в их состав модулей. В этом случае становится возможным достижение наилучших терапевтических результатов при невысоких действующих концентрациях противоопухолевого препарата, а значит, и снижение рисков тяжелых побочных эффектов [287, 419].

В работе были исследованы новые мультимодальные агенты, совмещающие активность фотосенсибилизатора и ингибитора рецепторных тирозинкиназ. Было исследовано два конъюгата, по-разному реализующие одну идею: объединение металлокомплексов хлорина *еб* с низкомолекулярными мультикиназными ингибиторами тирозинкиназ. На сегодняшний день соединения из группы хлоринов являются наиболее востребованными при разработке мультимодальных фотосенсибилизаторов [334]. Производные хлорина *еб* обладают желаемыми свойствами в качестве агента для ФДТ, включая низкую темновую токсичность, высокую эффективность генерации АФК и оптимальные фотофизические свойства [335]. В качестве таргетного агента мы использовали вандетаниб и кабозантиниб, имеющие различные профили активности в отношении рецепторных тирозинкиназ клетки [339, 342].

Оба конъюгата успешно зарекомендовали себя в проведенных исследованиях, что свидетельствует о перспективности предложенного нами подхода. Установлено, что при объединении в одну молекулярную структуру сохраняются как химические свойства, так и биологическая активность агентов. А исследования по определению

противоопухолевой активности подтвердили синергическое повышение эффективности ФДТ с применением данных соединений. Отметим, что наиболее выраженный синергический эффект получен при объединении агентов с помощью фермент-расщепляемого линкера. Было показано, что исследуемые мультимодальные фотосенсибилизаторы проявляют наибольшую активность в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем целевых рецепторов EGFR или HGFR, что делает их применимым для ФДТ опухолей с определенным молекулярным профилем.

Механизм действия мультимодальных фотосенсибилизаторов, по-видимому, обусловлен двойным воздействием на опухолевые клетки. Окислительное повреждение, индуцируемое в ходе фотодинамического воздействия, приводит к гибели опухолевых клеток. Однако сублетальные дозы ФДТ способны активировать молекулярные механизмы, направленные на выживание опухолевых клеток. Эти механизмы включают регуляторные каскады, опосредованные факторами транскрипции (например, STAT3, NF-κB), белками теплового шока (HSP), факторами роста (VEGF, HGF) и рецепторными тирозинкиназами (EGFR, VEGFR, HGFR) [14]. В случае применения мультимодального агента действие низкомолекулярного ингибитора, входящего в его состав, блокирует сигналы выживания, способствуя гибели клеток и предотвращая последующее развитие рецидива.

Известно, что в ответ на фотодинамическое воздействие опухолевые клетки активируют сигнальные пути выживания, включающие EGFR, VEGFR и HGFR [294, 421]. Пик активации данных путей наблюдается в первые 24 часа после облучения, что может оказаться критичным для своевременного подавления сигналов [301]. Например, аутофосфорилирование EGFR регистрируется уже через 5 минут после ФДТ, достигая максимума через 30–60 минут, с последующей ядерной транслокацией рецептора и активацией STAT3-зависимого транскрипционного ответа [15, 321]. Повышение уровня VEGF в ответ на гипоксию после ФДТ отмечается через 6–24 часа [422]. Помимо этого, в резистентности к ФДТ существенную роль может играть микроокружение опухоли. Так, активация

HGFR обусловлена паракринной секрецией HGF стромальными фибробластами (CAF) и погибающими опухолевыми клетками [17]. Это приводит к активации сигнальных путей PI3K/Akt, MAPK/ERK и STAT3, усиливающих пролиферацию и резистентность [423]. Таким образом, целенаправленное подавление адаптивных молекулярных процессов, запускаемых ФДТ, может приводить к повышению эффективности проводимой терапии.

Помимо этого, важным аспектом при разработке противоопухолевых препаратов является снижение токсичности для нормальных тканей. Для традиционных фотосенсибилизаторов и их производных характерно накопление в коже, что приводит к кожным реакциям, включая боль, отек, эритему и образование пустул [424]. Один из способов решения данной проблемы заключается в использовании пролекарственной формы мультимодальных фотосенсибилизаторов. Ферментативное расщепление исходного малоактивного конъюгата в опухолевой ткани может обеспечить его избирательную активацию и снизить негативное воздействие на нормальные клетки с низким уровнем экспрессии соответствующего фермента. В нашей работе такой подход показан для линкера, чувствительного к  $\beta$ -глюкуронидазе, уровень которой обычно повышен в опухолях [407].

Результаты проведенной работы свидетельствуют о перспективности подхода, основанного на создании мультимодальных конъюгатов, и эффективности исследованных соединений, **InChl-Vnd** и **ZnChl-Cbz**, как потенциальных агентов для комбинированной фотодинамической терапии EGFR- и HGFR-положительных опухолей. Дальнейшее изучение механизма синергического взаимодействия при сочетании ФДТ и ингибирования сигнальных путей клетки может стать основой для разработки новых более эффективных противоопухолевых агентов.

## ВЫВОДЫ

1. Дикатионный конъюгат индиевого комплекса хлорина *еб* и вандетаниба, **InChl-Vnd**, обладает высоким квантовым выходом генерации АФК при поглощении в красной области спектра и индуцирует в клетках фотодинамическую реакцию с образованием синглетного кислорода и супероксидного анион-радикала. Данное соединение демонстрирует выраженное синергическое взаимодействие терапевтических модулей и эффективно в отношении опухолевых клеток с гиперэкспрессией рецептора EGFR, проявляя цитотоксичность в наномолярном диапазоне концентраций.

2. Показано селективное накопление **InChl-Vnd** в ксенографтных опухолях по сравнению с мышечной тканью при внутривенном введении. Использование данного соединения без облучения светом приводит к торможению роста опухоли, а при фотодинамическом воздействии – к выраженной регрессии опухолевых узлов, что значительно превосходит терапевтический эффект в случае использования фотосенсибилизатора и вандетаниба по отдельности.

3. Установлено, что ферментативно расщепляемый конъюгат цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба, **ZnChl-Cbz**, обладает свойствами пролекарства: расщепление под действием  $\beta$ -глюкуронидазы сопровождается увеличением как квантового выхода флуоресценции, так и генерации синглетного кислорода. Данное соединение обладает селективностью действия в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии HGFR. Наличие фермент-расщепляемого линкера обеспечивает высвобождение активных фрагментов молекулы в клетке и увеличение синергизма их действия.

4. Показано, что культивирование опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле приводит к существенному повышению их устойчивости к действию как **ZnChl-Cbz**, так и неконъюгированного **ZnChl** по сравнению с монослойной культурой. При этом в случае обработки неконъюгированным фотосенсибилизатором рост культуры быстро восстанавливается после фотодинамического воздействия, тогда как в случае **ZnChl-Cbz** эффект ингибирования роста является пролонгированным и сохраняется в течение не

менее трех дней. Такой эффект может быть объяснен дополнительным действием мультикиназного ингибитора кабозантиниба на клетки, получившие сублетальную дозу фотодинамического воздействия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2004. – Vol. 1. – № 4. – P. 279-293. – DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
2. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 106. – P. 1098-1107. – DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
3. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem J*. – 2016. – Vol. 473 (4). – P. 347-364. – DOI: 10.1042/BJ20150942.
4. Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer // *Nature Reviews Cancer*. – 2003. – Vol. 3. – P. 380-387. – DOI: 10.1038/nrc1071.
5. Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S., Dong T., Yang Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions // *Pharmaceutics*. – 2021. – Vol. 13 (9). – P. 1332. – DOI: 10.3390/pharmaceutics13091332.
6. Michalak M., Mazurkiewicz S., Szymczyk J., Ziental D., Sobotta L. Photodynamic therapy applications – a review // *Journal of Medical Science*. – 2023. – Vol. 92 (4). – DOI: 10.20883/medical.e865.
7. Kim T. E., Chang J.-E. Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15 (9). – P. 2257. – DOI: 10.3390/pharmaceutics15092257.
8. Aebisher D., Rogóż K., Myśliwiec A., Dynarowicz K., Wiench R., Cieślak G., Kawczyk-Krupka A., Bartusik-Aebisher D. The use of photodynamic therapy in medical practice // *Frontiers in Oncology*. – 2024. – Vol. 14. – DOI: 10.3389/fonc.2024.1373263.
9. Grin M., Suvorov N., Ostroverkhov P., Pogorilyy V., Kirin N., Popov A. Sazonova A., Filonenko E. Advantages of combined photodynamic therapy in the treatment of oncological diseases // *Biophysical Reviews*. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 941-963. – DOI: 10.1007/s12551-022-00962-6.

10. Huis in 't Veld R.V., Heuts J., Ma S., Cruz L.J., Ossendorp F.A., Jager M.J. Current Challenges and Opportunities of Photodynamic Therapy against Cancer // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15 (2). – DOI: 10.3390/pharmaceutics15020330.
11. Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Kudriashova E.S., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Fedorov A. Yu. Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future Directions toward Selective Photodynamic Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 65 (3). – P. 1695-1734.
12. Kumar R., Goel H., Solanki R., Rawat L., Tabasum S., Tanwar P., Pal S., Sabarwal A. Recent developments in receptor tyrosine kinase inhibitors: A promising mainstay in targeted cancer therapy // *Medicine in drug discovery*. – 2024. – Vol. 23. – P. 100195. – DOI: 10.1016/j.medidd.2024.100195.
13. Bedard P.L., Hyman D.M., Davids M.S., Siu L.L. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology // *Lancet (London, England)*. – 2020. – Vol. 395. – Is. 10229. – P. 1078-1088. – DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30164-1.
14. Broekgaarden M., Weijer R., van Gulik T.M., Hamblin M.R., Heger M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies // *Cancer Metastasis Reviews*. – 2015. – Vol. 34. – P. 643-690. – DOI: 10.1007/s10555-015-9588-7.
15. Edmonds C., Sarah Ch., Gallagher-Colombo S.M., Busch T.M., Cengel K.A. Photodynamic therapy activated signaling from epidermal growth factor receptor and STAT3: Targeting survival pathways to increase PDT efficacy in ovarian and lung cancer // *Cancer Biology & Therapy*. – 2012. – Vol. 13 (14). – P. 1463–1470.
16. Bhuvaneshwari R., Gan Y.Y., Soo K.C., Olivo M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis // *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. – 2009. – Vol. 66. – № 14. – P. 2275-2283.
17. Vogel S., Peters C., Etminan N., Börger V., Schimanski A., Sabel M.C., Sorg R.V. Migration of mesenchymal stem cells towards glioblastoma cells depends on hepatocyte-growth factor and is enhanced by aminolaevulinic acid-mediated photodynamic treatment // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2013. – Vol. 431. – Is. 3. – P. 428-432. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.153.

18. Obaid G., Celli J.P., Broekgaarden M., Bulin A.-L., Uusimaa P., Pogue B., Hasan T., Huang H.-C. Engineering photodynamics for treatment, priming and imaging // *Nat Rev Bioeng.* – 2024. – Vol. 2. – P. 752-769. – DOI:10.1038/s44222-024-00196-z.
19. Abdel-kader M.H. The Journey of PDT Throughout History: PDT from Pharos to Present // In *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*. Ed. H. Kostron and T. Hasan. The Royal Society of Chemistry. – 2016. – Chapter 1. – P. 1-21. – DOI: 10.1039/9781782626824-00001.
20. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status // *Front. Chem.* – 2021. – Vol 9. – DOI: 10.3389/fchem.2021.686303.
21. Lima E., Reis L.V., Photodynamic Therapy: From the Basics to the Current Progress of N-Heterocyclic-Bearing Dyes as Effective Photosensitizers // *Molecules.* – 2023. – Vol. 28 (13). – P. 5092. – DOI: 10.3390/molecules28135092.
22. Lee C.-N., Hsu R., Chen H., Wong T.-W. Daylight Photodynamic Therapy: An Update // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25 (21). – P. 5195. – DOI: 10.3390/molecules25215195.
23. Aebischer D., Czech S., Dynarowicz K., Misiółek M., Komosińska-Vassev K., Kawczyk-Krupka A., Bartusik-Aebischer D. Photodynamic Therapy: Past, Current, and Future // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2024. – Vol. 25 (20). – P. 11325. – DOI: 10.3390/ijms252011325.
24. Rkein A.M., Ozog D.M. Photodynamic Therapy // *Dermatologic Clinics.* – 2014. – Vol. 32. – Is. 3. – P. 415-425. – DOI: 10.1016/j.det.2014.03.009.
25. Dobson J., de Queiroz G.F., Golding J.P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects // *The Veterinary Journal.* – 2018. – Vol. 233. – P. 8-18. – DOI: 10.1016/j.tvjl.2017.11.012.
26. Mansoori B., Mohammadi A., Amin Doustvandi M., Mohammadnejad F., Kamari F., Gjerstorff M.F., Baradaran B., Hamblin M.R. Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2019. – Vol. 26. – P. 395-404. – DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.033.

27. Zhao X., Liu J., Fan J., Chao H., Peng X. Recent progress in photosensitizers for overcoming the challenges of photodynamic therapy: from molecular design to application // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – Vol. 50. – P. 4185-4219.
28. D'Alessandro S., Priefer R. Non-porphyrin dyes used as photosensitizers in photodynamic therapy // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2020. – Vol. 60. – P. 101979. – DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101979.
29. Wainwright M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine // *Chemical Society Reviews*. – 1996. – Vol. 25. – P. 351-359.
30. O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy // *Photochemistry and Photobiology*. – 2009. – Vol. 85. – Is. 5. – P. 1053-1074. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x.
31. Oluwajembola A.M., Cleanclay W.D., Onyia A.F., Chikere B.N., Zakari S., Ndifreke E., De Campos O.C. Photosensitizers in photodynamic therapy: An advancement in cancer treatment // *Results in Chemistry*. – 2024. – Vol. 10. – P. 101715. – DOI: 10.1016/j.rechem.2024.101715.
32. Cheruthazhakkat S., Blassan P.G., Indira B., Heidi A. Photoactive Herbal Compounds: A Green Approach to Photodynamic Therapy // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27 (16). – P. 5084. – DOI: 10.3390/molecules27165084.
33. Aebisher D., Przygórzewska A., Bartusik-Aebisher D. Natural Photosensitizers in Clinical Trials // *Appl. Sci.* – 2024. – Vol. 14 (18). – P. 8436. – DOI: 10.3390/app14188436.
34. Cogno I.S., Gilardi P., Comini L., Núñez-Montoya S.C., Cabrera J.L., Rivarola V.A. Natural photosensitizers in photodynamic therapy: *In vitro* activity against monolayers and spheroids of human colorectal adenocarcinoma SW480 cells // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2020. – Vol. 31. – P. 101852. – DOI: 10.1016/j.pdpdt.2020.101852.
35. Gonçalves L.C.P. Photophysical properties and therapeutic use of natural photosensitizers // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 2021. – Vol. 7. – P. 100052. – DOI: 10.1016/j.jpap.2021.100052.

36. Sobotta L., Skupin-Mrugalska P., Piskorz J., Mielcarek J. Porphyrinoid photosensitizers mediated photodynamic inactivation against bacteria // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 175. – P. 72-106. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.04.057.
37. Kessel D. Photodynamic therapy: from the beginning // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2004. – Vol. 1. – Is. 1. – P. 3-7. – DOI: 10.1016/S1572-1000(04)00003-1.
38. Hamblin M.R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is Prologue // *Photochemistry and Photobiology*. – 2019. – Vol. 96. – Is. 3. – P. 506-516. – DOI: 10.1111/php.13190.
39. Nyman E.S., Hynninen P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2004. – Vol. 73. – Is. 1-2. – P. 1-28. – DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002.
40. Zhang J., Jiang C., Figueiró Longo J.P., Azevedo R.B., Zhang H., Muehlmann L.A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2018. – Vol. 8. – Is. 2. – P. 137-146. – DOI: 10.1016/j.apsb.2017.09.003.
41. Josefsen L.B., Boyle R.W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers // *Met Based Drugs*. – 2008. – Vol. 2008. – Is. 1. – P. 276109. – DOI: 10.1155/2008/276109.
42. Gold M.H., Goldman M.P. 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy: Where We Have Been and Where We Are Going // *Dermatologic Surgery*. – 2004. – Vol. 30(8). – P. 1077-1083.
43. Mfouo-Tynga I.S., Dias L.D., Inada N.M., Kurachi C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2021. – Vol. 34. – P. 102091.
44. Maeda Y., Oku M., Sakai Y. A defect of the vacuolar putative lipase Atg15 accelerates degradation of lipid droplets through lipolysis // *Autophagy*. – 2015. – Vol. 11 (8). – P. 1247-1258. – DOI: 10.1080/15548627.2015.1056969.

45. Gaio E., Scheglmann D., Reddi E., Moret F. Uptake and photo-toxicity of Foscan<sup>®</sup>, Foslip<sup>®</sup> and Fospeg<sup>®</sup> in multicellular tumor spheroids // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – Vol. 161. – P. 244-252.
46. Copley L., van der Watt P., Wirtz K.W., Parker M.I., Leaner V.D. Photolon<sup>™</sup>, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2008. – Vol. 40. – Is. 2. – P. 227-235. – DOI: 10.1016/j.biocel.2007.07.014.
47. Gomes-da-Silva L.C., Kepp O., Kroemer G. Regulatory approval of photoimmunotherapy: photodynamic therapy that induces immunogenic cell death // *Oncoimmunology*. – Vol. 9 (1). – P. 1841393. – DOI: 10.1080/2162402X.2020.1841393.
48. De Pinillos Bayona A.M., Mroz P., Thunshelle C., Hamblin M.R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2017. – Vol. 89. – Is. 2. – P. 192-206. – DOI: 10.1111/cbdd.12792.
49. Horne T.K., Cronjé M.J. Mechanistics and photo-energetics of macrocycles and photodynamic therapy: An overview of aspects to consider for research // *Chemical Biology & Drug Design*. – 2017. – Vol. 89. – Is. 2. – P. 221-242.
50. Zhang A., Kwan L., Stillman M.J. The spectroscopic impact of interactions with the four Gouterman orbitals from peripheral decoration of porphyrins with simple electron withdrawing and donating groups // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2017. – Vol. 15. – P. 9081-9094. – DOI: 10.1039/C7OB01960B.
51. Wamser C.C., Ghosh A. The Hyperporphyrin Concept: A Contemporary Perspective // *JACS Au*. – 2022. – Vol. 22. – Is. 7. – P. 1543–1560.
52. Nemykin V.N., Hadt R.G. Interpretation of the UV–vis Spectra of the meso(Ferrocenyl)-Containing Porphyrins using a TDDFT Approach: Is Gouterman’s Classic Four-Orbital Model Still in Play? // *The Journal of Physical Chemistry*. – 2010. – Vol. 114. – Is. 45. – P. 12062–12066. – DOI: 10.1021/jp1083828.
53. Algorri J. F., Ochoa M., Roldán-Varona P., Rodríguez-Cobo L., López-Higuera J. M. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13 (14). –P. 3484. – DOI:10.3390/cancers13143484.

54. Thakur M.S., Singh N., Sharma A., Rana R., Syukor A.R.A., Naushad M., Kumar S., Singh L. Metal coordinated macrocyclic complexes in different chemical transformations // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2022. – Vol. 471. – P. 214739. – DOI: 10.1016/j.ccr.2022.214739.
55. Dąbrowski J.M., Pucelik B., Regiel-Futyra A., Brindell M., Mazuryk O., Kyziół A., Stochel G., Macyk W., Arnaut L.G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers: 21st International Symposium on the Photophysics and Photochemistry of Coordination Compounds // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2016. – Vol. 325. – P. 67-101.
56. Yao Q., Fan J., Long S., Zhao X., Li H., Du J., Shao K., Peng X. The concept and examples of type-III photosensitizers for cancer photodynamic therapy // *Chem*. – 2022. – Vol. 8. – Is. 1. – P. 197-209. – DOI: 10.1016/j.chempr.2021.10.006.
57. Marian C.M. Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules // *WIREs Computational Molecular Science*. – 2011. – Vol. 2. – Is. 2. – P. 187-203. – DOI: 10.1002/wcms.83.
58. Kuncewicz J., Dąbrowski J.M., Kyziół A., Brindell M., Łabuz P., Mazuryk O., Macyk W., Stochel G. Perspectives of molecular and nanostructured systems with d- and f-block metals in photogeneration of reactive oxygen species for medical strategies // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 398. – P. 113012. – DOI: 10.1016/j.ccr.2019.07.009.
59. Bonnett, R. 9.22 - Metal Complexes for Photodynamic Therapy // *Comprehensive Coordination Chemistry II* / eds. J. A. McCleverty, T. J. Meyer. – Oxford : Pergamon, 2003. – P. 945-1003. – DOI: 10.1016/B0-08-043748-6/09204-5.
60. Pucci C., Martinelli C., Degl'Innocenti A., Desii A., De Pasquale D., Ciofani G. Light-Activated Biomedical Applications of Chlorophyll Derivatives // *Macromolecular Bioscience*. – 2021. – Vol. 21. – Is. 9. – P. 2100181. – DOI: 10.1002/mabi.202100181.
61. Baptista M.S., Cadet J., Di Mascio P., Ghogare A.A., Greer A., Hamblin M.R., Lorente C., Nunez S.C., Ribeiro M.S., Thomas A.H., Vignoni M., Yoshimura T.M. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways

// Photochemistry and Photobiology. – 2017. – Vol. 93. – Is. 4. – P. 912-919. – DOI: 10.1111/php.12716.

62. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C., Golab J. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA Cancer J Clin.* – 2011. – Vol. 61. – Is. 4. – P. 250-281. – DOI: 10.3322/caac.20114.

63. Ding H., Yu H., Dong Y., Tian R., Huang G., Boothman D.A., Sumer B.D., Gao J. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia // *Journal of Controlled Release.* – 2011. – Vol. 156. – Is. 3. – P. 276-280. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.08.019.

64. Foot C.S. Type I and Type II Mechanisms of Photodynamic Action // *ACS Symposium Series.* – 1987. – Vol. 339. – Ch. 2. – P. 22-38.

65. Chilakamarthi U., Singu P.S., Giribabu L. Photodynamic Therapy-Induced Oxidative Stress for Cancer Treatment // *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Therapeutic Aspects.* – 2022. – P. 1121-1143. – DOI: 10.1007/978-981-16-5422-0\_58.

66. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 1997. – Vol. 39. – Is. 1. – P. 1-18. – DOI: 10.1016/S1011-1344(96)07428-3.

67. Ricchelli F. Photophysical properties of porphyrins in biological membranes // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 1995. – Vol. 29. – Is. 2-3. – P. 109-118. – DOI: 10.1016/1011-1344(95)07155-U.

68. Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen // *Photochemistry and Photobiology.* – 1991. – Vol. 53. – Is. 4. – P. 549-553. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb03669.x.

69. Charara M., Tovmasyan A., Batinic-Haberle I., Craik J., Benov L. Post-illumination cellular effects of photodynamic treatment // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12.

70. Juan C. A., Pérez de la Lastra J. M., Plou F. J., Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies // *International*

Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22 (9). – P. 4642. – DOI: 10.3390/ijms22094642.

71. Girotti A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2001. – Vol. 63. – Is. 1-3. – P. 103-113. – DOI: 10.1016/S1011-1344(01)00207-X.

72. Girotti A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems // Photochemistry and Photobiology. – 1990. – Vol. 51. – Is. 4. – P. 497-509.

73. Grassi L., Cabrele C. Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions // Amino Acids. – 2019. – Vol. 51. – P. 1409–1431. – DOI: 10.1007/s00726-019-02787-2.

74. Kehm R., Baldensperger T., Raupbach J., Höhn A. Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases // Redox Biology. – 2021. – Vol. 42. – P. 101901. – DOI: 10.1016/j.redox.2021.101901.

75. Martinez De Pinillos Bayona A., Mroz P., Thunshelle C., Hamblin M.R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers // Chemical Biology & Drug Design. – 2017. – Vol. 89. – Is. 2. – P. 192-206. – DOI: 10.1111/cbdd.12792.

76. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2005. – Vol. 2. – Is. 1. – P. 1-23. – DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00030-X.

77. Figge F.H.J., Weiland G.S., Manganiello L.O.J. Cancer Detection and Therapy. Affinity of Neoplastic, Embryonic, and Traumatized Tissues for Porphyrins and Metalloporphyrins // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. – 1948. – Vol. 68. – Is. 3. – P. 640-641. – DOI: 10.3181/00379727-68-16580.

78. Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems: Delivery of photosensitizers in photodynamic therapy // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2004. – Vol. 56. – Is. 1. – P. 53-76.

79. Ivanova-Radkevich V.I. Biochemical Basis of Selective Accumulation and Targeted Delivery of Photosensitizers to Tumor Tissues // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – Vol. 87. – P. 1226-1242. – DOI: 10.1134/S0006297922110025.
80. Hamblin M. R., Luke Newman E. New trends in photobiology: On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1994. – Vol. 23. – Is. 1. – P. 3-8.
81. Pottier R., Kennedy J.C. New trends in photobiology: The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1990. – Vol. 8. – Is. 1. – P. 1-16. – DOI: 10.1016/1011-1344(90)85183-W.
82. Solban N., Rizvi I., Hasan Y. Targeted photodynamic therapy // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2006. – Vol. 38. – Is. 5. – P. 522-531. – DOI: 10.1002/lsm.20345.
83. El-Far M.A., Pimstone N.R. The interaction of tumour-localizing porphyrins with collagen, elastin, gelatin, fibrin and fibrinogen // *Cell Biochemistry and Function*. – 1985. – Vol. 3. – Is. 2. – P. 115-119. – DOI: 10.1002/cbf.290030206.
84. Sobolev A.S., Jans D.A., Rosenkranz A.A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 73. – Is. 1. – P. 51-90. – DOI: 10.1016/S0079-6107(00)00002-X.
85. Oliveira C.S., Turchiello R., Kowaltowski A.J., Indig G.L., Baptista M.S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2011. – Vol. 51. – Is. 4. – P. 824-833. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023.
86. Benov L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions // *Med Princ Pract*. – 2015. – Vol. 24. – P. 14-28. – DOI: 10.1159/000362416.
87. Roberts W. G., Berns M.W. *In vitro* photosensitization I. Cellular uptake and subcellular localization of mono-L-aspartyl chlorin e6, chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine, and photofrin II // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 1989. – Vol. 9. – Is. 2. – P. 90-101. – DOI: 10.1002/lsm.1900090203.
88. Leach M.W., Higgins R.J., Autry S.A., Boggan J.E., Lee S.-J. H., Smith K.M. *In vitro* photodynamic effects of lysyl chlorin p6: cell survival, localization and

- ultrastructural changes // *Photochemistry and Photobiology*. – 1993. – Vol. 58. – Is. 5. – P. 653-660. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1993.tb04948.x.
89. Scully A.D., Ostler R.B., MacRobert A.J., de Lara C., O'Neill P., Phillips D. Laser line-scanning confocal fluorescence imaging of the photodynamic action of aluminum and zinc phthalocyanines in V79-4 Chinese hamster fibroblasts // *Photochemistry and Photobiology*. – 1998. – Vol. 68 (2). – P. 199-204.
90. Scourides P.A., Böhmer R.M., Kaye A.H., Morstyn G. Nature of the tumor-localizing components of hematoporphyrin derivative // *Cancer Research*. – 1987. – Vol. 47 (13). – P. 3439-3445.
91. Berg, K., Moan J. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer // *Photochemistry and Photobiology*. – 1997. – Vol. 65. – № 3. – P. 403-409. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb08578.x.
92. Dummin H., Cernay Th., Zimmermann H.W. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn(II)phthalocyanines with lipophilic side-chains // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1997. – Vol. 37. – Is. 3. – P. 219-229. – DOI: 10.1016/S1011-1344(96)07416-7.
93. Teiten M.-H., Bezdetnaya L., Morlière P., Santus R., Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan<sup>®</sup> localisation in cultured tumour cells // *British Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 88. – P. 146-152. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6600664.
94. Sasaki I., Brégier F., Chemin G., Daniel J., Couvez J., Chkair R., Vaultier M., Sol V., Blanchard-Desce M. Hydrophilic Biocompatible Fluorescent Organic Nanoparticles as Nanocarriers for Biosourced Photosensitizers for Photodynamic Therapy // *Nanomaterials*. – 2024. – Vol. 14(2). – P. 216. – DOI: 10.3390/nano14020216.
95. Gradova M.A., Gradov O.V., Lobanov A.V., Bychkova A.V., Nikolskaya E.D., Yabbarov N.G., Mollaeva M.R., Egorov A.E., Kostyukov A.A., Kuzmin V.A., Khudyaeva I.S., Belykh D.V. Characterization of a Novel Amphiphilic Cationic Chlorin Photosensitizer for Photodynamic Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2003. – Vol. 24 (1). – P. 345. – DOI: 10.3390/ijms24010345.

96. Gallagher E., Zelenko Z., Neel B. et al. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 36. – P. 6462–6471.
97. He B, Yang Q. Recent Development of LDL-Based Nanoparticles for Cancer Therapy // *Pharmaceuticals*. – 2023. – Vol. 16(1). – DOI: 10.3390/ph16010018.
98. Hastings R.H., Wright R., Albertine K.H., Ciriales R., Matthay A. Effect of endocytosis inhibitors on alveolar clearance of albumin, immunoglobulin G, and SP-A in rabbits // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 1994. – Vol. 266. – Is. 5. – P. L544-L552. – DOI: 10.1152/ajplung.1994.266.5.L544.
99. Kessel D. The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1992. – Vol. 14. – Is. 3. – P. 261-262. – DOI: 10.1016/1011-1344(92)85103-2.
100. Mojzisova H., Bonneau S., Vever-Bizet C., Brault D. Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 2007. – Vol. 1768. – Is. 11. – P. 2748-2756. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.002.
101. Berg K., Bommer J.C., Winkelman J.W., Moan J. Cellular uptake and relative efficiency in cell inactivation by photo activated sulfonated meso-tetraphenylporphines // *Photochemistry and Photobiology*. – 1990. – Vol. 52. – Is. 4. – P. 775-781.
102. Morton C.A., McKenna K.E., Rhodes L.E. Guidelines for topical photodynamic therapy: update // *British Journal of Dermatology*. – 2008. – Vol. 159. – Is. 6. – P. 1245-1266. – DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08882.x.
103. Allison R.R., Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms // *Clinical Endoscopy*. – 2013. – Vol. 46 (1). – P. 24-29. – DOI: 10.5946/ce.2013.46.1.24.
104. Chen B., Pogue B.W., Hoopes P.J., Hasan T. Vascular and Cellular Targeting for Photodynamic Therapy // *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Eukaryotic Gene Expression*. – 2006. – Vol. 16. – Is. 4. – P. 279-306. – DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v16.i4.10.
105. Mang T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2004. – Vol. 1. – Is. 1. – P. 43-48.

106. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2005. – Vol. 2. – Is. 2. – P. 91-106. – DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00060-8.
107. Alekseeva P., Makarov V., Efendiev K., Shiryaev A., Reshetov I., Loschenov V. Devices and Methods for Dosimetry of Personalized Photodynamic Therapy of Tumors: A Review on Recent Trends // *Cancers*. – 2004. – Vol. 16 (13). – P. 2484.
108. Rizvi I., Anbil S., Alagic N., Celli J.P., Zheng L.Z., Palanisami A., Glidden M.D., Pogue B.W., Hasan T. PDT dose parameters impact tumoricidal durability and cell death pathways in a 3D ovarian cancer model // *Photochemistry and Photobiology*. – 2013. – Vol. 89. – Is. 4. – P. 942-952. – DOI: 10.1111/php.12065.
109. Kessel D., Oleinick N.L. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update // *Photochemistry and Photobiology*. – 2018. – Vol. 94. – Is. 2. – P. 213-218. – DOI: 10.1111/php.12857.
110. Mishchenko T., Balalaeva I., Gorokhova A., Vedunova M., Krysko D.V. Which cell death modality wins the contest for photodynamic therapy of cancer? // *Cell Death & Disease*. – 2022. – Vol. 13. – P. 455. – DOI: 10.1038/s41419-022-04851-4.
111. Donohoe C., Senge M.O., Arnaut L.G., Gomes-da-Silva L.C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2019. – Vol. 1872. – Is. 2. – P. 188308. – DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.07.003.
112. Plaetzer K., Kiesslich T., Verwanger T., Krammer B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview // *Medical Laser Application*. – 2003. – Vol. 18. – Is. 1. – P. 7-19. – DOI: 10.1078/1615-1615-00082.
113. Moor A.C.E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2000. – Vol. 57. – Is. 1. – P. 1-13. – DOI: 10.1016/S1011-1344(00)00065-8.
114. Yaqoob M.D., Xu L., Li C., Leong M.M.L., Xu D.D. Targeting mitochondria for cancer photodynamic therapy // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2022. – Vol. 38. – P. 102830. – DOI: 10.1016/j.pdpdt.2022.102830.

115. Yorimitsu T., Klionsky D. Autophagy: molecular machinery for self-eating // *Cell death and differentiation*. – 2005. – Vol. 12. – P. 1542-1552.
116. Kessel D., Graça M., Vicente H., Reiners J.J. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2006. – Vol. 38. – Is. 5. – P. 482-488. – DOI: 10.1002/lsm.20334.
117. Reiners J.J. Jr., Agostinis P., Berg K., Oleinick N.L., Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy // *Autophagy*. – 2010. – Vol. 6 (1). – P. 7-18. – DOI: 10.4161/auto.6.1.10220.
118. Donohoe C., Senge M.O., Arnaut L.G., Gomes-da-Silva L.C. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2019. – Vol. 1872. – Is. 2. – P. 188308.
119. Zhou Y., Liu L., Tao S., Yao Y., Wang Y., Wei Q., Shao A., Deng Y. Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer // *Pharmacological Research*. – 2021. – Vol. 163. – P. 105299. – DOI: 10.1016/j.phrs.2020.105299.
120. Soriano J., Mora-Espí I., Alea-Reyes M.E., Pérez-García L., Barrios L., Ibáñez E., Nogués C. Cell Death Mechanisms in Tumoral and Non-Tumoral Human Cell Lines Triggered by Photodynamic Treatments: Apoptosis, Necrosis and Parthanatos // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 41340. – DOI: 10.1038/srep41340.
121. Friedmann Angeli J.P., Krysko D.V., Conrad M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion // *Nature Reviews Cancer*. – 2019. – Vol. 9. – P. 405-414. – DOI: 10.1038/s41568-019-0149-1.
122. Huang Y., Li X., Zhang Z., Xiong L., Wang Y., Wen Y. Photodynamic Therapy Combined with Ferroptosis Is a Synergistic Antitumor Therapy Strategy // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15 (20). – P. 5043. – DOI: 10.3390/cancers15205043.
123. Kessel D. Paraptosis and Photodynamic Therapy: A Progress Report // *Photochemistry and Photobiology*. – 2020. – Vol. 96. – Is. 5. – P. 1096-1100.
124. Garrido-Armas M., Corona J.C., Escobar M.L., Torres L., Ordóñez-Romero F., Hernández-Hernández A., Arenas-Huertero F. Paraptosis in human glioblastoma cell line induced by curcumin // *Toxicology in Vitro*. – 2018. – Vol. 51. – P. 63-73.

125. Chang L.-C., Chiang S.-K., Chen S.-E., Hung M.-C. Exploring paraptosis as a therapeutic approach in cancer treatment // *Journal of Biomedical Science*. – 2024. – Vol. 31. – P. 101. – DOI: 10.1186/s12929-024-01089-4.
126. Pierroz V., Rubbiani R., Gentili C., Patra M., Mari C., Gasser G., Ferrari S. Dual mode of cell death upon the photo-irradiation of a RuII polypyridyl complex in interphase or mitosis // *Chemical Science (RSC Publishing)*. – 2016. – Vol. 7. – P. 6115-6124. – DOI: 10.1039/C6SC00387G.
127. Abel C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT) // *Photochemical & Photobiological*. – 2004. – Vol. 3. – P. 765-771.
128. Wang W., Moriyama L.T., Bagnato V.S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT // *Laser Physics Letters*. – 2013. – Vol. 10. – DOI: 10.1088/1612-2011/10/2/023001.
129. Huang Z., Xu H., Meyers A.D., Musani A.I., Wang L., Tagg R., Barqawi A.B., Chen Y.K. Photodynamic Therapy for Treatment of Solid Tumors — Potential and Technical Challenges // *Technology in Cancer Research & Treatment*. – 2008. – Vol. 7 (4). – P. 309-320. – DOI: 10.1177/153303460800700405.
130. Tan L., Shen X., He Z., Lu Y. The Role of Photodynamic Therapy in Triggering Cell Death and Facilitating Antitumor Immunology // *Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*. – 2022. – Vol. 12. – DOI: 10.3389/fonc.2022.863107.
131. Reginato E., Wolf P., Hamblin M.R. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects // *World Journal of Immunology*. – 2014. – Vol. 4 (1). – P. 1-11. – DOI: 10.5411/wji.v4.i1.1.
132. Falk-Mahapatra R., Gollnick S.O. Photodynamic Therapy and Immunity: An Update // *Photochemistry and Photobiology*. – 2020. – Vol. 96. – Is. 3. – P. 550-559.
133. Crous A., Abrahamse H. Photodynamic therapy of lung cancer, where are we? // *Frontiers in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 13. – DOI: 10.3389/fphar.2022.932098.
134. Sun W., Zhang Q., Wang X., Jin Z., Cheng Y., Wang G. Clinical Practice of Photodynamic Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer in Different Scenarios: Who Is the Better Candidate? // *Respiration*. – 2024. – Vol. 103 (4). – P. 193-204.

135. Griffin L.L., Lear J.T. Photodynamic Therapy and Non-Melanoma Skin Cancer // *Cancers*. – 2016. – Vol. 8 (10). – DOI: 10.3390/cancers8100098.
136. Yano T., Minamide T., Takashima K., Nakajo K., Kadota T., Yoda Y. Clinical Practice of Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium for Esophageal Cancer // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – Vol. 10 (13). – DOI: 10.3390/jcm10132785.
137. Lee T.Y., Cheon Y.K., Shim C.S. Current Status of Photodynamic Therapy for Bile Duct Cancer // *Clinical Endoscopy*. – 2013. – Vol. 46 (1). – P. 38-44.
138. Razlog R., Kruger C.A., Abrahamse H. Enhancement of Conventional and Photodynamic Therapy for Treatment of Cervical Cancer with Cannabidiol // *Integrative Cancer Therapies (ICT)*. – 2022. – Vol. 21. – DOI: 10.1177/15347354221092706.
139. Czarnecka-Czapczyńska M., Aebisher D., Oleś P., Sosna B., Krupka-Olek M., Dynarowicz K., Latos W., Cieślak G., Kawczyk-Krupka A. The role of photodynamic therapy in breast cancer – A review of *in vitro* research // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – Vol. 144. – P. 112342. – DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112342.
140. Rahman K.M., Giram P., Foster B.A., You Y. Photodynamic Therapy for Bladder Cancers, A Focused Review // *Photochemistry and Photobiology*. – 2022. – Vol. 99. – Is. 2. – P. 420-436. – DOI: 10.1111/php.13726.
141. Wildeman M., Nyst H.J., Karakullukcu B., Tan B.I. Photodynamic therapy in the therapy for recurrent/persistent nasopharyngeal cancer // *Head & Neck Oncology*. – 2009. – Vol. 1. – Is. 40. – DOI: 10.1186/1758-3284-1-40.
142. Kazemi K.S., Kazemi P., Mivehchi H., Nasiri K., Hoseini S.S.E., Nejati S.T., Bahrami P.P., Golestani S., Afjadi M.N. Photodynamic Therapy: A Novel Approach for Head and Neck Cancer Treatment with Focusing on Oral Cavity // *Biological Procedures Online*. – 2024. – Vol. 26. – Is. 25. – DOI: 10.1186/s12575-024-00252-3.
143. Gu B., Wang B., Li X., Feng Z., Ma C., Gao L., Yu Y., Zhang J., Zheng P. Wang Y., Li H., Zhang T., Chen H. Photodynamic therapy improves the clinical efficacy of advanced colorectal cancer and recruits immune cells into the tumor immune microenvironment // *Sec. Cancer Immunity and Immunotherapy*. – 2022. – Vol. 13. – DOI: 10.3389/fimmu.2022.1050421.

144. Alvarez N., Sevilla A. Current Advances in Photodynamic Therapy (PDT) and the Future Potential of PDT-Combinatorial Cancer Therapies // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25 (2). – DOI: 10.3390/ijms25021023.
145. Mal'shakova M.V., Pylina Y.I., Belykh D.V. Novel Hydrophilic Conjugates of Chlorin e6 with Fructose: Synthesis and Estimation of Photodynamic Activity // *Macroheterocycles.* – 2023. – Vol. 16 (3). – P. 204-210. – DOI: 10.6060/mhc235221b.
146. Mal'shakova M.V., Pylina Y.I., Belykh D.V. Novel hydrophilic galactose-conjugated chlorin e6 derivatives for photodynamic therapy and fluorescence imaging // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2019. – Vol. 29. – Is. 16. – P. 2064-2069.
147. Koifman O., Hanack M., Syrbu S., Lyubimtsev A. Phthalocyanine conjugates with carbohydrates: synthesis and aggregation in aqueous solutions // *Russian chemical bulletin.* – 2013. – Vol. 62. – P. 896-917. – DOI: 10.1007/s11172-013-0121-2.
148. Ranyuk E., Cauchon N., Klarskov K., Guérin B., van Lier J.E. Phthalocyanine–Peptide Conjugates: Receptor-Targeting Bifunctional Agents for Imaging and Photodynamic Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2013. – Vol. 56. – Is. 4. – P. 1520–1534. – DOI: 10.1021/jm301311c.
149. Caterino M., D'Aria F., Kustov A.V., Belykh D.V., Khudyaeva I.S., Starseva O.M., Berezin D.B., Pylina Y.I., Usacheva T., Amato J., Giancola C. Selective binding of a bioactive porphyrin-based photosensitizer to the G-quadruplex from the *KRAS* oncogene promoter // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020. – Vol. 145. – P. 244-251. – DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.152.
150. Svenskaya Yu.I., Pavlov A.M., Gorin D.A., Gould D.J., Parakhonskiy B.V., Sukhorukov G.B. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2016. – Vol. 146. – P. 171-179. – DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.090.
151. Svenskaya Yu., Parakhonskiy B., Haase A., Atkin V., Lykhanets E., Gorin D., Antolini R. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer // *Biophysical Chemistry.* – 2013. – Vol. 182. – P. 11-15. – DOI: 10.1016/j.bpc.2013.07.006.

152. Bucharskaya A.B., Genina E.A., Bashkatov A.N., Terentyuk G.S., Navolokin N.A., Maslyakova G.N., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Tuchin V.V. Morphological changes in transplanted sarcoma S45 at photodynamic therapy using nanocomposites based on gold nanorods // *Izvestiya of Saratov University. Physics.* – 2015. – Vol. 15. – Is. 4. – P. 22-27. – DOI: 10.18500/1817-3020-2015-15-4-22-27.
153. Belik A.Yu., Rybkin A.Yu., Goryachev N.S., Sadkov A.P., Filatova N.V., Buyanovskaya A.G., Talanova V.N., Klemenkova Z.S., Romanova V.S., Loifman M.O., Terentiev A.A., Kotelnikov A.I. Nanoparticles of water-soluble dyads based on amino acid fullerene C60 derivatives and pyropheophorbide: Synthesis, photophysical properties, and photodynamic activity // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* – 2021. – Vol. 260. – DOI: 10.1016/j.saa.2021.119885.
154. Millard M., Yakavets I., Piffoux M., Brun A., Gazeau F., Guigner J.M., Bezdetnaya, L. mTHPC-loaded extracellular vesicles outperform liposomal and free mTHPC formulations by an increased stability, drug delivery efficiency and cytotoxic effect in tridimensional model of tumors // *Drug Delivery.* – 2018. – Vol. 25 (1). – P. 1790–1801.
155. Lara P., Huis in 't Veld R.V., Jorquera-Cordero C., Chan A.B., Ossendorp F., Cruz L.J. Zinc-Phthalocyanine-Loaded Extracellular Vesicles Increase Efficacy and Selectivity of Photodynamic Therapy in Co-Culture and Preclinical Models of Colon Cancer // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13 (10). – DOI: 10.3390/pharmaceutics13101547.
156. Cheng H., Fan J.-H., Zhao L.-P., Fan G.-L., Zheng R.-R., Qiu X.-Z., Yu X.-Y., Li S.-Y., Zhang X.-Z. Chimeric peptide engineered exosomes for dual-stage light guided plasma membrane and nucleus targeted photodynamic therapy // *Biomaterials.* – 2019. – Vol. 211. – P. 14-24. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.05.004.
157. Blaudszun A.-R., Kim W.J., Um W., Yoon H.Y., Shim M.K., Kim K. Adoptive Transfer of Photosensitizer-Loaded Cytotoxic T Cells for Combinational Photodynamic Therapy and Cancer Immuno-Therapy. *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15(4).
158. Christie C., Madsen S.J., Peng Q., Hirschberg H. Macrophages as a photosensitizer delivery system for photodynamic therapy: Potential for the local treatment of resected glioblastoma // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* – 2024. – Vol. 45. – DOI: 10.1016/j.pdpdt.2023.103897.

159. Hanley T., Vankayala R., Lee C.-H., Tang J.C., Burns J.M., Anvari B. Phototheranostics Using Erythrocyte-Based Particles // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – № 5. – P. 729. – DOI: 10.3390/biom11050729.
160. Li X., Kim C., Shin J.M., Lee D., Kim G., Chung H.-M., Hong K.-S., Yoon J. Mesenchymal stem cell-driven activatable photosensitizers for precision photodynamic oncotherapy // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 187. – P. 18-26.
161. Mikolajewska P., Donnelly R.F., Garland M.J., Morrow D.I.J., Singh T.R.R., Iani V., Moan J., Juzeniene A. Microneedle Pre-treatment of Human Skin Improves 5-Aminolevulinic Acid (ALA)- and 5-Aminolevulinic Acid Methyl Ester (MAL)-Induced PpIX Production for Topical Photodynamic Therapy Without Increase in Pain or Erythema // *Pharmaceutical Research*. – 2010. – Vol. 27. – P. 2213–2220.
162. Zhu D.D., Wang Q.L., Liu X.B., Guo X.D. Rapidly separating microneedles for transdermal drug delivery // *Acta Biomaterialia*. – 2016. – Vol. 41. – P. 312-319.
163. Guo X., Jin H., Lo P.-C. Encapsulating an acid-activatable phthalocyanine–doxorubicin conjugate and the hypoxia-sensitive tirapazamine in polymeric micelles for multimodal cancer therapy // *Biomaterials Science*. – 2021. – Vol. 9. – № 14. – P. 4936-4951. – DOI: 10.1039/D1BM00443C.
164. Xiong J., Chu J.C.H., Fong W.-P., Ng D.K.P. Specific Activation of Photosensitizer with Extrinsic Enzyme for Precise Photodynamic Therapy // *Journal of the American Chemical Society*. – 2022. – Vol. 144. – № 23. – P. 10647-10658.
165. Miao J., Huo Y., Yao G., Feng Y., Weng J., Zhao W., Guo W. Heavy Atom-Free, Mitochondria-Targeted, and Activatable Photosensitizers for Photodynamic Therapy with Real-Time In-Situ Therapeutic Monitoring // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2022. – Vol. 61. – Is. 25. – DOI: 10.1002/anie.202201815.
166. He H., Lo P.-C., Ng D.K.P. A Glutathione-Activated Phthalocyanine-Based Photosensitizer for Photodynamic Therapy // *Chemistry – A European Journal*. – 2014. – Vol. 20. – Is. 21. – P. 6241-6245. – DOI: 10.1002/chem.201400001.
167. Wang C., Wang S., Wang Y., Wu H., Bao K., Sheng R., Li X. Microenvironment-triggered dual-activation of a photosensitizer- fluorophore conjugate for tumor specific imaging and photodynamic therapy // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10.

168. Sun B., Chang R., Cao S., Yuan C., Zhao L., Yang H., Li J., Yan X., van Hest J.C.M. Acid-Activatable Transmorphic Peptide-Based Nanomaterials for Photodynamic Therapy // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2020. – Vol. 59. – Is. 46. – P. 20582-20588. – DOI: 10.1002/anie.202008708.
169. Wei R., Dong Y., Tu Y., Luo S., Pang X., Zhang W., Yao W., Tang W., Yang H., Wei X., Jiang X., Yuan Y., Yang R. Bioorthogonal Pretargeting Strategy for Anchoring Activatable Photosensitizers on Plasma Membranes for Effective Photodynamic Therapy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2021. – Vol. 13. – Is. 12. – P. 14004–14014.
170. Linden G., Vázquez O. Bioorthogonal Turn-On BODIPY-Peptide Photosensitizers for Tailored Photodynamic Therapy // *Chemistry – A European Journal*. – 2020. – Vol. 26. – Is. 44. – P. 10014-10023. – DOI: 10.1002/chem.202001718.
171. Zhou Y., Wong R.C.H., Dai G., Ng D.K.P. A bioorthogonally activatable photosensitiser for site-specific photodynamic therapy // *Chemical Communications (RSC Publishing)*. – 2020. – Vol. 56. – Is. 7. – P. 1078-1081.
172. Chen J., Stefflova K., Niedre M.J., Wilson B.C., Chance B., Glickson J.D., Zheng G. Protease-Triggered Photosensitizing Beacon Based on Singlet Oxygen Quenching and Activation // *Journal of the American Chemical Society*. – 2004. – Vol. 126. – Is. 37. – P. 11450–11451. – DOI: 10.1021/ja047392k.
173. Niu H., Liu J., O'Connor H.M., Gunnlaugsson T., James T.D., Zhang H. Photoinduced electron transfer (PeT) based fluorescent probes for cellular imaging and disease therapy // *Chemical Society Reviews (RSC Publishing)*. – 2023. – Vol. 52. – Is. 7. – P. 2322-2357. – DOI: 10.1039/D1CS01097B.
174. Hu F., Xu S., Liu B. Photosensitizers with Aggregation-Induced Emission: Materials and Biomedical Applications // *Advanced Materials*. – 2018. – Vol. 30. – Is. 45.
175. Mou J., Lin T., Huang F., Chen H., Shi J. Black titania-based theranostic nanoplatform for single NIR laser induced dual-modal imaging-guided PTT/PDT // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 84. – P. 13-24. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.009.
176. Yang T., Liu L., Deng Y., Guo Z., Zhang G., Ge Z., Ke H., Chen H. Ultrastable Near-Infrared Conjugated-Polymer Nanoparticles for Dually Photoactive Tumor Inhibition // *Advanced Materials*. – 2017. – Vol. 29. – Is. 31.

177. Zhao W., Jun Hou Y., Song Wang X., Zhang B.W., Cao Y., Yang R., Wang W.B., Xiao X.R. Study on squarylium cyanine dyes for photoelectric conversion// Solar Energy Materials and Solar Cells. – 1999. – Vol. 58. – № 2. – P. 173-183.
178. Burke A., Schmidt-Mende L., Ito S., Grätzel M. A novel blue dye for near-IR ‘dye-sensitised’ solar cell applications // Chemical Communications (RSC Publishing). – 2007.– Is. 3. – P. 234-236. – DOI: 10.1039/B609266G.
179. Inoue T., Pandey S.S., Fujikawa N., Yamaguchi Y., Hayase S. Synthesis and characterization of squaric acid based NIR dyes for their application towards dye-sensitized solar cells// Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2010. – Vol. 213. – № 1. – P. 23-29. – DOI: 10.1016/j.jphotochem.2010.04.015.
180. Arnaut L.G., Pereira M.M., Dąbrowski J.M., Silva E.F.F., Schaberle F.A., Abreu A.R., Rocha L.B., Barsan M.M., Urbańska K., Stochel G., Brett Ch.M.A. Photodynamic Therapy Efficacy Enhanced by Dynamics: The Role of Charge Transfer and Photostability in the Selection of Photosensitizers // Chemistry – A European Journal. – 2014. – Vol. 20. – Is. 18. – P. 5346-5357. – DOI: 10.1002/chem.201304202.
181. Chatterjee D.K., Yong Z. Upconverting Nanoparticles as Nanotransducers for Photodynamic Therapy in Cancer Cells // Nanomedicine. – 2008. – Vol. 3. – Is. 1. – P. 73-82. – DOI: 10.2217/17435889.3.1.73.
182. Wang C., Tao H., Cheng L., Liu Z. Near-infrared light induced *in vivo* photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles// Biomaterials. – 2011. – Vol. 32. – № 26. – P. 6145-6154. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.007.
183. Ogawa K., Kobuke Y. Two-Photon Photodynamic Therapy by Water-Soluble Self-Assembled Conjugated Porphyrins // BioMed Research International. – 2012. – Vol. 2013. – Is. 1. – DOI: 10.1155/2013/125658.
184. Starkey J.R., Rebane A.K., Drobizhev M.A., Meng F., Gong A., Elliott A., McInnerney K., Spangler C.W. New Two-Photon Activated Photodynamic Therapy Sensitizers Induce Xenograft Tumor Regressions after Near-IR Laser Treatment through the Body of the Host Mouse // Clinical Cancer Research. – 2008. – Vol. 14 (20). – P. 6564–6573. – DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4162.

185. Rosenthal I., Sostaric J.Z., Riesz P. Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2004. – Vol. 11. – Is. 6. – P. 349-363. – DOI: 10.1016/j.ultsonch.2004.03.004.
186. Hachimine K., Shibaguchi H., Kuroki M., Yamada H., Kinugasa T., Nakae Y., Asano R., Sakata I., Yamashita Y., Shirakusa T., Kuroki M. Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I), which is devoid of photosensitivity // *Cancer Science*. – 2007. – Vol. 98 (6).
187. Ma L., Zou X., Chen W. A New X-Ray Activated Nanoparticle Photosensitizer for Cancer Treatment // *Journal of Biomedical Nanotechnology*. – 2014. – Vol. 10. – Is. 8. – P. 1501-1508. – DOI: 10.1166/jbn.2014.1954.
188. Souris J.S., Leoni L., Zhang H.J., Pan A., Tanios E., Tsai H.-M., Balyasnikova I.V., Bissonnette M., Chen C.-T. X-ray Activated Nanoplatforms for Deep Tissue Photodynamic Therapy // *Nanomaterials*. – 2023. – Vol. 13 (4).
189. Ran C., Zhang Z., Hooker J., Moore A. *In Vivo* Photoactivation Without “Light”: Use of Cherenkov Radiation to Overcome the Penetration Limit of Light // *Molecular Imaging and Biology*. – 2012. – Vol. 14. – P. 156-162.
190. Hu Y., Wang K., Zhu T.C. A light blanket for intraoperative photodynamic therapy // *Proceedings*. – 2009. – Vol. 7380. – DOI: 10.1117/12.823064.
191. Lee L.K., Whitehurst C., Pantelides M.L., Moore J.V. An interstitial light assembly for photodynamic therapy in prostatic carcinoma // *BJU International*. – 1999. – Vol. 84 (7). – P. 821-827. – DOI: 10.1046/j.1464-410x.1999.00314.x.
192. Mordon S. New optical sources for interstitial and metronomic photodynamic therapy / S. Mordon // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2018. – Vol. 23. – P. 209-211. – DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.07.002.
193. Zheng D.-W., Li B., Li C.-X., Fan J.-X., Lei Q., Li C., Xu Z., Zhang X.-Z. Carbon-Dot-Decorated Carbon Nitride Nanoparticles for Enhanced Photodynamic Therapy against Hypoxic Tumor via Water Splitting // *ACS Nano*. – 2016. – Vol. 10. – Is. 9. – P. 8715–8722. – DOI: 10.1021/acsnano.6b04156.
194. Kim J., Cho H.R., Jeon H., Kim D., Song C., Lee N., Choi S.H., Hyeon T. Continuous O<sub>2</sub>-Evolving MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle-Anchored Mesoporous Silica

- Nanoparticles for Efficient Photodynamic Therapy in Hypoxic Cancer // *Journal of the American Chemical Society*. – 2017. – Vol. 139. – Is. 32. – P. 10992–10995.
195. Ren H., Liu J., Li Y., Wang H., Ge S., Yuan A., Hu Y., Wu J. Oxygen self-enriched nanoparticles functionalized with erythrocyte membranes for long circulation and enhanced phototherapy // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – Vol. 59. – P. 269-282.
196. Kaneda M.M., Caruthers S., Lanza G.M., Wickline S.A. Perfluorocarbon Nanoemulsions for Quantitative Molecular Imaging and Targeted Therapeutics // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2009. – Vol. 37. – P. 1922-1933.
197. Cheng Y., Cheng H., Jiang C., Qiu X., Wang K., Huan W., Yuan A., Wu J., Hu Y. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – DOI: 10.1038/ncomms9785.
198. Sun Q., Bi H., Wang Z., Li C., Wang C., Xu J., Yang D., He F., Gai S., Yang P. O<sub>2</sub>-Generating Metal–Organic Framework-Based Hydrophobic Photosensitizer Delivery System for Enhanced Photodynamic Therapy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2019. – Vol. 11. – Is. 40. – P. 36347–36358. – DOI: 10.1021/acsami.9b11607.
199. Gao S., Zheng P., Li Z., Feng X., Yan W., Chen S., Guo W., Liu D., Yang X., Wang S., Liang X.-J., Zhang J. Biomimetic O<sub>2</sub>-Evolving metal-organic framework nanoplatforM for highly efficient photodynamic therapy against hypoxic tumor // *Biomaterials*. – 2018. – Vol. 178. – P. 83-94. – DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.007.
200. Tang W., Zhen Z., Wang M., Wang H., Chuang Y.-J., Zhang W., Wang G.D., Todd T., Cowger T., Chen H., Liu L., Li Z., Xie J. Red Blood Cell-Facilitated Photodynamic Therapy for Cancer Treatment // *Advanced Functional Materials*. – 2016. – Vol. 26. – Is. 11. – P. 1757-1768. – DOI: 10.1002/adfm.201504803.
201. Liu W.-L., Liu T., Zou M.-Z., Yu W.-Y., Li C.-X., He Z.-Y., Zhang M.-K., Liu M.-D., Li Z.-H., Feng J., Zhang X.-Z. Aggressive Man-Made Red Blood Cells for Hypoxia-Resistant Photodynamic Therapy // *Advanced Materials*. – 2018. – Vol. 30. – Is. 35. – P. 1802006. – DOI: 10.1002/adma.201802006.
202. Wang S., Yuan F., Chen K., Chen G., Tu K., Wang H., Wang L.-Q. Synthesis of Hemoglobin Conjugated Polymeric Micelle: A ZnPc Carrier with Oxygen Self-

- Compensating Ability for Photodynamic Therapy // *Biomacromolecules*. – 2015. – Vol. 16. – Is. 9. – P. 2693-2700. – DOI: 10.1021/acs.biomac.5b00571.
203. Zhou T.-J., Xing L., Fan Y.-T., Cui P.-F., Jiang H.-L. Light triggered oxygen-affording engines for repeated hypoxia-resistant photodynamic therapy // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 307. – P. 44-54. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.06.016.
204. Gong H., Chao Y., Xiang J., Han X., Song G., Feng L., Liu J., Yang G., Chen Q., Liu Z. Hyaluronidase To Enhance Nanoparticle-Based Photodynamic Tumor Therapy // *Nano Letters*. – 2016. – Vol. 16. – Is. 4. – P. 2512-2521.
205. Ropponen K., Tammi M., Parkkinen J., Eskelinen M., Tammi R., Lipponen P., Agren U., Alhava E., Kosma V.M. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer // *Cancer Research*. – 1998. – Vol. 58. – Is. 2. – P. 342-347.
206. Tian B., Wang C., Zhang S., Feng L., Liu Z. Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5. – Is. 9. – P. 7000-7009. – DOI: 10.1021/nn201560b.
207. Xiao Q., Zheng X., Bu W., Ge W., Zhang S., Chen F., Xing H., Ren Q., Fan W., Zhao K., Hua Y., Shi J. A Core/Satellite Multifunctional Nanotheranostic for *in Vivo* Imaging and Tumor Eradication by Radiation/Photothermal Synergistic Therapy // *Journal of the American Chemical Society*. – 2013. – Vol. 135. – № 35. – P. 13041-13048.
208. Feng L., Tao D., Dong Z., Chen Q., Chao Y., Liu Z., Chen M. Near-infrared light activation of quenched liposomal Ce6 for synergistic cancer phototherapy with effective skin protection // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 127. – P. 13-24.
209. Ju E., Dong K., Chen Z., Liu Z., Liu C., Huang Y., Wang Z., Pu F., Ren J., Qu X. Copper(II)–Graphitic Carbon Nitride Triggered Synergy: Improved ROS Generation and Reduced Glutathione Levels for Enhanced Photodynamic Therapy // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2016. – Vol. 55. – Is. 38. – P. 11467-11471.
210. Speisky H., Gómez M., Carrasco-Pozo C., Pastene E., Lopez-Alarcón C., Olea-Azar C. Cu(I)–Glutathione complex: A potential source of superoxide radicals generation // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 16. – Vol. 16. – Is. 13. – P. 6568-6574. – DOI: 10.1016/j.bmc.2008.05.026.

211. Liu Y., Zhou Z., Liu Y., Li Y., Huang Y., Qian C., Sun M. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated oxidative stress amplifier capable of GSH scavenging for enhancing tumor photodynamic therapy // *Biomaterials Science*. – 2019. – Vol. 7. – Is. 12. – P. 5359-5368.
212. Zhao L., Li J., Su Y., Yang L., ... Zhao Y. MTH1 inhibitor amplifies the lethality of reactive oxygen species to tumor in photodynamic therapy // *Science Advances*. – 2020. – Vol. 6. – Is. 10. – DOI: 10.1126/sciadv.aaz0575.
213. Lv Z., Wei H., Li Q., Su X., Liu S., Zhang K.Y., Lv W., Zhao Q., Li X., Huang W. Achieving efficient photodynamic therapy under both normoxia and hypoxia using cyclometalated Ru(II) photosensitizer through type I photochemical process // *Chemical Science*. – 2018. – Vol. 9. – Is. 2. – P. 502-512. – DOI: 10.1039/c7sc03765a.
214. Wu W., Zhao J., Guo H., Sun J., Ji S., Wang Z. Long-Lived Room-Temperature Near-IR Phosphorescence of BODIPY in a Visible-Light-Harvesting N<sup>C</sup>N Pt(II)-Acetylide Complex with a Directly Metalated BODIPY Chromophore // *Chemistry – A European Journal*. – 2012. – Vol. 18. – Is. 7. – P. 1961-1968.
215. Sun J., Wu W., Guo H., Zhao J. Visible-Light Harvesting with Cyclometalated Iridium(III) Complexes Having Long-Lived <sup>3</sup>IL Excited States and Their Application in Triplet-Triplet-Annihilation Based Upconversion // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2011. – Vol. 2011. – Is. 21. – P. 3165-3173. – DOI: 10.1002/ejic.201100501.
216. La Porte N.T., Martinez J.F., Hedström S., Rudshteyn B., Phelan B.T., Mauck C.M., Young R.M., Batista V.S., Wasielewski M.R. Photoinduced electron transfer from rylenediimide radical anions and dianions to Re(bpy)(CO)<sub>3</sub> using red and near-infrared light // *Chemical Science*. – 2017. – Vol. 8. – № 5. – P. 3821-3831.
217. Teng K.-X., Niu L.-Y., Xie N., Yang Q.-Z. Supramolecular photodynamic agents for simultaneous oxidation of NADH and generation of superoxide radical // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – DOI: 10.1038/s41467-022-33924-3.
218. Yin Y., Ge X., Ouyang J., Na N. Tumor-activated in situ synthesis of single-atom catalysts for O<sub>2</sub>-independent photodynamic therapy based on water-splitting // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15. – DOI: 10.1038/s41467-024-46987-1.

219. Li M., Gebremedhin K.H., Ma D., Pu Z., Xiong T., Xu Y., Kim J.S., Peng X. Conditionally Activatable Photoredox Catalysis in Living Systems // *Journal of the American Chemical Society*. – 2022. – Vol. 144. – Is. 1. – P. 163-173.
220. Kuzmina N.S., Fedotova E.A., Jankovic P., Gribova G.P., Nyuchev A.V., Fedorov A.Yu. Otvagin V.F. Enhancing Precision in Photodynamic Therapy: Innovations in Light-Driven and Bioorthogonal Activation // *Pharmaceutics*. – 2024. – Vol. 16 (4). – P. 479.
221. Know N., Weng H., Rajora M., Zheng G. Activatable Photosensitizers: From Fundamental Principles to Advanced Designs // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2025. – DOI: 10.1002/anie.202423348.
222. Martynov A.G., Safonova E.A., Tsivadze A.Yu., Gorbunova Yu.G. Functional molecular switches involving tetrapyrrolic macrocycles // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2019. – Vol. 387. – P. 325-347. – DOI: 10.1016/j.ccr.2019.02.004.
223. Nestoros E., Sharma A., Kim E. et al. Smart molecular designs and applications of activatable organic photosensitizers // *Nature Reviews Chemistry*. – 2025. – Vol. 9. – P. 46-60. – DOI: 10.1038/s41570-024-00662-7.
224. Xue E.Y., Yang C., Zhou Y., Ng D.K.P. A Bioorthogonal Antidote Against the Photosensitivity after Photodynamic Therapy // *Advanced Science*. – 2023. – Vol. 11. – Is. 11. – DOI: 10.1002/advs.202306207.
225. Gilaberte Y., Milla L., Salazar N., Vera-Alvarez J., Kourani O., Damian A. Rivarola V., Roca M.J., Espada J., González S., Juarranz A. Cellular Intrinsic Factors Involved in the Resistance of Squamous Cell Carcinoma to Photodynamic Therapy // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2014. – Vol. 134. – Is. 9. – P. 2428-2437.
226. Casas A., Venosa G.D., Hasan T., Batlle Al. Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy // *Current Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 18. – Is. 16. – P. 2486 – 2515. – DOI: 10.2174/092986711795843272.
227. Dąbrowska A., Mastalerz J., Wilczyński B., Osiecka B., Choromańska A. Determinants of Photodynamic Therapy Resistance in Cancer Cells // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25 (22). – DOI: 10.3390/ijms252212069.
228. Lucena S.R., Zamarrón A., Carrasco E. et al. Characterisation of resistance mechanisms developed by basal cell carcinoma cells in response to repeated cycles of

Photodynamic Therapy // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – DOI: 10.1038/s41598-019-41313-y.

229. Gracia-Cazaña T., Salazar N., Zamarrón A., Mascaraque M., Lucena S.R., Juarranz A. Resistance of Nonmelanoma Skin Cancer to Nonsurgical Treatments. Part II: Photodynamic Therapy, Vismodegib, Cetuximab, Intralesional Methotrexate, and Radiotherapy // Actas Dermo-Sifiliográficas. – 2016. – Vol. 107. – Resistencias al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte II. – № 9. – P. 740-750.

230. Luna M.C., Gomer C.J. Isolation and Initial Characterization of Mouse Tumor Cells Resistant to Porphyrin-mediated Photodynamic Therapy // Cancer Research. – 1991. – Vol. 51 (16). – P. 4243–4249.

231. Singh G., Espiritu M., Shen X.Y., Hanlon J.G., Rainbow A.J. *In Vitro* Induction of PDT Resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC Cells by Various Photosensitizers // Photochemistry and Photobiology. – 2001. – Vol. 73 (6). – P. 651-656. – DOI: 10.1562/0031-8655(2001)073<0651:IVIOPR>2.0.CO;2.

232. Milla L.N., Cogno I.S., Rodríguez M.E., Sanz-Rodríguez F., Zamarrón A., Gilaberte Y., Carrasco E., Rivarola V.A., Juarranz Á. Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy // Journal of Cellular Biochemistry. – 2011. – Vol. 112. – Is. 9. – P. 2266-2278. – DOI: 10.1002/jcb.23145.

233. Zamarrón A., Lucena S.R., Salazar N., Sanz-Rodríguez F., Jaén P., Gilaberte Y., González S., Juarranz A. Isolation and characterization of PDT-resistant cancer cells // Photochemical & Photobiological Sciences. – 2015. – Vol. 14. – P. 1378–1389.

234. Olsen C.E., Weyergang A., Edwards V.T., Berg K., Brech A., Weisheit S., Høgset A., Selbo P.K. Development of resistance to photodynamic therapy (PDT) in human breast cancer cells is photosensitizer-dependent: Possible mechanisms and approaches for overcoming PDT-resistance // Biochemical Pharmacology. – 2017. – Vol. 144. – P. 63-77.

235. Rice C.P.J., Chelakkot V.S., Conohan N.T., Hirasawa K. Cancer stem cell populations are resistant to 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy (5-ALA-PDT) // Scientific Reports volume. – 2025. – Vol. 15. – DOI: 10.1038/s41598-025-88173-3.

236. Shen Y., Li M., Sun F., Zhang Y., Qu C., Zhou M., Shen F., Xu L. Low-dose photodynamic therapy-induced increase in the metastatic potential of pancreatic tumor

- cells and its blockade by simvastatin // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2020. – Vol. 207. – DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111889.
237. Uzdensky A., Kolpakova E., Juzeniene A., Juzenas P., Moan J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 2005. – Vol. 1722. – Is. 1. – P. 43-50. – DOI: 10.1016/j.bbagen.2004.11.011.
238. Mokhtari R.B., Homayouni T.S., Baluch N., Morgatskaya E., Kumar S., Das B., Yeger H. Combination therapy in combating cancer // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – P. 38022-38043. – DOI: 10.18632/oncotarget.16723.
239. Hu Q., Sun W., Wang C., Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 98. – P. 19-34. – DOI: 10.1016/j.addr.2015.10.022.
240. Debela D.T., Muzazu S.G.Y., Heraro K.D., Ndalama M.T., Mesele B.W., Haile D.C., Kitui S.K., Manyazewal T. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives // *SAGE Open Medicine*. – 2021. – Vol. 9.
241. Wang H., Luna A., Yan G., Li X., Babur O., Mills G.B., Sander C., Korkut A. Targeting Adaptation to Cancer Treatment by Drug Combinations // *bioRxiv*. – 2021. – DOI: 10.1101/2021.04.14.439861.
242. Jagadeeshan S., Prasad M., Ortiz-Cuaran S., Gregoire V., Saintigny P., Elkabets M. Adaptive Responses to Monotherapy in Head and Neck Cancer: Interventions for Rationale-Based Therapeutic Combinations // *Trends in Cancer*. – 2019. – Vol. 5. – Is. 6. – P. 365-390. – DOI: 10.1016/j.trecan.2019.04.004.
243. Ayoub N.M. Editorial: Novel Combination Therapies for the Treatment of Solid Cancers // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – Vol. 11. – DOI: 10.3389/fonc.2021.708943.
244. Weijer R., Clavier S., Zaal E.A., Pijls M.M.E., van Kooten R.T., Vermaas K., Leen R., Jongejan A., Moerland P.D., van Kampen A.H.C., van Kuilenburg A.B.P., Berkers C.R., Lemeer S., Heger M. Multi-OMIC profiling of survival and metabolic signaling networks in cells subjected to photodynamic therapy // *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. – 2016. – Vol. 74. – № 6. – P. 1133-1151. – DOI: 10.1007/s00018-016-2401-0.

245. Chatterjee N., Bivona T.G. Polytherapy and Targeted Cancer Drug Resistance// Trends in Cancer. – 2019. – Vol. 5. – № 3. – P. 170-182.
246. Lei Z.-N., Tian Q., Teng Q.-X., Wurdell J.N.D., Zeng L., Pan Y., Chen Z.-S. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer // MedComm. – 2023. – Vol. 4. – Is. 3. – DOI: 10.1002/mco2.265.
247. Wołuń-Cholewa M., Szymanowski K., Andrusiewicz M., Warchoń W. Studies on Function of P-Glycoprotein in Photodynamic Therapy of Endometriosis // Photomedicine and Laser Surgery. – 2010. – Vol. 28. – № 6. – P. 735-740. – DOI: 10.1089/pho.2009.2657.
248. Ishikawa T., Nakagawa H., Hagiya Y., Nonoguchi N., Miyatake S., Kuroiwa T. Key Role of Human ABC Transporter ABCG2 in Photodynamic Therapy and Photodynamic Diagnosis // Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 2010. – Is. 1. – DOI: 10.1155/2010/587306.
249. Robey R.W., Steadman K., Polgar O., Bates S.E. ABCG2-mediated transport of photosensitizers: Potential impact on photodynamic therapy // Cancer Biology & Therapy. – 2005. – Vol. 4. – Is. 2. – P. 195-202. – DOI: 10.4161/cbt.4.2.1440.
250. Song C., Heping H., Shen Y., Jin S., Li D., Zhang A., Ren X., Wang K., Zhang L., Wang J., Shi D. AMPK/p38/Nrf2 activation as protective feedback to restrain oxidative stress and inflammation in microglia stimulated with sodium fluoride // Chemosphere. – 2020. – Vol. 244. – P. 125495. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125495.
251. Udomsak W., Kucinska M., Pospieszna J., Dams-Kozłowska H., Chatuphonprasert W., Murias M. Antioxidant Enzymes in Cancer Cells: Their Role in Photodynamic Therapy Resistance and Potential as Targets for Improved Treatment Outcomes // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25 (6). – DOI: 10.3390/ijms25063164.
252. Casas A., Perotti C., Ortel B., Di Venosa G., Saccoliti M., Batlle A., Hasan T. Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells // International Journal of Oncology. – 2006. – Vol. 29 (2). – P. 397-405.
253. Wang H.P., Qian S.Y., Schafer F.Q., Domann F.E., Oberley L.W., Buettner G.R. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-

- induced cell damage of photodynamic therapy // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2001. – Vol. 30. – Is. 8. – P. 825-835. – DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00469-5.
254. Dabrowski M.J., Maeda D., Zebala J., Lu W.D., Mahajan S., Kavanagh T.J., Aktins W.M. Glutathione S-transferase P1-1 expression modulates sensitivity of human kidney 293 cells to photodynamic therapy with hypericin // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – Vol. 449. – Is. 1. – P. 94-103. – DOI: 10.1016/j.abb.2006.02.009.
255. Dolgachev V., Oberley L.W., Huang T.-T., Kraniak J.M., Tainisky M.A., Hanada K., Separovic D. A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2005. – Vol. 332. – Is. 2. – P. 411-417. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.04.141.
256. Granville D.J., Jiang H., An M.T., Levy J.G., McManus M.B., Hunt D.W.C. Bcl-2 overexpression blocks caspase activation and downstream apoptotic events instigated by photodynamic therapy // *British Journal of Cancer*. – 1999. – Vol. 79. – № 1. – P. 95-100.
257. He J., Agarwal M.L., Larkin H.E., Friedman L.R., Xue L., Olelnick N.L. The Induction of Partial Resistance to Photodynamic Therapy by the Protooncogene *BCL-2* // *Photochemistry and Photobiology*. – 1999. – Vol. 64. – Is. 5. – P. 845-852.
258. Rodriguez L., DiVenosa G., Rivas M.A., Juarranz A., Sanz-Rodriguez F., Casas A. Ras-transfected human mammary tumour cells are resistant to photodynamic therapy by mechanisms related to cell adhesion // *Life Sciences*. – 2023. – Vol. 314. – P. 121287.
259. Rodriguez L., DiVenosa G., Batlle A., MacRobert A., Casas A. Response to ALA-based PDT in an immortalised normal breast cell line and its counterpart transformed with the Ras oncogene // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2007. – Vol. 6. – P. 1306-1310. – DOI: 10.1039/b704235c.
260. Singh G., Wilson B.C., Sharkey S.M., Brownman G.P., Deschamps P. Resistance to photodynamic therapy in radiation induced fibrosarcoma-1 and Chinese hamster ovary-multu-drug resistant cells *in vitro* // *Photochemistry and Photobiology*. – 1991. – Vol. 54. – Is. 2. – P. 307-312. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02021.x.
261. Espada J., Galaz S., Sanz-Rodríguez F., Blázquez-Castro A., Stockert J.C., Bagazgoitia L., Jaén P., González S., Cano A., Juarranz A. Oncogenic H-Ras and PI3K signaling can inhibit E-cadherin-dependent apoptosis and promote cell survival after

- photodynamic therapy in mouse keratinocytes // *Journal of Cellular Physiology*. – 2008. – Vol. 219. – Is. 1. – P. 84-93. – DOI: 10.1002/jcp.21652.
262. Xue L.-Y., Qiu Y., He J., Kung H.-J., Oleinick N.L. Etk/Bmx, a PH-domain containing tyrosine kinase, protects prostate cancer cells from apoptosis induced by photodynamic therapy or thapsigargin // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 18. – P. 3391–3398.
263. Chiu S.-M., Xue L.-Y., Usuda J., Azizuddin K., Oleinick N.L. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy // *British Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 89. – P. 1590–1597.
264. Shahmoradi Ghahe S., Kosicki K., Wojewódzka M., Majchrzak B.A., Fogtman A., Iwanicka-Nowicka R., Ciuba A., Koblowska M., Kruszewski M., Tudek B., Speina E. Increased DNA repair capacity augments resistance of glioblastoma cells to photodynamic therapy // *DNA Repair*. – 2021. – Vol. 104.
265. Gallego-Rentero M., Gutiérrez-Pérez M., Fernández-Guarino M., Mascaraque M., Portillo-Esnaola M., Gilaberte Y., Carrasco E., Juarranz Á. TGF $\beta$ 1 Secreted by Cancer-Associated Fibroblasts as an Inductor of Resistance to Photodynamic Therapy in Squamous Cell Carcinoma Cells // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13 (22).
266. Saad M.A., Zhung W., Stanley M.E., Formica S., Grimaldo-Garcia S., Obaid G., Hasan T. Photoimmunotherapy Retains Its Anti-Tumor Efficacy with Increasing Stromal Content in Heterotypic Pancreatic Cancer Spheroids // *Molecular Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 19. – Is. 7. – P. 2549–2563. – DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00260.
267. Xue Q., Wang X., Wang P., Zhang K., Liu Q. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6 // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2015. – Vol. 12. – № 1. – P. 84-91.
268. Hendrickx N., Volanti C., Moens U., Seternes O.M., de Witte P., Vandenheede J.R., Piette J., Agostinis P. Up-regulation of Cyclooxygenase-2 and Apoptosis Resistance by p38 MAPK in Hypericin-mediated Photodynamic Therapy of Human Cancer Cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 52. – P. 52231-52239.
269. Sanovic R., Krammer B., Grumboeck S., Verwanger T. Time-resolved gene expression profiling of human squamous cell carcinoma cells during the apoptosis

- process induced by photodynamic treatment with hypericin // *International Journal of Oncology*. – 2009. – Vol. 35. – Is. 4. – P. 921-939. – DOI: 10.3892/ijoc\_00000407.
270. Ziegler S.A., Loucks C., Madsen S.J., Carper S.W. Heat Shock Protein 27 Protects against Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis and Necrosis in Human Breast Cancer Cells // *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. – 2007. – Vol. 26. – Is. 3. – P. 173-183. – DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v26.i3.20.
271. Rodríguez M.E., Arévalo D.E., Sanabria L.M., Cuello Carrión F.D., Fanelli M.A., Rivarola V.A. Heat shock protein 27 modulates autophagy and promotes cell survival after photodynamic therapy // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2019. – Vol. 18. – P. 546-554. – DOI: 10.1039/c8pp00536b.
272. Kim J., Lim H., Kim S., Cho H., Kim Y., Li X., Choi H., Kim O. Effects of HSP27 downregulation on PDT resistance through PDT-induced autophagy in head and neck cancer cells // *Oncology Reports*. – 2016. – Vol. 35. – Is. 4. – P. 2237-2245.
273. Nonaka M., Ikeda H., Inokuchi T. Inhibitory Effect of Heat Shock Protein 70 on Apoptosis Induced by Photodynamic Therapy *In Vitro* // *Photochemistry and Photobiology*. – 2011. – Vol. 79. – Is. 1. – P. 94-98.
274. Hanlon J.G., Adams K., Rainbow A.J., Gupta R.S., Singh G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2001. – Vol. 64. – Is. 1. – P. 55-61.
275. Ferrario A., Rucker N., Wong S., Luna M., Gomer C.J. Survivin, a Member of the Inhibitor of Apoptosis Family, Is Induced by Photodynamic Therapy and Is a Target for Improving Treatment Response // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – Is. 10. – P. 4989-4995. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4785.
276. Zhou R., Zeng X., Zhao H., Chen Q., Wu P. Combating the hypoxia limit of photodynamic therapy through reversing the survival-related pathways of cancer cells // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2022. – Vol. 452. – P. 214306.
277. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N., Schwarz M.A., Gill P.S., Gomer C.J. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma // *Cancer Research*. – 2000. – Vol. 60. – Is. 15. – P. 4066-4069.

278. Ferrario A., Gomer C. Avastin Enhances Photodynamic Therapy Treatment of Kaposi's Sarcoma in a Mouse Tumor Model// *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. – 2006. – Vol. 25. – Is. 1-2. – P. 251-260. – DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25.i1-2.160.
279. Rosin F.C.P., Teixeira M.G., Pelissari C., Corrêa L. Photodynamic Therapy Mediated by 5-aminolevulinic Acid Promotes the Upregulation and Modifies the Intracellular Expression of Surveillance Proteins in Oral Squamous Cell Carcinoma // *Photochemistry and Photobiology*. – 2018. – Vol 95. – Is. 2. – P. 635-643.
280. Girotti A. W. Nitric Oxide-elicited Resistance to Antitumor Photodynamic Therapy via Inhibition of Membrane Free Radical-mediated Lipid Peroxidation // *Photochemistry and Photobiology*. – 2020. – Vol 97. – Is. 4. – P. 653-663. – DOI:10.1111/php.13373.
281. Warszyńska M., Repetowski P., Dąbrowski J.M. Photodynamic therapy combined with immunotherapy: Recent advances and future research directions // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2023. – Vol. 495. – P. 215350. – DOI: 10.1016/j.ccr.2023.215350.
282. Carobeli L.R., Camillo Santos A.B., Marques Martins L.B., Damke E., Lopes Consolaro M.E. Recent advances in photodynamic therapy combined with chemotherapy for cervical cancer: a systematic review// *Expert Review of Anticancer Therapy*. – 2024. – Vol. 24. – Is. 5. – P. 263-282. – DOI: 10.1080/14737140.2024.2337259.
283. Xu J., Gao J., Wei Q. Combination of Photodynamic Therapy with Radiotherapy for Cancer Treatment // *Journal of Nanomaterials*. – 2016. – Vol. 2016. – Is. 1. – DOI: 10.1155/2016/8507924.
284. Sultana N., Pathak R., Samanta S., Sen Sarma N. A comprehensive analysis of photothermal therapy (PTT) and photodynamic therapy (PDT) for the treatment of cancer // *Process Biochemistry*. – 2025. – Vol. 148. – P. 17-31.
285. Hu H., Zhao J., Ma K., Wang J., Wang X., Mao T., Xiang C., Luo H., Chang Y., Yu M., Qin Y., Yang K., Li Q., Sun Y., Wang S. Sonodynamic therapy combined with phototherapy: Novel synergistic strategy with superior efficacy for antitumor and antiinfection therapy // *Journal of Controlled Release*. – 2023. – Vol. 359. – P. 188-205. – DOI: 10.1016/j.jconrel.2023.05.041.

286. Douplik A. Combined surgery and photodynamic therapy of cancer // *Physics Procedia*. – 2010. – Vol. 5. P. 641-645. – DOI: 10.1016/j.phpro.2010.08.093.
287. Szumilak M., Wiktorowska-Owczarek A., Stanczak A. Hybrid Drugs—A Strategy for Overcoming Anticancer Drug Resistance? // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – Is. 9. – P. 2601. – DOI: 10.3390/molecules26092601.
288. Gilad Y., Gellerman G., Lonard D.M., O'Malley B.W. Drug Combination in Cancer Treatment—From Cocktails to Conjugated Combinations *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 4. – P. 669. – DOI: 10.3390/cancers13040669.
289. Fu R., Sun Y., Sheng W., Liao D. Designing multi-targeted agents: An emerging anticancer drug discovery paradigm // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 136. – P. 195-211. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.05.016.
290. Muhammad N., Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2014. – Vol. 19. – P. 144-153.
291. Song R., Kim Y.-S., Sohn Y.S. Synthesis and selective tumor targeting properties of water-soluble porphyrin–Pt(II) conjugates // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2002. – Vol. 89. – № 1. – P. 83-88. – DOI: 10.1016/S0162-0134(01)00413-5.
292. Lottner C., Knuechel R., Bernhardt G., Brunner H. Combined chemotherapeutic and photodynamic treatment on human bladder cells by hematoporphyrin–platinum(II) conjugates // *Cancer Letters*. – 2004. – Vol. 203. – № 2. – P. 171-180.
293. Lottner C., Bart K.-C., Bernhardt G., Brunner H. Hematoporphyrin-Derived Soluble Porphyrin–Platinum Conjugates with Combined Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2002. – Vol. 45. – № 10. – P. 2064-2078. – DOI: 10.1021/jm0110688.
294. Le N.A., Babu V., Kalt M., Schneider L., Schumer F., Spingler B. Photostable Platinated Bacteriochlorins as Potent Photodynamic Agents // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 64. – № 10. – P. 6792-6801.
295. Tikhonov S., Ostroverkhov P., Suvorov N., Mironov A., Efimova Y., Plutinskaya A., Pankratov A., Ignatova A., Feofanov A., Diachkova E., Vasil'ev Y., Grin M. Tin Carboxylate Complexes of Natural Bacteriochlorin for Combined Photodynamic and

- Chemotherapy of Cancer è // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – № 24. – P. 13563. – DOI: 10.3390/ijms222413563.
296. Toubia I., Nguyen C., Diring S., Pays M., Mattana E., Arnoux P., Frochet C., Gary-Bobo M., Kobeissi M., Odobel F. Study of Cytotoxic and Photodynamic Activities of Dyads Composed of a Zinc Phthalocyanine Appended to an Organotin // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14. – № 5. – P. 413. – DOI: 10.3390/ph14050413.
297. Martins-Teixeira M.B., Carvalho I. Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives // *ChemMedChem*. – 2020. – Vol 15. – Is. 11. – P. 933-948.
298. Ke M.-R., Chen S.-F., Peng X.-H., Zheng Q.-F., Zheng B.-Y., Yeh C.-K., Huang J.-D. A tumor-targeted activatable phthalocyanine-tetrapeptide-doxorubicin conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 127. – P. 200-209. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.056.
299. You H., Yoon H.-E., Yoon J.-H., Ko H., Kim Y.-C. Synthesis of pheophorbide-a conjugates with anticancer drugs as potential cancer diagnostic and therapeutic agents // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 19. – № 18. – P. 5383-5391. – DOI: 10.1016/j.bmc.2011.07.058.
300. Plotnikova E., Abramova O., Ostroverkhov P., Vinokurova A., Medvedev D., Tihonov S., Usachev M., Shelyagina A., Efremenko A., Feofanov A., Pankratov A., Shegay P., Grin M., Kaprin A. Conjugate of Natural Bacteriochlorin with Doxorubicin for Combined Photodynamic and Chemotherapy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25. – № 13. – P. 7210. – DOI: 10.3390/ijms25137210.
301. Spring B.Q., Rizvi I., Xu N., Hasan T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance // *Photochemical & Photobiological*. – 2015. – Vol. 14. – P. 1476-1491. – DOI: 10.1039/c4pp00495g.
302. Sanabria L.M., Rodríguez M.E., Congo I.S., Rumie Vittar N.B., Pansa M.F., Lamberti M.J., Rivarola V.A. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2013. – Vol. 1835. – Is. 1. – P. 36-45.
303. Liu G.-H., Chen T., Zhang X., Ma X.-L., Shi H.-S. Small molecule inhibitors targeting the cancers // *MedComm*. – 2022. – Vol. 3. – Is. 4. – DOI: 10.1002/mco2.181.

304. Bedard P.L., Hyman D.M., Davids M.S., Siu L.L. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 395. – Small molecules, big impact. – № 10229. – P. 1078-1088.
305. Heldin C.-H., Lu B., Evans R., Gutkind S. *Signals and Receptors* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – DOI: 10.1101/cshperspect.a005900.
306. Kumar R., Goel H., Solanki R., Rawat L., Tabasum S., Tanwar P., Pal S., Sabarwal A. Recent developments in receptor tyrosine kinase inhibitors: A promising mainstay in targeted cancer therapy // *Medicine in Drug Discovery*. – 2024. – Vol. 23. – P. 100195. – DOI: 10.1016/j.medidd.2024.100195.
307. Wang B., Wu H., Hu C., Wang H., Liu J., Wang W., Liu Q. An overview of kinase downregulators and recent advances in discovery approaches // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6 (1). – P. 1-19. – DOI: 10.1038/s41392-021-00826-7.
308. Zhong L., Li Y., Xiong L., Wang W., Wu M., Yuan T., Yang W., Tian C., Miao Z., Wang T., Yang S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2021. – Vol. 6.
309. Garuti L., Roberti M., Bottegoni G. *Multi-Kinase Inhibitors* // *Current Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 22. – Is. 6. – P. 695-712.
310. Min H.-Y., Lee H.-Y. Molecular targeted therapy for anticancer treatment // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2022. – Vol. 54. – № 10. – P. 1670-1694.
311. Garg H., Suri P., Gupta J.C., Talwar G.P., Dubey S. Survivin: a unique target for tumor therapy // *Cancer Cell International*. – 2016. – Vol. 16. – Is. 49.
312. Venkatesan N., Kanwar J.R., Deepa P.R., Navaneethakrishnan S., Joseph C., Krishnakumar S. Targeting HSP90/Survivin using a cell permeable structure based peptido-mimetic shepherdin in retinoblastoma// *Chemico-Biological Interactions*. – 2016. – Vol. 252. – P. 141-149. – DOI: 10.1016/j.cbi.2016.04.011.
313. Huang L., Wei G., Sun X., Jiang Y., Huang Z., Huang Y., Shen Y., Xu X., Liao Y., Zhao C. A tumor-targeted Ganetespib-zinc phthalocyanine conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 151. – P. 294-303.293. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.077.

314. Yang Y., Cao Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease // *Seminars in Cancer Biology*. – 2022. – Vol. 86. – P. 251-261.
315. Ferrario A., von Tiehl K.F., Rucker N., Schwarz M.A., Gill P.S., Gomer C.J. Antiangiogenic Treatment Enhances Photodynamic Therapy Responsiveness in a Mouse Mammary Carcinoma // *Cancer Research*. – 2000. – Vol. 60. – Is. 15. – P. 4066-4069.
316. Grossman C.E., Carter S.L., Czupryna J., Wang L., Putt M.E., Busch T.M. Fluence Rate Differences in Photodynamic Therapy Efficacy and Activation of Epidermal Growth Factor Receptor after Treatment of the Tumor-Involved Murine Thoracic Cavity // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – Is. 1. – P. 101.
317. Chu P.L., Shihabuddeen W.A., Low K.P., Poon D.J.J., Ramaswamy B., Liang Z.-G., Nei W.L., Chua K.L.M., Thong P.S.P., Soo K.C., Yeo E.L.L., Chua M.L.K. Vandetanib sensitizes head and neck squamous cell carcinoma to photodynamic therapy through modulation of EGFR-dependent DNA repair and the tumour microenvironment // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2019. – Vol. 27. – P. 367-374.
318. Ahmad N., Kalka K., Mukhtar H. *In vitro* and *in vivo* inhibition of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase pathway by photodynamic therapy // *Oncogene*. – 2001. – Vol. 20. – № 18. – P. 2314-2317. – DOI: 10.1038/sj.onc.1204313.
319. Dowlati A., Nethery D., Kern J.A. Combined inhibition of epidermal growth factor receptor and JAK/STAT pathways results in greater growth inhibition *in vitro* than single agent therapy // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2004. – Vol. 3. – № 4. – P. 459-463.
320. Zulkifli A.A., Tan F.H., Putoczki T.L., Stylli S.S., Luwor R.B. STAT3 signaling mediates tumour resistance to EGFR targeted therapeutics : Jak-Stat signaling and cancer // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2017. – Vol. 451. – P. 15-23. – DOI: 10.1016/j.mce.2017.01.010.
321. Yang P.W., Hung M.C., Hsieh C.Y., Tung E.-C., Wang Y.-H., Tsai J.-C., Lee J.-M. The effects of Photofrin-mediated photodynamic therapy on the modulation of EGFR in esophageal squamous cell carcinoma cells // *Lasers Med Sci*. – 2013. – Vol. 28. – P. 605-614. – DOI: 10.1007/s10103-012-1119-y.

322. Roskoski R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes // *Pharmacological Research*. – 2016. – Vol. 103. – P. 26-48. – DOI: 10.1016/j.phrs.2015.10.021.
323. Bareschino M.A., Schettino C., Troiani T., Martinelli E., Morgillo F., Ciardiello F. Erlotinib in cancer treatment // *Annals of Oncology*. – 2007. – Vol. 18. – P. vi35-vi41.
324. Zhang F.-L., Huang Q., Zheng K., Li J., Liu J.-Y., Xue J.-P. A novel strategy for targeting photodynamic therapy. Molecular combo of photodynamic agent zinc(II) phthalocyanine and small molecule target-based anticancer drug erlotinib // *Chemical Communications (RSC Publishing)*. – 2013. – Vol. 49. – P. 9570-9572.
325. Cheruku R.R., Cacaccio J., Durrani F.A., Tabaczynski W.A., Watson R., Marko A., Kumar R., El-Khouly M.E., Fukuzumi S., Missert J.R., Yao R., Sajjad M., Chandra D., Guru K., Pandey R.K. Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Multifunctional Photosensitizers for Bladder Cancer Imaging and Photodynamic Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62. – № 5. – P. 2598-2617.
326. Tian S., Li J., Wang D., Han Y., Dai H., Yan L. Sonodynamic-chemotherapy synergy with chlorin e6-based carrier-free nanoparticles for non-small cell lung cancer // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2024. – Vol. 12. – № 13. – P. 3282-3291.
327. Cheruku R.R., Cacaccio J., Durrani F.A., Tabaczynski W.A., Watson R., Sifers K., Missert J.R., Tracy E.C., Dukh M., Guru K., Koya R.C., Kalinski P., Baumann H., Pandey R.K. Synthesis, Tumor Specificity, and Photosensitizing Efficacy of Erlotinib-Conjugated Chlorins and Bacteriochlorins: Identification of a Highly Effective Candidate for Photodynamic Therapy of Cancer // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 64. – Is. 1. – P. 741-767. – DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c01735.
328. Matsumoto K., Umitsu M., De Silva D.M., Roy A., Bottaro D.P. Hepatocyte growth factor/MET in cancer progression and biomarker discovery // *Cancer Science*. – 2017. – Vol. 108. – Is. 3. – P. 296-307. – DOI: 10.1111/cas.13156.
329. Barzaman K., Vafaei R., Samadi M., Kazemi M.H., Hosseinzadeh A., Merikhian P., Moradi-Kalbolandi S., Eisavand M.R., Dinvari H., Farahmand L. Anti-cancer therapeutic strategies based on HGF/MET, EpCAM, and tumor-stromal cross talk // *Cancer Cell International*. – 2022. – Vol. 22. – № 1. – P. 259.

330. Broekgaarden M., Alkhateeb A., Bano S., Bulin A.-L., Obaid G., Rizvi I., Hasan T. Cabozantinib Inhibits Photodynamic Therapy-Induced Auto- and Paracrine MET Signaling in Heterotypic Pancreatic Microtumors // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12 (6). – DOI: 10.3390/cancers12061401.
331. Jung K.-A., Choi B., Kwak M.-K. The c-MET/PI3K Signaling Is Associated with Cancer Resistance to Doxorubicin and Photodynamic Therapy by Elevating BCRP/ABCG2 Expression // *Molecular Pharmacology*. – 2015. – Vol. 87. – Is. 3. – P. 465-476. – DOI: 10.1124/mol.114.096065.
332. Li Z., Qiu L. The Current Status of Chlorin e6-Based Nanoscale Delivery Systems for Cancer Therapy // *Oncologie*. – 2021. – Vol. 23. – № 4. – P. 515-531.
333. Hak A., Ali M.S., Sankaranarayanan S.A., Shinde V.R., Rengan A.K. Chlorin e6: A Promising Photosensitizer in Photo-Based Cancer Nanomedicine // *ACS Applied Bio Materials*. – 2023. – Vol. 6. – Is. 2. – P. 349-364. – DOI: 10.1021/acsabm.2c00891.
334. Boscencu R., Radulea N., Manda G., Machado I.F., Socoteanu R.P., Lupuliasa D., Burloiu, A.M., Mihai D.P., Ferreira L.F.V. Porphyrin Macrocycles: General Properties and Theranostic Potential // *Molecules*. – 2023. – Vol 28 (3).
335. Xu W., Ye C., Qing X., Liu S., Lv X., Wang W., Dong X., Zhang Y. Multi-target tyrosine kinase inhibitor nanoparticle delivery systems for cancer therapy // *Materials Today Bio*. – 2022. – Vol. 16. – P. 100358. – DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100358.
336. Nassif E., Thibault C., Vano Y., Fournier L., Mauge L., Verkarre V., ... Oudard S. Sunitinib in kidney cancer: 10 years of experience and development // *Expert Review of Anticancer Therapy*. – 2016. – Vol. 17 (2). – P. 129-142.
337. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R., Chen Z.-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade // *Drug Resistance Updates*. – 2015. – Vol. 18. – P. 1-17. – DOI: 10.1016/j.drug.2014.11.002.
338. Sano D., Matsumoto F., Valdecanas D.R., Zhao M., Molkenkine D.P., Takahashi Y., Hanna E.Y., Papadimitrakopoulou V., Heymach J., Milas L., Myers J.N. Vandetanib Restores Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells' Sensitivity to Cisplatin and Radiation *In Vivo* and *In Vitro*. *Clin Cancer Res*. – 2011. – Vol. 17 (7). – P. 1815-1827.

339. Gustafson D.L., Frederick B., Merz A.L. et al. Dose scheduling of the dual VEGFR and EGFR tyrosine kinase inhibitor vandetanib (ZD6474, Zactima®) in combination with radiotherapy in EGFR-positive and EGFR-null human head and neck tumor xenografts // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2008. – Vol. 61. – P. 179–188.
340. Cochin V., Gross-Goupil M., Ravaud A., Godbert Y., Le Moulec S. Cabozantinib: Mechanism of action, efficacy and indications // *Bulletin du Cancer.* – 2017. – Vol. 104. – Is. 5. – P. 393-401. – DOI: 10.1016/j.bulcan.2017.03.013.
341. Santoni M., Lacovelli R., Colonna V., Klinz S., Mauri G., Nuti M. Antitumor effects of the multi-target tyrosine kinase inhibitor cabozantinib: a comprehensive review of the preclinical evidence // *xpert Review of Anticancer Therapy.* – 2021. – Vol. 21 (9). – P. 1029-1054. – DOI: 10.1080/14737140.2021.1919090.
342. Kwilas A.R., Ardiani A., Donahue R.N., Aftab D.T., Hodge J.W. Dual effects of a targeted small-molecule inhibitor (cabozantinib) on immune-mediated killing of tumor cells and immune tumor microenvironment permissiveness when combined with a cancer vaccine // *Journal of Translational Medicine.* – 2014. – Vol. 12.
343. Patnaik A., Swanson K.D., Csizmadia E. et al. Cabozantinib Eradicates Advanced Murine Prostate Cancer by Activating Antitumor Innate Immunity // *Cancer Discov.* – 2017. – Vol. 7 (7). – P. 750-765. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0778.
344. Krylova L.V., Otvagin V.F., Gribova G.P., Kuzmina N.S., Fedotova E.A., Zelepukin I.V., Nyuchev A.V., Kustov A.V., Morshnev P.K., Berezin D.B., Koifman M.O., Vatsadze S.Z., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. Developing Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugates with Nanomolar Activity for Targeted Photodynamic Therapy: Design, Synthesis, SAR, and Biological Evaluation // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 2025. – Vol. 68. – Is. 2. – P. 1901-1923. – DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c02643.
345. Otvagin V.F., Krylova L.V., Peskova N.N., Kuzmina N.S., Fedotova E.A., Nyuchev A.V., Romanenko Y.V., Koifman O.I., Vatsadze S.Z., Schmalz H.-G., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. A first-in-class  $\beta$ -glucuronidase responsive conjugate for selective dual targeted and photodynamic therapy of bladder cancer // *European Journal of Medicinal Chemistry.* – 2024. – Vol. 269. – P. 116283 – DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116283.

346. Kaščáková S., Kruijt B., de Bruijn H.S., van der Ploeg-van den Heuvel A., Robinson D.J., Sterenborg H.J.C.M., Amelink A. *Ex vivo* quantification of mTHPC concentration in tissue: Influence of chemical extraction on the optical properties // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2008. – Vol. 91. – Is. 2. – P. 99-107. – DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2008.02.003.
347. Jones H.J., Vernon D.I., Brown S.B. Photodynamic therapy effect of *m*-THPC (Foscan<sup>®</sup>) *in vivo*: correlation with pharmacokinetics // *British Journal of Cancer*. – 2003. – Vol. 89. – P. 398-404. – DOI: 10.1038/sj.bjc.6601101.
348. Neumann M.G., Miranda W.G., Schmitt C.C., Rueggeberg F.A., Correa I.C. Molar extinction coefficients and the photon absorption efficiency of dental photoinitiators and light curing units // *Journal of Dentistry*. – 2005. – Vol. 33. – № 6. – P. 525-532.
349. Magde D., Rojas G.E., Seybold P.G. Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthene Dyes // *Photochemistry and Photobiology*. – 2008. – Vol. 70. – Is. 5. – P. 737-744. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1999.tb08277.x.
350. Würth C., Grabolle M., Pauli J., Spieles M., Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples // *Nature Protocols*. – 2013. – Vol. 8. – P. 1535–1550. – DOI: 10.1038/nprot.2013.087.
351. Krieg M. Determination of singlet oxygen quantum yields with 1,3-diphenylisobenzofuran in model membrane systems // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 1993. – Vol. 27. – Is. 2. – P. 143-149.
352. Shilyagina N.Y., Plekhanov V.I., Shkunov I.V., Shilyagin P.A., Dubasova L.V., Brilkina A.A., Sokolova E.A., Turchin I.V., Balalaeva I.V. LED Light Source for *in vitro* Study of Photosensitizing Agents for Photodynamic Therapy // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2014. – Vol. 6 (2). – P. 15.
353. Bagrov I.V., Dadeko A.V., Kiselev V.M. et al. Comparative Study of the Photophysical Properties of Dimegine, Photoditazine, and Radachlorin // *Opt. Spectrosc.* – 2018. – Vol. 125. – P. 903-910. – DOI: 10.1134/S0030400X19020048.
354. Shestakova L.N., Lyubova T.S., Lermontova S.A., Belotelov A. O., Peskova N.N., Klapshina L.G., Balalaeva I.V., Shilyagina N.Y. Comparative Analysis of Tetra(2-

naphthyl)tetracyano-porphyrazine and Its Iron Complex as Photosensitizers for Anticancer Photodynamic Therapy // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14 (12).

355. Thul P.J., Lindskog C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome // *Protein Science*. – 2017. – Vol. 27 (1). – P. 233-234. – DOI: 10.1002/pro.3307.

356. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65. – Is. 1-2. – P. 55-63. – DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

357. Fu J., Zhang N., Chou J.H., Dong H.-J., Lin S.-F., Ulrich-Merzenich G.S., Chou T.-C. Drug combination *in vivo* using combination index method: Taxotere and T607 against colon carcinoma HCT-116 xenograft tumor in nude mice // *Synergy*. – 2016. – Vol. 3. – Is. 3. – P. 15-30. – DOI: 10.1016/j.synres.2016.06.001.

358. Yu D., Zha Y., Zhong Z., Ruan Y., Li Z., Sun L., Hou S. Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2021. – Vol. 339. – DOI: 10.1016/j.snb.2021.129878.

359. Nsubuga A., Mandl G.A., Capobianco J.A. Investigating the reactive oxygen species production of Rose Bengal and Merocyanine 540-loaded radioluminescent nanoparticles // *Nanoscale Advances*. – 2021. – Vol. 3. – Is. 5. – P. 1375-1381.

360. Jennings D.B., Ehrenshaft M., Pharr D.M., Williamson J.D. Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. Vol. 95 (25). – P. 15129-15133. – DOI: 10.1073/pnas.95.25.15129.

361. Meyer D.V., Green E.F., Birch-Machin M.A., Hatch E. Tiron is Protective Against ROS-Induced Damage in Human Bronchial Epithelial Cells // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 124. – P. 570-571.

362. Flatow U., Rabson A.B., Rabson A.S. Tumorigenicity of T24 urinary bladder carcinoma cell sublines // *International Journal of Cancer*. – 1987. – Vol. 40. – Is. 2. – P. 240-245. – DOI: 10.1002/ijc.2910400220.

363. Sencha L.M., Dobrynina O.E., Pospelov A.D., Guryev E.L., Peskova N.N., Brilkina A.A., Cherkasova E.I., Balalaeva I.V. Real-Time Fluorescence Visualization and Quantitation of Cell Growth and Death in Response to Treatment in 3D Collagen-Based

Tumor Model // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – Is. 16. – P. 8837. – DOI: 10.3390/ijms23168837.

364. Wolf S.P., Wen F.T., Schreiber H. Criteria to make animal studies more relevant to treating human cancer // Current Opinion in Immunology. – 2022. – Vol. 74. – P. 25-31.

365. Kaplan M.A., Kapinus V.N., Yaroslavtseva-Isayeva E.V., Spichenkova I.S., Shubina A.M., Borgul O.V., Goranskaya E.V. Photodynamic therapy: development of methods and clinical applications in FCI MRCC MOH // Photodynamic therapy and photodyagnosis. – 2014. – Vol. 3(1). – P. 8-15.

366. Tsednee M., Huang Y.-C., Chen Y.-R., Yeh K.-C. Identification of metal species by ESI-MS/MS through release of free metals from the corresponding metal-ligand complexes // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – Is. 1. – P. 26785.

367. Tomayko M.M., Reynolds, C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice // Cancer Chemother. Pharmacol. – 1989. – Vol. 24. – P. 148-154.

368. Abramova O.B., Drozhzhina V.V., Churikova T.P., Kozlovtsceva E.A., Arkhipova L.M., Kaplan M.A., Ivanov S.A., Kaprin A.D. Photodynamic therapy of the experimental tumors of different morphological types with liposomal boronated chlorin e6 // Biomedical Photonics. – 2021. – Vol. 10(3). – P. 12-22.

369. Kushnir E.A., Belopolskaya M.V., Popov V.S., Lovat M.L. Severity assessment of scientific procedures performed on laboratory animals. Theoretical and applied aspects // Lab. Animals for Science. – 2022. – Vol. 4. – DOI: 10.57034/2618723X-2022-04-07.

370. Lan M., Zhao H., Yuan H., Jiang C., Zuo S., Jiang Y. Absorption and EPR spectra of some porphyrins and metalloporphyrins // Dyes and Pigments. – 2007. – Vol. 74. – Is. 2. – P. 357-362. – DOI: 10.1016/j.dyepig.2006.02.018.

371. Yoon I., Li J.Z., Shim Y.K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy // Clinical Endoscopy. – 2013. – Vol. 46. – Is. 1. – P. 7-23.

372. Ferreira J., Kurachi C., Moriyama L.T., Menezes P.F.C., Perussi J.R., Sibata C., Zucoloto S., Castro e Silva O., Bagnato V.S. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers // Laser Physics Letters. – 2005. – Vol. 3. – Is. 2. – P. 91. – DOI: 10.1002/lapl.200510057.

373. Kitamura S., Maeda T., Yanagi T. Vandetanib inhibits cell growth in EGFR-expressing cutaneous squamous cell carcinoma // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – Vol. 531. – Is. 3. – P. 396-401.
374. Gaffney D.C., Soyer H.P., Simpson F. The epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma: An emerging drug target // *Australasian Journal of Dermatology*. – 2013. – Vol. 55. – Is. 1. – P. 24-34. – DOI: 10.1111/ajd.12025.
375. Osterloh J., Vicente M.G.H. Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2012. – Vol. 6. – Is. 5. – DOI: 10.1142/S1088424602000373.
376. Tsubone T.M., Martins W.K., Pavani C., Junqueira H.C., Itri R., Baptista M.S. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – Is. 1. – P. 6734. – DOI: 10.1038/s41598-017-06788-7.
377. Gonzalo-Navarro C., Zafon E., Organero J.A., Jalón F.A., Lima J.C., Espino G., Rodríguez A.M., Santos L., Moro A.J., Rodríguez S., Castro J., Camacho-Aguayo J., Massaguer A., Manzano B.R., Durá G. Ir(III) Half-Sandwich Photosensitizers with a  $\pi$ -Expansive Ligand for Efficient Anticancer Photodynamic Therapy // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – Vol. 67. – Is. 3. – P. 1783-1811.
378. Isaac-Lam MF. Chlorin Conjugates in Photodynamic Chemotherapy for Triple-Negative Breast Cancer // *Pharmaceuticals*. – 2024. – Vol. 17 (5). – DOI: 10.3390/ph17050576.
379. Baglo Y., Sorrin A.J., Liang B.J., Huang H.-C. Harnessing the Potential Synergistic Interplay Between Photosensitizer Dark Toxicity and Chemotherapy // *Photochemistry and Photobiology*. – 2019. – Vol. 96. – Is. 3. – P. 636-645.
380. Canti G., Nicolin A., Cubeddu R., Taroni P., Bandieramonte G., Valentini G. Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors // *Cancer Letters*. – 1998. – Vol. 125. – Is. 1-2. – P. 39-44.
381. Balalaeva, I.V., Krylova, L.V., Karpova, M.A. et al. Synergistic Effect of the Combined Action of Targeted and Photodynamic Therapy on HER2-Positive Breast Cancer // *Dokl Biochem Biophys*. – 2022. – Vol. 507. – P. 330-333.

382. Park J.S., Park S., Park S.-J., Kim S.-K. Synergistic effects of concurrent photodynamic therapy with indocyanine green and chemotherapy in hepatocellular carcinoma cell lines and mouse models // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2023. – Vol. 239. – DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112642.
383. Sun X., Cao Z., Mao K., Wu C., Chen H., Wang J., Wang X., Cong X., Li Y., Meng X., Yang X., Yang Y.-G., Sun T. Photodynamic therapy produces enhanced efficacy of antitumor immunotherapy by simultaneously inducing intratumoral release of sorafenib // *Biomaterials*. – 2020. – Vol. 240. – P. 10.1016/j.biomaterials.2020.119845.
384. Liu T., Liu W., Zhang M., Yu W., Gao F., Li C., Wang S.-B., Feng J., Zhang X.-Z. Ferrous-Supply-Regeneration Nanoengineering for Cancer-Cell-Specific Ferroptosis in Combination with Imaging-Guided Photodynamic Therapy // *ACS Nano*. – 2018. – Vol. 12. – P. 12181–12192. – DOI: 10.1021/acsnano.8b05860.
385. Liu W., Zhang J., Ding L., Ni W., Yuan J., Xiao H., Zhang J. RBC-derived nanosystem with enhanced ferroptosis triggered by oxygen-boosted phototherapy for synergized tumor treatment // *Biomaterial Science*. – 2021. – Vol. 9. – P. 7228-7236. – DOI: 10.1039/D1BM00175B.
386. Postiglione I., Chiaviello A., Aloj S.M., Palumbo G. 5-aminolaevulinic acid/photodynamic therapy and gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines: a potential strategy to improve gefitinib therapeutic efficacy // *Cell Prolif*. – 2013. – Vol. 46 (4). – P. 382-95. – DOI: 10.1111/cpr.12040.
387. Wei G., Huang L., Jiang Y., Shen Y., Huang Z., Huang Y., Sun X., Zhao C. Lenvatinib-zinc phthalocyanine conjugates as potential agents for enhancing synergistic therapy of multidrug-resistant cancer by glutathione depletion // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 169. – P. 53-64.
388. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2007. – Vol. 43. – Is. 7. – P. 995-1022.
389. Brilkina A.A., Peskova N.N., Dudenkova V.V., Gorokhova A.A., Sokolova E.A., Balalaeva I.V. Monitoring of hydrogen peroxide production under photodynamic

- treatment using protein sensor HyPer // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018. – Vol. 178. – P. 296-301. – DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.11.020.
390. Chernyak B.V., Izymov D.S., Lyamzaev K.G., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W.A., Skulachev V.P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. – 2006. – Vol. 1757. – Is. 5-6. – P. 525-534. – DOI: 10.1016/j.bbabi.2006.02.019.
391. Zhao H., Xing D., Chen Q. New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy // *European Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 47. – Is. 18. – P. 2750-2761.
392. Orenstein A., Kostenich G., Roitman L. et al. A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model // *Br J Cancer*. – 1996. – Vol. 73. – P. 937-944. – DOI: 10.1038/bjc.1996.185.
393. Chen B., Zheng R., Liu D., Li B., Lin J., Zhang W. The tumor affinity of chlorin e6 and its sonodynamic effects on non-small cell lung cancer // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2013. – Vol. 20. – Is. 2. – P. 667-673. – DOI: 10.1016/j.ultsonch.2012.09.008.
394. Gavrina A.I., Shirmanova M.V., Aksenova N.A., Yuzhakova D.V., Snopova L.B., Solovieva A.B., Timashev P.S., Dudenkova V.V., Zagaynova E.V. Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6- polyvinyl alcohol complex // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2018. – Vol. 178. – P. 614-622.
395. Liu B., Qi W., Tian L., Li Z., Miao G., An W., Liu D., Lin J., Zhang X., Wu W. *In Vivo* Biodistribution and Toxicity of Highly Soluble PEG-Coated Boron Nitride in Mice // *Nanoscale Research Letters*. – 2015. – Vol. 10. – Is. 1. – P. 478.
396. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2009. – Vol. 6. – Is. 2. – P. 94-96. – DOI: 10.1016/j.pdpdt.2009.06.001.
397. Jung, J. Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development // *Toxicol Res*. – 2014. – Vol. 30. – P. 1-5. – DOI: 10.5487/TR.2014.30.1.001.

398. Silva Z.S., Bussadori S.K., Santos Fernandes K.P., Huang Y.-Y., Hamblin M.R. Animal models for photodynamic therapy (PDT) // *Bioscience Reports*. – 2015. – Vol. 35. – Is. 6. – DOI: 10.1042/BSR20150188.
399. Guo S., Qian W., Cai J., Zhang L., Wery J.-P., Li Q.-X. Molecular Pathology of Patient Tumors, Patient-Derived Xenografts, and Cancer Cell Lines // *Cancer Res*. – 2016. – Vol. 76 (16). – P. 4619-4626. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3245.
400. Szadvar I., Krizanova O., Babula P. Athymic Nude Mice as an Experimental Model for Cancer Treatment // *Physiol. Res*. – 2016. – Vol. 65 (4). – DOI: 10.33549/physiolres.933526.
401. Korbelik M., Kroszl G., Kroszl J., Dougherty G.J. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy // *Cancer Res*. – 1996. – Vol. 56 (24). – P. 5647-52.
402. Rocha L.B., Gomes-da-Silva L.C., Dąbrowski J.M., Arnauta L.G. Elimination of primary tumours and control of metastasis with rationally designed bacteriochlorin photodynamic therapy regimens // *European Journal of Cancer*. – 2015. – Vol. 51. – Is. 13. – P. 1822 – 1830.
403. Silva-Santana G., Bax J.C., Fernandes D.C.S., Bacellar D.T.L., Hooper C., Oliveira Dias A.A.S., Barbosa Silva C., de Souza A.M., Ramos S., Santos R.A., Pinto T.R., Ramão M.A., Mattos-Guaraldi A.L. Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus* // *Animal Models and Experimental Medicine*. – 2020. – Vol. 3. – Is. 4. – P. 304-315. – DOI: 10.1002/ame2.12139.
404. Xu M., Fu S., Wang B., Song X., Li B., Liu X., Li Y., Wang Y., Wang Q., Ling H., Li A., Liu M., Zhang X. Evaluation of Renal Microhemodynamics Heterogeneity in Different Strains and Sexes of Mice // *Laboratory Investigation*. – 2024. – Vol. 104. – Is. 7. – P. 102087. – DOI: 10.1016/j.labinv. 2024.102087.
405. Leriche G., Chisholm L., Wagner A. Cleavable linkers in chemical biology : Chemical Proteomics // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2012. – Vol. 20. – Is. 2. – P. 571-582. – DOI: 10.1016/j.bmc.2011.07.048.

406. Tranoy-Opalinski I., Legigan T., Barat R., Clarhaut J., Thomas M., Renoux B., Papot S.  $\beta$ -Glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: An update // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 74. – P. 302-313.
407. Awolade P., Cele N., Kerru N., Gummidi L., Oluwakemi E., Singh P. Therapeutic significance of  $\beta$ -glucuronidase activity and its inhibitors: A review // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 187. – P. 111921.
408. Martin H., Lázaro L.R., Gunnlaugsson T., Scanlan E.M. Glucosidase activated prodrugs for targeted cancer therapy // *Chem. Soc. Rev.* – 2022. – Vol. 51. – P. 9694-9716.
409. Blumenschein G.R., Mills G.B., Gonzalez-Angulo A.M. Targeting the Hepatocyte Growth Factor–cMET Axis in Cancer Therapy // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30 (26). – DOI: 10.1200/JCO.2011.40.3774.
410. Apolo A.B., Nadal R., Girardi D.M., Niglio S.A., Ley L., Cordes L.M., Steinberg S.M., ... Mortazavi A. Phase I Study of Cabozantinib and Nivolumab Alone or With Ipilimumab for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma and Other Genitourinary Tumors // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 38. – Is. 31. – DOI: 10.1200/JCO.20.01652.
411. Zhang G.-N., Zhang Y.-K., Wang Y.-J., Barbuti A.M., Zhu X.-J., Yu X.-Y., Wen A.-W., Wurpel J.N.D., Chen Z.-S. Modulating the function of ATP-binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2) with inhibitor cabozantinib // *Pharmacological Research*. – 2017. – Vol. 119. – P. 89-98. – DOI: 10.1016/j.phrs.2017.01.024.
412. Druzhkova I., Nikonova E., Ignatova N., Koryakina I., Zyuzin M., Mozherov A., Kozlov D., Krylov D., Kuznetsova D., Lisitsa U., Shcheslavskiy V., Shirshin E. A., Zagaynova E., Shirmanova M. Effect of Collagen Matrix on Doxorubicin Distribution and Cancer Cells' Response to Treatment in 3D Tumor Model // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14. – № 22. – P. 5487. – DOI: 10.3390/cancers14225487.
413. Hastings J.H., Skhinas J.N., Fey D., Croucher D.R., Cox T.R. The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks // *British Journal of Pharmacology*. – 2018. – Vol. 176. – Is. 1. – P. 82-92. – DOI: 10.1111/bph.14195.

414. Xu X., Farach-Carson M.C., Jia X. Three-dimensional *in vitro* tumor models for cancer research and drug evaluation // *Biotechnology Advances*. – 2014. – Vol. 32. – Is. 7. – P. 1256-1268. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.009.
415. Shan Fong E.L., Lamhamedi-Cherradi S.-E., Burdett et al. Modeling Ewing sarcoma tumors *in vitro* with 3D scaffolds // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2013. – Vol. 110 (16). – P. 6500-6505. – DOI: 10.1073/pnas.1221403110.
416. Tosca E.M., Ronchi D., Facciolo D., Magni P. Replacement, Reduction, and Refinement of Animal Experiments in Anticancer Drug Development: The Contribution of 3D *In Vitro* Cancer Models in the Drug Efficacy Assessment // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – Is. 4. – P. 1058. – DOI: 10.3390/biomedicines11041058.
417. Kutova O.M., Sencha L.M., Pospelov A.D., Dobrynina O.E., Brilkina A.A., Cherkasova E.I., Balalaeva I.V. Comparative Analysis of Cell–Cell Contact Abundance in Ovarian Carcinoma Cells Cultured in Two- and Three-Dimensional *In Vitro* Models // *Biology*. – 2020. – Vol. 9. – Is. 12. – P. 446. – DOI: 10.3390/biology9120446.
418. Kucinska M., Plewinski A., Szczolko W., Kaczmarek M., Goslinski T., Murias M. Modeling the photodynamic effect in 2D versus 3D cell culture under normoxic and hypoxic conditions // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 162. – P. 309-326. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.304.
419. Doostmohammadi A., Jooya H., Ghorbanian K., Gohari S., Dadashpour M. Potentials and future perspectives of multi-target drugs in cancer treatment: the next generation anti-cancer agents // *Cell Communication and Signaling*. – 2024. – Vol. 22. – Is. 1. – P. 228. – DOI: 10.1186/s12964-024-01607-9.
420. Liu D., He H., Kong F., Cao Y., Zang F., Ma M., Gu N., Zhang Y. A versatile metal–organic nanoplatform in combination with CXCR4 antagonist and PD-L1 inhibitor for multimodal synergistic cancer therapy and MRI-guided tumor imaging // *Nano Today*. – 2022. – Vol. 47. – P. 101689. – DOI: 10.1016/j.nantod.2022.101689.
421. Rapozzi V. Resistance to Photodynamic therapy in Cancer. Ed. Jori G. 2015.
422. Otrrock Z.K., Hatoum H.A., Awada A.H., Ishak R.S., Shamseddine A.I. Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: Structure, regulation and clinical perspectives // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. – 2009. – Vol. 70. – Is. 2. – P. 93-102.

423. Gomer C.J., Ferrario A., Luna M., Rucker N., Wong S. Photodynamic therapy: Combined modality approaches targeting the tumor microenvironment // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2006. – Vol. 38. – Is. 5. – P. 516-521. – DOI: 10.1002/lsm.20339.
424. Borgia F., Giuffrida R., Caradonna E., Vaccaro M., Guarneri F., Cannavò S.P. Early and Late Onset Side Effects of Photodynamic Therapy // *Biomedicines*. – 2018. – Vol. 6 (1). – DOI: 10.3390/biomedicines6010012.