

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н. Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ШОЛИНА НАТАЛЬЯ ВАЛЕРИЕВНА

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

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Степанова Евгения Владиславовна

кандидат физико-математических наук

Хайдуков Евгений Валерьевич

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1.1. Общие принципы ФДТ	11
1.1.2. Фотоокислительные реакции, лежащие в основе ФДТ	12
1.1.3. Классификация ФС для проведения ФДТ	14
1.1.4. Механизмы ФДТ-опосредованной цитотоксичности.....	16
1.1.5. Апоптоз	18
1.1.6. Аутофагия	19
1.1.7. Некроз.....	21
1.1.8. Механизмы клеточной защиты	22
1.1.9. Сосудистые повреждения при ФДТ	24
1.1.10. Иммунный ответ при ФДТ	25
1.2. Рибофлавин (витамин В2) как перспективный ФС для ФДТ солидных опухолей	27
1.2.1. Физико-химические свойства рибофлавина	28
1.2.2. Транспорт рибофлавина	29
1.2.3. Механизмы фотосенсибилизации рибофлавина	30
1.2.4. Продукты фоторазложения рибофлавина	31
1.2.5. Цитотоксические свойства фотоактивированного рибофлавина	33
1.3. Оптимизация метода ФДТ с использованием технологии фотовозбуждения ФС ИК-светом.....	35
1.3.1. Физико-химические свойства НАФ.....	35
1.3.2. Модификация поверхности НАФ для биомедицинского применения	37
1.3.3. Накопление НАФ в опухолевых тканях.....	38
1.3.4. Использование антистоксовой фотолюминесценции для проведения ФДТ	41

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Список реактивов, использованных в работе	45
2.2. Приборы, использованные в работе.....	46
2.3. Клеточные линии и обработка клеток	47
2.4. Исследование токсичности ФМН <i>in vitro</i>	47
2.5. Исследование клеточного накопления ФМН.....	49
2.6. Исследование клеточной гибели	50
2.7. Измерение уровня АФК	51
2.8. Исследование накопления ФМН <i>in vivo</i>	52
2.9. ФДТ первичной опухоли.....	52
2.10. ФДТ дистантной опухоли	53
2.11. Исследование НАФ <i>in vitro</i>	54
2.12. Исследование доставки НАФ в опухолевую ткань	55
2.13. ФДТ с применением ФМН и НАФ.....	56
2.14. Морфологический анализ	57
2.15. Статистическая обработка данных	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	58
3.1. Исследование фототоксичности ФМН и его фотопродуктов <i>in vitro</i>	58
3.2. Исследование клеточного накопления ФМН.....	64
3.3. Исследование клеточной гибели	66
3.4. Измерение уровня АФК <i>in vitro</i>	67
3.5. Исследование накопления ФМН <i>in vivo</i>	71
3.6. ФДТ первичной опухоли.....	72
3.7. Опосредованное действие ФДТ на дистантную опухоль	74
3.8. Исследование токсичности НАФ <i>in vitro</i>	74
3.9. Исследование доставки НАФ в опухолевую ткань	75
3.10. ФДТ солидных опухолей с применением ФМН в качестве ФС и НАФ	79

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Фотодинамическая терапия (ФДТ) - клинически одобренная минимально инвазивная терапевтическая процедура, основанная на селективном накоплении фотосенсибилизатора (ФС) в ткани и сосудистой сети опухоли с последующим образованием цитотоксических активных форм кислорода (АФК) и продуктов фотораспада ФС при облучении светом [1, 2, 3, 4].

Фототерапия существенно расширяет арсенал имеющихся на сегодняшний день методов лечения опухолей различной локализации, а также рекомендована при опухолях, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). По сравнению с хирургическим вмешательством ФДТ является малоинвазивным методом с более коротким реабилитационным периодом. Клинически одобренные ФС гематопорфиринового (первое поколение) и хлоринового (второе поколение) ряда имеют некоторые недостатки, среди которых основные - системная токсичность и длительный реабилитационный период после сеансов терапии, что существенно влияет на качество жизни пациентов [5, 6]. Поиск новых соединений, лишенных недостатков первого и второго поколения ФС является одной из актуальных задач для повышения эффективности метода ФДТ.

Эффективные ФС не должны проявлять токсических свойств в отсутствии облучения, преимущественно накапливаться опухолевыми тканями, обладать коротким периодом полувыведения из организма, иметь высокую эффективность наработки АФК при облучении и желательно фотоактивироваться под действием фотонов из красной или ближней инфракрасной (ИК) области спектра, поскольку они способны глубоко проникать в биоткани. Одним из таких соединений, которое удовлетворяет этим требованиям является рибофлавин (витамин В2) и его дериватив - флавиномононуклеотид (ФМН). Рибофлавин является кофактором для различных ферментативных реакций и его можно рассматривать как эндогенный ФС [7, 8, 9], генерирующий больше синглетного кислорода (СК), чем синтетические ФС, такие как клинически используемый Фотофрин, Фотосенс,

Радахлорин и др. [10]. Благодаря своим фотохимическим свойствам и способности образовывать АФК при облучении ультрафиолетовым (УФ) и синим светом рибофлавин был продемонстрирован как эффективный антибактериальный [9, 11, 12] и противовирусный агент [13], а также рассматривался в качестве ФС для лечения рака шейки матки [14] и меланомы [15] в условиях *in vitro*. В отличие от обычных ФС, рибофлавин считается безопасным [16, 17], а для его водорастворимой формы – ФМН, токсичность не установлена. Рибофлавин не распознается белками МЛУ, поэтому может преодолевать резистентность, часто возникающую в опухолях.

Рибофлавин, так же как и его фосфорилированная водорастворимая форма - ФМН, имеет две линии поглощения с максимумом на 365 нм (УФ) и 450 нм (синий диапазон спектра) [8, 18, 19], что является сдерживающим фактором для его клинического применения, поскольку свет на длине волны 450 нм проникает в биоткань лишь на глубину 1,5–2 мм [20]. Именно по этой причине требуются дополнительные способы его опосредованной фотоактивации на большей глубине биоткани. Решение этой проблемы стало возможным благодаря созданию новых неорганических наноматериалов – наночастиц с антистоксовым характером фотолюминесценции (наноразмерные апконвертирующие фосфоры, НАФ), способных конвертировать глубоко проникающий ближний ИК свет на длине волны 975 нм в свет УФ и синего диапазона спектра, необходимого для возбуждения рибофлавина и увеличения эффективности его фототерапевтического действия.

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Исследовать темновую цитотоксичность флавиномононуклеотида и эффективность его внутриклеточного накопления в отношении ряда опухолевых и нормальных клеточных линий.

2. Исследовать фототоксичность флавиномононуклеотида в отношении ряда опухолевых и нормальных клеток при его прямой фотоактивации светом синего диапазона спектра.

3. Продемонстрировать эффективность применения флавиномононуклеотида в качестве самостоятельного фотосенсибилизатора для ФДТ солидных опухолей животных и человека.

4. Исследовать опосредованную наноразмерными апконвертирующими фосфорами фотоактивацию флавиномононуклеотида светом ближнего ИК диапазона спектра и продемонстрировать эффективность их комбинации для ФДТ солидных опухолей.

Научная новизна

Исследовано различие в накоплении ФМН опухолевыми и нормальными клеточными линиями, а также продемонстрировано его избирательное фототоксическое действие в отношении злокачественных клеток. Значение IC_{50} для опухолевых клеток (A375, Mel IL и Mel Z) находится в диапазоне концентраций 10–30 мкМ, достижимых в опухолевой ткани при системном введении ФМН. Выполнена дифференциальная оценка вклада в цитотоксичность АФК и продуктов фоторазложения ФМН, образующихся при облучении светом УФ и синего диапазона спектра. Показана регрессия ксенотрансплантата меланомы кожи в результате внутривенного введения ФМН с последующим

облучением. Показано, что применение наночастиц, преобразующих кванты ближнего ИК диапазона спектра в УФ и синий свет позволяет фотоактивировать ФМН и, как следствие, реализовать ФДТ на большей глубине биоткани, что продемонстрировано на модели ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы.

Теоретическая и практическая значимость

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

Методы и методология исследования

В качестве модельной системы *in vitro* были использованы клетки меланомы человека Mel Z, Mel IL и Mel MTP, полученные из опухолевого материала пациентов, проходящих лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Блохина» Минздрава России. Фибробласты человека BJ-5ta, кератиноциты кожи человека HaCaT, клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, клетки глиобластомы человека U87-MG, глиомы крысы C6, клетки меланомы кожи человека A375 и меланомы мыши B16-F10 были получены из Американской коллекции типированных культур (ATCC). Оценка антипролиферативного эффекта ФМН и НАФ осуществлялась с помощью МТТ-теста. Уровень клеточного накопления ФМН и механизм клеточной гибели определяли методом проточной цитофлуориметрии после окраски аннексином V и йодистым пропидием (PI). Исследование внутриклеточной локализации ФМН проведено методом конфокальной микроскопии на клеточном анализаторе InCell Analyzer 6000. Измерение уровня АФК в режиме реального времени исследовали с

помощью платинированного наноэлектрода, а также с использованием флуоресцентного красителя CellROX Deep Red (Molecular Probes, Thermo). Накопление ФМН и НАФ в опухолевой ткани *in vivo* изучали на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC) на мышах - гибридах BDF1 с использованием эпилюминесцентной имиджинговой системы, разработанной в Институте фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (ИФТ РАН, г. Троицк). ФДТ с использованием ФМН в качестве ФС изучена на модели ксенотрансплантатов меланомы кожи человека Mel II и A375 на мышах линии Balb/c nu/nu. Содержание меланина *in vitro* оценивали путем измерения спектра поглощения в лизатах клеток с использованием спектрофотометра Cary 50 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Длительность циркуляции НАФ в кровотоке малых животных исследована с помощью антистоксового флуоресцентного микроскопа (ИФТ РАН, г. Троицк). ФДТ солидной опухоли с применением ФМН и НАФ проведена на мышах линии Balb nu/nu на модели ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.

Положения, выносимые на защиту

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

апконвертирующими фосфорами позволяет провести ФДТ светом ближнего ИК диапазона спектра.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация выполнена в соответствии с общепринятыми стандартами молекулярно-биологических исследований. Достоверность полученных результатов обусловлена использованием различных методик и адекватных моделей исследования. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными по изучению эффективности и механизмов действия ФДТ, а так же возможности комбинации ФС с наноматериалами, в частности, с НАФ. Результаты, опубликованные в работах по теме диссертации, активно цитируются, в том числе зарубежными учеными, для подготовки публикаций по смежным темам исследований.

Всего опубликовано 15 работ, из них по материалам диссертации – 8 статей в отечественных и зарубежных журналах, включенных в перечень ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации. Результаты диссертационного исследования были доложены на следующих конференциях: XIX Российский онкологический конгресс (Москва, 2015 г.), II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2016 г.), III Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017 г.), XXII Российский онкологический конгресс (Москва, 2018 г.), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2018 г.), The 43rd FEBS Congress (Прага, Чехия), Single-Molecule Sensors and NanoSystems International Conference 2020 (Мюнхен, 2019 г.), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2019 г.), IX Международный конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2020 г.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1.1. Общие принципы ФДТ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – один из методов лечения онкологических заболеваний, основанный на способности фотосенсибилизатора (ФС) селективно накапливаться в опухолевой ткани. Процесс ФДТ запускается под действием лазерного излучения в сенсibilизированных клетках и тканях, что приводит к реакциям с выделением активных форм кислорода (АФК) и разрушению пораженных тканей [6, 21]. ФДТ одобрена Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (англ. Food and Drug Administration, FDA), в России данный вид терапии был внесен в «Перечень видов высокотехнологичной медицинской помощи, оказываемой за счет средств федерального бюджета в федеральных медицинских учреждениях». ФДТ существенно расширяет арсенал имеющихся на сегодняшний день методов лечения опухолей различной локализации, а также рекомендована при опухолях, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [22, 23].

Исторически первое применение фотосенсибилизирующего средства в сочетании со светом можно отнести к 1905 году, когда была предпринята первая попытка лечения рака кожи с использованием 5% раствора акридиновых красителей, однако процедура не получила широкого распространения [24]. Исследования Р.Л. Липсона и Е. Шварца в 50-60-е годы XX века возобновили интерес к методу фототерапии и показали возможность визуализировать границы опухолевого процесса за счет флуоресцентных свойств ФС [6, 25, 26]. Началом широкого клинического применения ФДТ в онкологии считается вторая половина прошлого столетия, когда Т. Догерти (Институт рака им. Розуэлла в Буффало, штат Нью-Йорк) описал развитие некротического процесса в 90% обработанных светом опухолей [27].

Для проведения ФДТ требуется три основных компонента: ФС, лазерное излучение со специфичной для данного ФС длиной волны и молекулярный

кислород [28, 29]. Ни один из компонентов процедуры сам по себе не является токсичным, но вместе они инициируют фотохимическую реакцию, которая завершается образованием высокореактивных продуктов, называемыми АФК, включающие ионы кислорода, свободные радикалы (СР) и перекись [30–32]. В свою очередь, продукты фотохимической реакции способны вызывать значительную токсичность, приводящую к гибели клеток по пути апоптоза, некроза или аутофагии [33–37]. Противоопухолевые эффекты ФДТ *in vivo* следуют из трех взаимосвязанных механизмов - прямого цитотоксического воздействия на опухолевые клетки, повреждения сосудистой сети опухоли и индукции сильной воспалительной реакции, которая может привести к развитию системного иммунного ответа [35, 38–40].

Поскольку ФДТ является двухэтапной процедурой, то после введения светочувствительных ФС опухоль облучают светом соответствующей длины волны. В случае легкодоступных для проведения процедуры образований (меланома, базальноклеточная карцинома и др.) облучение происходит непосредственно на поверхности тела, однако опухоли внутренних органов также не являются противопоказанием для проведения фототерапии – свет может быть доставлен практически в любой орган тела с помощью гибких волоконно-оптических устройств. Эффективность ФДТ определяется как способностью ФС локализоваться в опухолевых очагах, так и точной доставкой света к целевому органу [6, 41, 42].

1.1.2. Фотоокислительные реакции, лежащие в основе ФДТ

В своем основном состоянии молекула ФС имеет два электрона с противоположными спинами, и такое состояние называется синглетным. Поглощение фотона света с соответствующей квантовой энергией (длиной волны) приводит к возбуждению молекулы в результате электронного перехода. ФС в возбужденном состоянии очень нестабилен и теряет свою избыточную энергию в виде излучения света (флуоресценция) или тепла [43, 44]. Возбужденный синглетный ФС способен перейти в более стабильное возбужденное триплетное состояние. Молекула ФС в триплетном состоянии может переходить обратно в

основное состояние, испуская при этом фотон, но это частично «запрещенный процесс» по правилам квантового отбора, поэтому триплетное состояние гораздо более долгоживущее по сравнению с синглетным возбужденным состоянием (доходит до секунды по сравнению с наносекундами для возбужденного синглета) [45].

Находясь в своем возбужденном состоянии ФС может принимать участие в двух типах реакций. Длительное время жизни триплетного состояния позволяет ему передать энергию при столкновении с молекулярным кислородом (O_2), который уникален тем, что является триплетом в своем основном состоянии. Эта стадия переноса энергии приводит к образованию синглетного кислорода (1O_2) и называется фотохимическим процессом типа II [4, 23, 45, 46]. Фотохимический процесс типа I происходит, когда ФС в возбужденном состоянии подвергается реакции переноса электронов, образующих в конечном итоге активные формы кислорода (АФК) [47, 48] с образованием, например, катион-радикала или анион-радикала. Анион-радикал может реагировать с кислородом с образованием супероксидного анион-радикала ($O_2^{\bullet-}$), не отличающегося большой реакционной способностью. Дисмутация или одноэлектронное восстановление $O_2^{\bullet-}$ приводит к образованию перекиси водорода (H_2O_2), которая, в свою очередь, может подвергаться другому одноэлектронному восстановлению с образованием мощных окислительных гидроксильных радикалов (HO^{\bullet}) (реакция Габера - Вейса) [11, 45, 48, 49].

Генерация АФК по пути фотохимической реакции типа II протекает легче, чем с помощью типа I, и считается, что большинство ФС, используемых сегодня для противоопухолевой ФДТ, работают именно по этому механизму. При этом оба типа реакций могут протекать одновременно и конкурировать между собой, что зависит от типа ФС, концентрации кислорода в ткани и pH среды [45]. Эти АФК повреждают большинство типов биомолекул (аминокислоты, липиды, нуклеиновые кислоты) [45, 50]. Схематически эти механизмы представлены на рисунке 1.

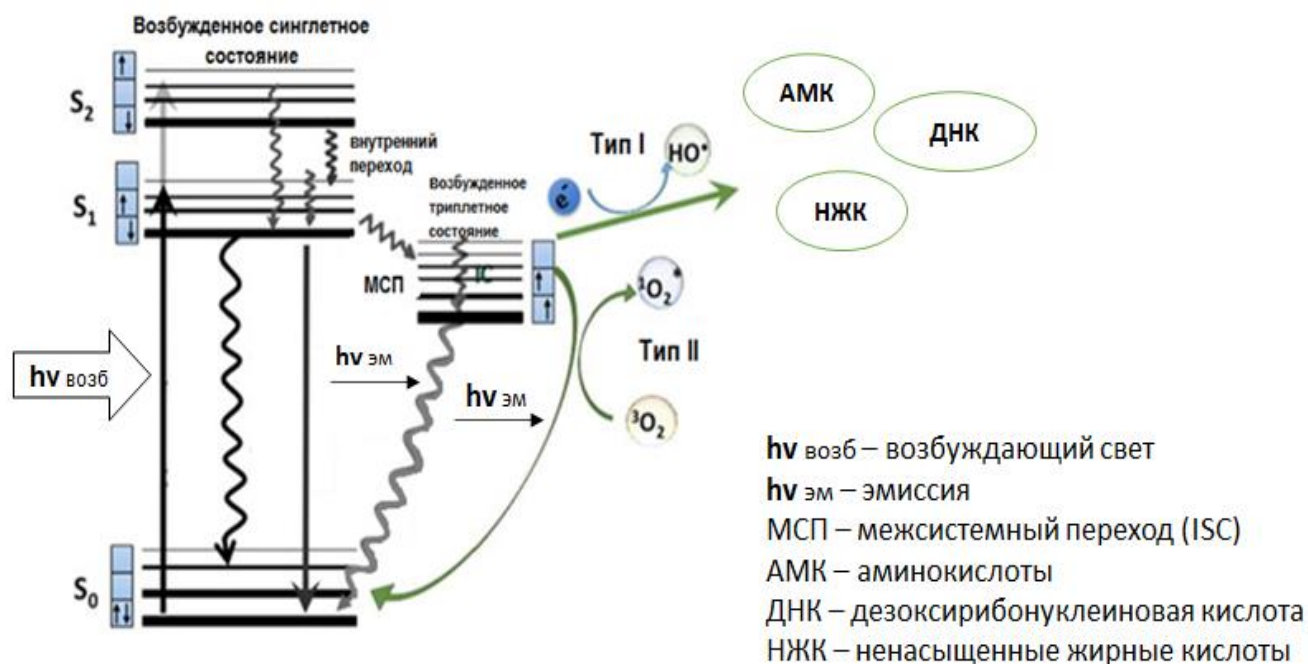


Рисунок 1 — Фотоокислительные реакции I и II типа, лежащие в основе фотодинамической терапии

1.1.3. Классификация ФС для проведения ФДТ

ФС – вещество эндогенного или синтетического происхождения, способное фотосенсибилизировать биологические ткани, то есть увеличению их чувствительности к воздействию света за счет фотохимических или фотофизических реакций [3, 45, 51]. Можно выделить следующие требования к ФС:

- 1) фотосенсибилизация только при определённой длине волны;
- 2) высокая фотохимическая активность, характеризующаяся максимальным выходом токсических АФК;
- 3) отсутствие *темновой* токсичности (полная биологическая безопасность в отсутствие света, фотоактивирующего ФС);
- 4) полоса возбуждения не должна перекрывать полосы поглощения эндогенных веществ, таких как меланин, гемоглобин и др.;
- 5) высокая селективность накопления в отношении опухолевых тканей.

Таблица 1 – Некоторые классы наиболее распространенных в клинической и экспериментальной практике ФС и их представители

Класс	Группа	Представители
Тетрапиррольные ФС	Порфирины	Фотофрин (фактическая структура фотофрина представляет собой сложную смесь сложноэфирных и эфирных димеров и олигомеров), [58], ALA-индуцированный протопорфирин IX, Аласенс [59]
	Хлорины	Фоскан [52], Вертепорфин [53], Хлорин е6 [52, 54, 55], Моноаспартилхлорин (е6) [54], НРРН [56].
	Бактериохлорины	LUZ11 [57], BC19 [58].
	Фталоцианины	Лизосомальный ZnPC [59], Хлоралюминийсульфированный фталоцианин (CASP) [60], Фталоцианин кремния (PC4), [61].
Синтетические ФС	Фенотиазиниевая соль	Метиленовый синий [62], Толуидин Блю О [63], PP904 [64].
	Бензофенотиазиниевая соль	EtNBS [65].
	Галогенированный ксантен	Роза бенгальская [66].

	Скварины	ASQI [67].
	BODIPY	Цинк (II) -дипиколиламин ди-йод-бодипи [68], DIMPy-BODIPY [69].
	Феналеноны	Катионные [52].
	Комплекс переходного металла	Рутений [70], Родий [71], Иридий [52].
Природные соединения в качестве ФС	Периленхиноны	Гиперицин [72], Гипокреллин, [73].
	Флавины	Рибофлавин [7, 74]
	Куркуминоиды	Куркумин, [75]

1.1.4. Механизмы ФДТ-опосредованной цитотоксичности

ФДТ может приводить к различным путям гибели клеток, в том числе к апоптозу, некрозу и аутофагии [36, 39, 76]. Реакция на ФДТ может варьироваться не только в зависимости от типа клетки, ее генетического или метаболического потенциала, но также в зависимости от экспериментальной модели, дозы светового воздействия, различных типов ФС и их внутриклеточной локализации [55, 77].

АФК и СР, повреждающие клетки, образуются при непосредственной активации ФС энергией лазерного излучения. Хотя эти первичные цитотоксические агенты являются недолговечными, имеется достаточно доказательств того, что фототерапия вызывает длительный окислительный стресс в клетках, подвергнувшихся терапии [37, 78]. Окислительный стресс (ОС) после ФДТ возникает из-за окисленных продуктов, таких как липиды [78] и белки [79], имеющих более длительное время жизни, истощения внутриклеточных антиоксидантов [80] и, следовательно, обуславливает дальнейшее обострение и

без того нарушенного внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза.

Генерирование цитотоксических агентов независимо от типа протекающей реакции и окислительного стресса приводит к активации трех различных противоопухолевых механизмов. Первый механизм основан на прямой токсичности фотопродуцируемых АФК и СР, которые повреждают биомолекулы и влияют на функции органелл и клетки в целом. Например, 8-гидроксидезоксигуанозин является продуктом реакции АФК с гуанозином [81] и может индуцировать повреждение ДНК [76]. Кроме того, 8-оксо-7,8-дигидро-2'-гуанозин является продуктом реакций окисления РНК, что приводит к нарушению трансляции РНК-белка [76].

Линолевые кислоты фосфолипидов являются таргетными мишенями для АФК-опосредованного перекисного окисления [82, 83], давая 9-, 10-, 12- и 13-гидропероксиоктадекадиеновые кислоты в качестве специфических продуктов окисления линолевой кислоты, опосредованного $^1\text{O}_2$. Другие мембранные компоненты, такие как холестерин, α -токоферол, альдегиды и простагландины, подвержены окислению с помощью АФК по механизмам фотохимических реакций типа I и II. Окисленные модификации фосфолипидов и встроенных в мембрану молекул приводят к изменениям ее пластичности, проницаемости, свойств фазового перехода и функциональности мембранных белков [47, 84, 85]. Поскольку многие ФС являются липофильными, окисление мембранных компонентов с помощью ФДТ, вероятно, является основной причиной гибели клеток.

В дополнение к нуклеиновым кислотам и липидам, большинство белковых остатков также подвержены окислению по типу I и типу II, что потенциально может привести к разрыву полипептидного остова в результате гидролиза пептидной связи, расщепления основной цепи, или образованию белок-белковых поперечных связей [86]. Конкретные аминокислоты, такие как гистидин, триптофан, тирозин, цистеин и метионин, которые могут быть вовлечены в активные центры ферментов, также могут быть окислены. Органические

соединения, которые в наибольшей степени модифицированы с помощью генерируемых в результате фотохимической реакции цитотоксических продуктов, включают белки, участвующие в энергетическом метаболизме (например, α-енолазу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу), белки теплового шока (HSP) и цитоскелетные белки (например, цитоплазматический актин 1 и филамин А) [2, 41, 87, 88]. Помимо отрицательного воздействия на функцию белка, окислительная модификация этих биологически важных субстратов нарушает физиологическое окислительно-восстановительное состояние клеток, приводя к окислительному стрессу и, в случае чрезмерного повреждения или стресса, гибели клеток по одному из механизмов (апоптоз, аутофагия или некроз), в зависимости от того, какие внутриклеточные субстраты наиболее подвержены воздействию АФК и СР [76].

1.1.5. Апоптоз

Апоптоз - это сложный многоступенчатый процесс программируемой гибели клеток, который может быть инициирован либо активацией соответствующих рецепторов, либо выделением цитохрома из митохондрий [89], что в конечном итоге приводит к активации каскадов каспаз 3, 6 и 7 [90, 91]. В результате происходит расщепление клеточных субстратов, что приводит к характерным биохимическим и морфологическим изменениям клетки [92, 93]. Хорошо известно, что устойчивость опухолевых клеток к апоптозу является особенностью опухолевого процесса, поэтому активация этого пути в большинстве случаев заложена в самом принципе противоопухолевой терапии [94]. Считается, что ФДТ индуцирует фотоповреждение Bcl-2 и родственных антиапоптотических белков и активирует проапоптотические белки семейства Bax [95]. Сообщалось об изменении экспрессии белков семейства Bcl-2 в различных клеточных линиях и опухолях после ФДТ. Клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека, резистентная к ФДТ, показала вариабельность многочисленных генов и белков, включая повышение уровня Bcl-2 и снижение уровня Bax [96]. Апоптотическая гибель клеток, вызванная ФДТ с использованием в качестве ФС 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК)

представляла собой результат подавления уровня мРНК Bcl-2 и повышение мРНК Вах в клеточной линии рака шейки матки, в клетке рака пищевода и в клеточной линии U87 MG злокачественной глиобластомы человека [97]. Участие белков Вах в ФДТ-опосредованном апоптозе была показана в работе Srivastava и др. [98] при оценке влияния ФДТ на состояние белка Вах в трансфицированных Bcl-2-гиперэкспрессирующих клетках эпидермальной карциномы A431. С помощью иммуноблоттинга было показано, что световое воздействие приводит к увеличению уровня белка Вах в клетках по сравнению с нормальными клетками A431 и увеличению соотношения Вах/Bcl-2 [98]. Исследование, проведенное Usuda и др. [99], также подтвердило участие Вах в ФДТ-опосредованной гибели клеток. Результаты показали, что Рс4-ФДТ вызывает высвобождение белка Вах из митохондрий клеток MCF7, но не из Вах-негативных клеток рака простаты человека DU-145. Накопленные данные свидетельствуют о том, что ФДТ является эффективным индуктором апоптоза во многих линиях раковых клеток, тогда как отсутствие способности подвергаться апоптозу не защищает клетки от цитотоксических эффектов ФДТ. Таким образом, опухолевые клетки с повышенным соотношением Вах/Bcl-2 могут более эффективно отвечать на ФДТ [37].

1.1.6. Аутофагия

Аутофагия - это катаболический клеточный процесс, позволяющий клетке поддерживать баланс между синтезом, деградацией и переработкой клеточных продуктов [100]. Наиболее известный механизм действует следующим образом: двойная мембранная структура, называемая аутофагосомой, окружает область-мишень, создавая везикулу, которая отделяет ее содержимое от остальной части цитоплазмы. Этот пузырь затем транспортируется и сливается с лизосомой, образуя структуру, называемую аутофаголизосомой, содержимое которой впоследствии разлагается лизосомальными гидролазами [101, 102]. Помимо облегчения удаления нежелательных белков, органелл и микроорганизмов, аутофагия также позволяет клетке перераспределять свои питательные вещества из ненужных процессов в жизненно важные во время голодания или стресса.

Молекулярный контроль аутофагии стал предметом внимания в конце 1990-х годов. Сигнальные пути, регулирующие этот процесс, стали более понятными после идентификации мишени рапамицинкиназы (mTOR), которая контролирует рост клеток и синтез белка [103].

Одним из первых направлений в области изучения аутофагии стал опухолевый процесс [104]. Было обнаружено, что белок Beclin1, участвующий в аутофагическом механизме, является также опухолевым супрессором [105]. Первоначально аутофагия подавляет рост опухоли за счет производства Beclin1. Однако впоследствии опухоль становится более адаптированной и этот механизм начинает способствовать прогрессированию опухоли, так как позволяет выживать клеткам в центральной части опухоли с низким содержанием питательных веществ. Также было обнаружено, что аутофагия блокирует апоптотические пути, тем самым защищая раковые клетки от лечения [105]. С другой стороны, некоторые методы лечения рака вызывают аутофагическую гибель опухолевых клеток. Этот двойственный эффект аутофагии может быть использован при проведении противоопухолевой терапии.

До сих пор неясно, как именно аутофагия влияет на результат ФДТ [39, 106, 107]. В целом, клетки млекопитающих используют аутофагию в качестве защиты от АФК-опосредованного повреждения путем очистки клеток от поврежденных органелл [108]. В зависимости от типа АФК и степени окислительного повреждения, ФДТ может стимулировать аутофагию [109], которая либо защищает клетки, либо вызывает аутофагическую гибель клеток [110]. Аутофагия может играть роль в апоптозе, вызванном ФДТ, но эти два процесса также могут происходить независимо друг от друга [111]. Исследование, проведенное на клетках лейкемии мышей L1210, показало, что волна аутофагии возникает непосредственно перед апоптозом [112]. Было также обнаружено, что предотвращение аутофагии путем подавления экспрессии гена *Agt7* позволяет добиться эффекта ФДТ при более низких дозах облучения. Это наблюдение согласуется с теорией, согласно которой аутофагия является защитным механизмом против АФК, индуцированных ФДТ [113].

Многие белки, непосредственно участвующие в аутофагическом процессе, повреждаются под действием АФК, генерируемых в процессе ФДТ. Некоторые митохондриальные ФС вызывают повреждение Bcl-2, с которым связывается Beclin1 (проаутофагический белок). На белок IP3, регулятор аутофагического процесса, связанного с ЭР [114, 115], влияет фталоцианиновый ФС - Pc4 [116]. ФС AIPcS вызывает повреждение мишени рапамицина, mTOR, регулятора роста клеток, который участвует в пути аутофагической передачи сигналов [117]. Другие белки, такие как Beclin1, Atg5 и Atg7, по-видимому, не подвержены воздействию ФДТ [107]. Такие ФС, как NPe6 и TPPS2 связываются с лизосомальной мембраной, вызывая ее разрыв при облучении. Высвобожденные, но не нейтрализованные протеазы могут индуцировать апоптоз при катепсин-опосредованном расщеплении Bid [118]. Лизосомы, аутофагосомы, эндосомы и аутолизосомы клеток, обработанных этим амфифильным ФС, будут накапливать его в своих мембранах. При облучении мембраны разрушаются и высвобождают свое содержимое в цитоплазму.

На основании этих результатов можно сделать вывод, что влияние ФДТ на аутофагию опухолевой клетки зависит от типа используемого ФС.

1.1.7. Некроз

Гибель клеток по пути некроза была описана как насильственная и быстрая форма дегенерации клеток, характеризующаяся разрушением органелл и плазматической мембраны, что приводит к высвобождению внутриклеточного содержимого и последующему воспалению *in situ* [119]. Некроз представляет собой гибель клеток, вызванную физическим или химическим повреждением извне и обычно считается незапрограммированным процессом [101, 120].

Общей чертой некротической и апоптотической программ, инициированной ФДТ, является быстрое высвобождение митохондриального цитохрома с в цитозоль с последующей активацией апоптосомы и каспазы-3. В случае применения ФС, локализованного в плазматической мембране, процесс фотосенсибилизации может быстро переключить баланс в сторону гибели клеток по некротическому механизму в связи с потерей целостности плазматической

мембраны и быстрого истощения внутриклеточной АТФ [121]. Также возможно, что высокие дозы ФДТ могут фотохимически инактивировать незаменимые ферменты и другие компоненты апоптотического каскада, такие как каспазы. Например, Lavie и его коллеги [115] использовали периленхиноны (гиперицин и диметилтетрагидроксигелиантрон) и обнаружили, что ФДТ в высоких дозах ингибирует апоптоз, препятствуя фосфорилированию ламина или их фотодинамическому сшиванию.

Xue и Oleinick [122] сравнили Pс4-опосредованную ФДТ клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, в которых отсутствует каспаза-3, с той же линией клеток, но трансфицированной каспазы-3. Они обнаружили апоптотические маркеры только в клетках, экспрессирующих каспазу, однако обе клеточные линии показали одинаковую степень цитотоксичности при клоногенном анализе. Dahle, Steen и Moan сообщили [123], что способ гибели клеток под действием ФДТ зависит от степени конfluenceнтности клеток. Они высевали клетки почки собаки MDCK II в различных количествах и инкубировали их с мезотетра (4-сульфонатофенил) порфином (TPPS4) в течение 18 часов, после чего промывали и облучали синим светом. Через четыре часа клетки исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии. При общей гибели клеток <55% (в низкотоксичных дозах) апоптотическая фракция была значительно выше для клеток в плотных монослоях, чем для клеток, растущих в микроколониях. Конfluenceнтные клетки были в 2,9 раза более чувствительными к ФДТ, чем клетки в микроколониях, отчасти вследствие увеличения в 1,5 раза поглощения ФС в случае плотного монослоного роста.

1.1.8. Механизмы клеточной защиты

На первой стадии инактивация АФК и СР может происходить с помощью антиоксидантной системы ферментов (глутатионная система, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза или липоамиддегидрогеназа) [124–127]. Также белки теплового шока (БТШ), выступая в качестве шаперонов для других белков, предотвращают нежелательную агрегацию белка и помогают стабилизировать частично развернутые белки [127, 128] и, таким образом,

восстанавливают клетки после повреждения ФДТ. На втором этапе после фотоповреждения может произойти усиленное восстановление белков, мембран и даже ДНК.

Еще в 1991 году появились первые работы, в которых была показана возможная устойчивость клеток к фотодинамическому воздействию [129]. Клетки фибросаркомы RIF-1 подвергались воздействию по двум протоколам с использованием Фотофрина II: короткое воздействие (первичное повреждение, связанное, главным образом, с плазматической мембраной) и длительное воздействие (связанное с повреждением органелл и ферментов). В обоих случаях резистентные варианты демонстрировали стабильный уровень фотосенсибилизации и увеличение выживаемости на 25% и 30%, соответственно, при самых высоких дозах света. Когда устойчивые клетки вводили мышам, то, соответственно, наблюдали развитие устойчивости опухоли к ФДТ *in vivo*. Кроме того, резистентные клетки, эксплантированные сразу после процедуры ФДТ *in vivo*, также были устойчивы к лечению. Однако индекс резистентности был ниже, что свидетельствует о том, что прямого цитотоксического действия ФДТ на опухолевые клетки недостаточно, и, таким образом, подтверждает роль факторов, связанных с повреждением сосудистой системы.

Считается, что структура ФС является ключевым моментом в развитии резистентности, и эта особенность, вероятно, связана с его конкретной субклеточной локализацией [127]. Гидрофобный препарат Фотофрин II локализуется в плазматической мембране или во внутриклеточных мембранах, включая митохондриях, в зависимости от времени инкубации [130], тогда как гидрофильный дисульфонируемый фталоцианин алюминия (AIPCS4) и нильский синий А в основном находятся в лизосомах [34, 131]. Singh и др. [132] использовали эти три ФС с различной внутриклеточной локализацией, чтобы индуцировать резистентные к ФДТ варианты опухолей. Они обнаружили различные степени устойчивости, и только из линии аденокарциномы толстой кишки HT29 можно было выделить резистентные варианты при использовании трех ФС. Линия клеток мочевого пузыря HT1376 продемонстрировала

резистентность только к нильскому синему А, тогда как нейробластома SK-N-MC вообще не развивала резистентности, что позволило сделать вывод, что резистентность в случае ФДТ направлена на сам препарат, а не на фотосенсибилизацию.

Понимание резистентных механизмов может потенциально помочь разработать новые и надежные стратегии лечения, такие как комбинация ФДТ с химиотерапией или другими методами лечения.

1.1.9. Сосудистые повреждения при ФДТ

Неоангиогенез является ключевым процессом в развитии опухолей. Некротические очаги и низкое парциальное давление кислорода в опухоли, где нарушен сам процесс формирования сосудов и их архитектура, говорит о важности адекватного кровоснабжения для любого процесса в живом организме, в том числе и для канцерогенеза. Повреждение существующей сосудистой системы или ингибирование образования новых сосудов подавляет пролиферацию опухолевых клеток, в связи с чем появилась новая перспективная группа антиангиогенных лекарственных препаратов – блокаторы эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF) (бевацизумаб, ранибизумаб) [29, 133, 134].

Повреждение сосудистой сети опухоли является важным фактором эффективности ФДТ. Например, терапевтический эффект деривата гематопорфирина (HrD) в значительной степени связан с повреждением эндотелиальных и субэндотелиальных клеток и, как результат, нарушением кровотока [88]. Прямое повреждение сосудистой сети значительно увеличивается при сокращении времени между введением ФС и его световой активацией, что было исследовано, когда противоопухолевое действие вертепорфина на хондросаркомы крыс оценивали путем изменения светового интервала между введением и активацией лекарственного средства [88, 135]. Длительная регрессия опухоли наблюдалась, когда вертепорфин активировали через 5 минут после инъекции, вызывая ишемический эффект в опухоли. ФДТ через 180 минут после введения вертепрофина не вызывала выраженного острого сосудистого ответа. Эти исследования иллюстрируют влияние повреждения сосудов на разрушение

опухоли, вызванное ФДТ. Внутрисосудистая ФДТ повреждает эндотелиальные клетки, меняя их морфологию и расширяет соединения между ними. Поврежденные клетки выделяют факторы свертывания крови, такие как фактор Виллебранда, активирующий тромбоциты [21, 136]. Активированные тромбоциты взаимодействуют с субэндотелием, что приводит к агрегации последних, образованию тромба, последующей полной закупорке или существенному сужению сосудов, еще больше снижая приток крови, ограничивая доставку питательных веществ и, в конечном итоге, приводя к гипоксии ткани и разрушению опухоли [135, 137, 138].

Повышение эффективности также наблюдалось, когда комбинировалось воздействие на опухолевую паренхиму (длительный интервал между введением ФС и его активацией) и на сосудистую сеть (короткий интервал) [139]. Усиленный терапевтический эффект в этих исследованиях, вероятно, связан с более продолжительной гипоксией тканей. При измерении уровня парциального давления кислорода в тканях (pO_2) во время и после ФДТ, pO_2 значительно падает во время обеих процедур вследствие образования АФК. Однако при фототерапии уровни кислорода быстро восстанавливаются, но в случае процедуры, нацеленной на сосудистую сеть, такого восстановления не наблюдается. Терапевтический результат снижает реоксигенация тканей после ФДТ, но ее можно избежать путем разрушения кровеносных сосудов, обеспечивая таким образом длительную гипоксию и лучший терапевтический результат [140].

1.1.10. Иммунный ответ при ФДТ

Проблема терапевтического воздействия на метастатические очаги опухолей на сегодняшний день остается нерешенным вопросом, поэтому существует повышенный интерес к методам лечения, которые устраняют не только первичные опухоли, но и системно активируют противоопухолевый иммунный ответ. В этом смысле ФДТ выступает в качестве перспективного направления, поскольку недавние результаты указывают на то, что ФДТ способна вызывать системные эффекты, включая переключение иммунного ответа [6, 40].

Целью иммунотерапии является создание сильного иммунного ответа, стимулирующего эндогенные цитотоксические лимфоциты для уничтожения опухолевых клеток и, в конечном итоге, достижения долгосрочного противоопухолевого иммунитета и увеличения общей выживаемости после проведенной терапии [141]. В последние годы было показано, что некоторые терапевтические подходы способны вызывать перспективный вид гибели раковых клеток, называемый иммуногенной гибелью клеток или иммуногенным апоптозом (ICD, Immunogenic cell death) [142]. Концепция ICD была недавно введена для описания пути гибели опухолевых клеток, которые выделяют молекулы эндогенной опасности (DAMPs) после воздействия определенных цитотоксических агентов, которые распознаются как антиген (АГ) [31, 142]. Эти сигналы дополнительно распознаются дендритными клетками (ДК) для стимуляции презентации опухолевых антигенов Т-клеткам. Было выяснено, что инициирование способа гибели опухолевых клеток, связанного с высвобождением DAMPs, заметно повышает иммуногенность раковых клеток. До настоящего времени основные DAMPs, вовлеченные в ICD, включали в себя белок эндоплазматического ретикулума (ЭР) кальретикулин, БТШ 70, БТШ 90 и пассивно высвобождаемый ядерный негистоновый хроматин-связывающий белок (HMGB1). Клетки иммунной системы, такие как макрофаги, лимфоциты и ДК, привлекают DAMPs во время воспаления, чтобы удалить клеточный мусор и способствовать заживлению тканей [92, 142, 143].

Традиционные виды противоопухолевой терапии, такие как химио-, лучевая и таргетная терапии были изучены как потенциальные индукторы иммуногенного потенциала, но только некоторые из них показали активацию ICD, так как сама идея такого вида стимуляции иммунного ответа включает в себя условие индукции ЭР – стресса, вызванного АФК. В таком случае потенциал ФДТ в стимуляции ICD кажется наиболее перспективным, что было показано в нескольких работах [92, 142, 143]. Потенциальные механизмы иммуностимуляции ФДТ включают острый воспалительный ответ после процедуры, который может усиливать презентацию опухолевых АГ, активирующих ДК, и их присоединение к

регионарным и периферическим лимфатическим узлам, что в конечном итоге стимулирует цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+) и NK-клетки и подавляет повторный рост опухоли [40]. Сообщалось, что степень острого воспаления, вызванного ФДТ, зависит от режима облучения и коррелирует с выраженностью сосудистого поражения [40]. Иммуногенный потенциал еще не был протестирован для всех ФС, однако недавние результаты с гиперацином представляют собой важное достижение, поскольку они позволили классифицировать ФДТ как терапию, способную индуцировать ICD [142, 143].

1.2. Рибофлавин (витамин В2) как перспективный ФС для ФДТ солидных опухолей

В 1879 году английский химик Александр Винтер Блит описал компонентный состав коровьего молока. Одной из составляющей был желтый пигмент, который А. Блит назвал «лактохромом». Более 30 лет после описания ученым желтый пигмент оставался не охарактеризованным. В 1920 году, после исследований Элмера МакКолума и Корнеллой Кеннеди о влиянии тканевого экстракта, содержащего желтый пигмент, на состояние организма при пеллагре, А. Эммет и Г. Лурос провели дальнейшие исследования и назвали описанный ранее пигмент «рибофлавином» (витамин В2). Физиологическое значение рибофлавина оставалось неизвестным до прорывного открытия, сделанного Отто Варбургом и Уолтером Кристианом в 1932 году [16, 144–147]. Они выделили фермент, содержащий флавиновые нуклеотиды, в настоящее время известный как флавопротеин НАДФН-дегидрогеназа, которая требует флавинмононуклеотид (ФМН) – фосфорилированную водорастворимую форму рибофлавина, в качестве кофактора для многих жизненно важных процессов, протекающих в живой клетке. В конце 1930-х годов Ричард Ривлин и Джон Пинто идентифицировали химическую структуру ФМН и флавинадениндинуклеотида (ФАД) [148] .

Рибофлавин является витамином, который играет ключевую роль в энергетическом обмене и незаменим для роста и пролиферации клеток. Рибофлавин участвует в широком спектре окислительно-восстановительных реакций через свои производные (кофакторы) - ФМН и ФАД, которые действуют

как переносчики электронов при клеточном дыхании и выработке энергии [145]. Во многих исследованиях изучалась метаболическая роль рибофлавина и его связь с широким спектром заболеваний [17], включая онкологию [149–153].

Рибофлавин и его производные были успешно использованы в *in vitro* и *in vivo* исследованиях в качестве лигандов, нацеленных на опухоль, демонстрируя усиленное специфическое накопление рибофлавин-связанных наноплатформ, несущих паклитаксел, в клетках MCF-7 [154], а также рибофлавин-связанных липосом в моделях мышечных ксенотрансплантатов эпидермоидной карциномы A431 и рака предстательной железы PC3 [155].

1.2.1. Физико-химические свойства рибофлавина

С химической точки зрения рибофлавин состоит из изоаллоксазинового кольца (флавина), замещенного в положении N10 рибитолом ($C_5H_{12}O_5$, адонит, адонидодульцит) – пятиатомным спиртом. Рибофлавин - это порошок оранжево-желтого цвета, термостойкий, светочувствительный и слабо растворимый в воде и кислоте (1 г на 3-15 л воды). Однако его производные - ФМН и ФАД хорошо растворимы благодаря своим ионным фосфатным группам [151, 156, 157]. Изоаллоксазиновое кольцо в составе рибофлавина и его производных обеспечивает поглощение света в УФ и синем диапазоне спектра и флуоресценцию в желто-зеленой области (530 нм), которая ослабевает при сдвиге pH в кислую и щелочную области. Флавины имеют четыре пика поглощения с длинами волн 450, 375, 265 и 220 нм. Квантовый выход флуоресценции является низким по сравнению с другими флуорофорами и зависит от полярности растворителя ($\pm 0,45$ в ацетонитриле и $\pm 0,26$ в воде) [19, 145, 158]. Водный раствор флавинов состоит из равновесного соотношения между тремя окислительно-восстановительными формами: окисленной, одноэлектронно-восстановленной (семихинон) и полностью (двухэлектронная) восстановленной (гидрохинон) формами. Каждое состояние существует в ионизированной и нейтральной формах. Окислительно-восстановительное состояние флавинов резко влияет на их физико-химические свойства. Окисленные флавины имеют желтый цвет со специфическим пиком поглощения около 450 нм и желтовато-зеленой

флуоресценцией. В восстановленной форме семихинона флавины имеют синий или красный цвет, в зависимости от состояния протонирования изоаллоксазинового кольца. В полностью восстановленном состоянии флавины практически теряют свой цвет и становятся бледно-желтыми [11, 16, 19, 159].

1.2.2. Транспорт рибофлавина

До настоящего времени были идентифицированы три переносчика рибофлавина - RFVT 1, 2 и 3 [160–163]. Систематическое исследование уровней RFVT в здоровой ткани человека выявило отличительные тканеспецифичные профили их экспрессии, что свидетельствует о роли RFVTs в регуляции клеточного гомеостаза рибофлавина [162]. Однако индивидуальная роль каждого RFVT остается неясной. Например, в случае плоскоклеточной карциномы пищевода SCC наблюдалось 185-кратное увеличение уровня RFVT 3, в 42 раза более высокая экспрессия RFVT 2 отмечена в метастатической меланоме кожи, в 22 раза – RFVT 1 в ткани рака молочной железы люминального типа А по сравнению с их соответствующими здоровыми тканями [164, 165].

Исследования, изучающие механизмы поглощения рибофлавина, дали противоречивые результаты. С одной стороны, клатрин-опосредованный эндоцитоз рассматривается в качестве основного механизма клеточного поглощения рибофлавина [166], но в то же время истощение АТФ не полностью ингибирует его внутриклеточное накопление, что позволяет рассматривать пассивную диффузию в качестве альтернативного пути интернализации. Однако этот путь наблюдался лишь во время добавления рибофлавина *in vitro* в избыточных концентрациях и поэтому не представляется подходящим вариантом для эффективной доставки препарата [167]. Данные свидетельствуют о том, что рибофлавин локализуется в митохондриях, что может быть использовано для доставки цитотоксических препаратов [168]. Поскольку рибофлавин участвует в клеточной дыхательной цепи [169] и дефицит этого витамина связан с дисфункцией митохондрий [170, 171], его использование может быть перспективным для адресной терапии опухолей.

1.2.3. Механизмы фотосенсибилизации рибофлавина

Флавины участвуют в реакции сенсibilизированного окисления при воздействии синего или УФ света [172], образуя синглетное состояние с интенсивной флуоресценцией, но коротким временем жизни (5 нс в воде). Это синглетное состояние распадается через межсистемный переход в чрезвычайно активное и долгоживущее триплетно-возбужденное состояние (время жизни 15 мс в воде) [9]. Последнее является мощным бирадикальным окислителем, способным окислять широкий спектр биомолекул в процессах фотоокисления I типа и нарабатывать синглетный кислород в механизмах фотоокисления II типа [11, 16, 45, 173, 174].

По сравнению с экзогенными ФС, рибофлавин и его производные, как эндогенные молекулы, поглощают УФ и синий свет, образуя свободные радикалы (СР) и СК. Эффективность генерации СК выражается квантовым выходом (ФД) и снижается при уменьшении парциального давления кислорода. В естественных условиях, например, в живой коже, парциальное давление кислорода составляет всего 20 мм рт. ст. ($[pO_2] = 3 \text{ мМ}$), а внутри самих клеток это значение еще меньше. Ввиду разницы в парциальном давлении кислорода генерация СК фотоактивированным рибофлавином уменьшается примерно в два раза. Эти результаты важны при сравнении экспериментов *in vitro* и *in vivo* [45, 175].

В результате фотоактивации рибофлавина существует конкуренция между образованием СР и СК. Это соотношение зависит от концентрации кислорода в соответствующих экспериментальных условиях. В аэрированных условиях ($[pO_2] \approx 280 \text{ мкМ}$) преобладает образование СК ($\Phi\Delta = 0,54$). При низких концентрациях кислорода ($[pO_2] < 2 \text{ мкМ}$) генерация СК уменьшается до $\Phi\Delta < 0,20$. Это важно, поскольку большинство эндогенных ФС расположены внутри клеток, а парциальное давление кислорода внутри клетки может составлять 4 мм.рт.ст ($[O_2] = 7,5 \text{ мкМ}$) и даже меньше [176]. В тоже время генерация других АФК (например, кислородных радикалов) может увеличиться. Это хорошо согласуется с данными о том, что водный раствор рибофлавина проявляет более сильную цитотоксичность при облучении в условиях гипоксии, чем в аэрированных

условиях вследствие повышенной генерации перекиси водорода [19]. Недавние результаты также свидетельствуют о том, что инактивация цитозольного фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) является результатом прямого окисления возбужденным триплетным состоянием рибофлавина в реакции фотосенсибилизированного типа I (при низкой концентрации кислорода в ткани) [45].

1.2.4. Продукты фоторазложения рибофлавина

Рибофлавин является светочувствительным соединением и образует ряд фотопродуктов в водных и органических растворителях под воздействием УФ (365 нм) и синего света (450 нм). Основные продукты фотолиза включают формилметилфлавин (ФМФ), который еще более чувствителен к свету и распадается на люмихром (ЛХ) и люмифлавин (ЛФ). Циклодегидрорибофлавин (ЦДРф) является еще одним фотопродуктом, который образуется при добавлении молекулы рибофлавина в присутствии двухвалентных анионов, таких как гидрофосфат (HPO_4^{2-}) и сульфат (SO_4^{2-}) [9, 19, 156, 177]. В дополнение к этим соединениям также сообщается о незначительных фотопродуктах, которые включают карбоксиметилфлавин (КМФ), β -кетокислоту, флаво-фиолетовый (продукты расщепления изаллоксазинового кольца) и 2,3-бутандион. Природа продуктов фотодегградации рибофлавина зависит от условий реакции, таких как природа растворителя, pH, тип и концентрация буфера, содержание кислорода в среде, интенсивность света и длина волны [156].

ФМФ, ЛХ и ЛФ образованы возбужденным триплетным состоянием рибофлавина, тогда как возбужденное синглетное состояние играет роль в образовании ЛХ и ЦДРф [178, 179]. Реакции, вовлеченные в фотохимическую дегградацию рибофлавина, включают фотовосстановление, фотоприсоединение и фотодеалкилирование.

Общая схема фотодегградации рибофлавина представлена на рисунке 2.

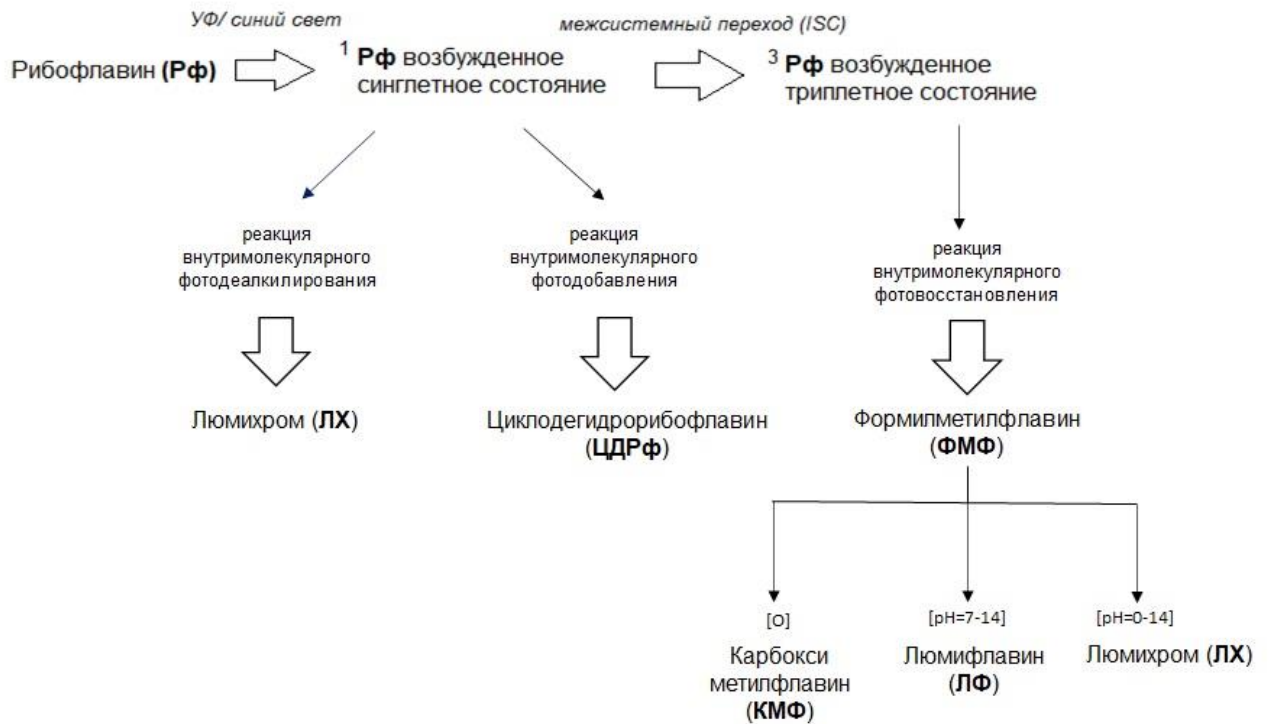


Рисунок 2 — Общая схема фотодеградации рибофлавина в растворе под действием УФ (365 нм) и света синего диапазона спектра (450 нм)

Влияние источника излучения, интенсивности и длины волны на образование продуктов фотодеградации рибофлавина

Характеристики излучения являются важным фактором, играющим значительную роль в фотодеградации рибофлавина. Около 30% вещества разрушается солнечным светом в водном растворе в течение 30 минут. В виде порошка и в условиях темноты рибофлавин остается стабильным в течение длительного времени. Скорость распада рибофлавина выше при УФ облучении (365 нм) по сравнению с синим светом (450 нм), что может быть связано с более высокой интенсивностью источника УФ излучения [179–181].

Влияние pH среды

На фотодеградацию рибофлавина и его водорастворимой формы - ФМН и компонентный состав фотопродуктов сильно влияет pH среды: он устойчив в кислых растворах, но легко разрушается в нейтральных и щелочных. Основными фотопродуктами рибофлавина являются ЛХ и ЛФ, которые образуются при pH 1–12 и pH 7–12, соответственно, в результате окисления рибитоловой боковой цепи.

Оба этих основных фотопродукта образуются через триплетное возбужденное состояние при посредничестве ФМФ, который служит промежуточным звеном в фотолизе рибофлавина [156, 179]. Эти продукты фотораспада так же являются светочувствительными, однако ЛХ более стабилен в кислой среде, чем в щелочной. ЛФ может подвергаться дальнейшему распаду в щелочной среде (при рН 14–14,6 в условиях комнатной температуры) и образует анионный 7,8-диметилизоаллоксазин, анионный метилизоаллоксазин и хиноксалиновые производные 1,2 – дигидро – 2 – кето – 1, 6, 7 – триметилхиноксалин – 3 – карбоновой кислоты, 2 – метокси – 6, 7 – диметилхиноксалин – 3 – карбоновой кислоты, метилхиноксалин – 2 – ола и 3 – гидроксид – 1, 6, 7 – триметил – 1Н – хиноксалин – 2, как результат расщепления изоаллоксазинового кольца [145, 182]. Также при фоторазложении рибофлавина образуются некоторые второстепенные продукты, такие как ЦДРФ при рН 1–12, а β -кетокислота и дикетосоединение при рН около 10–12. Было обнаружено летучее соединение с маслянистым запахом после длительного воздействия света в 0,1М растворе рибофлавина при различных значениях рН (4,5, 6,5 и 8,5). Это соединение было идентифицировано как 2,3 – бутандион, образующийся из боковой цепи рибофлавина под действием СК [19, 181].

1.2.5. Цитотоксические свойства фотоактивированного рибофлавина

Влияние облученного рибофлавина на опухолевые клетки указывают на перспективность его применения для терапии рака. В нескольких работах было продемонстрировано, что облученный рибофлавин обладает потенциальным цитотоксическим действием против клеток лейкемии человека HL60, клеток рака предстательной железы человека РС3 и клеток меланомы мыши В16-F10, вызывая их гибель по апоптотическому пути [172]. Также вероятными потенциальными мишенями действия фотоактивированного рибофлавина является ингибирование активности матриксной металлопротеиназы - 2 (ММП - 2) и снижение экспрессии факторов роста эндотелия сосудов (VEGF; англ. vascular endothelial growth factor),

в частности VEGF-2, играющих важную роль в росте и метастазировании опухоли [134, 146, 183].

В работе [184] показано действие облученного рибофлавина на клетки аденокарциномы простаты человека РС3, которые особенно устойчивы к химиотерапевтическим препаратам. Активированный УФ светом (365 нм) рибофлавин останавливал рост клеток и проявлял цитотоксические свойства в концентрации IC_{50} 20–30 мкМ, при этом в необлученном виде он не влиял на рост клеточной культуры. Пролиферация контрольных групп клеток (гепатоциты человека, клетки простаты крысы) не снижалась под действием фотоактивированного рибофлавина. При выяснении механизма гибели клеток было выявлено значительное ингибирование уровней экспрессии белка АКТ/РКВ и p110 PI3K, что указывало на нацеленность продуктов фотораспада рибофлавина на сигнальный путь PI3K/АКТ. Индуцирование апоптоза, а не некроза или другого типа гибели клеток, было показано активацией каспазы-3, уровень которой был максимален при концентрации рибофлавина 40 мкМ. Этот результат согласуется с низким уровнем c-IAP1, наблюдаемым при использовании концентраций 40 и 50 мкМ. Тем не менее, существует вероятность активации других типов гибели клеток при более высоких концентрациях фотоактивированного рибофлавина.

Обратимое фосфорилирование белков, регулируемое протеинкиназами и протеинфосфатазами влияет на многие клеточные функции и является важным механизмом контроля пролиферации, дифференцировки и трансформации клеток [184]. Фотопродукты рибофлавина вызывали снижение уровня фосфорилирования как остатков серина/треонина, так и тирозина. Ингибирование серин/треонин фосфатазы PP2A, наблюдаемое после воздействия рибофлавина, коррелирует с другими работами, показывающими индукцию апоптоза под действием ингибиторов PP2A [185].

Фотопродукты рибофлавина могут подавлять метастатический потенциал солидных опухолей. В литературе есть сообщения об увеличении противоопухолевой эффективности тамоксифена в отношении клеток рака

молочной железы, когда эта химиотерапия была объединена с витамином В2. Молекулярный механизм действия фотопродуктов рибофлавина на различные виды раковых клеток остается до конца неизученным [185–187].

1.3. Оптимизация метода ФДТ с использованием технологии фотовозбуждения ФС ИК-светом

Глубина проникновения и эффективность доставки света являются двумя основными препятствиями при фотодинамическом лечении [21, 24]. Эндогенные хромофоры, такие как гемоглобин и меланин, имеют сильное поглощение света в синем (видимом) диапазоне спектра до 600-700 нм. Следовательно, идеальный ФС должен иметь пик поглощения выше 700 нм, чтобы обеспечить максимально глубокое проникновение света в ткани [188]. Поскольку свет может в значительной степени рассеиваться и поглощаться при взаимодействии с биотканями, коэффициент экстинкции света зависит от параметров биоткани (пигментация, фиброзная структура, гидратация и др.), а также принимая во внимание ослабление энергии с увеличением длины волны, для глубокого проникновения в ткани подходит свет в диапазоне 700 - 1100 нм (т.е. ближний ИК диапазон) [189, 190]. На сегодняшний день одним из самых безопасных и эффективных методов увеличения проникновения света через слой ткани для активации ФС является антистоксовая люминесценция и новые возможности ее применения.

1.3.1. Физико-химические свойства НАФ

Апконверсия (антистоксовая фотолюминесценция) является ступенчатым процессом, при котором свет ближнего ИК диапазона преобразуется в фотоны УФ и видимого спектра [191–193]. Этот процесс может обеспечиваться низкоинтенсивным непрерывным диодным лазером. Такое преобразование возбуждающего света может быть реализовано в апконвертирующих наночастицах (наноразмерные апконвертирующие фосфоры, НАФ) на основе фторидной матрицы, легированной трехвалентными ионами редкоземельных элементов (иттербия, эрбия или тулия).

Коэффициент конверсии (КК) - наиболее важный параметр наноматериалов, влияющий на их фотолюминесцентные свойства. КК определяется как отношение излученной мощности к поглощенной [192]. Синтез НАФ основан на координационной стабилизации солей прекурсоров металлов Na^+ , Y^{3+} , Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} в растворе олеиновой кислоты, проходящий с нагревом в бескислородной среде. Получившиеся в результате синтеза нанокристаллы с кубической кристаллической решеткой (α -фаза), характеризуется низким КК и требуют дополнительной обработки в узком диапазоне температур (310°C), после чего фазовое состояние нанокристаллов характеризуется гексагональной кристаллической решеткой (β -фаза) и отличается беспрецедентно высоким КК, пригодным для биомедицинских приложений [194] (Рисунок 3).

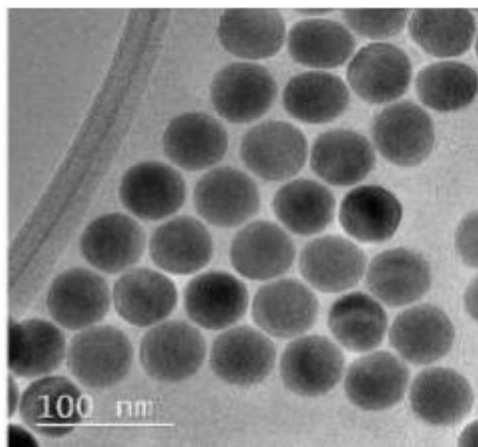


Рисунок 3 — ПЭМ изображение НАФ, размер $40\text{ nm} \times 30\text{ nm}$, гексагональная модификация (β -фаза)

НАФ, использованные в диссертационной работе, представляют собой неорганические гидрофобные нанокристаллы, состоящие из инертной матрицы-хозяина NaYF_4 и ионов лантаноидов (Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+}), выступающих в качестве центров люминесценции. Их уникальные оптические свойства основаны на феномене апконверсии. Это нелинейный оптический процесс, в котором частица последовательно поглощает два или более низкоэнергетических фотона и испускает фотон с более короткой длиной волны. Энергия возбуждающего ИК света поглощается ионами сенсibilизатора (Yb^{3+}) и безызлучательно передаётся на ионы-активаторы Er^{3+} и/или Tm^{3+} . Возбуждённые состояния ионов

лантаноидов являются долгоживущими, что создает возможность поглощения более чем одного кванта света с последующей передачей энергии тому же иону активатору. Энергия на этих ионах аккумулируется, что вызывает их переход на высокие энергетические уровни. Возвращение в исходное состояние сопровождается испусканием фотонов с энергиями, превосходящими энергию возбуждающего света. Ионы Tm^{3+} имеют несколько энергетических уровней, что обеспечивает наличие узких пиков эмиссии в УФ, видимой и ИК областях спектра, ионы Er^{3+} в свою очередь дают эмиссию в красной и зеленой областях спектра. Выраженные максимумы эмиссии дают возможность регистрировать фотолюминесцентный сигнал, четко отличая его от автофлуоресценции биоткани и рассеянного возбуждающего излучения.

Такие НАФ представляют собой новое поколение оптических зондов с большим потенциалом в области биомедицинских приложений. Кроме того, по сравнению с традиционными флуоресцентными зондами со стоксовой люминесценцией (квантовые точки, органические красители и др.), НАФ обладают важными преимуществами, такими как большие сдвиги стоксовой люминесценции, низкая токсичность и фотостабильность [194–196].

1.3.2. Модификация поверхности НАФ для биомедицинского применения

Для использования НАФ в биомедицинских приложениях поверхность гидрофобных нанокристаллов должна быть гидрофилизирована биосовместимыми полимерами. Принимая во внимание такие физиологические параметры, как фильтрация печенью, экстравазация, диффузия в ткани и выведение почками, размер частиц и их полимерное покрытие являются ключевыми факторами в биораспределении и продолжительности циркуляции в организме [197–199]. Кроме того, большую роль играет поверхностный заряд частицы, влияющий на активацию фагоцитоза. Сообщается, что частицы, несущие положительный заряд на поверхности, значительно быстрее выводятся из организма, чем нейтральные или отрицательно заряженные [200, 201].

Одним из перспективных полимеров, используемых для модификации НАФ с целью создания визуализирующих агентов для применения *in vivo*, является полиэтиленгликоль (ПЭГ). При модификации НАФ с использованием ПЭГ одна или несколько частей химически активированного ПЭГ взаимодействует с функциональными группами на поверхности частицы, образуя новый комплекс, обладающий физико-химическими и физиологическими характеристиками, которые отличаются от таковых для исходного соединения. В последнее время модификация молекулами ПЭГ используется не только как способ доставки лекарств, но как технология придания биологическому препарату определенных свойств, способствующих улучшению фармакокинетических и фармакодинамических параметров, для достижения максимальной клинической эффективности. На сегодняшний день создание покрытия из ПЭГ молекул является технологией, которая широко используется для придания лекарственным препаратам требуемых свойств: создает стерический барьер вокруг частицы, эффективно предотвращая адсорбцию белков плазмы на поверхности наночастицы, что препятствует поглощению мононуклеарными фагоцитами. Адсорбция белков плазмы, также известная как опсонизация, может происходить мгновенно, как только частица попадает в кровоток [195, 200, 202, 203]. Некоторые опсоны имеют высокую аффинность связывания и, следовательно, могут формировать прочную связь с поверхностью наночастиц. Физические характеристики получающегося в результате комплекса «наночастица-белок» могут значительно отличаться от характеристик нативной наночастицы. Понимание этих различий необходимо для оценки биологических реакций и распределения в организме. Связывание с белком может увеличить эффективный размер наночастицы и изменить ее поверхностный заряд, который затем повлияет на поглощение макрофагами, существенно снизив ее биодоступность [200, 204, 205].

1.3.3. Доставка и накопление НАФ в опухолевых тканях

Благодаря биосовместимым полимерным покрытиям, НАФ получают возможность циркулировать в кровотоке длительное время и могут эффективно

накапливаться в целевых очагах благодаря так называемому эффекту повышенной проницаемости и удержания (англ. - enhanced permeability and retention, EPR, ЭПР), который впервые был описан Я. Мацумурой и Х. Маедой в 1986 году (Yasuhiro Matsumura, Hiroshi Maeda) [206–209]. ЭПР зависит от конкретных патофизиологических характеристик опухолей по сравнению со здоровыми тканями.

Одной из наиболее важных особенностей опухолей является их инвазивный и быстрый рост, что приводит к сильному стрессу, вызванному пролиферацией большого количества клеток в пространственно-ограниченном объеме. Наличие собственного кровоснабжения является обязательным для роста и прогрессирования солидных опухолей диаметром более ~ 1-2 мм [210, 211]. Однако многие из этих кровеносных сосудов в результате сильного стресса становятся обтурированными или подвергаются рестрикции, что приводит к гипоксии и выработке проангиогенных факторов, таких как брадикинин, ИЛ-8, ММП-2, VEGF и др. Вновь образованные кровеносные сосуды обычно встречаются в опухолевой ткани с более высокой плотностью [211–214], в структуре их стенки отсутствует типичный гладкомышечный слой, они имеют больший просвет и более широкие фенестры (с размерами до 1000 нм) и обычно содержат дефектные по строению эндотелиальные клетки. Кроме того, в опухолях нарушена перфузия, результатом чего является замедление кровотока. Вследствие отсутствия правильно функционирующей лимфодренажной системы, злокачественные новообразования имеют тенденцию к развитию высокого интерстициального давления (ИД), которое ослабляет проникновение и накопление лекарственных препаратов, особенно к центру опухоли [215, 216].

Другим важным фактором, способствующим эффекту ЭПР, является стромальный компартмент, который можно подразделить на внеклеточный матрикс (ВКМ) и стромальные клетки. К последним относятся эндотелиальные клетки, перициты, миофибробласты, клетки гладких мышц, дендритные клетки, макрофаги и другие иммунные клетки. Плотность компонентов ВКМ, таких как коллаген и гиалуроновая кислота, сильно влияет на накопление наночастиц,

независимо от их природы, поскольку они формируют барьер, препятствующий экстравазации частиц вглубь опухолевого интерстиция, дополнительно способствуя их неравномерному распределению [210]. Клетки в строме опухоли играют решающую роль в определении эффективности ЭПР-опосредованного накопления препаратов. В частности, макрофаги оказывают сильное влияние на удержание или удаление наночастиц в целевом очаге [217–220]. Например, было показано, что пролекарства платины, связанные с полимером и меченные флуорофором, накапливаются в макрофагах, ассоциированных с опухолью (МАО) [55, 218]. Препараты вводили системно через хвостовую вену, накопление в подкожно имплантированных опухолях фибросаркомы HT1080 было визуализировано в режиме реального времени. По сигналу люминесценции можно было сделать вывод, что МАО действовали как депо пролекарства и постепенно высвобождали их в строму опухоли. Эксперименты по предварительной элиминации МАО привели к снижению флуоресцентного сигнала в опухоли и также к снижению эффекта ингибирования роста опухоли, что может указывать на то, что накопление и эффективность препаратов, в том числе и наночастиц, зависит от содержания макрофагов [55, 218].

Эффект ЭПР является весьма неоднородным, изменяющимся со временем в процессе эволюции опухоли и, возможно, непостоянным. Это патофизиологическое явление различается не только между экспериментальными животными моделями и реальными клиническими пациентами, но и среди опухолей и метастатических очагов одного и того же биологического объекта [207, 221]. Представление о том, что этот эффект имеет индивидуальный характер часто приводит к пессимистическому взгляду на ЭПР-опосредованную доставку терапевтического и/или диагностического объекта. S. Wilhelm и его коллеги [222] подвергают сомнению успешность доставки препаратов по данному механизму, утверждая, что среднее накопление наночастиц в целевом очаге составляет примерно 7% от общего введенного количества. Однако авторы не учитывают, что для эффективной противоопухолевой терапии этого количества может быть

вполне достаточно, так как это значение намного выше накопления стандартных цитостатических соединений [223–225].

Помимо анатомических и физиологических характеристик, размер наночастиц также влияет на эффективность доставки в опухолевую ткань [198]. Как показано в работе Цветковой и др., рибофлавин : ПЭГ-функционализованные неорганические наночастицы разного размера (10 кДа и 40 кДа; диаметром приблизительно 7 и 13 нм, соответственно) показывали преимущественное накопление в опухолевой ткани частиц в случае их молекулярной массы 10 кДа и в МАО - более крупные нанообъекты (40 кДа). Важно отметить, что повышенное накопление в опухолевой ткани не означает высокий уровень их клеточной интернализации. Хотя использование в оболочке частиц покрытий, ориентированных на перенос их белками-транспортерами, обеспечивающими таргетную доставку, все же экстравазация, локальное удержание частиц, их клеточное поглощение обусловлено в большей части их физическими характеристиками (заряд поверхности, природа полимерного покрытия и, собственно, размер частицы) [155].

1.3.4. Использование антистоксовой фотолюминесценции для проведения ФДТ

Основным ограничением ФДТ для клинического применения является недостаточная проникающая способность света в ткани для последующей активации ФС. При этом ближний ИК свет попадает в «окно прозрачности» биоткани (650-1100 нм) и может не только обеспечить глубину проникновения на порядок больше, чем у синего и УФ света, но также обладает минимальным собственным фотоповреждением для здоровых тканей, и, следовательно, является идеальным источником света для фототерапии [203, 226, 227].

Использование в ФДТ наночастиц с антистоксовым характером фотолюминесценции по сравнению с ФС и другими наноматериалами со стоксовой люминесценцией, где спектр возбуждения сдвинут по отношению к спектру излучения в сторону более длинных волн, демонстрирует улучшенную

глубину проникновения света, отсутствие автофлуоресцентного фона при визуализации частиц в биоткани и более высокий выход АФК и свободных радикалов при их фотоактивации – это именно те параметры, которые необходимы для успешного проведения ФДТ [227]. НАФ могут выступать в роли донора энергии, а в роли акцептора может быть любой применяемый ФС, длина волны возбуждения которого перекрывается со спектром люминесценции, испускаемой НАФ. Такой механизм носит название фёрстеровский резонансный перенос энергии (FRET). Необходимым условием является расстояние между молекулой ФС и наночастицей, которое не должно превышать ~5 нм [226].

ФДТ на основе НАФ совместно с ФС была продемонстрирована в нескольких клеточных экспериментах [228–230]. В исследовании, проведенном Р. Zhang и его коллегами, наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}$ со структурой ядро/оболочка были конъюгированы с Zn-фталоцианином (ZnPc). При облучении 980 нм видимый свет, генерируемый частицей, активирует молекулу ZnPc посредством резонансной передачи энергии, что приводит к локальной генерации АФК. Применение такой комбинации на клетках рака мочевого пузыря MB49 снизило их жизнеспособность на 65-70% по сравнению с интактными клетками той же клеточной линии. Дальнейшие исследования показали, что мишенью АФК были митохондрии (по месту локализации ФС), в результате чего произошло выделение цитохрома С в цитозоль и гибель клеток произошла путем апоптоза [230].

В другом исследовании, Liu и соавторы использовали фолиевую кислоту для создания тераностической фотосенсибилизирующей наноплатформы для одновременной оптической визуализации и фототерапии на основе НАФ:ФС (бенгальский розовый). Специфическое нацеливание на клетки хориокарциномы JAR, несущие на своей поверхности фолатный рецептор (ФР), подтверждается ярким люминесцентным сигналом в них, по сравнению с отсутствующим в эмбриональных фибробластах линии NIH 3T3, отрицательных по ФР. После ИК облучения лазера с интенсивностью $1,5 \text{ Вт/см}^2$ в течение 10 мин,

жизнеспособность клеток значительно уменьшились в случае хориокарциномы, но не изменилась для ФР-отрицательных нераковых клеток [231].

Wang и соавторы включили хлорин еб (Ce6) в НАФ, покрытые ПЭГ. Полученный комплекс после интернализации вызывал гибель клеток рака молочной железы 4T1 при воздействии света 980 нм с интенсивностью 0,5 Вт/см² в течение 30 минут на мышах Balb/c. В результате наблюдалось существенное торможение роста опухоли, в то время как отдельный неактивированный светом наноконкомплекс и монотерапия лазерным излучением не приводили к регрессии опухоли. Через 2 месяца был исследован биопсийный материал опухоли и паренхиматозных органов *ex vivo* с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии, в результате которого было показано, что к этому времени НАФ элиминируются из организма [232].

Y. Park и соавторы в своей работе демонстрируют эффект от системного введения ПЭГилированных НАФ (NaGdY₄):Ce6 с последующей ИК активацией. Иммунодефицитным мышам линии Balb nu/nu с глиобластомой U87-MG системно вводили созданный наноконкомплекс через хвостовую вену (0,1 мг/мышь). Накопление в опухоли отслеживали путем регистрации люминесцентного сигнала и по изображениям, полученным с помощью метода магнитно-резонансной томографии, что исследователи связывают с проявлением ЭПР-эффекта. В результате лечения объем опухоли значительно уменьшился, и существенно снизилась прогрессия роста по сравнению с контрольными группами. Эти результаты указывают на большой потенциал использования НАФ для ФДТ под контролем мультимодальной визуализации [233].

Обзор литературы показывает большой потенциал применения рибофлавина (витамина В2) и его производных, в частности ФМН, для биомедицинских приложений, в том числе в качестве ФС для ФДТ. Его биологическая безопасность и перспективность подтверждена во многих высокорейтинговых научных работах, а сдерживающим фактором для его широкого применения в биомедицинских целях является лишь недостаточная глубина проникновения в ткани его фотоактивирующего света.

Спектроскопические свойства наночастиц с антистоксовой фотолюминесценцией позволяют расширить спектр применения рибофлавина и ФМН и реализовать комбинированный метод глубокой ИК-опосредованной ФДТ. В этом случае становится возможным активация «коротковолнового» ФС светом необходимой длиной волны за счет конверсии света из ИК в УФ и синюю области спектра, происходящей внутри каждой наночастицы и осуществления фотодинамической реакции *in situ*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Список реактивов, использованных в работе

1. Натрий хлорид, «Химмед», Россия.
2. Этиловый спирт, «ПанЭко», Россия.
3. Флаavinмоноклеотид (рибофлаavin-5-фосфат), «Фармстандарт», Россия.
4. Перекись водорода, «Sigma», США.
5. Образец НАФ (β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$, Tm^{3+} / NaYF_4), «УФ+» (РТУ МИРЭА, синтез – к.х.н. Нечаев А.В.); *возбуждение НАФ – ближним ИК светом (975 нм), эмиссия – в УФ, синей и ближней ИК области спектра.*
6. Образец НАФ (β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$, Er^{3+} / NaYF_4), «УФ-» (РТУ МИРЭА, синтез - к.х.н. Нечаев А.В.); *возбуждение НАФ – ближним ИК светом (975 нм), эмиссия – в красной и зеленой области спектра.*
7. Питательная среда RPMI-1640, «ПанЭко», Россия.
8. Питательная среда DMEM, «ПанЭко», Россия.
9. L-глутамин, «ПанЭко», Россия.
10. Гентамицин (50 ед/мл), «ПанЭко», Россия.
11. Бычий сывороточный альбумин (БСА), «HyClone», США.
12. Раствор Версена, «Sigma», США.
13. Фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7.4) «ПанЭко», Россия.
14. МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид, «Sigma», США.
15. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия.
16. Параформальдегид, «Sigma», США.
17. Флуоресцентный краситель CellROX[®] Deep Red, «Thermo Fisher Scientific», США.
18. Реактив для детекции апоптоза Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, «Thermo Fisher Scientific», USA.
19. Красители гематоксилин и эозин, «Thermo Fisher Scientific», США.
20. Внеклеточный матрикс Matrigel[™], «BD Biosciences», США.

21. Наркоз для интраперитонеального введения – смесь препаратов Золетил 50, «Вирбак», Франция ($5, 0 \text{ мг/кг}^{-1}$) и 10 мкл 2%-го раствора Рометара, «Биовета», Чехия (0, 2 мкл/мышь).

22. Пропидия йодид (PI), «Thermo Fisher Scientific», США.

23. Hoechst 33258, «Thermo Fisher Scientific», США.

2.2. Приборы, использованные в работе

1. Спектрофотометр Multiscan FC, «Thermo Scientific», США.

2. Спектрофотометр NanoVue Plus, «GE Healthcare», США.

3. Спектрофотометр Cary 50 UV-Vis, «Agilent Technologies», США.

4. Микропланшетный ридер Infinite F500 Tecan, «Tecan», Австрия.

5. Проточный цитофлуориметр NovoCyte 2000R, «ACEA Biosciences», США

6. Флуоресцентный микроскоп, «Zeiss», Германия.

7. Конфокальный микроскоп InCell Analyzer 6000, «GE Healthcare», США.

8. Диодный лазер (мощность 7 мВт/см^2 , длина волны 450 нм), «Полироник», Россия.

9. Эпилюминесцентная имиджинговая система, разработанная в Институте фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (г. Москва, г. Троицк).

10. Инвертированный микроскоп Nikon (Япония) с микроманипулятором PatchStar, «Scientifica», Великобритания).

11. Флуоресцентно-инвертированный микроскоп AE31, «Motic», Китай, дополненный полупроводниковым лазером 975 нм «АТС-SD», Россия и охлаждаемой камерой HR SCMOS, «Photonic Science», Великобритания.

12. Полупроводниковый лазер ATCC4000-200-AMF-975, «Semiconductor devices», Россия.

13. Прямой флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse 80i с камерой Ds-Fi1, «Nikon», Япония.

2.3. Клеточные линии и обработка клеток

В работе использовали клетки меланомы человека Mel Z, Mel IL и Mel MTP, полученные из опухолевого материала пациентов, проходящих лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Фибробласты человека BJ-5ta, кератиноциты кожи человека HaCaT, клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, клетки глиобластомы человека U87-MG, глиомы крысы С6, клетки меланомы кожи человека A375, меланомы мыши B16-F10 и M-3 были получены из Американской коллекции типированных культур (ATCC). Все клеточные линии культивировали в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональную сыворотку телят, 3% L-глутамин и гентамицин (50 ед/мл) при 37°C и в 5% CO₂. Среду заменяли каждые 2-3 дня.

2.4. Исследование токсичности ФМН *in vitro*

Для исследования *темновой* токсичности клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U87-MG и глиомы крысы С6, меланомы кожи человека A375, Mel IL, Mel MTP и кератиноцитов кожи человека HaCaT высевали в 96-луночные планшеты (5×10⁴/мл, 100 мкл на лунку) в полной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Через 24 часа среду заменяли на свежую, содержащую 10 мкМ –5 мМ водорастворимую форму рибофлавина - флавинмононуклеотида (ФМН) (Фармстандарт-УфаВИТА, Россия), и инкубировали в темноте в течение 24 часов при 37°C и в 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали путем добавления 0,5 мг/мл МТТ, через 4 часа с последующим растворением образовавшихся кристаллов формазана в ДМСО. Результат оценивали спектрофотометрически на длине волны 540 нм (Multiscan FC, Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{ОП экспериментальной группы}}{\text{ОП контрольной группы}} \times 100\%.$$

Всего было проведено три независимых эксперимента, каждый из которых включал в себя не менее трех повторов для каждой экспериментальной точки.

Для исследования *световой* токсичности были использованы те же клеточные линии, что и при исследовании темновой токсичности. Клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 /мл, 100 мкл на лунку) в полной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Через 24 часа среду заменяли на свежую, содержащую 10–100 мкМ ФМН и инкубировали в темноте в течение 90 минут. Затем среду с ФМН удаляли, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4) и облучали лазером в питательной среде RPMI-1640 без ФМН (ООО «Полироник», Россия, на длине волны 450 нм в течение 10 мин с интенсивностью 7 мВт/см²). Через 24 часа жизнеспособность клеток оценивали проведением МТТ-анализа, как описано выше.

С целью определения *цитотоксичности фотопродуктов* соответствующие рабочие растворы ФМН (10-100 мкМ) в полной среде RPMI-1640 облучали при 450 нм (доза 5 Дж/см²) и инкубировали в течение ночи при 37°C и в 5% CO₂. Затем эти аликвоты ФМН (100 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 48 часов при 37°C и в 5% CO₂. МТТ-анализ проводили, как описано выше.

Исследование содержания меланина *in vitro*

Содержание меланина оценивали путем измерения спектра поглощения в лизатах клеток Vj-5ta, HaCaT, Mel IL, Mel MTP, Mel Z, A375 в ДМСО (10^6 кл/мл) с использованием спектрофотометра Cary 50 UV-Vis, США. В эксперименте задействованы четыре линии клеток меланомы: Mel MTP, Mel IL, Mel Z, A375 и две нормальные (человеческие кератиноциты HaCaT и человеческие фибробласты кожи VJ-5ta) клеточные линии. Для определения содержания меланина клетки лизировали в 1М NaOH, содержащем 10% ДМСО и инкубировали при 80°C в течение 1 часа. После инкубации лизаты центрифугировали (3000 оборотов в течение 5 минут) и измеряли поглощение в питательной среде RPMI-1640 при 405 нм.

2.5. Исследование клеточного накопления ФМН

Накопление ФМН оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием опухолевых клеток меланомы кожи человека Mel MTP, Mel IL, A375, меланомы мыши B16-F10, аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиомы человека U87-MG, глиомы крысы C6 и двух нормальных клеточных линий - кератиноциты человека HaCaT и фибробласты кожи человека BJ-5ta). Клетки снимали раствором Версена, осаждали центрифугированием при 300 оборотах в течение 5 минут и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI-1640 до конечной концентрации 10^6 кл/мл. Затем 100 мкл клеточной суспензии переносили в защищенные от света пробирки для проточной цитофлуориметрии. Соответствующие рабочие растворы ФМН (10-100 мкМ) в среде RPMI-1640 готовили непосредственно перед экспериментами. Растворы ФМН добавляли в пробирки, конечная концентрация ФМН составляла 10, 30 и 100 мкМ. Затем клетки инкубировали в темноте в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут. По окончании инкубации в каждую пробирку добавляли 1 мл холодного PBS и клетки центрифугировали (300 оборотов, 4°C) в течение 5 минут. Супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 300 мкл холодного PBS и переносили на лед для снижения скорости ферментативных реакций. Флуоресценцию исследовали с использованием проточного цитометра NovoCyte 2000R (ACEA Biosciences) и программного обеспечения NovoExpress v.1.2.4. Флуоресценция была нормализована к фоновому уровню каждой клеточной линии. Флуоресценцию измеряли на канале, соответствующем флуоресценции FITC, и для каждого образца исследовали, по меньшей мере, 10 000 событий. Для оценки уровня накопления ФМН в клетках определяли средние значения флуоресценции в каждом образце, а затем рассчитывали относительный уровень флуоресценции (F) по следующей формуле:

$$F = F (\text{экспериментального образца}) - F (\text{фоновая})$$

Конфокальная микроскопия. Исследование клеточной локализации ФМН

Клетки меланомы кожи Mel II, A375, глиомы человека U87-MG, глиомы крысы C6 и кератиноциты кожи человека HaCaT высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток на 200 мкл питательной среды RPMI-1640 в лунке) с последующей инкубацией в течение ночи. Затем к клеткам добавляли 100 мкл соответствующих рабочих растворов ФМН (10 мкМ, 30 мкМ и 100 мкМ) в среде RPMI-1640 и планшеты инкубировали в темноте в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут. После этого клетки промывали 3 раза холодным PBS и дополнительно окрашивали красителем Hoechst 33258 (50 мкМ) в течение 15 минут в темноте при комнатной температуре. Оптические изображения и данные интенсивности флуоресценции были получены с использованием InCell Analyzer 6000 и соответствующего программного обеспечения In Cell Analyzer Workstation v.3.7.3 (GE Healthcare, США).

2.6. Исследование клеточной гибели

Клетки (Mel MTP, Mel II) высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток на лунку) с последующей инкубацией в течение ночи при 37°C и в 5% CO₂. Затем к клеткам добавляли 100 мкл соответствующих рабочих растворов ФМН (10 мкМ, 30 мкМ и 100 мкМ) в среде RPMI-1640 и планшеты инкубировали в темноте в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут при 37°C и в 5% CO₂. После этого клетки облучали лазером 450 нм в дозе 5 Дж/см². Затем клетки последовательно промывали холодным PBS и буфером для связывания аннексина, окрашивали аннексином V-FITC, йодидом пропидия (PI) и Hoechst 33258 в темноте при комнатной температуре в течение 15 минут. Оптические изображения и данные интенсивности флуоресценции были получены с использованием InCell Analyzer 6000 и программного обеспечения In Cell Analyzer Workstation v.3.7.3 (GE Healthcare, США).

2.7. Измерение уровня АФК

Измерение уровня АФК с использованием углеродного нанoeлектрода

Клетки меланомы кожи человека Mel MTP, Mel IL, Mel Z, A375, глиомы человека U87-MG, глиомы крысы C6 и кератиноциты кожи человека HaCaT высевали в чашку Петри (94×16 мм) с последующей инкубацией в течение ночи при 37°C и в 5% CO₂. Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при 37°C и в 5% CO₂ с 100 мкМ ФМН в темноте и 3 раза промывали PBS. Далее платинированный нанoeлектрод был введен с использованием точного микроманипулятора в одну ячейку под оптическим контролем с помощью инвертированного микроскопа. Данный нанoeлектрод создан научным коллективом МГУ им. М.В. Ломоносова и подробно описан в работе [234]. Для манипулирования и регулировки электродов использовали микроманипулятор PatchStar (Scientifica, Великобритания). Циклические вольтамперометрические данные собирали с усилителем с патч-зажимом, модель 2400 (А-М Systems, США). Запись сигнала осуществлялась с помощью многофункционального устройства ввода-вывода USB-6211 (National Instruments, США) и компьютерной программы WinWCP.

Все измерения были выполнены на оптическом столе инвертированного микроскопа Nikon (Япония). Во всех измерениях электрод Ag/AgCl использовался в качестве электрода контроля.

Измерение уровня АФК с использованием флуоресцентного красителя

Оценку уровня АФК проводили с использованием флуоресцентного красителя CellROX Deep Red (Molecular Probes, Thermo). Клетки меланомы Mel IL и A375 (5×10³ клеток на лунку) высевали в 96-луночные планшеты (Nunc, Дания) и инкубировали с 2,5 мкМ CellROX Deep Red в полной среде RPMI-1640 в течение 30 минут при 37°C и в 5% CO₂, затем 3 раза промывали PBS. Далее к клеткам добавляли 100 мкл соответствующих рабочих растворов (10 мкМ, 30 мкМ и 100 мкМ) ФМН в среде RPMI-1640 без фенолового красного и инкубировали при 37°C и в 5% CO₂ в течение 30 минут. После этого клетки облучали лазером 450 нм в дозе 5 Дж/см². Ядра клеток дополнительно

окрашивали 50 мкМ раствором красителя Hoechst 33258 в течение 15 минут по ранее описанной методике. Оптические изображения и данные интенсивности флуоресценции CellROX Deep Red клеток меланомы Mel II и A375 были получены с использованием InCell Analyzer 6000 и программного обеспечения In Cell Analyzer Workstation v.3.7.3 (GE Healthcare, США).

2.8. Исследование накопления ФМН *in vivo*

Мышам-гибридам BDF1 (C57Bl/6×DBA2) внутримышечно в заднюю правую конечность перевивали модель карциномы легкого Льюис (LLC) из банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. На 10-й день после перевивки мышам системно (через ретроорбитальный синус) вводили раствор ФМН в объеме 150 мкл с концентрацией 10 мг/мл. Через 2 и 24 часа по 3 мыши выводили из эксперимента, кожный лоскут над опухолью удаляли и сканировали открытую область непрерывным полупроводниковым лазером с длиной волны 450 нм при помощи эпилюминесцентной имиджинговой системы, разработанной в Институте фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (г. Троицк). Спектральная полоса регистрации флуоресценции составляла 500–570 нм. Полученные изображения были обработаны в программном обеспечении XCAP for Windows, версия 3.7.120907.083752, позволяющем перевести люминесцентные изображения в относительные единицы люминесценции ФМН для любой области изображения. Для каждого изображения в программе XCAP было сделано по 10 измерений в области опухоли и по 10 измерений в области нормальных тканей.

2.9. ФДТ первичной опухоли

Самцы мышей Balb/c nu/nu (возраст 6–7 недель) были закуплены в питомнике Института биоорганической химии им. Шемякина – Овчинникова РАН и содержались в контролируемых условиях окружающей среды в вентилируемом SPF-шкафу для животных A-Box 80 (Noroit, Франция) и свободном доступе к стерильной воде и пище.

Для создания ксенотрансплантата меланомы кожи человека клетки Mel II и A375 собирали с чашки Петри (96×16 мм) раствором Версена, осаждали центрифугированием при 300 оборотах в течение 5 минут и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI-1640. Клеточную суспензию меланомы смешивали с Matrigel (BD Biosciences) (объемом 1:1) и инокулировали подкожно в правый бок мыши (2×10^6 клеток на инъекцию 200 мкл), чтобы обеспечить успешную инициацию опухоли и измерение динамики ее роста.

Введение ФМН начинали на 10-й день после инокуляции, когда размер опухоли достигал 100–120 мм³. Раствор ФМН (150 мкл, 10 мг/мл) вводили мышам внутривенно через ретроорбитальный синус, опухоль облучали синим светом (450 нм) в течение 15 минут при дозе облучения ~ 20 Дж/см².

Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле:

$$V = \frac{\text{длина} \times \text{ширина}^2}{2}$$

Действие фотоактивированного ФМН определяли путем оценки степени торможения роста опухоли (ТРО%), рассчитанной как:

$$\text{ТРО}\% = \frac{V \text{ опухоли (контроль)} - V \text{ опухоли (эксперимент)}}{V \text{ опухоли (контроль)}} \times 100\%$$

2.10. ФДТ дистантной опухоли

Самцы мышей C57BL / 6 (возраст 6–7 недель) были закуплены в питомнике Института биоорганической химии им. Шемякина – Овчинникова РАН.

Клетки меланомы B16-F10 собирали с чашки Петри (96×16 мм) раствором Версена, осаждали центрифугированием при 300 оборотах в течение 5 минут и ресуспендировали в бессывороточной среде RPMI-1640. Опухолевые клетки смешивали в объеме 1:1 с Matrigel (BD Biosciences), полученную клеточную

суспензию (2×10^6 клеток на инъекцию 200 мкл) имплантировали подкожно в правый и левый бок мышей для инициации опухолевого процесса.

Введение ФМН начинали на 4-й день после инокуляции, когда размер опухоли достигал 60 ± 16 мм³. Раствор ФМН (150 мкл, 10 мг/мл) внутривенно вводили мышам через ретроорбитальный синус, через 30 минут одну из опухолей облучали синим светом 450 нм в течение 15 мин, конечная доза составила 20 Дж/см². В качестве контроля использовали две группы: инъекция ФМН в той же дозе без облучения светом и лазерное облучение 450 нм без предварительной инъекции ФМН. Объем опухолей и оценку степени торможения их роста рассчитывали, как описано выше.

2.11. Исследование НАФ *in vitro*

Для исследования токсичности образцов НАФ «УФ-» и «УФ+» клетки дермальных фибробластов человека Vj-5ta и кератиноцитов кожи HaCaT высевали в 96-луночные планшеты (5×10^4 /мл, 100 мкл на лунку) в полной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия). Через 24 часа среду заменяли на свежую, содержащую 0,1–0,8 мг/мл образцов НАФ, и инкубировали в темноте в течение 24 часов при 37°C и в 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали путем добавления 0,5 мг/мл МТТ, через 4 часа с последующим растворением образовавшихся кристаллов формазана в ДМСО. Результат оценивали спектрофотометрически на длине волны 540 нм (Multiscan FC, Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{ОП экспериментальной группы} \times 100\%}{\text{ОП контрольной группы}}$$

Всего было проведено три независимых эксперимента, каждый из которых включал в себя не менее трех повторов для каждой экспериментальной точки.

2.12. Исследование доставки НАФ в опухолевую ткань

Исследование циркуляции НАФ в кровотоке мышей

Образцы НАФ, модифицированные ПМАО и ПМАО-ПЭГ («УФ+», «УФ-») в объеме 150 мкл в концентрации 0,8 мг/мл были внутривенно введены мышам Balb/c (средний вес животного - 23 г) через ретроорбитальный синус. Острых аллергических реакций при введении НАФ в течение проведения эксперимента не наблюдалось. Образцы крови (10-12 мкл) были собраны из хвостовой вены через промежутки времени от 1 до 180 мин после внутривенного введения и проанализированы с помощью антистоксового флуоресцентного микроскопа на длине волны 975 нм (ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк). Изображения получали с четырех случайных областей, в каждой произведен расчет количества наночастиц в поле зрения. Данные получены от 15 мышей для каждого образца.

Оптическая визуализация опухоли

Оптическая визуализация опухоли *in vivo* при помощи НАФ была продемонстрирована на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC, ATCC, CRL-1642TM) с использованием оптической имиджинговой системы (ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк). 0,2 мл клеточной суспензии LLC в бессывороточной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с концентрацией 2×10^6 клеток были привиты подкожно в правый бок мышей BDF1 (C57Bl/6×DBA/2; самцы 5-6 недель, лаборатория «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России).

При достижении опухоли объема 200 мм³ образцы НАФ с покрытием ПМАО-ПЭГ в объеме 150 мкл и концентрации 0,8 мг/мл были внутривенно введены мышам через ретроорбитальный синус. Размер опухоли был идентичным для каждой экспериментальной и контрольной групп. Предварительно до инъекции НАФ мышей анестезировали внутрибрюшинно, используя смесь Золетил (5,0 мг / кг) и 10 мкл 2% раствора Рометар (0,2 мл/мышь). Острых аллергических реакций не наблюдалось. Для получения изображений участок опухоли был депилирован. Эпиллюминесцентные изображения были получены с интервалами времени от 1 до

180 мин после введения образцов. Также для визуализации локализации НАФ в сосудах с опухоли был откинут кожный лоскут и сделаны снимки с помощью антистоксового флуоресцентного микроскопа на длине волны 975 нм (ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк). Для визуализации *ex vivo* мышей выводили из эксперимента декапитацией через 2 часа после инъекции НАФ. Данные получены от 15 мышей для каждого образца.

2.13. ФДТ с применением ФМН и НАФ

ФДТ *in vitro*. Исследование ИК-индуцированной фототоксичности ФМН в присутствии НАФ

Для демонстрации эффекта фотоактивации ФМН в присутствии НАФ «УФ+» с покрытием ПМАО-ПЭГ клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 высевали в 96-луночный планшет (5×10^4 кл на 200 мкл среды) и инкубировали в течение 24 часов, затем были добавлены НАФ в концентрации 0,8 мг/мл, инкубировали в течение 10 минут при 37°C и в 5% CO_2 , после инкубации клетки промывали PBS. Затем последовательно добавлялись раствор ФМН 100 мкМ и 2 мкМ PI, растворенного в PBS, и делали контрольный снимок клеток с помощью эпифлуоресцентного инвертированного микроскопа (ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Троицк). Клетки подвергались облучению лазером с длиной волны 975 нм в дозе 600 Дж/см². Данная установка позволяет проводить облучение планшета с клетками и одновременно детектировать люминесцентный сигнал НАФ на длине волны 975 нм в ячейке стандартного 96-луночного планшета. Для того чтобы исключить возможность гибели клеток за счет перегрева, при облучении был использован импульсный режим, исключающий тепловой шок в клетках с непрерывным мониторингом температуры среды микротермопарой.

ФДТ с применением ФМН и НАФ *in vivo*

Клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 (5×10^5 клеток) имплантировали подкожно в правый бок иммунодефицитных мышей линии Balb nu/nu (НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН, г. Пущино). Динамику роста опухоли (V – объем опухоли) оценивали по формуле:

$$V = \frac{\text{длина} \times \text{ширина}^2}{2}$$

Терапию проводили при достижении опухоли размеров 120 ± 15 мм³. Мышам перитуморально вводили комбинацию ФМН (50 мкл, 500 мкМ) и НАФ (25 мкг); через 1,5 часа после введения комбинации опухоль облучали лазером АТСС4000-200-АМФ-975 (Semiconductor devices, Россия) на длине волны 975 нм (доза лазерного облучения 900 Дж/см², импульсный режим). Для подтверждения результативности именно под действием ИК-опосредованной активации комбинации НАФ «УФ+» и ФМН, каждый из этих компонентов был исследован в монотерапии в качестве контрольных групп.

Торможение роста опухоли [ТРО, %] в течение 50 дней после однократного сеанса ФДТ определяли путем вычисления:

$$\text{ТРО}\% = \frac{V \text{ опухоли (контроль)} - V \text{ опухоли (эксперимент)}}{V \text{ опухоли (контроль)}} \times 100\%$$

Для оценки тканевой реакции на терапию по 3 мыши из каждой группы (в каждой группе по 12 животных) выводились из эксперимента через сутки после воздействия.

2.14. Морфологический анализ

Для морфологического анализа животных выводили из эксперимента декапитацией. Все образцы опухолевой ткани фиксировали 4% параформальдегидом в течение 24 часов и затем заливали парафином. Срезы ткани (толщиной 4 мкм) окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Исследование гистологических образцов было выполнено на микроскопе Nikon Eclipse 80i с камерой Ds-Fi1, Япония.

2.15. Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили в трех независимых повторах, если не указано иное. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Исследование фототоксичности ФМН и его фотопродуктов *in vitro*

Была изучена фототоксичность флавиномононуклеотида (ФМН) – дериватива рибофлавина, в которой данный витамин находится в живых клетках и тканях.

Было показано, что в темновых условиях ФМН не проявлял токсических свойств и не подавлял пролиферацию клеточных линий меланомы кожи человека A375, Mel IL, Mel MTP, кератиноцитов кожи человека HaCaT, аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U87-MG и глиомы крысы C6 вплоть до концентрации 5 мМ (Рисунок 4, Рисунок 5).

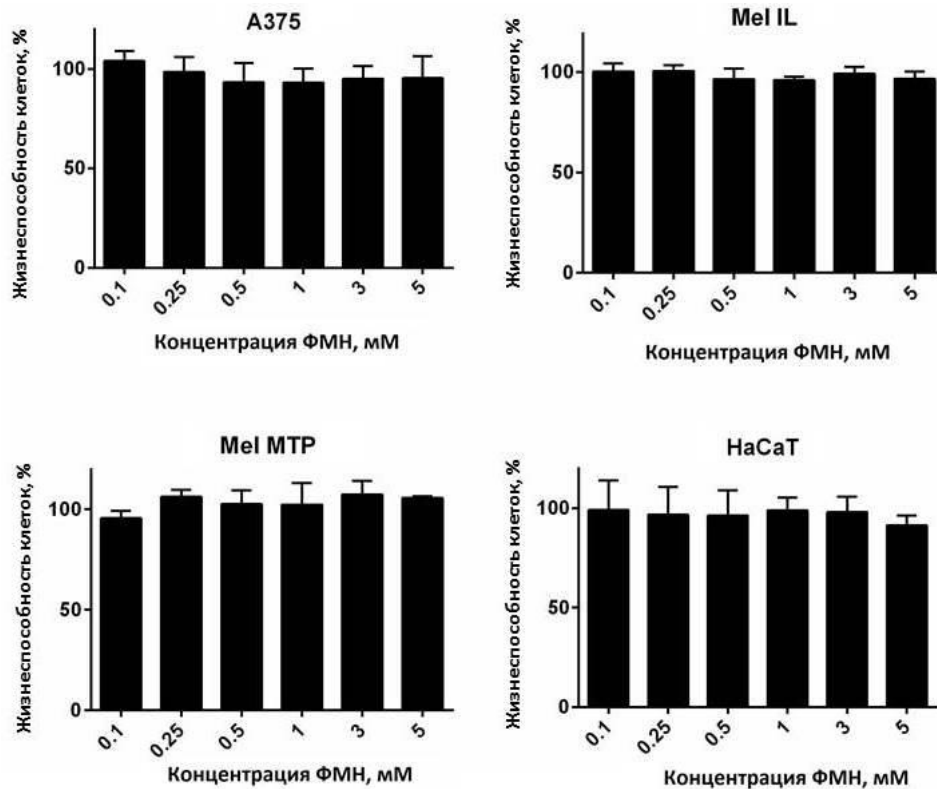


Рисунок 4 — Жизнеспособность клеток меланомы кожи человека A375, Mel IL, Mel MTP и кератиноцитов кожи человека HaCaT в присутствии ФМН в концентрациях до 5 мМ без облучения. Жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 24 часа. На гистограмме приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

Облучение тех же клеточных линий, инкубированных с ФМН, приводило к клеточной гибели, выраженность которой зависела от концентрации ФМН и дозы облучения. Так, при облучении синим светом (450 нм, 5 Дж/см²) клеток меланомы в среде, содержащей 10-100 мкМ ФМН, значения IC₅₀ через 48 ч инкубации находились в диапазоне 10-30 мкМ в зависимости от типа клеток. При этом важно, что для кератиноцитов кожи человека HaCaT значение IC₅₀ было значительно выше и составляло 47,7 ± 4,6 мкМ (Таблица 2).

Также было показано, что облучение в тех же условиях (450 нм, 5 Дж/см²) среды, содержащей 50 мкМ ФМН, через 24 часа приводило к снижению жизнеспособности клеток карциномы молочной железы человека SK-BR-3 до 52±8% относительно контроля. Для клеток глиомы U87-MG и C6 снижение выживаемости составило 35±7% и 40±4%, соответственно (Рисунок 5).

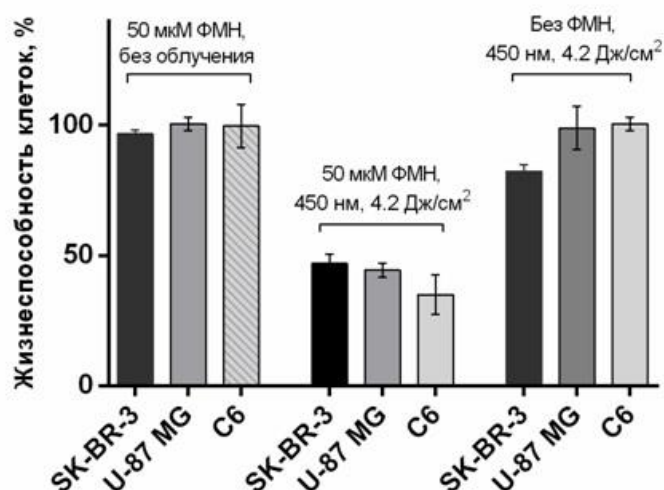


Рисунок 5 — Жизнеспособность клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, глиомы человека U87-MG и глиомы крысы C6 в присутствии 50 мкМ ФМН в течение 90 мин и облучения синим светом (450 нм, доза облучения 4,2 Дж/см²). Жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 24 часа. Выживаемость интактных клеток (контроль) принимали за 100%. Оценена также темновая токсичность 50 мкМ ФМН (без облучения) и выживаемость при облучении клеток в среде, не содержащей ФМН. На гистограмме приведены средние значения ± SD трех независимых экспериментов, p<0,05

Для демонстрации зависимости токсичности ФМН от дозы облучения, выживаемость клеток меланомы человека A375, Mel IL и кератиноцитов кожи HaCaT оценивалась в течение 48 ч в диапазоне доз 0,2 Дж/см² - 7 Дж/см². Для всех линий клеток была обнаружена четкая зависимость от дозы облучения, при этом для линии HaCaT такая зависимость проявлялась лишь при 100 мкМ ФМН, в то время как концентрации 10 мкМ и 30 мкМ ФМН практически не подавляли рост клеток даже при высокой дозе облучения. Наоборот, для клеток меланомы A375 зависимые от дозы кривые облучения были продемонстрированы даже при 10 мкМ ФМН. Было обнаружено, что низкая доза 2 Дж/см² достаточна для достижения максимального ингибирования роста опухолевых клеток, в то же время более высокие дозы света не увеличивали цитотоксичность ФМН (Рисунок 6).

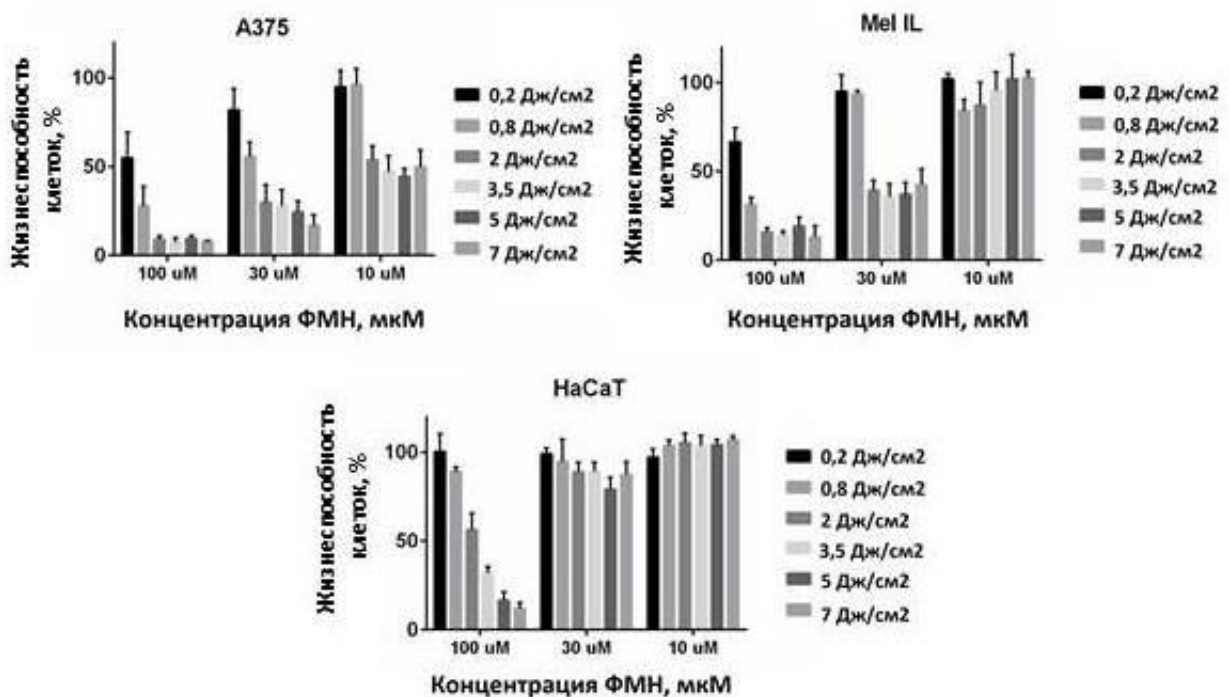


Рисунок 6 — Жизнеспособность клеток меланомы кожи человека A375, Mel IL и кератиноцитов кожи человека HaCaT в присутствии ФМН в концентрациях 10 – 100 мкМ в зависимости от дозы облучения (от 0,2 до 7 Дж/см²). Жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 48 часов. На гистограмме приведены средние значения ± SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

Поскольку фототоксический эффект ФМН может быть связан как с токсичностью АФК, генерируемых в ходе облучения, так и с токсичностью продуктов фотораспада ФМН, был оценен вклад каждого из этих компонентов отдельно (Рисунок 7, 8, Таблица 2). Для этого протокол оценки выживаемости клеток был модифицирован. Так, для оценки вклада АФК с коротким временем жизни, среда, содержащая ФМН и продукты его фотораспада, удалялась сразу после завершения облучения (450 нм, 5 Дж/см²). Для оценки токсичности фотопродуктов раствор ФМН в бесклеточной питательной среде облучали при тех же условиях (450 нм, 5 Дж/см²), оставляли на 24 часа и затем этот раствор добавляли к культуре клеток для оценки токсичности. Показано, что воздействие каждого из этих компонентов (АФК, продукты фотораспада) уступает их комбинированной токсичности (Таблица 2).

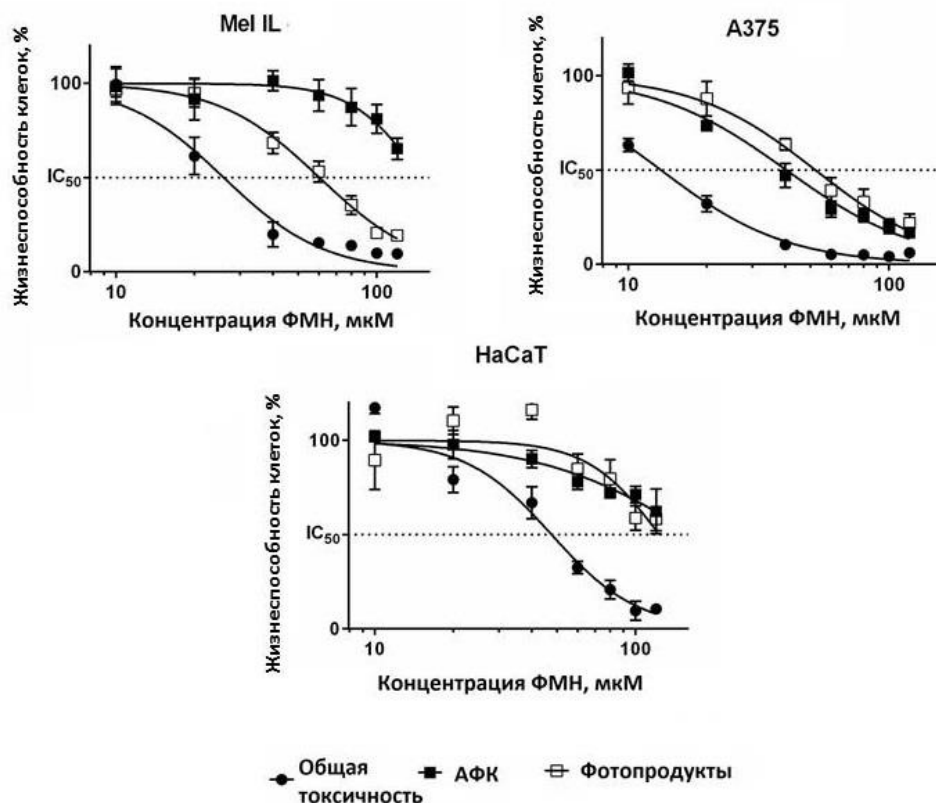


Рисунок 7 — Влияние АФК и продуктов фотораспада ФМН на жизнеспособность клеток меланомы кожи человека Mel IL, A375 и кератиноцитов кожи человека HaCaT после фотоактивации ФМН (450 нм). На графиках приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

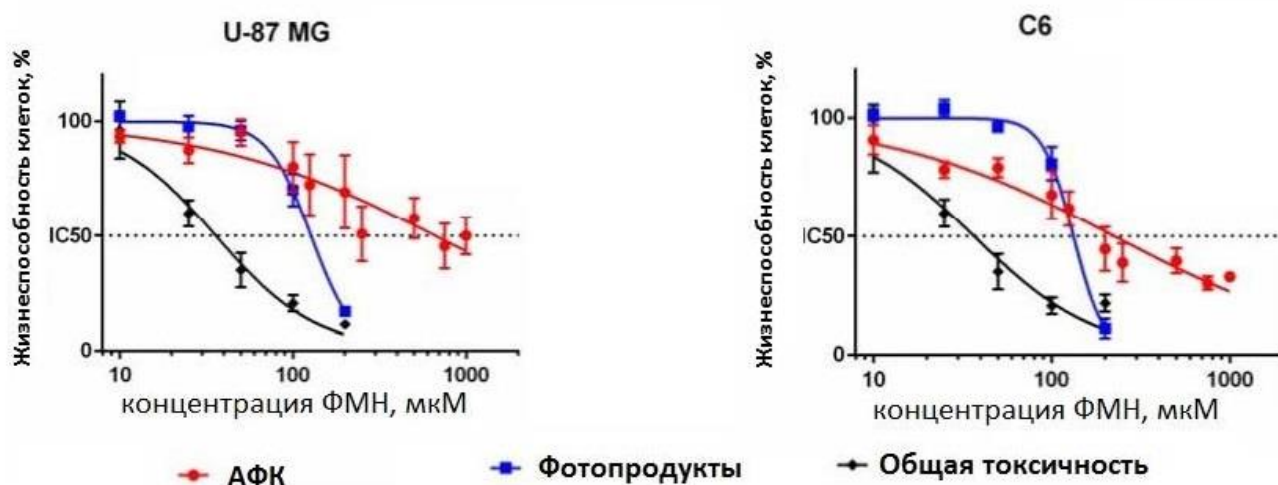


Рисунок 8 — Влияние АФК и продуктов фотораспада ФМН на жизнеспособность клеток глиомы человека U87-MG и глиомы крысы С6 после фотоактивации ФМН (450 нм). Концентрации ФМН - 10 – 1000 мкМ, доза облучения - 5 Дж/см². Жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 24 часа. Выживаемость интактных клеток (контроль) принимали за 100%. На графиках приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

Таблица 2 — Значения IC₅₀ общей токсичности, токсичности АФК и продуктов фотораспада для клеток меланомы кожи человека Mel MTP, Mel IL, Mel Z, A375, кератиноцитов кожи человека HaCaT, глиомы человека U87-MG и глиомы крысы С6 после фотоактивации ФМН. В таблице приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

Клетки	IC ₅₀ , мкМ		
	Общее	АФК	Продукты фотораспада ФМН
Mel MTP	29,0 \pm 1,3	>150	>150
Mel IL	25,9 \pm 1,3	>150	60,4 \pm 7,1
Mel Z	24,2 \pm 2,0	115,8 \pm 11,8	103,4 \pm 10,1
A375	13,3 \pm 1,3	52,2 \pm 3,4	40,4 \pm 4,0
U87-MG	44,5 \pm 4,2	663 \pm 4,8	225 \pm 3,9

С6	53,4 ± 3,5	127 ± 3,3	132 ± 2,8
HaCaT	47,7 ± 4,6	>150	123,5 ± 10,2

При этом для клеток с высоким уровнем меланина (Mel IL, Mel Z) токсичность фотопродуктов была выше, чем токсичность АФК. Для клеток с низким уровнем меланина (А-375) более токсичным был вклад АФК.

Уровень меланина в культуре клеток оценивали путем измерения спектра поглощения в лизатах клеток (Рисунок 9).

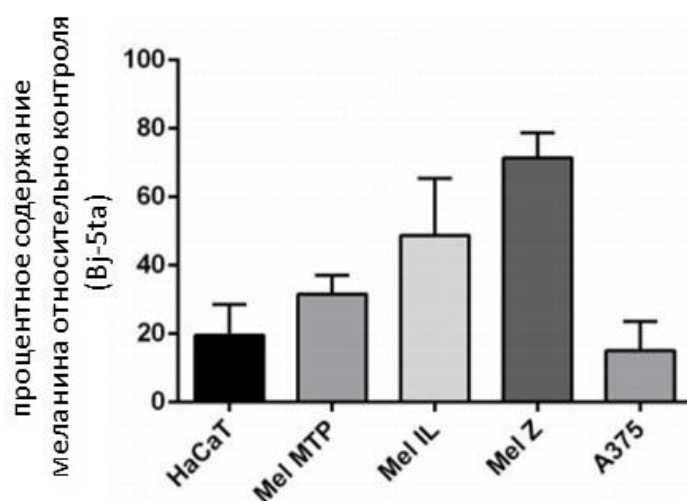


Рисунок 9 — Содержание меланина в клеточных линиях меланомы кожи человека Mel MTP, Mel IL, Mel Z, A375 и кератиноцитах кожи человека HaCaT. Результаты выражены как среднее значение интенсивности поглощения, относительно содержания меланина в дермальных фибробластах человека Bj-5ta. На гистограмме приведены средние значения ± SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

Полученные данные подтверждают важность антиоксидантной функции меланина в клетках, а также демонстрируют возможность преодоления этой защиты при проведении фототерапии с использованием ФМН.

3.2. Исследование клеточного накопления ФМН

Накопление ФМН оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием опухолевых клеток (меланома кожи человека Mel MTP, Mel IL, A375, меланома мыши M-3 и аденокарцинома молочной железы человека SK-BR-3, глиома человека U87-MG глиома крысы C6) и двух нормальных клеточных линий (кератиноциты человека HaCaT и фибробласты кожи человека BJ-5ta). Найдено что все клетки меланомы демонстрируют более высокое накопление ФМН по сравнению с кератиноцитами кожи HaCaT. Более того, клеточные линии меланомы, а именно Mel MTP, Mel IL, M-3, накапливали больше ФМН, чем фибробласты BJ-5ta (в диапазоне концентраций ФМН 10-100 мкМ), тогда как накопление ФМН в клетках A375 было на уровне BJ-5ta. Клетки SK-BR-3 были предложены в качестве положительного контроля, поскольку по литературным данным эта линия клеток демонстрирует высокое накопление рибофлавина (Рисунок 10, 11) [235].

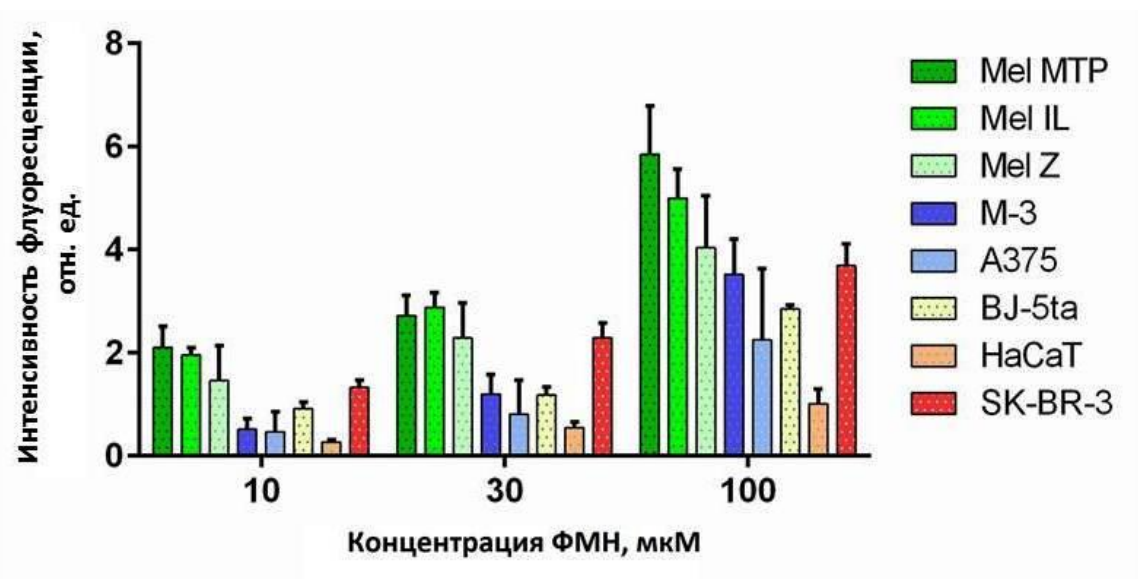


Рисунок 10 — Уровни накопления ФМН, исследованные методом проточной цитометрии, в опухолевых и нормальных клеточных линиях в диапазоне концентраций ФМН 10 – 100 мкМ. На гистограмме приведены средние значения \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

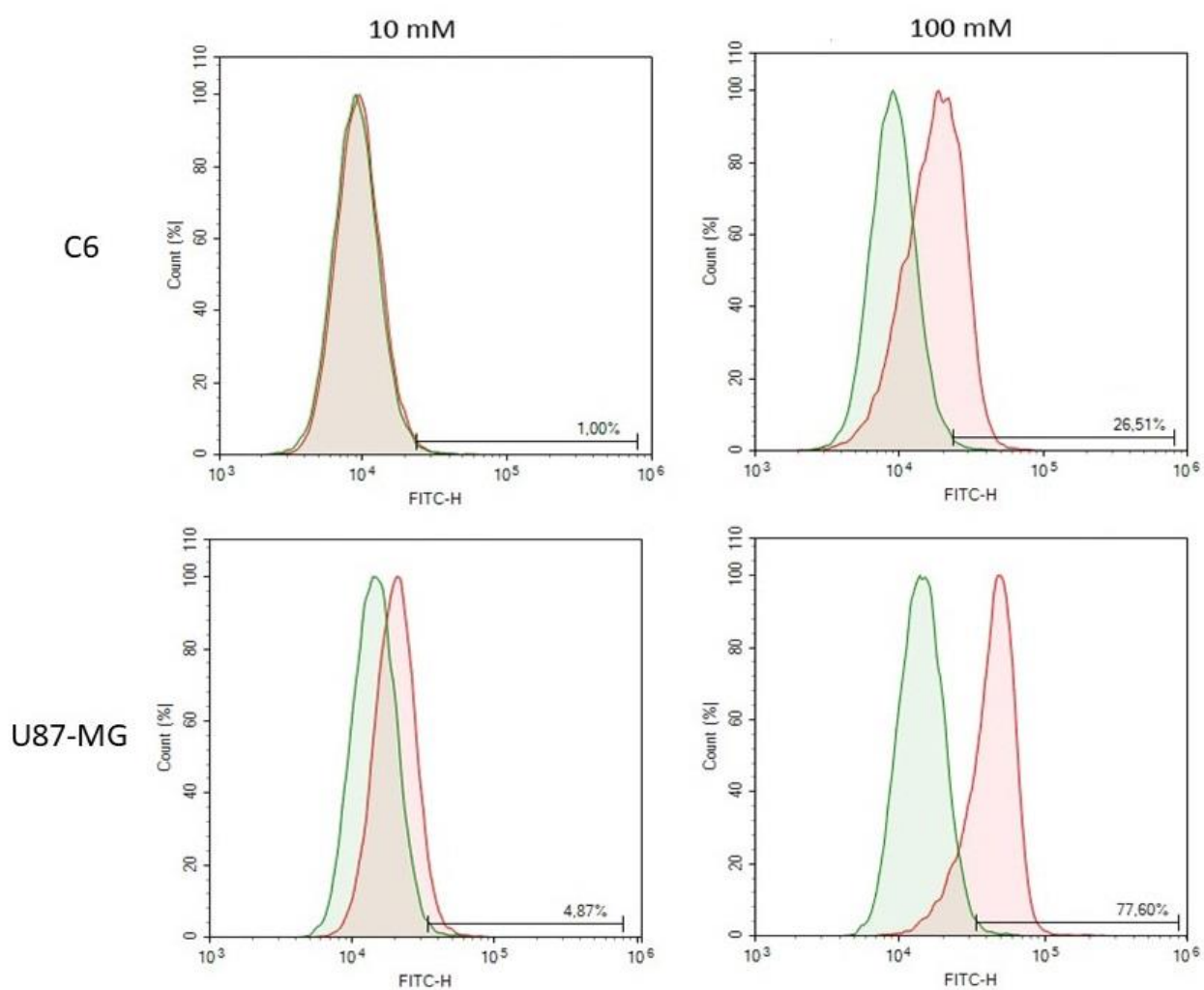


Рисунок 11 – Зависимость накопления ФМН клетками глиомы крысы C6 и глиомы человека U87-MG от его концентрации, $p < 0,05$

Конфокальная микроскопия подтверждает накопление ФМН в клетках. Кроме того, для клеток меланомы человека Mel II, для которых характерен высокий уровень накопления ФМН по данным проточной цитометрии, было отмечено точечное накопление ФМН на клеточной мембране (Рисунок 12).

100мкМ ФМН + свет	4.6± 3.2	46.1±4. 6	2.6±1. 2	46.5±6. 5	5.2± 1.9	47.4± 3.1	4.0±1. 5	43.4±5. 4
30мкМ ФМН + свет	15.7 ±2.3	66.7±5. 0	1.5±0. 2	16.1±5. 8	32.3± 1.8	46.2± 6.3	1.8±0. 2	19.8±5. 2
10мкМ ФМН + свет	11.6 ±2.4	74.1±0. 6	1.3±0. 2	12.9±2. 6	25.3± 3.4	61.5± 3.7	1.5±1. 1	11.7±1. 7
свет (контроль)	53.3 ±2.1	46.6±2. 0	0.1±0. 1	0.1±0.1	53.0± 4.7	43.9± 2.7	1.0±0. 8	2.1±1.8
ФМН (контроль)	87.5 ±2.5	12.3±2. 6	0.2±0. 1	0.1±0.1	82.2± 3.7	16.5± 3.9	1.1±0. 3	0.2±0.2

3.4. Измерение уровня АФК *in vitro*

Фотоактивация ФМН *in vitro* запускалась с помощью флуоресцентной светодиодной установки с длиной волны 375 нм, полуширина линии 50 нм (Полироник, Россия). Измерения АФК, вызванные фотоактивацией ФМН, начинались, когда сигнал АФК достигал плато, которое можно считать фоновым уровнем, типичным для исследуемой клеточной линии. Выключение света приводило к возвращению к фоновому внутриклеточному уровню АФК вследствие короткого периода жизни радикалов. Этот подход позволил нам отслеживать выработку АФК путем электрохимического обнаружения в режиме реального времени до и во время облучения светом, что невозможно реализовать с помощью обычных флуоресцентных зондов (Рисунок 13).

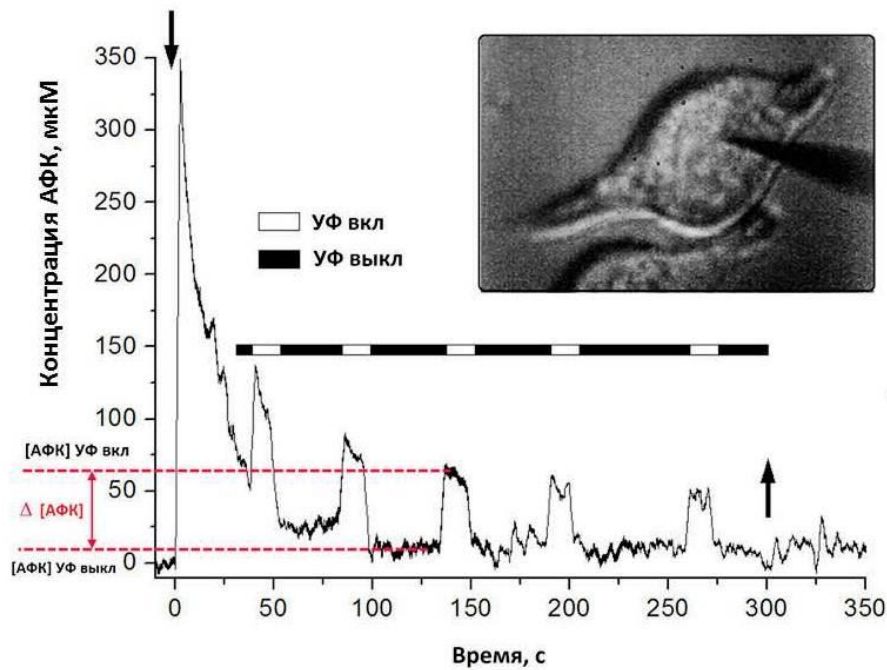


Рисунок 13 — Электрохимический платинированный нанoeлектрод для измерения уровня АФК в клетках меланомы кожи человека А375 (фото на вставке) после предварительной инкубации с 100 мкМ ФМН. Темная шкала - выключение света (УФ_{выкл}), белая шкала - включение света (УФ_{вкл}). Моменты ввода электрода в клетку и выход из клетки показаны стрелками, направленными вниз и вверх, соответственно. Изменения уровня АФК при фотоактивации ФМН рассчитывали по следующей формуле: $\Delta[\text{АФК}] = [\text{АФК}]_{\text{УФ вкл}} - [\text{АФК}]_{\text{УФ выкл}}$

Было обнаружено, что облучение светом приводит к быстрому росту продукции АФК. Таким образом, клетки А375, предварительно инкубированные с 100 мкМ ФМН, были способны продуцировать 56 ± 15 мкМ АФК, тогда как клетки Mel II продуцировали только $18,5 \pm 4$ мкМ АФК. Облучение контрольной группы клеток (не инкубированных с ФМН) привело к незначительным изменениям уровней АФК (5 ± 1 мкМ для клеток А375 и $1 \pm 0,5$ мкМ для клеток Mel II), подтверждая, что ФМН является источником АФК. Следует отметить, что измерение АФК с помощью электрохимического зонда имеет высокую чувствительность и позволяет определять уровни АФК ниже 1 мкМ (Рисунок 14).

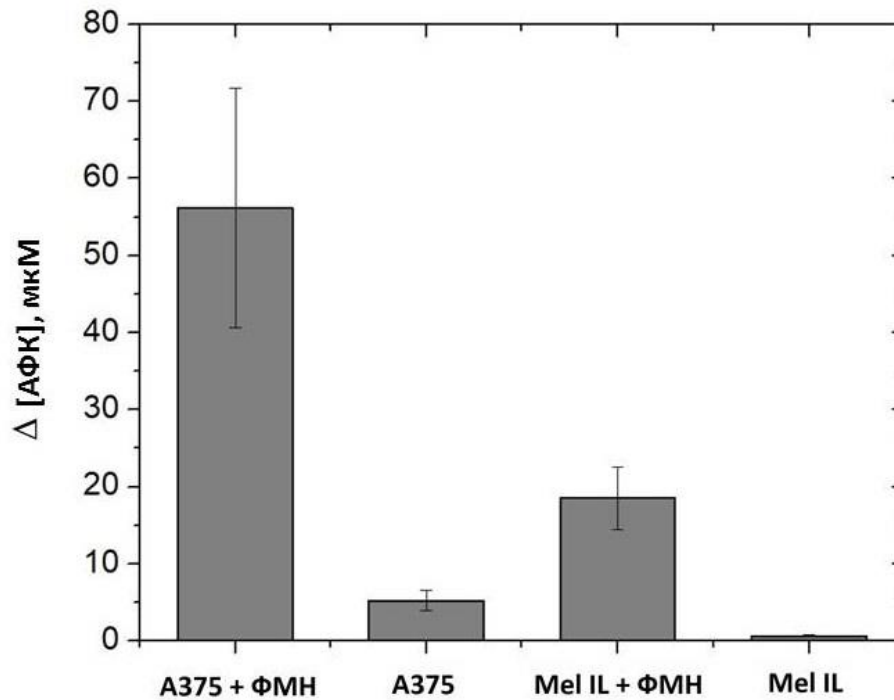


Рисунок 14 — Сравнение Δ [АФК] в клеточных линиях меланомы кожи человека A375 и Mel IL как в результате фотоактивации ФМН (100 мкМ, 450 нм), так и в контрольных клетках (облучение без инкубации с ФМН). Данные представляют собой среднее значение \pm SD, $p < 0,05$

Продуцирование АФК в клетках меланомы после облучения ФМН также измерялось с помощью флуоресцентного красителя CellROX Deep Red (Thermo Fisher Scientific, США). Действительно, четкая корреляция между концентрацией ФМН и продуцированием АФК была подтверждена для клеток Mel IL и A375 (Рисунок 15А). Флуоресцентный сигнал АФК для 10 мкМ ФМН был примерно в 1,25 раза выше по сравнению с контролем, а для 100 мкМ ФМН он был примерно в 1,75 раза выше. В отличие от электрохимического обнаружения в режиме реального времени, флуоресцентный метод подходит для определения АФК во всех обработанных клетках во время цикла облучения, поэтому эти две техники дополняют друг друга (Рисунок 15Б).

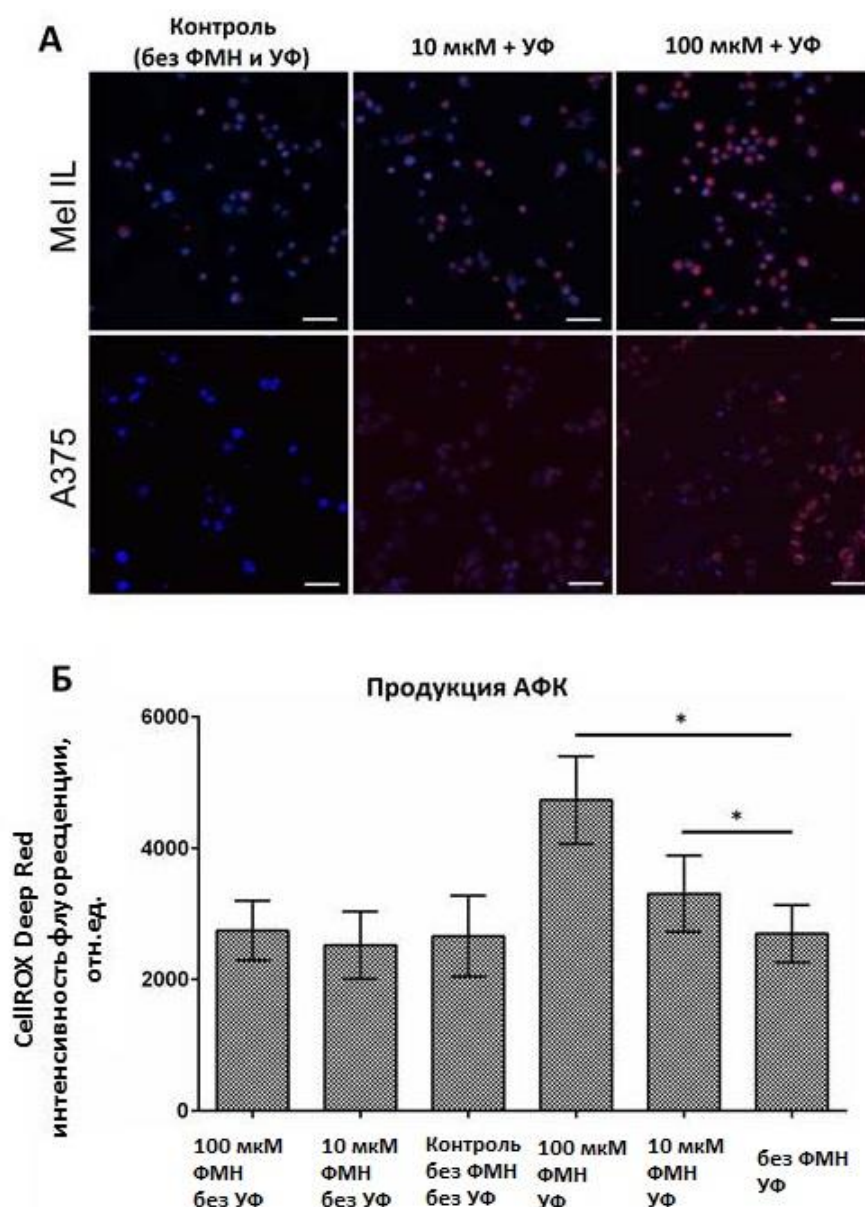


Рисунок 15 — Исследование генерации АФК с помощью флуоресцентного красителя CellROX Deep Red. Клетки подвергали воздействию света 450 нм, 5 Дж/см². **А.** Продукция АФК в клетках Mel II и A375, качественно показанная с помощью флуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии. Ядра клеток отмечены синим цветом (Hoechst 33258), CellROX Deep Red - красным. Масштабная линейка 50 мкм. **Б.** Полуколичественное измерение уровня АФК в клетках меланомы кожи человека Mel II в зависимости от концентрации ФМН (10 – 100 мкМ) на основании данных интенсивности флуоресценции красителя CellROX Deep Red, полученных методом конфокальной микроскопии. Данные представляют собой среднее значение \pm SD, $p < 0,05$

3.5. Исследование накопления ФМН *in vivo*

Для оценки накопления ФМН *in vivo* была использована модель перевитой эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC). Через 2 часа после введения ФМН флуоресцентный сигнал регистрировался по периферии опухоли, при этом визуальный контраст составлял 1:10 (Рисунок 16 А). Через 24 часа после введения ФМН визуально видно, что, несмотря на высокое интерстициальное давление, которое препятствует проникновению и распределению основного количества ФС, сигнал от ФМН регистрируется по всему объему опухоли (Рисунок 16 Б). На основе калибровочных измерений программного обеспечения XCAP for Windows имиджинговой системы, концентрация ФМН в опухоли через 24 часа оценена как 30 мкМ и выше (Рисунок 16 В).

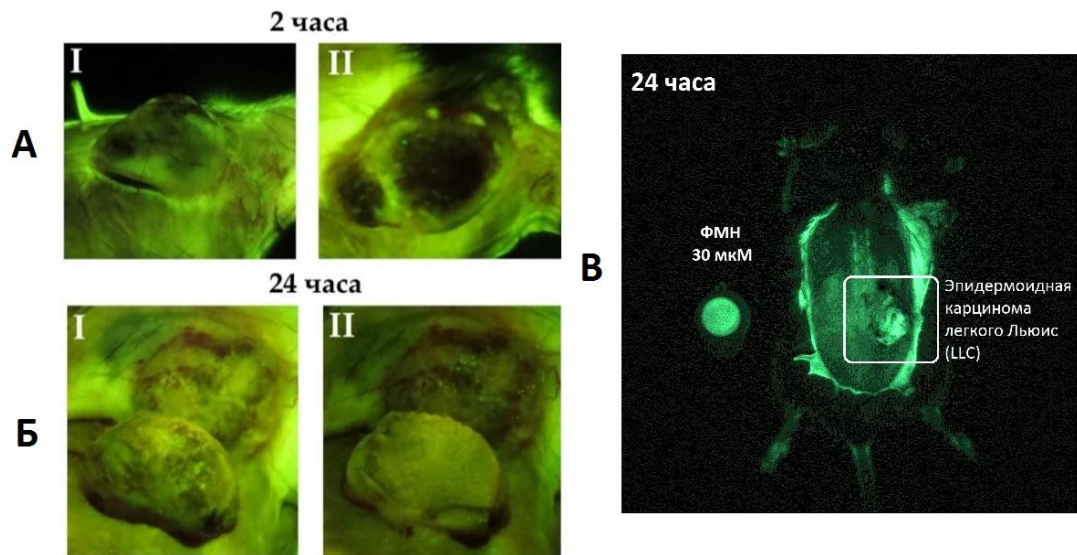


Рисунок 16 — Фотографии мыши BDF1 с карциномой легкого Льюис (LLC), привитой на дорсальной поверхности тела животного с откинутым кожным лоскутом. **А.** I. Поверхность опухоли через 2 часа после системного введения ФМН; II. Та же область, срез через центр опухоли. **Б.** I. Поверхность опухоли через 24 часа после системного введения ФМН; II. Та же область, срез через центр опухоли. **В.** Эпилюминесцентное изображение мыши BDF1 с перевитой опухолью LLC с откинутым кожным лоскутом через 24 часа после инъекции ФМН. Рядом с животным - пластиковая кювета, содержащая раствор ФМН с концентрацией ≈ 30 мкМ (зеленый - псевдоцвет)

3.6. ФДТ первичной опухоли

Для оценки эффективности ФМН в качестве ФС для ФДТ *in vivo*, проводили серию экспериментов на мышах с ксенотрансплантатом меланомы кожи человека Mel 1L (высокий фоновый уровень меланина) и A375 (низкий фоновый уровень меланина) (Рисунок 17А, Б). Было показано, что проведение ФДТ с использованием ФМН позволяло значительно затормозить рост опухоли по сравнению с контролем. Торможение роста опухоли (ТРО) составило 85% для A375 и 89% для Mel 1L на 50 день после проведения фототерапии (Рисунок 17 В). Таким образом, в условиях *in vivo* показано, что высокий уровень меланина в опухоли Mel 1L не является препятствием для эффективности ФДТ. Гистологический анализ опухолевой ткани через 24 часа после ФДТ показал интенсивные функциональные нарушения с вазодилатацией и экстравазацией эритроцитов. В случае как A375, так и Mel 1L большинство клеток в опухолевых образованиях оказались поврежденными (Рисунок 17 Г).

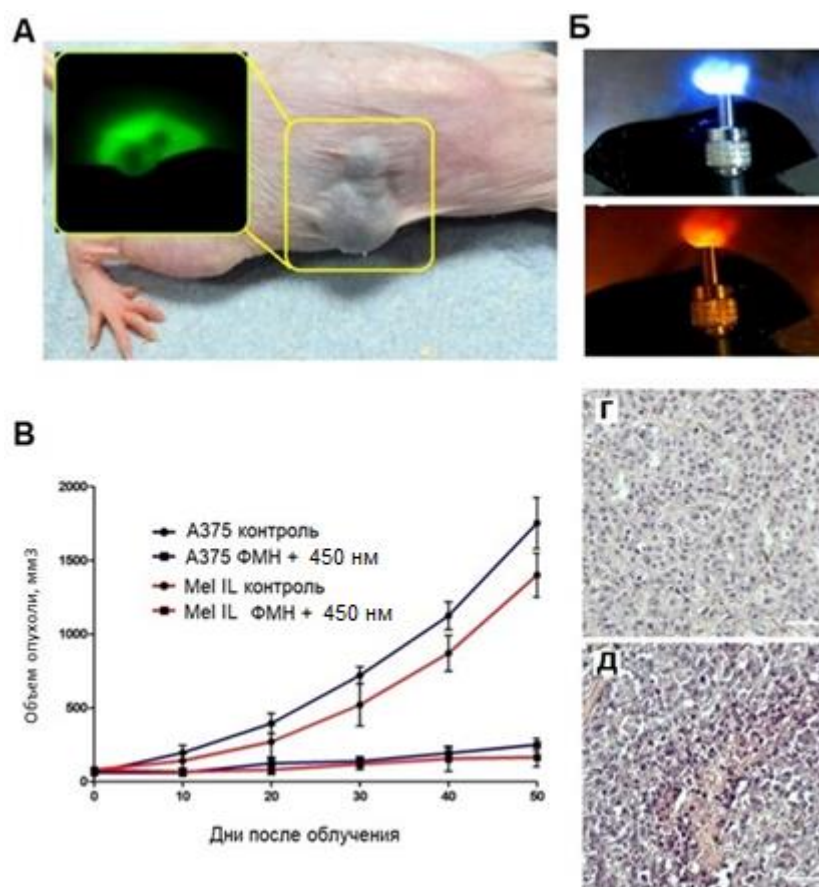


Рисунок 17 — ФДТ меланомы кожи человека *in vivo*. **А.** Фотография мыши с ксенотрансплантатом Mel II (высокий фоновый уровень меланина), на вставке - флуоресцентное изображение ксенотрансплантата, демонстрирующее фотолюминесценцию ФМН. **Б.** Верхнее фото — процесс облучения ксенотрансплантата A375 (низкий фоновый уровень меланина) оптическим волокном (450 нм), нижнее фото — соответствующий участок опухоли. Фотография сделана через красный оптический фильтр, демонстрирующая накопление и фотоактивацию ФМН (красное свечение, 620–670 нм). **В.** Кривые роста опухолей для ксенотрансплантатов меланомы кожи человека Mel II и A375 в течение 50 дней после проведения однократной процедуры ФДТ. **Г.** Гистологический анализ контрольного ксенотрансплантата Mel II, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм. **Д.** Гистологический анализ ксенотрансплантата Mel II после ФДТ (450 нм) с ФМН, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм

3.7. Опосредованное действие ФДТ на дистантную опухоль

Было изучено влияние лечения ФДТ с применением ФМН в качестве ФС на модели отдаленных опухолей, когда облучалась только одна из двух подкожных опухолей (меланома B16-F10) одного животного (самцы мышей C57BL/6). Динамика роста как облученных, так и дистантных опухолей наблюдалась в течение 16 дней. ТРО в случае дистантного необлученного образования по сравнению с контрольными опухолями оценивали как 20% для однократной процедуры ФДТ и 30% для двукратного применения терапии (Рисунок 18).

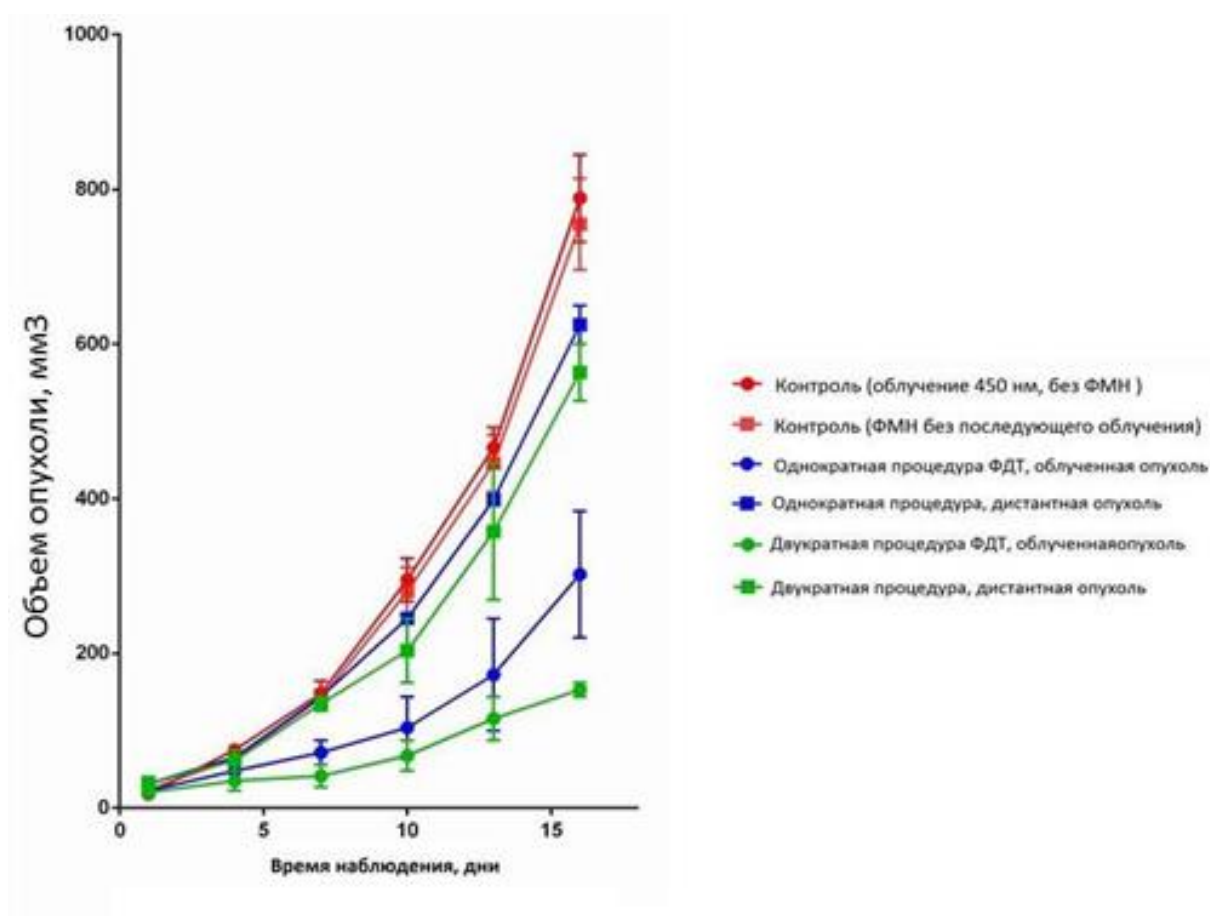


Рисунок 18 — Влияние лечения ФДТ с применением ФМН в качестве ФС на модели отдаленных опухолей (меланома B16-F10)

3.8. Исследование токсичности НАФ *in vitro*

Анализ с помощью МТТ-теста проводили для оценки жизнеспособности дермальных фибробластов человека Vj-5ta и кератиноцитов кожи HaCaT,

инкубированных с образцами НАФ «УФ-» и «УФ+» с полимерными покрытиями ПМАО и ПМАО-ПЭГ в концентрации 0,1-0,8 мг/мл в течение 24 часов при 37°C. Было показано, что жизнеспособность клеток Vj-5ta и HaCaT под действием всех исследуемых образцов практически не снижается (процент жизнеспособных клеток колеблется в пределах от 94 до 99 % независимо от типа НАФ и культуры клеток) (Рисунок 19).

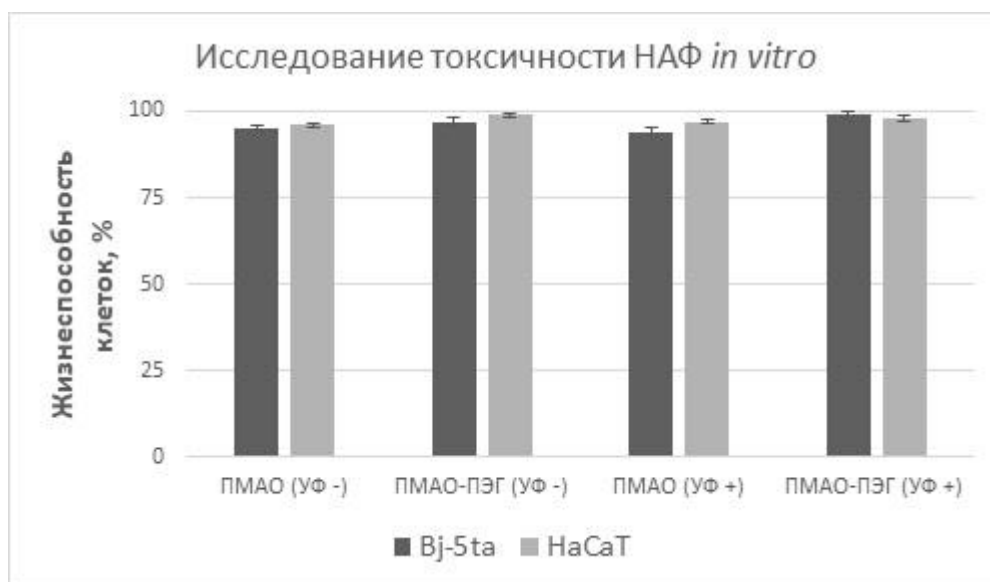


Рисунок 19 — Жизнеспособность дермальных фибробластов VJ-5ta и кератиноцитов кожи человека HaCaT в присутствии образцов НАФ «УФ+» и «УФ-» с полимерными покрытиями ПМАО и ПМАО-ПЭГ. Жизнеспособность оценивали методом МТТ-теста через 24 часа. На гистограмме приведены средние значения для максимальной исследованной концентрации НАФ 0,8 мг/мл \pm SD трех независимых экспериментов, $p < 0,05$

3.9. Исследование доставки НАФ в опухолевую ткань

При системном введении образцов НАФ УФ «-», модифицированных полимерными покрытиями ПМАО и ПМАО-ПЭГ в кровотоки малых животных было обнаружено, что НАФ с покрытием ПМАО-ПЭГ регистрируются в образцах крови при помощи эпифлуоресцентной микроскопии с использованием антистоксового флуоресцентного микроскопа в течение трех часов, а покрытие ПМАО обеспечивает циркуляцию в течение 10 минут (Рисунок 20).

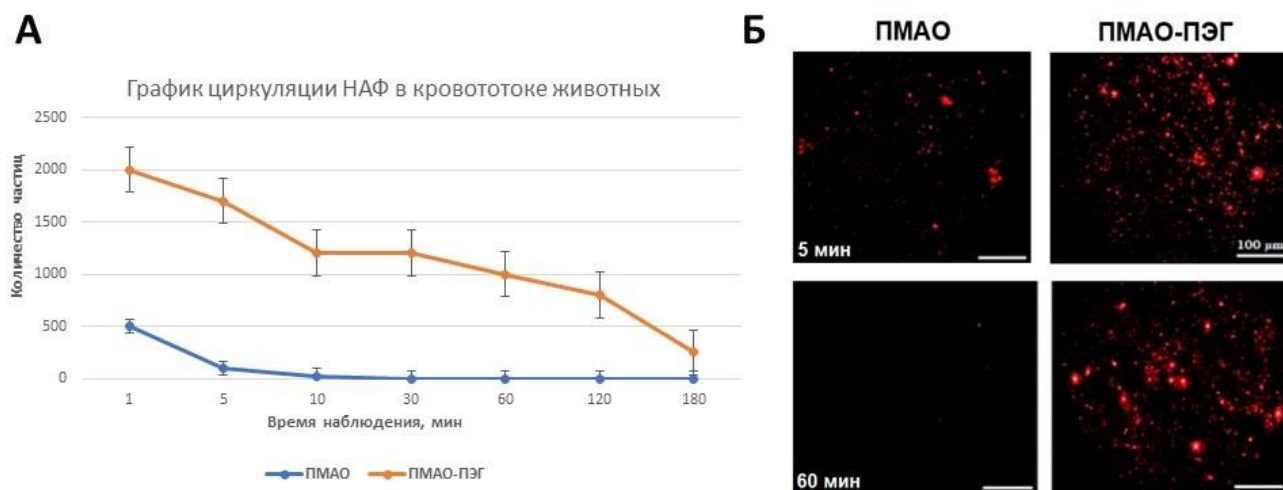


Рисунок 20 — Циркуляция НАФ в кровотоке мышей. **А.** Зависимость изменения концентрации наночастиц от времени циркуляции наночастиц в кровотоке мыши начиная с 1-й минуты после введения препарата. **Б.** Микрофотографии с апконверсионного люминесцентного микроскопа, демонстрирующие люминесценцию апконвертирующих наночастиц в образцах крови на 5 и 60 минуте после введения. Исходная концентрация вводимых наночастиц одинакова. Размер наночастиц и их фотолюминесцентные свойства идентичны. Масштабная линейка 100 мкм

В результате полученных данных по пролонгированной циркуляции частицы «УФ-» с покрытием ПМАО-ПЭГ в кровотоке животного были выбраны для демонстрации доставки в опухолевую ткань. Оптическая визуализация опухоли *in vivo* была продемонстрирована на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC, ATCC, CRL-1642TM) с использованием оптической имиджинговой системы (ИФТ РАН, Троицк). Эпилюминесцентные изображения были получены с интервалами времени от 1 до 180 мин после введения образцов. Наночастицы предпочтительно накапливались по периферии опухоли, где наблюдается повышенная плотность кровеносных сосудов, визуально подтверждая проявление ЭПР – эффекта, затем сигнал равномерно распределяется по всему объему опухоли (Рисунок 21).

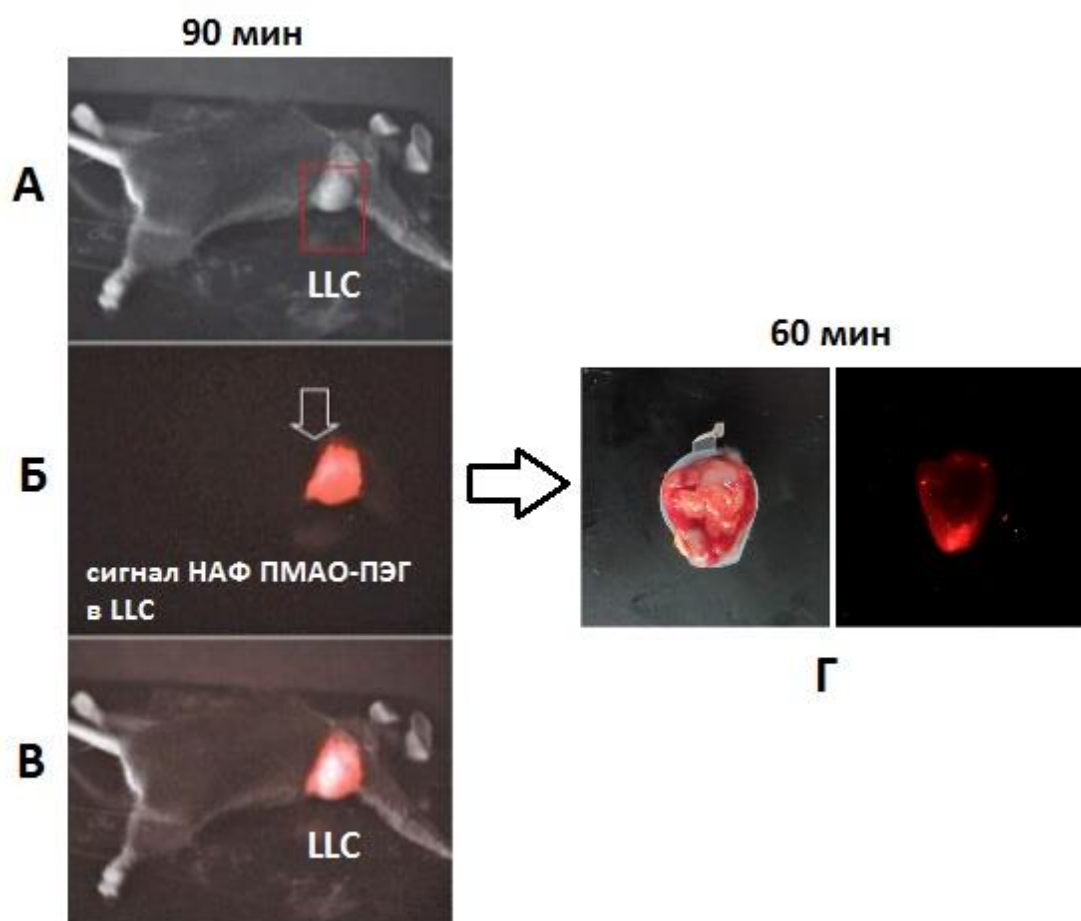


Рисунок 21 — Демонстрация эффективности маркирования опухоли НАФ с покрытием ПМАО-ПЭГ. Изображения получены *in vivo* через 90 мин после инъекции наночастиц. Эпилюминесцентный сигнал от фотолюминесцентных наночастиц показан красным цветом (красный - псевдоцвет). **А.** Светлопольное изображение мыши с перевитой эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC). **Б.** Эпилюминесцентный сигнал от НАФ «УФ-» с покрытием ПМАО – ПЭГ в LLC. **В.** Наложение эпилюминесцентного сигнала со светлопольной фотографией. **Г.** Фотография среза опухоли LLC (слева) и соответствующее люминесцентное изображение (справа) через 60 мин после инъекции наночастиц. Показано, что накопление наночастиц идет по периферии опухоли, где более развита сосудистая система и меньше интерстициальное давление

Для визуализации локализации НАФ в сосудах был откинута кожный лоскут и сделаны снимки с помощью антистоксового флуоресцентного микроскопа. Оптическая визуализация лоскута кожи, плотно прилегающего к опухоли эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), выбранной в качестве модели для изучения доставки НАФ в опухолевую ткань, качественно продемонстрировала внутрисосудистое расположение наночастиц, покрытых ПМАО-ПЭГ. Данный подход позволил оценить скорость потока НАФ в режиме реального времени и их способности перераспределяться между сосудами различного диаметра (эпилюминесцентная микроскопия) (Рисунок 22).

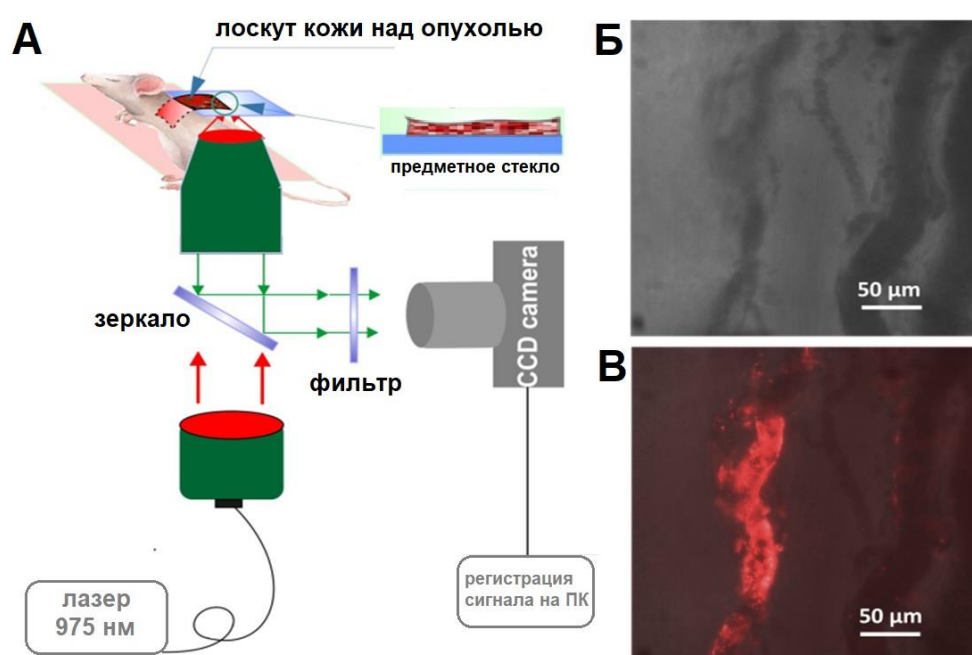


Рисунок 22 — **А.** Принципиальная схема апконверсионного микроскопа для детекции сигнала НАФ в биотканях. Луч от непрерывного полупроводникового лазера 975 нм сканирует исследуемый объект. Детектирование сигнала фотолюминесценции исследуемой области осуществляется цифровой CCD камерой с использованием интерференционных фильтров для отсекающего возбуждающего излучения лазера. **Б.** Светлопольная фотография васкуляризованного участка лоскута кожи. **В.** Эпилюминесцентная фотография исследуемой области, демонстрирующая локализацию НАФ в кровеносных сосудах различного диаметра. Масштабная линейка 50 мкм

3.10. ФДТ солидных опухолей с применением ФМН в качестве ФС и НАФ

Фототоксическое действие пары НАФ + ФМН в условиях *in vitro* было продемонстрировано с помощью двухфазной процедуры инкубации клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 с образцами НАФ «УФ+» и «УФ-» с полимерным покрытием ПМАО - ПЭГ и ФМН и облучением лазером с длиной волны 975 нм (доза облучения составила 600 Дж/см²). Исходя из результатов предыдущих экспериментов в отношении ФМН, применение НАФ, генерирующих УФ (НАФ «УФ+») привело к фотоактивации ФМН и генерации АФК, в конечном итоге вызывающей гибель клеток. Через 30 мин после облучения клетки становятся проницаемыми для PI, который наблюдается в красном флуоресцентном канале и указывает на то, что гибель клеток произошла, вероятно, в результате разрушения мембраны (Рисунок 23).



Рисунок 23 — Опосредованная фотоактивация ФМН с помощью НАФ. **А.** Фотолюминесценция образцов НАФ «УФ+» и УФ «-» с покрытием ПМАО-ПЭГ под действием возбуждающего излучения 975 нм. **Б.** Фазово-контрастное изображение клеточной линии аденокарциномы молочной железы SK-BR-3. **В.** Изображение, демонстрирующее отсутствие токсического действия комбинации ФМН и НАФ «УФ-» на клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 при возбуждении светом ближнего ИК диапазона спектра (слева) и изображение, демонстрирующее разрушение клеточной мембраны под действием комбинации ФМН и НАФ «УФ+» на клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 при возбуждении светом ближнего ИК диапазона спектра (справа). Масштабная линейка 50 мкм

С использованием аналогичной клеточной линии, что и в эксперименте *in vitro*, в экспериментах *in vivo* на иммунодефицитных мышах линии Balb nu/nu было показано, что ФДТ с использованием света ближнего ИК диапазона (975 нм) для НАФ-опосредованного возбуждения ФМН приводила к значительному уменьшению объема опухоли по сравнению с контрольными группами. ТРО при этом составило $90\% \pm 5\%$ через 50 дней после облучения (Рисунок 24В).

Через 24 часа после сеанса ФДТ по два животных из каждой группы выводились из эксперимента для патоморфологического анализа процессов, протекающих в опухолевой ткани. Результаты гистологии опухолей в контрольных группах характеризовались наличием неповрежденных опухолевых клеток без каких-либо изменений. Однако опухоли, содержащие комбинацию ФМН и НАФ «УФ+», продемонстрировали резкое снижение плотности ядросодержащих клеток. Большинство из них имели вакуолизированную цитоплазму и разрушенные цитоплазматические мембраны. Ядра имели округлую или неправильную форму, были отекшими, с разрывами кариолеммы. Процедура ФДТ также вызывала разрыв кровеносных сосудов с обширными кровоизлияниями в интерстиций опухоли. Основываясь на гистологическом заключении, мы оцениваем диапазон глубины воздействия ФДТ с помощью комбинации «ФМН + НАФ «УФ+» + ИК» в 8-10 мм с учетом толщины опухолевого очага (Рисунок 24Г).

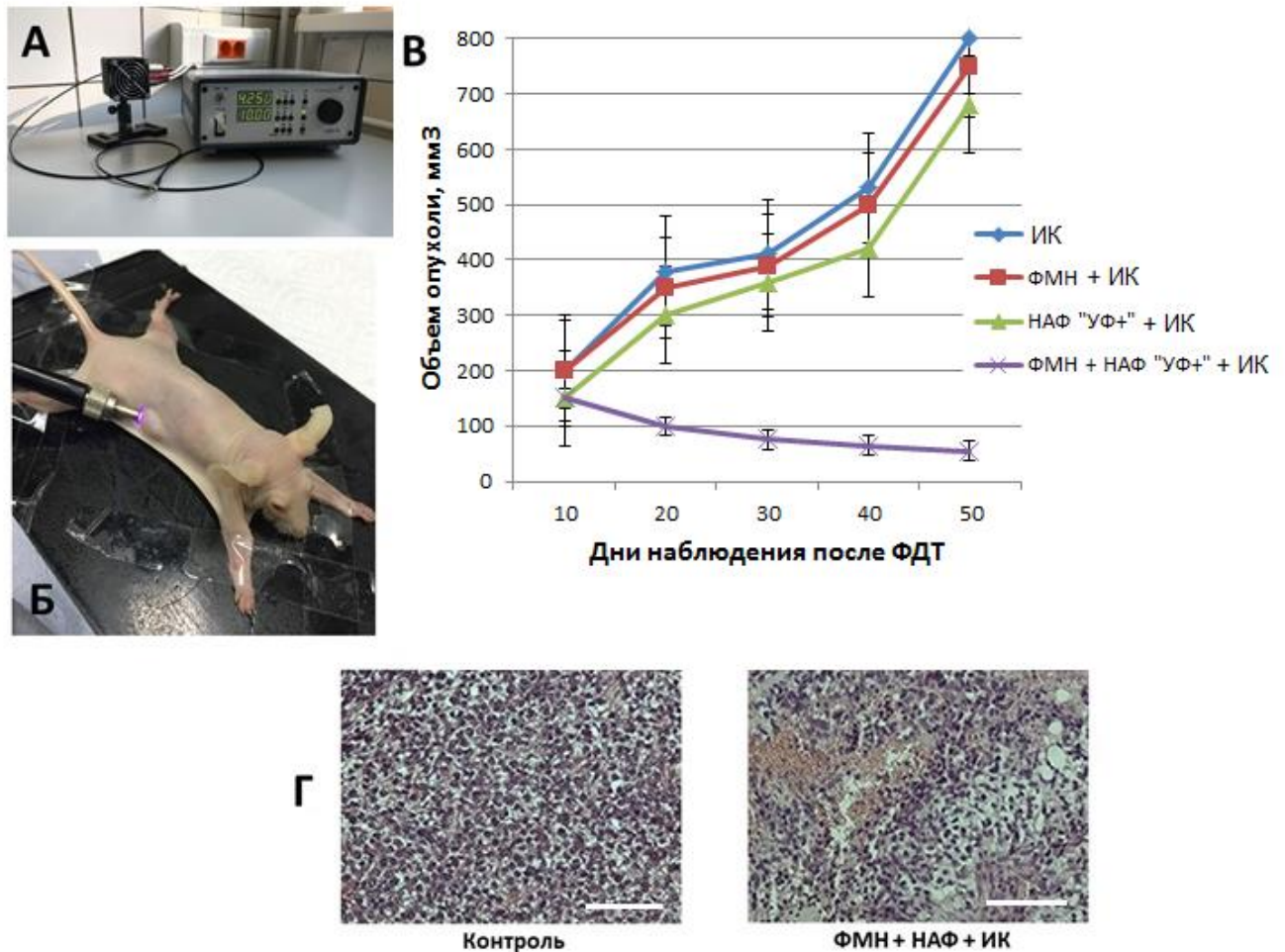


Рисунок 24 — ФДТ аденокарциномы молочной железы человека *in vivo*.
А. Экспериментальная лазерная установка для проведения ФДТ. **Б.** Мышиная модель ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.
В. График торможения роста опухоли в экспериментальной и контрольных группах в течение 50 дней после однократного сеанса ФДТ. **Г.** Результаты гистологического исследования опухолевой ткани экспериментальной и контрольной (интактной) групп через сутки после сеанса ФДТ, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 200$. Масштабная линейка 100 мкм

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка новых эффективных методов и подходов в онкологии - одна из наиболее актуальных и активно развивающихся областей медицины. В данной диссертационной работе показаны фототоксические свойства флавинмононуклеотида (фосфорилированная форма рибофлавина, витамина В2) с использованием клеточных культур и лабораторных животных, чтобы продемонстрировать его противоопухолевый потенциал в отношении солидных опухолей животных и человека и его возможное комбинированное применение с наноразмерными апконвертирующими фосфорами (НАФ), способными генерировать УФ свет, необходимый для внутриопухолевой активации ФМН, при возбуждении таких частиц ближним ИК светом, глубоко проникающим через биологическую ткань.

In vitro и in vivo ФДТ для лечения опухолей человека и животных с использованием флавинмононуклеотида в качестве ФС

Была исследована фототоксичность фосфорилированной водорастворимой формы рибофлавина – ФМН с использованием колориметрического анализа МТТ. В работе экспериментально доказано, что в отличие от многих органических ФС, ФМН обладает крайне низкой темновой токсичностью и не оказывает ингибирующего эффекта на рост клеток до концентрации как минимум 5 мМ (см. Рисунок 4). Следует отметить, что темновая токсичность коммерчески доступных агентов для ФДТ часто выявляется уже при микромолярных концентрациях. Например, значения IC_{50} «Фотофрина» (порфирин натрия) и «Фоскана» (темопорфин) для клеток эпидермоидной карциномы человека A431 составляют 5 мкМ и 8 мкМ, соответственно [236, 237].

В то же время, облучение клеток, инкубированных с ФМН, приводило к их гибели в зависимости от концентрации вещества и дозы облучения, что, предположительно, связано с уровнем его внутриклеточного накопления (см. Рисунок 6). Действительно, было обнаружено, что все опухолевые клеточные линии продемонстрировали повышенное накопление ФМН по сравнению с нормальными кератиноцитами HaCaT и фибробластами BJ-5ta

(см. Рисунок 10). Клетки меланомы человека Mel MTP, Mel IL и Mel Z накапливали больше ФМН, чем клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, предложенные в качестве положительного контроля, известного по повышенному накоплению рибофлавина [238, 239], а накопление в клетках A375 было аналогично уровню VJ-5ta. Все эти данные подтверждают идею о том, что ФМН может быть предложен в качестве адресной молекулы для клеток меланомы. Кроме того, конфокальные флуоресцентные изображения клеток Mel IL показали накопление ФМН на клеточной мембране, вероятно, связанное с его взаимодействием с рецепторами клеточной поверхности (см. Рисунок 12). Недавние исследования показали, что рецепторы опосредуют поглощение рибофлавина клетками за счет рецепторно-опосредованного эндоцитоза и пиноцитоза [240–242]. Ранее, в *in vitro* экспериментах повышенное накопление рибофлавина связывали с свехэкспрессией рецепторов RFVT в эпидермоидной карциноме человека A431, и эндотелиальных клетках пупочной вены человека HUVES. В *in vivo* исследованиях было показано, что RFVT 3 в существенно больших количествах экспрессируется в клетках плоскоклеточной карциномы пищевода и глиоме по сравнению со здоровой тканью. Для оценки потенциала использования рибофлавина в качестве направляющего модуля его сравнивали с широко используемой для адресной доставки фолиевой кислотой (ФК). Было показано, что интернализация рибофлавин-специфичных комплексов происходит с более высокой аффинностью, чем для ФК-специфичных комплексов [164, 165, 243].

Так, три клеточные линии с различным уровнем накопления ФМН, а именно Mel IL (высокое накопление), A375 (среднее накопление) и HaCaT (низкое накопление) были проинкубированы с ФМН (1-100 мкМ), затем их облучали синим светом различной интенсивности. Четкая зависимость цитотоксичности от дозы облучения была показана для кератиноцитов HaCaT при 100 мкМ ФМН, но 10 мкМ и 30 мкМ ФМН не вызывали значительной клеточной гибели даже при высокой дозе облучения. Поскольку взаимодействие между меланоцитами и кератиноцитами важно для прогрессирования меланомы,

большой интерес представляет возможность нацеливания именно на злокачественные клетки без повреждения окружающей здоровой ткани. Для клеток меланомы A375 была продемонстрирована зависимость их выживаемости от дозы облучения и показано, что цитотоксический эффект наблюдается даже при 10 мкМ ФМН. Найдено, что даже сравнительно небольшая доза облучения (2 Дж/см²) позволяет достичь максимального ингибирования роста опухолевых клеток, но при этом более высокие дозы облучения существенно не увеличивали фототоксичность препарата (см. Рисунок 6). Это может быть связано с быстрым разложением ФС при облучении, как это было описано в работах [244, 245]. Интересно, что клетки Mel II были более устойчивы к ФДТ на основе ФМН, чем клетки A375, несмотря на его более высокое накопление. Можно заключить, что нормальные клетки, в частности кератиноциты HaCaT, более устойчивы к фотодинамическому воздействию в следствие более низкого накопления ФМН. Опухолевые клетки линии Mel II проявляли большую устойчивость к ФДТ, чем клетки A375, несмотря на более высокий уровень накопления ФМН. Это можно объяснить антиоксидантной активностью меланина в клетках Mel II, по сравнению с амеланотическими клетками A375 [246, 247].

Меланин может защищать клетки меланомы от АФК-опосредованного действия. Использование электрохимического зонда на основе платинированных углеродных нанoeлектродов для измерения внутриклеточных АФК позволило в режиме реального времени отследить наработку АФК при фотоактивации ФМН *in vitro* (см. Рисунок 13). Следует отметить, что в депигментированных клетках меланомы A375 генерация АФК была в 10 раз выше, чем в клетках Mel II, что может быть связано с антиоксидантной активностью меланина в клетках Mel II (см. Рисунок 14). Найдено, что облучение светом приводит к быстрому росту продукции АФК, а отсутствие светового воздействия приводило к немедленному возвращению к фоновому внутриклеточному уровню АФК, связанному с коротким периодом их жизни. Облучение группы клеток, не инкубированных с ФМН, привело к незначительным изменениям уровня АФК (5 ± 1 мкМ для клеток A375 и $1 \pm 0,5$ мкМ для клеток Mel II), что подтверждает действие ФМН как

источника АФК. Измерение АФК с помощью электрохимического зонда имеет высокую чувствительность и позволяет определять уровни АФК ниже 1 мкМ. Таким образом, прямое измерение генерации АФК в опухолевых клетках в режиме реального времени позволяет прогнозировать эффективность фотодинамического воздействия.

Образование АФК в клетках меланомы после фотоактивации ФМН также было измерено с помощью флуоресцентного красителя CellROX Deep Red и была подтверждена четкая корреляция между концентрацией вещества и генерацией АФК для тех же клеточных линий - Mel IЛ и A375 (см. Рисунок 15). В отличие от электрохимического метода в режиме реального времени, флуоресцентный метод подходит для определения активных форм кислорода во всех клетках во время цикла облучения, поэтому эти два метода дополняют друг друга.

Однако АФК не являются единственным фактором токсичности. Ранее фотопродукты рибофлавина (ЛХ, ЛМФ, КМФ и др.) были продемонстрированы в качестве возможного фактора агрессивности клеток меланомы B16-F10 как в *in vitro*, так и в *in vivo* условиях [248]. В работе показано, что АФК были более токсичными для амеланотических клеток A375 по сравнению с фотопродуктами рибофлавина (значения IC_{50} составляли $52,2 \pm 3,4$ мкМ и $40,4 \pm 4,0$ мкМ, соответственно). С другой стороны, действие АФК было менее эффективно для пигментированных клеток Mel IЛ, чем продукты фотораспада (значения IC_{50} были $60,4 \pm 7,1$ мкМ и >150 мкМ, соответственно) (см. Таблица 2). Важно, что аддитивное действие АФК и фотопродуктов резко снижает концентрации ФМН, необходимые для достижения 50% жизнеспособности клеток (см. Рисунок 7).

ФДТ может индуцировать различные механизмы гибели клеток, включая апоптоз, некроз и аутофагию, и эти механизмы могут возникать одновременно. Апоптоз является предпочтительным путем элиминации раковых клеток, поскольку это запрограммированная гибель, не провоцирующая развития дополнительного воспаления *in situ* и в прилегающих здоровых тканях [106, 249, 250]. Для определения доли апоптотических и некротических клеток, инкубированных с ФМН и подвергнутых облучению синим светом, было

использовано окрашивание аннексином-FITC и PI. Обнаружена четкая корреляция между концентрацией ФМН и гибелью клеток через апоптотический и некротический пути (см. Таблица 3). Гибель клеток путем апоптоза была специфична для низкой (10 мкМ) и средней (30 мкМ) концентрации ФМН, тогда как некроз происходил в основном при высокой (100 мкМ) дозе исследуемого вещества. В подтверждение данного факта в исследованиях, проведенных нескольких лет назад, показано, что невысокие концентрации рибофлавина могут инициировать гибель клеток путем апоптоза [251, 252].

В результате *in vitro* исследований фототоксических свойств ФМН в отношении клеточных линий меланомы кожи по сравнению с нормальными клетками, полученные данные подтверждают важность антиоксидантной функции меланина в клетках, но в то же время демонстрируют возможность преодоления этой защиты при проведении фототерапии с использованием ФМН.

В экспериментах *in vivo* на модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис показано, что концентрация ФМН, необходимая для проявления подтвержденных в *in vitro* цитотоксических свойств (30 мкМ и выше) может быть достигнута при системном введении ФМН в течение 2-24 часов (см. Рисунок 16). С целью демонстрации эффективности ФМН в качестве ФС для ФДТ в *in vivo* исследованиях была проведена серия экспериментов на ксенографтах меланомы A375 и Mel II. Меланома кожи человека представляет собой опухоль с относительно простым доступом к облучению, поэтому ФДТ в этом случае является одной из многообещающих терапевтических процедур.

Животным вводили внутривенно ФМН, через два часа опухоль облучали синим светом (450 нм). Животные, которым вводили ФМН без дальнейшего облучения, использовались в качестве контроля. В контрольной группе опухоли демонстрировали устойчивый рост, тогда как в экспериментальной группе наблюдалось выраженное торможение роста опухоли (85% для A375 и 89% для Mel II на 50 день после однократного проведения ФДТ). Морфологическое исследование образцов опухолевой ткани через 24 часа после сеанса ФДТ показал повреждение не только опухолевых клеток, но и дистрофические изменения

кровеносных сосудов (нарушение формы и целостности эндотелиальных клеток, расширение эндотелиальных промежутков, периваскулярный отек и инфильтрацию), что приводит к дезорганизации сосудистой сети, увеличению проницаемости и, как следствие, обширным кровоизлияниям в интерстиций опухоли (см. Рисунок 17). Известно, что именно сосудистые повреждения в результате фотодинамического воздействия обеспечивают наиболее быструю реакцию на проводимую терапию и часто выявляются до завершения лечения. Некоторые ФС хлоринового ряда были показаны как эффективные фототерапевтические агенты, а также несколько новых ФС сегодня находятся на стадии клинических исследований [40, 141, 265].

Было протестировано влияние ФДТ с использованием ФМН на модели отдаленных опухолей [254], когда облучалась только одна из двух подкожных опухолей мышины меланомы B16-F10. Снижение скорости роста отдаленной опухоли по сравнению с контрольными опухолями оценивается в 20% торможения для однократной процедуры ФДТ и 30% - для двукратной (см. Рисунок 18). Вероятно, фототерапевтическое лечение одной опухоли оказывает иммунологическое влияние на скорость роста отдаленной опухоли. Наблюдаемый эффект требует дальнейшего детального изучения, так как ФДТ на основе ФМН может быть перспективным методом лечения для снижения риска рецидива в сочетании со стандартной хирургической резекцией.

Еще одной перспективной областью применения ФДТ являются злокачественные образования головного мозга. В этом случае у ФДТ также есть свои преимущества: избирательное разрушение опухоли, обусловленное селективностью накопления ФС при максимальном сохранении жизнеспособности окружающих нормальных тканей, что особенно важно для ткани головного мозга, несущей функциональный характер, возможность проведения предоперационной процедуры с целью уменьшения объема хирургического вмешательства, а также сочетание в себе диагностического и терапевтического компонента.

По последним литературным данным 85% всех рецидивов глиобластомы происходит на расстоянии порядка 5 мм ткани от первичного очага опухоли. На основе этих данных был разработан протокол I фазы клинического исследования эффективности интраоперационной ФДТ (ФС - 5-аминолевулиновая кислота, 5-АЛК) при глиобластоме, которая проводится в дополнение к текущему стандарту лечения, включающему в себя операцию по резекции опухоли с последующей адъювантной терапией [267–270]. Похожее по дизайну клиническое исследование было проведено с использованием талапорфина [256]. Основные исследования в области ФДТ злокачественных опухолей головного мозга направлены на изучение противоопухолевой активности различных ФС, которые включают Фотофрин, Фотолон, Аласенс и другие производные 5-АЛК. Вопрос о селективности накопления ФС в опухолях головного мозга и высокой цитотоксичности в отношении злокачественных клеток – один из ключевых в проблеме повышения эффективности процедуры и такое многообразие препаратов говорит об отсутствии универсального агента для нейроФДТ [21].

В данной работе впервые была оценена способность ФМН к избирательному накоплению в клетках глиомы *in vitro*. Было обнаружено, что ФМН способен накапливаться в клетках глиобластомы человека U87-MG и глиомы крысы С6, однако уровень накопления уступал накоплению в линии карциномы молочной железы SK-BR-3, клетках меланомы (А-375, В16-F10) и примерно соответствовал уровню накопления в нормальных клетках (дермальные фибробласты человека Vj-5ta) (см. Рисунок 11). Внутриклеточная локализация ФМН соответствовала цитоплазме, а не мембране, чего можно было бы ожидать в случае наличия большого числа рецепторов к рибофлавиону на поверхности клеток глиомы, что коррелирует с данными по исследованию уровней белка-переносчика рибофлавина при глиоме *in vivo* [257].

Была оценена темновая и световая токсичность ФМН *in vitro* для аналогичных клеточных линий U87-MG и С6. Показано, что облучение синим светом (450 нм, 4,2 Дж/см²) среды, содержащей 50 мкМ ФМН, через 24 часа приводило к снижению жизнеспособности клеток глиомы U87-MG и С6.

Снижение выживаемости составило $35 \pm 7\%$ и $40 \pm 4\%$, соответственно (см. Рисунок 5). Как и в случае клеточных линий меланомы было показано, что цитотоксичность ФМН может быть обусловлена влиянием АФК и продуктами фотораспада рибофлавина, образующихся при облучении. В обоих случаях оказалось, что и АФК, и фотопродукты по отдельности менее токсичны, чем их комбинация (см. Рисунок 8). Так, значения IC_{50} для фотопродуктов составили $225 \pm 3,9$ мкМ и $132 \pm 2,8$ мкМ для клеточных линии U87-MG и C6, а для АФК - $663 \pm 4,8$ мкМ и $127 \pm 3,3$ мкМ, соответственно (см. Таблица 2).

Результаты, полученные в *in vitro* и *in vivo* тестах показывают, что таргетные свойства ФМН по отношению к злокачественным клеткам и тканям делают его потенциальным маркером для обнаружения опухолей (способность нацеливаться на различные компартменты опухоли, включая паренхиму (собственно раковые клетки) и строму опухоли), мониторинга и терапии, а также в перспективе многообещающим инструментом для систем адресной доставки лекарств.

In vitro и *in vivo* ФДТ с использованием в качестве ФС флавинмононуклеотида и технология его фотовозбуждения ИК светом на глубине ткани посредством наноразмерных апконвертирующих фосфоров

Глубина проникновения и эффективность доставки света являются двумя основными препятствиями для ФДТ с использованием ФМН, так как проникновение УФ и синего света, необходимого для его фотоактивации ограничено [258]. Принимая во внимание ослабление интенсивности с уменьшением длины волны, для глубокого проникновения в ткани подходит только свет в диапазоне 700 - 1100 нм (т.е. ближний ИК диапазон) [189, 190]. На сегодняшний день одним из самых безопасных и эффективных методов увеличения проникновения света через слой ткани для активации ФС является создание комплексов с наночастицами с антистоксовой люминесценцией и новые возможности их применения. Благодаря своим фотофизическим свойствам, наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ) в последние годы получили широкое биомедицинское применение, благодаря ряду преимуществ перед

другими флуорофорами. На сегодняшний день имеется множество работ, в которых НАФ успешно использовались в качестве агентов для оптической визуализации [194, 259, 260], биосенсоров [205], агентов для ФДТ и фототермической терапии [203, 261].

При реализации терапевтических подходов НАФ позволяют использовать глубоко проникающее в биоткань возбуждающее ИК излучение (до 3 см) с последующей передачей энергии кванта света на органическую молекулу ФС (в случае ФДТ) или металлические наночастицы различной природы (при фототермической терапии).

В работе показана биологическая безопасность используемых образцов НАФ с помощью МТТ-теста на клеточных линиях дермальных фибробластов человека Vj-5ta и кератиноцитов кожи HaCaT. Показано, что жизнеспособность клеток практически не снижалась ($98 \pm 2\%$ и $95 \pm 2\%$, соответственно) при инкубации с наночастицами в их максимальной исходной концентрации (0,8 мг/мл) (см. Рисунок 19).

Предложенная модификация поверхности наночастиц биосовместимыми полимерными покрытиями обеспечила длительную циркуляцию в кровотоке до 180 мин (см. Рисунок 20). Рост опухоли в значительной степени зависит от неоангиогенеза [202, 206, 207, 262]. При системном введении НАФ в кровотоки малых животных было обнаружено, что наночастицы предпочтительно накапливаются по периферии опухоли, где наблюдается повышенная плотность кровеносных сосудов, визуально подтверждая проявление ЭПР – эффекта (см. Рисунок 21). Изучение локализации НАФ проводили с помощью уникальной системы визуализации, сконструированной в ИФТ ФНИЦ «Кристаллография и фотника» РАН, г. Троицк – оптического диффузионного томографа с системой отложенной регистрации сигнала.

К трудностям флуоресцентной оптической визуализации следует отнести проблему автофлуоресценции живой ткани. Применение стоксовых флуорофоров, детектируемых на фоне автофлуоресценции биоткани, особенно интенсивной в видимом спектральном диапазоне, приводит к существенному снижению контраста

получаемых изображений. Одним из решений данной проблемы является как самостоятельное, так и возможно комбинированное применение в качестве маркирующей метки наночастиц с антистоксовым характером люминесценции - НАФ, а использование оптической системы, регистрирующей антистоксовую люминесценцию, обеспечивает полное разделение сигнала НАФ от автофлуоресценции биоткани.

Изучение транспорта молекул/частиц в кровеносных сосудах имеет большое значение для *in vivo* визуализации и последующей терапии, так как рост сосудов в опухолях можно обсуждать как независимый фактор клинического исхода. При ламинарном движении по сосуду клетки крови равномерно движутся по прямым линиям и их движение в общей системе происходит с разной скоростью в зависимости от расположения в просвете сосуда. При неппульсирующем потоке с максимальной скоростью движется осевая струя жидкости, с минимальной — слой, прилегающий к стенке сосуда, в котором преимущественно располагаются наночастицы. Таким образом, скорость движения частиц существенно замедляется в местах бифуркации сосуда или слияния более крупного сосуда с мелким капилляром и возможно их «проваливание» через широкие эндотелиальные промежутки дефектных опухолевых сосудов в прилегающую опухолевую ткань, что снижает равномерность доставки в целевую ткань и результативность проводимой терапии [260].

Конструкция используемых в данной работе НАФ «УФ+» и «УФ-» (небольшой размер частиц – 70 ± 5 нм, отрицательный заряд поверхности, биосовместимое полимерное покрытие) позволило изучить особенности их накопления в микрокапиллярах. Оптическая визуализация лоскута кожи, плотно прилегающего к опухоли эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), выбранной в качестве модели для изучения доставки НАФ в опухолевую ткань, качественно продемонстрировала внутрисосудистое расположение наночастиц, покрытых ПМАО-ПЭГ, проведена оценка скорости потока НАФ в режиме реального времени и их способность перераспределяться между сосудами различного диаметра (см. Рисунок 22). Ламинарное внутрисосудистое движение частиц обеспечивает

более равномерное распределение в ткани, что важно для дальнейшей диагностики и терапии опухоли. Таким образом, НАФ с покрытием ПМАО-ПЭГ имеют большой потенциал для использования в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов и/или ФС в целевую ткань.

В диссертационной работе показана *in vitro* фотоактивация ФМН с использованием НАФ на клеточной культуре аденокарциномы молочной железы SK-BR-3. Клетки поочередно инкубировали с НАФ «УФ+» (покрытие ПМАО-ПЭГ) и ФМН с последующим облучением ИК светом (975 нм). Это привело к генерации АФК, вызывающих гибель клеток. Через 30 минут после облучения клетки стали проницаемыми для PI, сигнал которого регистрируется в красном флуоресцентном канале и указывает на то, что гибель клеток произошла в результате разрушения клеточной мембраны (см. Рисунок 23).

In vivo реализован подход, основанный на использовании НАФ с заданными оптическими свойствами для преобразования света ближнего ИК диапазона в свет УФ и синего спектра, что позволило активировать ФМН на глубине опухолевой ткани. Показано, что такая оптимизированная методика ФДТ позволила добиться значительного ТРО ($90\% \pm 5$ через 50 дней после облучения) ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, при этом глубина эффективного воздействия оценивается до 1 см с учетом толщины опухолевого очага. Гистологическая картина срезов опухоли после однократной процедуры фототерапии показала аналогичную картину, как в случае использования только ФМН в качестве ФС. Контрольные группы характеризовались наличием неповрежденных опухолевых клеток без каких-либо изменений. Однако опухоли, содержащие комбинацию ФМН и НАФ, продемонстрировали резкое снижение плотности ядросодержащих клеток. Большинство из них имели вакуолизированную цитоплазму и разрушенные клеточные мембраны. Ядра имели округлую или неправильную форму, были отекшими, с разрывами кариолеммы. Процедура также вызывала разрыв кровеносных сосудов с обширными кровоизлияниями в интерстиций опухоли (см. Рисунок 24).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФДТ является одним из малоинвазивных и высокоселективных методов лечения онкологических заболеваний. В основе метода лечения лежит фотогенерация в опухоли цитотоксических АФК, вызывающих окислительный стресс и гибель клеток. До настоящего времени широкое применение этого метода в клинической практике ограничивалось такими свойствами применяемых веществ, как системная токсичность, малая глубина проникновения возбуждающего света и быстрое фотообесцвечивание препарата, что требует введения повторных доз ФС для эффективности проводимой терапии. Производное рибофлавина (витамина В2), его водорастворимая форма – флавинмононуклеотид (ФМН), эффективно накапливаемый опухолевой тканью и не проявляющий системных токсических свойств, идеально подходит в качестве кандидата для ФДТ, однако его применение имеет ограничения, связанные с глубиной проникновения возбуждающего света. Недавний существенный прогресс в разработке и синтезе нового класса наноматериалов – наноразмерных апконвертирующих фосфоров (НАФ), позволил в значительной мере преодолеть указанные недостатки и предложить новую стратегию эффективной ФДТ с увеличенной глубиной терапии. Кроме того, такие частицы считаются тераностическими агентами нового поколения – они могут одновременно применяться для высококонтрастной визуализации локализации опухолей с использованием современных методов флуоресцентного биоимиджинга в реальном времени и использоваться в терапевтических целях.

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

4. Показано, что в *in vitro* исследованиях опухолевые клетки демонстрируют более высокий уровень накопления флавиномононуклеотида по сравнению с нормальными клеточными линиями, с преимущественной его локализацией на клеточной мембране, что подтверждено методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. В условиях *in vivo* на модели эпидермоидной карциномы лёгкого Льюис показано, что концентрация флавиномононуклеотида, необходимая для проявления цитотоксических свойств (30 мкМ и выше) может быть достигнута при его системном введении в течение 24 часов.

5. Показано, что применение флавиномононуклеотида в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ позволяет значительно затормозить рост опухоли

(торможение роста оценивается как 85% и 89% через 50 дней после облучения для ксенотрансплантатов меланомы кожи человека A375 и Mel II, соответственно).

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

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

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ATCC – американский каталог клеточных культур
- BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) — протоонкоген B-Raf, серин-треониновая киназа
- VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов
- IAP (inhibitor of apoptosis) – ингибитор апоптоза
- FDA (Food and Drug Administration) – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- HMGB1 (high-mobility group protein B1) – негистоновый хроматин-связывающий белок
- ICD (immunogenic cell death) – иммуногенная клеточная гибель
- МАРК (Mitogen-activated protein kinases) – митоген-активируемая киназа
- МЕК – митоген-активированная протеинкиназа киназа
- MiT /TFE (TFE3, MITF и TFEB) – семейство транскрипционных факторов
- ММР – матриксная металлопротеиназа
- mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень рапамицина у млекопитающих
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид), «
- NF-κB – ядерный транскрипционный фактор «каппа-би»
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PI – пропидия йодид
- PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) – фосфатидилинозит-3-киназа
- SD – стандартное отклонение
- АФК – активные формы кислорода
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- БТШ – белки теплового шока
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ДК – дендритные клетки
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИД – интерстициальное давление

ИК – инфракрасный свет
ИЛ – интерлейкины
КК – коэффициент конверсии
КМФ – карбоксиметилфлавин
КТ – квантовые точки
ЛФ – люмифлавин
ЛХ – люмихром
МАО – макрофаги, ассоциированные с опухолью
МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
МРТ – магнитно-резонансная томография
НАФ – наноразмерные апконвертирующие фосфоры
ПМАО – чередующийся сополимер малеинового ангидрида и октадецена
ПМК – полимолочная кислота
ПСК – полисиаловая кислота
ПЭГ – полиэтиленгликоль
ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
СК – синглетный кислород
ТМАГ – тетраметиламмония гидроксид
УФ – ультрафиолетовый свет
ФАД – флавинадениндинуклеотид
ФДТ – фотодинамическая терапия
ФЛ – фотолюминесценция
ФМН – флавинмононуклеотид
ФР – фолатный рецептор
ФС – фотосенсибилизатор
ФТТ – фототермическая терапия
ЦДРф – циклодегидрорибофлавин
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
ЭР – эндоплазматический ретикулум
ЭПР – эффект – эффект повышенного проникновения и удержания
ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baldea I. Photodynamic therapy in melanoma - An update / Baldea I. // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2012. – Т. 63. – № 2. – С. 109–118.
2. Benov L. Photodynamic therapy: Current status and future directions / Benov L. // *Med Princ Pract.* - 2015. - №. 24. – С. 14–28.
3. Yanovsky R.L. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature / Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S., Isakoff S.J., Chen S.T. // *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* – 2019. – № 3. - С. 12489.
4. Kwiatkowski S. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. / Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J. // *Biomedicine & pharmacotherapy* – 2018. – Т. 106 – С.1098–1107.
5. Sheleg S. V. Photodynamic therapy with chlorin e6 for skin metastases of melanoma / Sheleg S. V., Zhavrid E.A., Khodina T. V., Kochubeev G.A., Istomin Y.P., Chalov V.N., Zhuravkin I.N. // *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* – 2004. – Т. 20 – № 1 – С. 21–26.
6. Allison R.R. Photodynamic therapy: Oncologic horizons / Allison R.R. // *Futur. Oncol.* – 2014. – Т. 10. – № 1. – С. 123–142.
7. Akasov R.A. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide / Akasov R.A., Sholina N. V., Khochenkov D.A., Alova A. V., Gorelkin P. V., Erofeev A.S., Generalova A.N., Khaydukov E. V. // *Scientific Reports* – 2019. – Т. 9 – № 1.
8. Cardoso D.R. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality / Cardoso D.R., Libardi S.H., Skibsted L.H. // *Food & Function* – 2012. – Т. 3 – № 5 – С. 487.
9. Insińska-Rak M. Riboflavin interactions with oxygen - A survey from the photochemical perspective // *Chem. - A Eur. J.* – 2014. – Т. 20. – № 47. – С. 15280–15291.
10. Baier J. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers / Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Bäuml W.

// Biophysical Journal – 2006. – T. 91 – № 4 – C. 1452–1459.

11. Cardoso D.R. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality // Food Funct. – 2012. – T. 3. – № 5. – C. 487–502.

12. Baier J. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. / Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Bäuml W. // Biophysical journal – 2006. – T. 91 – № 4 – C. 1452–1459.

13. Faddy H.M. Riboflavin and ultraviolet light: impact on dengue virus infectivity / Faddy H.M., Fryk J.J., Watterson D., Young P.R., Modhiran N., Muller D.A., Keil S.D., Goodrich R.P., Marks D.C. // Vox Sanguinis – 2016. – T. 111 – № 3 – C. 235–241.

14. Yang M.-Y. Blue light induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide on lethality of HeLa cells / Yang M.-Y., Chang C.-J., Chen L.-Y. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – 2017. – T. 173 – C. 325–332.

15. Ohara M. Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin / Ohara M., Fujikura T., Fujiwara H. // International journal of oncology – 2003. – T. 22 – № 6 – C.1291–1295.

16. B. Entsch. Flavins / B. Entsch., D.P. Ballou // Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition) - 2013 - C. 309 - 313.

17. Thakur K. Riboflavin and health: A review of recent human research / Thakur K., Tomar S.K., Singh A.K., Mandal S., Arora S. // Critical Reviews in Food Science and Nutrition – 2017. – T. 57 – № 17 – C. 3650–3660.

18. Combs G.F. Riboflavin / Combs G.F. // The Vitamins - 2017. – C. 315–329.

19. Holzer W. Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution / Holzer W., Shirdel J., Zirak P., Penzkofer A., Hegemann P., Deutzmann R., Hochmuth E. // Chemical Physics – 2005. – T. 308 – № 1–2 – C. 69–78.

20. Ashoori M. Riboflavin (vitamin B 2) and oxidative stress: a review / Ashoori M., Saedisomeolia A. // Br J Nutr. - 2019 - T. 111 - № 11 - C. 1985-1991.

21. Agostinis P. Photodynamic therapy of cancer: an update / 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. // *CA: a cancer journal for clinicians* – 2011. – T. 61 – № 4 – C.250-255.

22. Ash C. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods / Ash C., Dubec M., Donne K., Bashford T. // *Lasers in Medical Science* – 2017. – T. 32 – № 8 – C. 1909–1918.

23. Uzdensky A.B. The biophysical aspects of photodynamic therapy / Uzdensky A.B. // *Biophysics (Russian Federation)* – 2016. – T. 61 – № 3 – C. 461–469.

24. Santos A.F. Dos Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review / Santos A.F. Dos, Almeida D.R.Q. De, Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* – 2019. – T. 2019.

25. Kurohane K. Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels / Kurohane K., Tominaga A., Sato K., North J.R., Namba Y., Oku N. // *Cancer Letters* – 2001. – T. 167 – № 1 – C. 49–56.

26. Allison R.R. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms / Allison R.R., Moghissi K. // *Clinical Endoscopy* – 2013. – T. 46 – № 1 – C. 24–29.

27. Dougherty T.J. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors / Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A. // *Cancer Research* – 1978. – T. 38 – № 8 – C. 2628–2635.

28. Dolmans D.E.J.G.J. Photodynamic therapy for cancer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003.– T. 3. – № 5. –C. 380–387.

29. Allison R.R. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review / Allison R.R., Sibata C.H. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2010. – T.7 – № 2 – C.61–75.

30. Chen B. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: Effects, mechanism, and therapeutic implications / Chen B., Pogue B.W., Luna J.M., Hardman R.L., Hoopes P.J., Hasan T. // *Clinical Cancer Research* – 2006.–T.12– № 3 – C. 917–923.

31. Garg A.D. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: An emerging amalgamation // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* – 2010. – T. 1805 – № 1 – C. 53–71.

32. Ascencio M. Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching is a useful tool to predict the response of rat ovarian cancer following hexaminolevulinate photodynamic therapy / Ascencio M., Collinet P., Farine M.O., Mordon S. // *Lasers in Surgery and Medicine* – 2008. – T. 40 – № 5 – C. 332–341.

33. Santos A.F. Dos Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review / Santos A.F. Dos, Almeida D.R.Q. De, Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* – 2019. – T. 2019.

34. Peng Q. Effects of Photodynamic Therapy on Tumor Stroma / Peng Q., Nesland J.M. // *Ultrastructural Pathology* – 2004. – T. 28 – № 5–6 – C. 333–340.

35. Molckovsky A. Monitoring of cell and tissue responses to photodynamic therapy by electrical impedance spectroscopy / Molckovsky A., Wilson B.C. // *Physics in Medicine and Biology* – 2001. – T. 46 – № 4 – C. 983–1002.

36. Agostinis P. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. / Agostinis P., Buytaert E., Breysens H., Hendrickx N. // *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* – 2004. – T. 3 – № 8 – C. 721–729.

37. Mroz P. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. / Mroz P., Yaroslavsky A., Kharkwal G.B., Hamblin M.R. // *Cancers* – 2011. – T. 3 – № 2 – C. 2516–2539.

38. Bacellar I.O.L. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. / Bacellar I.O.L., Tsubone T.M., Pavani C., Baptista M.S. // *International journal of molecular sciences* – 2015. – T. 16 – № 9 – C. 20523–20559.

39. Kessel D. Death pathways associated with photodynamic therapy / Kessel D. // *Medical Laser Application* – 2006. – T. 21 – № 4 – C. 219–224.

40. Mroz P. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy // *Expert Rev. Clin. Immunol.* – 2011. – T. 7. – № 1. – C. 75–91.

41. Wilson B.C. Photodynamic Therapy for Cancer: Principles / Wilson B.C. // *Canadian Journal of Gastroenterology* – 2002. – T. 16 – № 6 – C. 393–396.

42. Frochot C. Update of the situation of clinical photodynamic therapy in Europe in the 2003-2018 period / Frochot C., Mordon S. // *Journal of Porphyrins and*

Phthalocyanines – 2019. – T. 23 – № 4–5 – C. 347–357.

43. Plaetzer K. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects // *Lasers Med. Sci.* – 2009. – T. 24. – № 2. – C. 259–268.

44. Kwiatkowski S. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – T. 106. – C. 1098–1107.

45. Baptista M.S. Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways // *Photochem. Photobiol.* – 2017. – T. 93. – № 4. – C. 912–919.

46. Juzeniene A. Biophysical aspects of photodynamic therapy. / Juzeniene A., Nielsen K.P., Moan J. // *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology* : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer – 2006. – T. 25 – № 1–2 – C. 7–28.

47. Bergamini C. Oxygen, Reactive Oxygen Species and Tissue Damage / Bergamini C., Gambetti S., Dondi A., Cervellati C. // *Current Pharmaceutical Design* – 2005. – T. 10 – № 14 – C. 1611–1626.

48. Zhou Z. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. / Zhou Z., Song J., Nie L., Chen X. // *Chemical Society reviews* – 2016. – T. 45 – № 23 – C. 6597–6626.

49. Moloney J.N. ROS signalling in the biology of cancer / Moloney J.N., Cotter T.G. // *Seminars in Cell & Developmental Biology* – 2018. – T. 80 – C. 50–64.

50. Wilson B.C. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy // *Phys. Med. Biol.* – 2008. – T. 53. – № 9.

51. Allison R.R. Future of oncologic photodynamic therapy. // *Future Oncol.* – 2010. – T. 6. – № 6. – C. 929–940.

52. Abrahamse H. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem. J.* – 2016. – T. 473. – № 4. – C. 347–364.

53. Chan W.M. Verteporfin PDT for non-standard indications-a review of current literature // *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2010. – T. 248. – № 5. – C. 613–626.

54. Rosa F.S. De Photodynamic therapy of skin cancers: Sensitizers, clinical studies and future directives // *Pharm. Res.* – 2000. – T. 17. – № 12. – C. 1447–1455.

55. Kataoka H. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers / Kataoka H., Nishie H., Hayashi N., Tanaka M., Nomoto A., Yano S., Joh T. // *Annals of Translational Medicine* – 2017. – T. 5 – № 8.

56. Shafirstein G. Photodynamic therapy with 3-(1'-hexyloxyethyl) pyropheophorbide-a for early-stage cancer of the larynx: Phase Ib study / Shafirstein G., Rigual N.R., Arshad H., Cooper M.T., Bellnier D.A., Wilding G., Tan W., Merzianu M., Henderson B.W. // *Head and Neck* – 2016. – T. 38 – № 1 – C. 377–383.

57. Azzouzi A.R. Vascular-targeted photodynamic therapy with **TOOKAD**® Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure / Azzouzi A.R., Lebdaï S., Benzaghrou F., Stief C. // *World Journal of Urology* – 2015 – T. 33 – № 7 – C. 937–944.

58. Huang Y.Y. In vitro photodynamic therapy and quantitative structure-activity relationship studies with stable synthetic near-infrared-absorbing bacteriochlorin photosensitizers / Huang Y.Y., Mroz P., Zhiyentayev T., Sharma S.K., Balasubramanian T., Ruzié C., Kraymer M., Fan D., Borbas K.E., Yang E., Kee H.L., Kirmaier C., Diers J.R., Bocian D.F., Holten D., Lindsey J.S., Hamblin M.R. // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2010. – T. 53 – № 10 – C. 4018–4027.

59. Soriano J. Vehiculization determines the endocytic internalization mechanism of Zn(II)-phthalocyanine / Soriano J., Villanueva A., Stockert J.C., Cañete M. // *Histochemistry and Cell Biology* – 2013. – T. 139 – № 1 – C. 149–160.

60. Stern S.J. Photodynamic therapy with chloroaluminum sulfonated phthalocyanine in the rat window chamber / Stern S.J., Flock S.T., Small S., Thomsen S., Jacques S. // *The American Journal of Surgery* – 1990. – T. 160 – № 4 – C. 360–364.

61. Anderson C.Y. A Comparative Analysis of Silicon Phthalocyanine Photosensitizers for in vivo Photodynamic Therapy of RIF-1 Tumors in C3H Mice / Anderson C.Y., Freye K., Tubesing K.A., Li Y.S., Kenney M.E., Mukhtar H., Elmets C.A. // *Photochemistry and Photobiology* – 1998. – T. 67 – № 3 – C. 332–336.

62. Wainwright M. Methylene Blue - A therapeutic dye for all seasons? // *J. Chemother.* – 2002. – T. 14. – № 5. – C. 431–443.

63. Jajarm H.H. A comparative study of toluidine blue-mediated photodynamic therapy versus topical corticosteroids in the treatment of erosive-atrophic oral lichen planus: a randomized clinical controlled trial / Jajarm H.H., Falaki F., Sanatkhani M., Ahmadzadeh M., Ahrari F., Shafae H. // *Lasers in Medical Science* – 2015. – T. 30 – № 5 – C. 1475–1480.

64. Morley S. Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: A new approach to antimicrobial therapy / Morley S., Griffiths J., Philips G., Moseley H., O'Grady C., Mellish K., Lankester C.L., Faris B., Young R.J., Brown S.B., Rhodes L.E. // *British Journal of Dermatology* – 2013. – T. 168 – № 3 – C. 617–624.

65. Cincotta L. Novel photodynamic effects of a benzophenothiazine on two different murine sarcomas. / Cincotta L., Foley J.W., MacEachern T., Lampros E., Cincotta A.H. // *Cancer research* – 1994. – T. 54 – № 5 – C. 1249–1258.

66. Ali M.F.M. Topical delivery and photodynamic evaluation of a multivesicular liposomal Rose Bengal / Ali M.F.M. // *Lasers in Medical Science* – 2011. – T. 26 – № 2 – C. 267–275.

67. Shafeekh K.M. Synthesis and characterization of near-infrared absorbing water soluble squaraines and study of their photodynamic effects in DLA live cells / Shafeekh K.M., Soumya M.S., Rahim M.A., Abraham A., Das S. // *Photochemistry and Photobiology* – 2014. – T. 90 – № 3 – C. 585–595.

68. Rice D.R. Bacterial imaging and photodynamic inactivation using zinc(ii)-dipicolylamine BODIPY conjugates / Rice D.R., Gan H., Smith B.D. // *Photochemical and Photobiological Sciences* – 2015. – T. 14 – № 7 – C. 1271–1281.

69. Carpenter B.L. Antiviral, antifungal and antibacterial activities of a BODIPY-based photosensitizer / Carpenter B.L., Situ X., Scholle F., Bartelmess J., Weare W.W., Ghiladi R.A. // *Molecules* – 2015. – T. 20 – № 6 – C. 10604–10621.

70. Lei W. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by Ru(ii) complexes / Lei W., Zhou Q., Jiang G., Zhang B., Wang X. // *Photochemical and Photobiological*

Sciences – 2011. – T. 10 – № 6 – C. 887–890.

71. Knoll J.D. Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy // *Coord. Chem. Rev.* – 2015. – T. 282–283. – C. 110–126.

72. Theodossiou T.A. The multifaceted photocytotoxic profile of hypericin // *Mol. Pharm.* – 2009. – T. 6. – № 6. – C. 1775–1789.

73. Zhenjun D. Hypocrellins and their use in photosensitization // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – T. 52. – № 3. – C. 609–616.

74. Maisch T. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives / Maisch T., Eichner A., Späth A., Gollmer A., König B., Regensburger J., Bäuml W. // *PLoS ONE* – 2014. – T. 9 – № 12.

75. Tonon C.C. Comparative effects of photodynamic therapy mediated by curcumin on standard and clinical isolate of *Streptococcus mutans* / Tonon C.C., Paschoal M.A. uréli., Correia M., Spolidório D.M.P., Bagnato V.S., Giusti J.S.M., Santos-Pinto L. // *The journal of contemporary dental practice* – 2015. – T. 16 – № 1 – C. 1–6.

76. Broekgaarden M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies // *Cancer Metastasis Rev.* – 2015. – T. 34. – № 4. – C. 643–690.

77. Kim Y. Role of extracellular matrix and microenvironment in regulation of tumor growth and LAR-mediated invasion in glioblastoma / Kim Y., Kang H., Powathil G., Kim H., Trucu D., Lee W., Lawler S., Chaplain M. // *PLoS ONE* – 2018. – T. 13 – № 10.

78. Sakharov D. V. Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591 / Sakharov D. V., Elstak E.D.R., Chernyak B., Wirtz K.W.A. // *FEBS Letters* – 2005. – T. 579 – № 5 – C.1255–1260.

79. Szokalska A. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response / Szokalska A., Makowski M., Nowis D., Wilczyński G.M.,

Kujawa M., Wójcik C., Młynarczuk-Biały I., Salwa P., Bil J., Janowska S., Agostinis P., Verfaillie T., Bugajski M., Gietka J., Issat T., Głodkowska E., Mrówka P., Stokłosa T., Hamblin M.R., Mróz P., Jakóbisiak M., Golab J. // *Cancer Research* – 2009. – T. 69 – №10 – C. 4235–4243.

80. Chiou J.F. Verteporfin-photoinduced apoptosis in HepG2 cells mediated by reactive oxygen and nitrogen species intermediates / Chiou J.F., Wang Y.H., Jou M.J., Liu T.Z., Shiau C.Y. // *Free Radical Research* – 2010. – T. 44 – № 2 – C. 155–170.

81. Cadet J. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: Mechanistic aspects and formation in cells / Cadet J., Douki T., Ravanat J.L. // *Accounts of Chemical Research* – 2008. – T. 41 – № 8 – C. 1075–1083.

82. Trachootham D. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? / Trachootham D., Alexandre J., Huang P. // *Nature Reviews Drug Discovery* – 2009. – T. 8 – № 7 – C. 579–591.

83. Pelicano H. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications / Pelicano H., Carney D., Huang P. // *Drug Resistance Updates* – 2004. – T. 7 – № 2 – C. 97–110.

84. Kalluru P. Photosensitization of singlet oxygen and in vivo photodynamic therapeutic effects mediated by PEGylated W18O49 nanowires / Kalluru P., Vankayala R., Chiang C.S., Hwang K.C. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2013. – T. 52 – № 47 – C. 12332–12336.

85. Liou G.-Y. Reactive oxygen species in cancer. / Liou G.-Y., Storz P. // *Free radical research* – 2010. – T. 44 – № 5 – C. 479–96.

86. Stadtman E.R. Protein oxidation and aging / Stadtman E.R. // *Free Radical Research* – 2006. – T. 40 – № 12 – C. 1250–1258.

87. Berlien H.P. Photodynamic Therapy (PDT) / Berlien H.P. // *Journal of Biophotonics* – 2016. – T. 9 – № 11–12 – C. 1300–1301.

88. Straten D. van Oncologic photodynamic therapy: Basic principles, current clinical status and future directions // *Cancers (Basel)*. – 2017. – T. 9. – № 2.

89. Rustin P. Mitochondria, from cell death to proliferation // *Nat. Genet.* – 2002. – T. 30. – № 4. – C. 352–353.

90. Perfettini J.L. Caspase activation is not death // *Nat. Immunol.* – 2003. – T. 4. – № 4. – C. 308–310.
91. Gougeon M.L. Charming to death: Caspase-dependent or -independent / Gougeon M.L. // *Nature* - 2003 – T. 3 - № 2 - C. 390–392.
92. Rathmell J.C. The central effectors of cell death in the immune system / Rathmell J.C., Thompson C.B. // *Annual Review of Immunology* – 1999. – T. 17 – № 1 – C.781–828.
93. Okada H. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – T. 4. – № 8. – C. 592–603.
94. Igney F.H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – T. 2. – № 4. – C. 277–288c.
95. Oleinick N.L. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – T. 1. – № 1. – C. 1–21.
96. Shen X. Alterations in mitochondrial and apoptosis regulating gene expression in photodynamic therapy resistant variants of HT29 colon carcinoma cells / Shen X., Zacal N., Singh G., Rainbow A.J. // *Photochemistry and Photobiology* – 2004 – T. 81 – № 2.
97. Karmakar S. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma U87MG cells / Karmakar S., Banik N.L., Patel S.J., Ray S.K. // *Neuroscience Letters* – 2007. – T. 415 – № 3 – C. 242–247.
98. Srivastava M. Involvement of Bcl-2 and Bax in Photodynamic Therapy-mediated Apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis / Srivastava M., Ahmad N., Gupta S., Mukhtar H. // *Journal of Biological Chemistry* – 2001. – T. 276 – № 18 – C. 15481–15488.
99. Usuda J. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: dependence on Bax / Jitsuo Usuda, Song-mao Chiu, Kashif Azizuddin, Liang-yan Xue, Minh Lam, Anna-Liisa Nieminen, Nancy L Oleinick // *Photochem Photobiol.* - 2002 - T. 76 - № 2 - C. 217 - 223.

100. Mathew R. Role of autophagy in cancer / Mathew R. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2007. – T. 7. – № 12. – С. 961–967.

101. Galluzzi L. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / Lorenzo Galluzzi, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, Lucia Altucci, Ivano Amelio, David W. Andrews, Margherita Annicchiarico-Petruzzelli, Alexey V. Antonov, Eli Arama, Eric H. Baehrecke, Nickolai A. Barlev, Nicolas G. Bazan, Francesca Bernassola, Mathieu J. M. Bertrand, Katiuscia Bianchi, Mikhail V. Blagosklonny, Klas Blomgren, Christoph Borner, Patricia Boya, Catherine Brenner, Michelangelo Campanella, Eleonora Candi, Didac Carmona-Gutierrez, Francesco Cecconi, Francis K.-M. Chan, Navdeep S. Chandel, Emily H. Cheng, Jerry E. Chipuk, John A. Cidlowski, Aaron Ciechanover, Gerald M. Cohen, Marcus Conrad, Juan R. Cubillos-Ruiz, Peter E. Czabotar, Vincenzo D'Angiolella, Ted M. Dawson, Valina L. Dawson, Vincenzo De Laurenzi, Ruggero De Maria, Klaus-Michael Debatin, Ralph J. DeBerardinis, Mohanish Deshmukh, Nicola Di Daniele, Francesco Di Virgilio, Vishva M. Dixit, Scott J. Dixon, Colin S. Duckett, Brian D. Dynlacht, Wafik S. El-Deiry, John W. Elrod, Gian Maria Fimia, Simone Fulda, Ana J. García-Sáez, Abhishek D. Garg, Carmen Garrido, Evripidis Gavathiotis, Pierre Golstein, Eyal Gottlieb, Douglas R. Green, Lloyd A. Greene, Hinrich Gronemeyer, Atan Gross, Gyorgy Hajnoczky, J. Marie Hardwick, Isaac S. Harris, Michael O. Hengartner, Claudio Hetz, Hidenori Ichijo, Marja Jäättelä, Bertrand Joseph, Philipp J. Jost, Philippe P. Juin, William J. Kaiser, Michael Karin, Thomas Kaufmann, Oliver Kepp, Adi Kimchi, Richard N. Kitsis, Daniel J. Klionsky, Richard A. Knight, Sharad Kumar, Sam W. Lee, John J. Lemasters, Beth Levine, Andreas Linkermann, Stuart A. Lipton, Richard A. Lockshin, Carlos López-Otín, Scott W. Lowe, Tom Luedde, Enrico Lugli, Marion MacFarlane, Frank Madeo, Michal Malewicz, Walter Malorni, Gwenola Manic, Jean-Christophe Marine, Seamus J. Martin, Jean-Claude Martinou, Jan Paul Medema, Patrick Mehlen, Pascal Meier, Sonia Melino, Edward A. Miao, Jeffery D. Molkentin, Ute M. Moll, Cristina Muñoz-Pinedo, Shigekazu Nagata, Gabriel Nuñez, Andrew Oberst, Moshe Oren, Michael Overholtzer, Michele Pagano, Theocharis Panaretakis, Manolis Pasparakis, Josef M. Penninger,

David M. Pereira, Shazib Pervaiz, Marcus E. Peter, Mauro Piacentini, Paolo Pinton, Jochen H.M. Prehn, Hamsa Puthalakath, Gabriel A. Rabinovich, Markus Rehm, Rosario Rizzuto, Cecilia M.P. Rodrigues, David C. Rubinsztein, Thomas Rudel, Kevin M. Ryan, Emre Sayan, Luca Scorrano, Feng Shao, Yufang Shi, John Silke, Hans-Uwe Simon, Antonella Sistigu, Brent R. Stockwell, Andreas Strasser, Gyorgy Szabadkai, Stephen W.G. Tait, Daolin Tang, Nektarios Tavernarakis, Andrew Thorburn, Yoshihide Tsujimoto, Boris Turk, Tom Vanden Berghe, Peter Vandenabeele, Matthew G. Vander Heiden, Andreas Villunger, Herbert W. Virgin, Karen H. Vousden, Domagoj Vucic, Erwin F. Wagner, Henning Walczak, David Wallach, Ying Wang, James A. Wells, Will Wood, Junying Yuan, Zahra Zakeri, Boris Zhivotovsky, Laurence Zitvogel, Gerry Melino & Guido Kroemer // *Cell Death Differ.* – 2018. – T. 25. – № 3. – C. 486–541.

102. Kroemer G. Lysosomes and autophagy in cell death control / Kroemer G. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – T. 5. – № 11. – C. 886–897.

103. Bjornsti M.A. The TOR pathway: A target for cancer therapy / Bjornsti M.A. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2004. – T. 4. – № 5. – C. 335–348.

104. Kondo Y. The role of autophagy in cancer development and response to therapy // *Nat. Rev. Cancer.* – 2005. – T. 5. – № 9. – C. 726–734.

105. Maiuri M.C. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome / Maiuri M.C. // *EMBO J.* – 2010. – T. 29. – № 3. – C. 515–516.

106. Kessel D. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy / Kessel D., Vicente M.G.H., Reiners J.J. // *Lasers in Surgery and Medicine* – 2006. – T. 38– № 5 – C. 482–488.

107. Reiners J.J. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy / Reiners J.J. // *Autophagy.* – 2010. – T. 6. – № 1. – C. 7–18.

108. Scherz-Shouval R. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 / Scherz-Shouval R., Shvets E., Fass E., Shorer H., Gil L., Elazar Z. // *EMBO Journal* – 2007. – T. 26 – № 7 – C. 1749–1760.

109. Sasnauskiene A. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior / Sasnauskiene A., Kadziauskas J., Vezelyte N., Jonusiene V., Kirvelienu V. // *Apoptosis* – 2009. – T. 14 – № 3 – C. 276–286.

110. Scherz-Shouval R. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy / Scherz-Shouval R., Elazar Z. // *Trends in Cell Biology* – 2007 – T. 17 – № 9 – C. 422–427.

111. Kessel D. Initiation of Autophagy by Photodynamic Therapy // *Methods Enzymol.* – 2009. – T. 453. – № C. – C. 1–16.

112. Kessel D. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage / Kessel D. // *NIH Public Access* - 2007 – T. 2 - № 1 - C. 1290–1295.

113. Kessel D. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage / Kessel D. // *NIH Public Access* - 2007. – T. 2 - № 1 - C. 1024–1028.

114. Criollo A. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor / Criollo A., Maiuri M.C., Tasdemir E., Vitale I., Fiebig A.A., Andrews D., Molgó J., Díaz J., Lavandero S., Harper F., Pierron G., Stefano D. di, Rizzuto R., Szabadkai G., Kroemer G. // *Cell Death and Differentiation* – 2007. – T. 14 – № 5 – C. 1029–1039.

115. Criollo A. The inositol trisphosphate receptor in the control of autophagy / Criollo A., Vicencio J.M., Tasdemir E., Maiuri M.C., Lavandero S., Kroemer G. // *Autophagy* – 2007. – T. 3 – № 4 – C. 350–353.

116. Xue L.Y. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: Apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy // *Photochem Photobiol* - 2007 – T. 1 - № 2 - C. 1016–1023.

117. Weyergang A. Photodynamic therapy targets the mTOR signaling network in Vitro and in Vivo / Weyergang A., Berg K., Kaalhus O., Peng Q., Selbo P.K. // *Molecular Pharmaceutics* – 2009. – T. 6 – № 1 – C. 255–264.

118. Moan J. Intracellular Localization of Photosensitizers / Moan J. / *Ciba Found Symp.* - 2007. – T.3 - №1 - C. 95–111.

119. Danial N.N. Cell Death: Critical Control Points // *Cell.* – 2004. – T. 116. – № 2. – C. 205–219.

120. Proskuryakov S. Mechanisms of Tumor Cell Necrosis / Proskuryakov S., Gabai V. // *Current Pharmaceutical Design* – 2009. – T. 16 – № 1 – C. 56–68.

121. Kessel D. Sites of Photodamage Induced by Photodynamic Therapy With a Chlorin e6 Triacetoxymethyl Ester (CAME) / Kessel D., R D Poretz // *Photochemistry and photobiology* – 2000. – T. 71 – № 1.

122. Lavie G. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthone and hypericin in leukaemic cells: Possible relevance to photodynamic therapy / Lavie G., Kaplinsky C., Toren A., Aizman I., Meruelo D., Mazur Y., Mandel M. // *British Journal of Cancer* – 1999. – T. 79 – № 3–4 – C. 423–432.

123. Dahle J. The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density. / Dahle J., Steen H.B., Moan J. // *Photochemistry and photobiology* – 1999 – T. 70 – № 3 – C. 363–367.

124. Kliukiene R. The protective effects of dihydrolipoamide and glutathione against photodynamic damage by A1-phtalocyanine tetrasulfonate / Kliukiene R., Maroziene A., Nivinskas H., Čenas N., Kirveliėne V., Juodka B. // *Biochemistry and Molecular Biology International* – 1997. – T. 41 – № 4 – C. 707–713.

125. Dolgachev V. A role for manganese superoxide dismutase in apoptosis after photosensitization / Dolgachev V., Oberley L.W., Huang T.T., Kraniak J.M., Tainisky M.A., Hanada K., Separovic D. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2005. – T. 332 – № 2 – C. 411–417.

126. Oberdanner C.B. Photodynamic treatment with fractionated light decreases production of reactive oxygen species and cytotoxicity in vitro via regeneration of glutathione. / Oberdanner C.B., Plaetzer K., Kiesslich T., Krammer B. // *Photochemistry and photobiology* – T. 81 – № 3 – C. 609–613.

127. Lucena S.R. Characterisation of resistance mechanisms developed by basal cell carcinoma cells in response to repeated cycles of Photodynamic Therapy / Lucena S.R., Zamarrón A., Carrasco E., Marigil M.A., Mascaraque M., Fernández-Guarino M., Gilaberte Y., González S., Juarranz A. // *Scientific Reports* – 2019. – T. 9 – № 1 – C. 1–15.

128. Shackley D.C. Comparison of the cellular molecular stress responses after treatments used in bladder cancer / Shackley D.C., Haylett A., Whitehurst C., Betts

C.D., O'Flynn K., Clarke N.W., Moore J. V. // *BJU International* – 2002. – T. 90 – № 9 – C. 924–932.

129. Luna M.C. Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. / Luna M.C., Gomer C.J. // *Cancer research* – 1991. – T. 51 – № 16 – C. 4243–4249.

130. Morgan J. Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative. / Morgan J., Potter W.R., Oseroff A.R. // *Photochemistry and photobiology* – 2000. – T. 71 – № 6 – C. 747–57.

131. Lin C.W. Lysosomal Localization and Mechanism of Uptake of Nile Blue Photosensitizers in Tumor Cells / Lin C.W., Shulok J.R., Kirley S.D., Cincotta L., Foley J.W., Lin C.W. // *Cancer Research* – 1991. – T. 51 – № 10 – C. 2710–2719.

132. Hillegersberg R. Van Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats / Hillegersberg R. Van, Berg J.W.O. Van Den, Kort W.J., Terpstra O.T., Wilson J.H.P. // *Gastroenterology* – 1992. – T. 103 – № 2 – C. 647–651.

133. Hanahan D. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis // *Cell*. – 1996. – T. 86. – № 3. – C. 353–364.

134. Al-Husein B. Antiangiogenic therapy for cancer: An update // *Pharmacotherapy*. – 2012. – T. 32. – № 12. – C. 1095–1111.

135. Fingar V.H. Vascular effects of photodynamic therapy. / Fingar V.H. // *Journal of clinical laser medicine & surgery* – 1996. – T. 14 – № 5 – C. 323–328.

136. Ben-Hur E. Release of clotting factors from photosensitized endothelial cells: A possible trigger for blood vessel occlusion by photodynamic therapy / Ben-Hur E., Heldman E., Crane S.W., Rosenthal I. // *FEBS Letters* – 1988. – T. 236 – № 1 – C.105–108.

137. Nelson J.S. Tumor destruction in photodynamic therapy / Nelson J.S., Liaw L.H, Berns M.W. // *Photochemistry and Photobiology* – 1987. – T. 46 – № 5 – C. 829 – 836.

138. Fingar V.H. The Effects of Thrombocytopenia on Vessel Stasis and Macromolecular Leakage after Photodynamic Therapy Using Photofrin / Fingar V.H.,

Wieman T.J., Haydon P.S. // *Photochemistry and Photobiology* – 1997. – T. 66 – № 4 – C. 513–517.

139. Chen B. Combining vascular and cellular targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy / Chen B., Pogue B.W., Hoopes P.J., Hasan T. // *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* – 2005. – T. 61 – № 4 – C. 1216–1226.

140. Krzykawska-Serda M. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy / Krzykawska-Serda M., Dąbrowski J.M., Arnaut L.G., Szczygieł M., Urbańska K., Stochel G., Elas M. // *Free Radical Biology and Medicine* – 2014. – T. 73 – C. 239–251.

141. Shams M. Development of photodynamic therapy regimens that control primary tumor growth and inhibit secondary disease. / Shams M., Owczarczak B., Manderscheid-Kern P., Bellnier D.A., Gollnick S.O. // *Cancer immunology, immunotherapy: CII* – 2015. – T. 64 – № 3 – C. 287–97.

142. Zhou J. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers // *J. Cell. Mol. Med.* – 2019. – T. 23. – № 8. – C. 4854–4865.

143. Garg A.D. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. / Garg A.D., Agostinis P. // *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* – 2014. – T. 13 – № 3 – C. 474–487.

144. No authors. Metabolism of riboflavin in rat and man / *Nutrition Reviews* – 1984. – T. 42 – № 8 – C. 294–296.

145. Massey V. The chemical and biological versatility of riboflavin / Massey V. // *Portland Press Ltd* - 2000. – T. 2 - № 1 - C. 283–296.

146. Pinto J.T. Riboflavin. / Pinto J.T., Zempleni J. // *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* – 2016. – T. 7 – № 5 – C. 973–975.

147. Foy H. Riboflavin. / Foy H., Mbaya V. // *Progress in food & nutrition science* – 1977. – T. 2 – № 8 – C. 357–94.

148. Rivlin R.S. Riboflavin Metabolism // N. Engl. J. Med. – 1970. – T. 283. – № 9. – C. 463–472.

149. Rao P.N. Elevation of serum riboflavin carrier protein in breast cancer. / Rao P.N., Levine E., Myers M.O., Prakash V., Watson J., Stolier A., Kopicko J.J., Kissinger P., Raj S.G., Raj M.H. // Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology – 1999. – T. 8 – № 11 – C. 985–990.

150. Souza A.C.S. De A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death / Souza A.C.S. De, Kodach L., Gadelha F.R., Bos C.L., Cavagis A.D.M., Aoyama H., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V. // Apoptosis – 2006. – T. 11 – № 10 – C. 1761–1771.

151. Northrop-Clewes C.A. The discovery and characterization of riboflavin / Northrop-Clewes C.A. // Ann. Nutr. Metab. – 2012. – T. 61. – № 3. – C. 224–230.

152. Powers H.J. Riboflavin (vitamin B-2) and health / Powers H.J. // The American Journal of Clinical Nutrition – 2003. – T. 77 – № 6 – C. 1352–1360.

153. Rivlin R.S. Riboflavin and cancer: a review. / Rivlin R.S. // Cancer research – 1973. – T. 33 – № 9 – C. 1977–1986.

154. Singh S. Development and Characterization of the Paclitaxel loaded Riboflavin and Thiamine Conjugated Carbon Nanotubes for Cancer Treatment / Singh S., Mehra N.K., Jain N.K. // Pharmaceutical Research – 2016. – T. 33 – № 7 – C. 1769–1781.

155. Tsvetkova Y. Refinement of adsorptive coatings for fluorescent riboflavin-receptor-targeted iron oxide nanoparticles / Tsvetkova Y., Beztsinna N., Jayapaul J., Weiler M., Arns S., Shi Y., Lammers T., Kiessling F. // Contrast Media and Molecular Imaging – 2016. – T. 11 – № 1 – C. 47–54.

156. Sheraz M.A. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. / Sheraz M.A., Kazi S.H., Ahmed S., Anwar Z., Ahmad I. // Beilstein journal of organic chemistry – 2014. – T. 10 – C. 1999–2012.

157. Northrop-Clewes C.A. The discovery and characterization of riboflavin. / Northrop-Clewes C.A., Thurnham D.I. // Annals of nutrition & metabolism – 2012

– T. 61 – № 3 – C. 224–230.

158. Drössler P. Fluorescence quenching of riboflavin in aqueous solution by methionin and cystein / Drössler P., Holzer W., Penzkofer A., Hegemann P. // *Chemical Physics* – 2003. – T. 286 – № 2 – C. 409–420.

159. Baier J. Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers. / Baier J., Maisch T., Maier M., Engel E., Landthaler M., Bäuml W. // *Biophysical journal* – 2006. – T. 91 – № 4 – C. 1452–1459.

160. Yonezawa A. Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: Identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52 // *Mol. Aspects Med.* – 2013. – T. 34. – № 2 – C. 693–701.

161. Yamamoto S. Identification and functional characterization of rat riboflavin transporter 2. / Yamamoto S., Inoue K., Ohta K., Fukatsu R., Maeda J., Yoshida Y., Yuasa H. // *Journal of biochemistry* – 2009. – T. 145 – № 4 – C. 437–43.

162. Yao Y. Identification and Comparative Functional Characterization of a New Human Riboflavin Transporter hRFT3 Expressed in the Brain / Yao Y., Yonezawa A., Yoshimatsu H., Masuda S., Katsura T., Inui K. // *The Journal of Nutrition* – 2010 – T. 140 – № 7 – C. 1220–1226.

163. Jin C. Riboflavin transporters RFVT/SLC52A mediate translocation of riboflavin, rather than FMN or FAD, across Plasma Membrane / Jin C., Yao Y., Yonezawa A., Imai S., Yoshimatsu H., Otani Y., Omura T., Nakagawa S., Nakagawa T., Matsubara K. // *Biological and Pharmaceutical Bulletin* – 2017. – T. 40 – № 11 – C. 1990–1995.

164. Jiang X.R. RFT2 is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma and promotes tumorigenesis by sustaining cell proliferation and protecting against cell death / Jiang X.R., Yu X.Y., Fan J.H., Guo L., Zhu C., Jiang W., Lu S.H. // *Cancer Letters* – 2014. – T. 353 – № 1 – C. 78–86.

165. Fu T. Overexpression of riboflavin transporter 2 contributes toward progression and invasion of glioma / Fu T., Liu Y., Wang Q., Sun Z., Di H., Fan W., Liu M., Wang J. // *NeuroReport* – 2016. – T. 27 – № 15 – C. 1167–1173.

166. Bareford L.M. Riboflavin-targeted polymer conjugates for breast tumor delivery / Bareford L.M., Avaritt B.R., Ghandehari H., Nan A., Swaan P.W. // *Pharmaceutical Research* – 2013. – T. 30 – № 7 – C. 1799–1812.

167. Kumar C.K. Mechanism and regulation of riboflavin uptake by human renal proximal tubule epithelial cell line HK-2 / Kumar C.K., Yanagawa N., Ortiz A., Said H.M. // *American Journal of Physiology - Renal Physiology* – 1998. – T. 274 – № 1 – C. 43-51.

168. Thakur K. Riboflavin and health: A review of recent human research / Thakur K., Tomar S.K., Singh A.K., Mandal S., Arora S. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* – 2017. – T. 57 – № 17 – C. 3650–3660.

169. Mansoorabadi S.O. The diverse roles of flavin coenzymes - Nature's most versatile thespians // *J. Org. Chem.* – 2007. – T. 72. – № 17. –C. 6329–6342.

170. Udhayabanu T. Riboflavin Responsive Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases / Udhayabanu T., Manole A., Rajeshwari M., Varalakshmi P., Houlden H., Ashokkumar B. // *Journal of Clinical Medicine* – 2017. – T. 6 – № 5.

171. Ozsvari B. Targeting flavin-containing enzymes eliminates cancer stem cells (CSCs), by inhibiting mitochondrial respiration: Vitamin B2 (Riboflavin) in cancer therapy / Ozsvari B., Bonuccelli G., Sanchez-Alvarez R., Foster R., Sotgia F., Lisanti M.P. // *Aging* – 2017. – T. 9 – № 12 – C. 2610–2628.

172. Katsuhito Kino. Commentary on the Phototoxicity and Absorption of Vitamin B2 and Its Degradation Product, Lumichrome / Katsuhito Kino, Akira Nakatsuma, Hiromi Nochi, Yoshimitsu Kiriya, Takuro Kurita T.K. and H.M. // *Pharmaceutica Analytica Acta* – 2015. – T. 6 – № 8.

173. Huang R. Kinetics for Singlet Oxygen Formation by Riboflavin Photosensitization and the Reaction between Riboflavin and Singlet Oxygen / Huang R., Choe E., Min D.B. // *Journal of Food Science* – 2006. – T. 69 – № 9 – C. 726–732.

174. Ribeiro D.O. Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use. / Ribeiro D.O., Pinto D.C., Lima L.M.T.R., Volpato N.M., Cabral L.M., Sousa V.P. de // *Nutrition journal* – 2011. – T. 10 – C. 47- 62.

175. Stücker M. The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis / Stücker M., Struk A., Altmeyer P., Herde M., Baumgärtl H., Lübbers D.W. // *Journal of Physiology* – 2002. – T. 538 – № 3 – C. 985–994.

176. Schenkman K.A. Cardiac performance as a function of intracellular oxygen tension in buffer-perfused hearts / Schenkman K.A. // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* – 2001. – T. 281 – № 6 - C. 50 - 6.

177. Kino K. Photoirradiation products of flavin derivatives, and the effects of photooxidation on guanine / Kino K., Kobayashi T., Arima E., Komori R., Kobayashi T., Miyazawa H. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 2009. – T. 19 – № 7 – C. 2070–2074.

178. Ahmad I. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: A kinetic study / Ahmad I., Fasihullah Q., Noor A., Ansari I.A., Ali Q.N.M. // *International Journal of Pharmaceutics* – 2004. – T. 280 – № 1 – C. 199–208.

179. Huang R. Photosensitizing Effect of Riboflavin, Lumiflavin, and Lumichrome on the Generation of Volatiles in Soy Milk / Huang R., Kim H.J., Min D.B. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry* – 2006. – T. 54 – № 6 – C. 2359–2364.

180. A de L.R. Riboflavin Photodegradation and Photosensitizing Effects Are Highly Dependent on Oxygen and Ascorbate Concentrations / A. de La Rochette, E. Silva, I. Birlouez-Aragon, M. Mancini, A. M. Edwards, P. Morlière // *Photochemistry and photobiology* – 2000. – T. 72 – № 6.

181. Ahmad I. Solvent Effect on the Photolysis of Riboflavin / Ahmad I., Anwar Z., Ahmed S., Sheraz M.A., Bano R., Hafeez A. // *AAPS PharmSciTech* – 2015. – T. 16 – № 5 – C. 1122–1128.

182. Cardoso D.R. Mechanism of deactivation of triplet-excited riboflavin by ascorbate, carotenoids, and tocopherols in homogeneous and heterogeneous aqueous food model systems / Cardoso D.R., Olsen K., Skibsted L.H. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry* – 2007. – T. 55 – № 15 – C. 6285–6291.

183. Zhao Y. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor / Zhao Y., Adjei A.A. // *The Oncologist* – 2015 – T. 20 – № 6 – C. 660–673.

184. Souza Queiroz K.C. de A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours / Souza Queiroz K.C. de, Zambuzzi W.F., Santos de Souza A.C., Silva R.A. da, Machado D., Justo G.Z., Carvalho H.F., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V. // *Cancer Letters* – 2007. – T. 258 – № 1 – C. 126–134.

185. Chaves Neto A.H. Antitumor activity of irradiated riboflavin on human renal carcinoma cell line 786-O / Chaves Neto A.H., Pelizzaro-Rocha K.J., Fernandes M.N., Ferreira-Halder C.V. // *Tumor Biology* – 2015. – T. 36 – № 2 – C. 595–604.

186. Salman M. Riboflavin as adjuvant with cisplatin: study in mouse skin cancer model. / Salman M., Naseem I. // *Frontiers in bioscience (Elite edition)* – 2015. – T. 7 – C. 242–54.

187. Machado D. Irradiated Riboflavin Diminishes the Aggressiveness of Melanoma In Vitro and In Vivo / Machado D., Shishido S.M., Queiroz K.C.S., Oliveira D.N., Faria A.L.C., Catharino R.R., Spek C.A., Ferreira C. V. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 1 – C. 54269 - 54285.

188. Hu J. Nanocomposite-Based Photodynamic Therapy Strategies for Deep Tumor Treatment / Hu J., Tang Y., Elmenoufy A.H., Xu H., Cheng Z., Yang X. // *Small* – 2015. – T. 11 – № 44 – C. 5860–5887.

189. Smith A.M. Bioimaging: second window for in vivo imaging. / Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. // *Nature nanotechnology* – 2009. – T. 4 – № 11 – C.710–721.

190. Heiden M.G. Vander Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2011. – T. 10. – № 9. – C. 671–684.

191. Auzel F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids // *Chem. Rev.* – 2004. – T. 104. – № 1. – C. 139–173.

192. Wang F. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals // *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – T. 38. – № 4. – C. 976–989.

193. Haase M. Upconverting nanoparticles // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2011 – T. 50. – № 26. – C. 5808–5829.

194. Wang M. Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. / Wang M., Abbineni G., Clevenger A., Mao C., Xu S. // *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* – 2011. – T. 7 – № 6 – C. 710–729.

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

196. Nadort A. Quantitative Imaging of Single Upconversion Nanoparticles in Biological Tissue / Nadort A., Sreenivasan V.K.A., Song Z., Grebenik E.A., Nechaev A. V., Semchishen V.A., Panchenko V.Y., Zvyagin A. V. // *PLoS ONE* – 2013. – T. 8 – № 5 – C. 63292.

197. Guller A.E. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells / Guller A.E., Generalova A.N., Petersen E. V., Nechaev A. V., Trusova I.A., Landyshev N.N., Nadort A., Grebenik E.A., Deyev S.M., Shekhter A.B., Zvyagin A. V. // *Nano Research* – 2015. – T. 8 – № 5 – C. 1546–1562.

198. Sahay G. Endocytosis of nanomedicines // *J. Control. Release.* – 2010 – T. 145. – № 3. – C. 182–195.

199. Treuel L. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles // *J. R. Soc. Interface.* – 2013. – T. 10. – № 82.

200. Jin J. Polymer-coated NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ upconversion nanoparticles for charge-dependent cellular imaging / Jin J., Gu Y.J., Man C.W.Y., Cheng J., Xu Z., Zhang Y., Wang H., Lee V.H.Y., Cheng S.H., Wong W.T. // *ACS Nano* – 2011. – T. 5 – № 10 – C. 7838–7847.

201. Kim K. Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy. / Kim K., Choi H., Choi E.S., Park M.-H., Ryu J.-H. // *Pharmaceutics* – 2019

– T. 11 – № 7.

202. Tsvetkova Y. Balancing Passive and Active Targeting to Different Tumor Compartments Using Riboflavin-Functionalized Polymeric Nanocarriers / Tsvetkova Y., Beztsinna N., Baues M., Klein D., Rix A., Golombek S.K., Rawashdeh W. Al, Gremse F., Barz M., Koynov K., Banala S., Lederle W., Lammers T., Kiessling F. // *Nano Letters* – 2017. – T. 17 – № 8 – C. 4665–4674.

203. Qiu H. Recent progress in upconversion photodynamic therapy // *Nanomaterials*. – 2018. – T. 8. – № 5.

204. Gnach A. Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity // *Chem. Soc. Rev.* – 2015. – T. 44. – № 6.

205. Dou Q.Q. Core-shell upconversion nanoparticle - semiconductor heterostructures for photodynamic therapy. / Dou Q.Q., Rengaramchandran A., Selvan S.T., Paulmurugan R., Zhang Y. // *Scientific reports* – 2015. – T. 5 – C. 8252.

206. Kobayashi H. Super enhanced permeability and retention (SUPR) effects in tumors following near infrared photoimmunotherapy // *Nanoscale*. – 2016. – T. 8. – № 25. – C. 12504–12509.

207. Golombek S.K. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2018. – T. 130. – C. 17–38.

208. Maeda H. The link between infection and cancer: Tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect // *Cancer Sci.* – 2013. – T. 104 – № 7. – C. 779–789.

209. Kobayashi H. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target? // *Theranostics*. – 2014. – T. 4. – № 1 – C. 81–89.

210. Parker N.N. *The Microenvironment in Cancer* // John Wiley and Sons – 2010 – T. 15 – № 5 – C. 1–6.

211. Nagy J.A. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? // *Br. J. Cancer*. – 2009. – T. 100. – № 6. – C. 865–869.

212. Dudley A.C. *Tumor endothelial cells* / Dudley A.C. // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine – 2012. – T. 2 – № 3.

213. Vakoc B.J. Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging / Vakoc B.J., Lanning R.M., Tyrrell J.A., Padera T.P., Bartlett L.A., Stylianopoulos T., Munn L.L., Tearney G.J., Fukumura D., Jain R.K., Bouma B.E. // *Nature Medicine* – 2009. – T. 15 – № 10 – C. 1219–1223.

214. Moens S. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2014. – T. 25. – № 4 – C. 473–482.

215. Padera T.P. Cancer cells compress intratumour vessels / Padera T.P., Stoll B.R., Tooredman J.B., Capen D., Tomaso E. Di, Jain R.K. // *Nature* – 2004. – T. 427 – № 6976 – C.695.

216. Roose T. Solid stress generated by spheroid growth estimated using a linear poroelasticity model / Roose T., Netti P.A., Munn L.L., Boucher Y., Jain R.K. // *Microvascular Research* – 2003. – T. 66 – № 3 – C. 204–212.

217. Lee S. Macrophage-based cell therapies: The long and winding road / Lee S., Kivimäe S., Dolor A., Szoka F.C. // *Journal of Controlled Release* – 2016 – T. 240 – C.527–540.

218. Binnemars-Postma K.A. Differential uptake of nanoparticles by human M1 and M2 polarized macrophages: Protein corona as a critical determinant / Binnemars-Postma K.A., Hoopen H.W. Ten, Storm G., Prakash J. // *Nanomedicine* – 2016. – T. 11 – № 22 – C. 2889–2902.

219. MacParland S.A. Phenotype Determines Nanoparticle Uptake by Human Macrophages from Liver and Blood / MacParland S.A., Tsoi K.M., Ouyang B., Ma X.Z., Manuel J., Fawaz A., Ostrowski M.A., Alman B.A., Zilman A., Chan W.C.W., McGilvray I.D. // *ACS Nano* – 2017. – T. 11 – № 3 – C. 2428–2443.

220. Miller M.A. Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug / Miller M.A., Zheng Y.R., Gadde S., Pfirschke C., Zope H., Engblom C., Kohler R.H., Iwamoto Y., Yang K.S., Askevold B., Kolishetti N., Pittet M., Lippard S.J., Farokhzad O.C., Weissleder R. // *Nature Communications* – 2015. – T. 6.

221. Nichols J.W. Odyssey of a cancer nanoparticle: From injection site to site of action // *Nano Today*. – 2012. – T. 7. – № 6. – C. 606–618.

222. Wilhelm S. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nat. Rev. Mater.* – 2016. – T. 1. – № 5. – C. 1–12.

223. Vlerken L.E. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model // *American Chemical Society* - 2008. – T. 7 – № 8 - C. 516–526.

224. Cui Y. Dual-Targeting Magnetic PLGA Nanoparticles for Codelivery of Paclitaxel and Curcumin for Brain Tumor Therapy / Cui Y., Zhang M., Zeng F., Jin H., Xu Q., Huang Y. // *ACS Applied Materials and Interfaces* – 2016. – T. 8 – № 47 – C. 32159–32169.

225. Lammers T. Cancer nanomedicine: Is targeting our target? // *Nat. Rev. Mater.* – 2016. – T. 1. – № 9.

226. Wang C. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics // *Theranostics*. – 2013. – T. 3. – № 5. – C. 317–330.

227. Hamblin M.R. Upconversion in photodynamic therapy: Plumbing the depths / Hamblin M.R. // *Dalton Transactions* – 2018. – T. 47 – № 26 – C. 8571–8580.

228. Zhang P. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation / Zhang P., Steelant W., Kumar M., Scholfield M. // *Journal of the American Chemical Society* – 2007. – T. 129 – № 15 – C. 4526–4527.

229. Chatterjee D.K. Small upconverting fluorescent nanoparticles for biomedical applications // *Small*. – 2010. – T. 6. – № 24. – C. 2781–2795.

230. Guo H. Singlet oxygen-induced apoptosis of cancer cells using upconversion fluorescent nanoparticles as a carrier of photosensitizer / Guo H., Qian H., Idris N.M., Zhang Y. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* – 2010. – T. 6 – № 3 – C. 486–495.

231. Liu K. Covalently assembled NIR nanoplatform for simultaneous fluorescence imaging and photodynamic therapy of cancer cells / Liu K., Liu X., Zeng Q., Zhang Y., Tu L., Liu T., Kong X., Wang Y., Cao F., Lambrechts S.A.G., Aalders

M.C.G., Zhang H. // ACS Nano – 2012. – T. 6 – № 5 – C. 4054–4062.

232. Wang C. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles / Wang C., Tao H., Cheng L., Liu Z. // Biomaterials – 2011. – T. 32 – № 26 – C. 6145–6154.

233. Park Y. II Theranostic probe based on lanthanide-doped nanoparticles for simultaneous in vivo dual-modal imaging and photodynamic therapy / Park Y. II, Kim H.M., Kim J.H., Moon K.C., Yoo B., Lee K.T., Lee N., Choi Y., Park W., Ling D., Na K., Moon W.K., Choi S.H., Park H.S., Yoon S.Y., Suh Y.D., Lee S.H., Hyeon T. // Advanced Materials – 2012. – T. 24 – № 42 – C. 5755–5761.

234. Actis P. Electrochemical nanoprobe for single-cell analysis / Actis P., Tokar S., Clausmeyer J., Babakinejad B., Mikhaleva S., Cornut R., Takahashi Y., López Córdoba A., Novak P., Shevchuck A.I., Dougan J.A., Kazarian S.G., Gorelkin P. V., Erofeev A.S., Yaminsky I. V., Unwin P.R., Schuhmann W., Klenerman D., Rusakov D.A., Sviderskaya E. V., Korchev Y.E. // ACS Nano – 2014. – T. 8 – № 1 – C. 875–884.

235. Mironova K.E. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro / Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A. V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R. V., Deyev S.M. // Theranostics – 2013. – T. 3 – № 11 – C. 831–840.

236. Amos-Tautua B.M. Application of porphyrins in antibacterial photodynamic therapy // Molecules. – 2019. – T. 24. – № 13.

237. Berlanda J. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT / Berlanda J., Kiesslich T., Engelhardt V., Krammer B., Plaetzer K. // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – 2010 – T. 100 – № 3 – C. 173–180.

238. Khaydukov E. V. Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment / Khaydukov E. V., Mironova K.E., Semchishen V.A., Generalova A.N., Nechaev A. V., Khochenkov D.A., Stepanova E. V., Lebedev O.I., Zvyagin A. V., Deyev S.M., Panchenko V.Y. // Scientific Reports – 2016. – T. 6 - C. 1065-1089.

239. Rao Kudle K. Prediction of riboflavin carrier protein (RCP) secondary

structure using K2 D2 web tool / Rao Kudle K., Rao Kudle M., Merugu R., Rudra M.P.P. // *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* – 2015. – T. 7 – № 11 – C. 288–291.

240. Phelps M.A. A novel rhodamine-riboflavin conjugate probe exhibits distinct fluorescence resonance energy transfer that enables riboflavin trafficking and subcellular localization studies. / Phelps M.A., Foraker A.B., Gao W., Dalton J.T., Swaan P.W. // *Molecular pharmaceutics* – 2004. – T. 1 – № 4 – C. 257–266.

241. Holladay S.R. Riboflavin-mediated delivery of a macromolecule into cultured human cells / Holladay S.R., Yang Z.F., Kennedy M.D., Leamon C.P., Lee R.J., Jayamani M., Mason T., Low P.S. // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* – 1999. – T. 1426 – № 1 – C. 195–204.

242. Huang S.N. Involvement of endocytic organelles in the subcellular trafficking and localization of riboflavin / Huang S.N., Phelps M.A., Swaan P.W. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* – 2003. – T. 306 – № 2 – C. 681–687.

243. Bartmann L. Evaluation of riboflavin transporters as targets for drug delivery and theranostics / Bartmann L., Schumacher D., Stillfried S. Von, Sternkopf M., Alampour-Rajabi S., Zandvoort M.A.M.J. Van, Kiessling F., Wu Z. // *Frontiers in Pharmacology* – 2019. – T. 10 .

244. Insińska-Rak M. New photochemically stable riboflavin analogue-3-Methyl-riboflavin tetraacetate / Insińska-Rak M., Sikorska E., Bourdelande J.L., Khmelinskii I. V., Prukała W., Dobek K., Karolczak J., Machado I.F., Ferreira L.F.V., Dulewicz E., Komasa A., Worrall D.R., Kubicki M., Sikorski M. // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* – 2007. – T. 186 – № 1 – C. 14–23.

245. Ahmad I. Metal ion mediated photolysis reactions of riboflavin: A kinetic study / Ahmad I., Anwar Z., Ahmed S., Sheraz M.A., Khattak S.R. // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* – 2017. – T. 173 – C. 231–239.

246. Hamblin M.R. Melanoma resistance to photodynamic therapy: New insights // *Biol. Chem.* – 2013. – T. 394. – № 2. – C. 239–250.

247. Brenner M. The protective role of melanin against UV damage in human

skin // *Photochem. Photobiol.* – 2008. – T. 84. – № 3. – C. 539–549.

248. Machado D. Irradiated Riboflavin Diminishes the Aggressiveness of Melanoma In Vitro and In Vivo / Machado D., Shishido S.M., Queiroz K.C.S., Oliveira D.N., Faria A.L.C., Catharino R.R., Spek C.A., Ferreira C. V. // *PLoS ONE* – 2013 – T. 8 – № 1.

249. Kessel D. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage // *Photochem Photobiol Sci* - 2007 – T. 6 - № 12 - C. 1290–1295.

250. Broekgaarden M. Tumor cell survival pathways activated by photodynamic therapy: a molecular basis for pharmacological inhibition strategies. / Broekgaarden M., Weijer R., Gulik T.M. van, Hamblin M.R., Heger M. // *Cancer metastasis reviews* – 2015. – T. 34 – № 4 – C. 643–90.

251. Hassan I. Vitamin B2: A promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management // *Food Chem. Toxicol.* – 2013 – T. 59. – C. 715–723.

252. Naseem I. Riboflavin as adjuvant with cisplatin Study in mouse skin cancer model / Naseem I. // *Frontiers in Bioscience* – 2015. – T. 7 – № 2 – C.731.

253. Dichiara M. Recent advances in drug discovery of phototherapeutic non-porphyrinic anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem.* – 2017. – T. 142. – C. 459–485.

254. Toraya-Brown S. Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8+ T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors / Toraya-Brown S., Sheen M.R., Zhang P., Chen L., Baird J.R., Demidenko E., Turk M.J., Hoopes P.J., Conejo-Garcia J.R., Fiering S. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* – 2014 – T. 10 – № 6 – C. 1273–1285.

255. Dupont C. Intraoperative photodynamic therapy for glioblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial / Dupont C., Vermandel M., Leroy H.A., Quidet M., Lecomte F., Delhem N., Mordon S., Reyns N. // *Clinical Neurosurgery* – 2019. – T. 84 – № 6 – C. 414–419.

256. Shimizu K. Intraoperative photodynamic diagnosis using talaporfin sodium simultaneously applied for photodynamic therapy against malignant glioma: A prospective clinical study / Shimizu K., Nitta M., Komori T., Maruyama T., Yasuda T.,

Fujii Y., Masamune K., Kawamata T., Maehara T., Muragaki Y. // *Frontiers in Neurology* – 2018. – T. 9 – № 1 – C. 30.

257. Bartmann L. Evaluation of Riboflavin Transporters as Targets for Drug Delivery and Theranostics. / Bartmann L., Schumacher D., Stillfried S. von, Sternkopf M., Alampour-Rajabi S., Zandvoort M.A.M.J. van, Kiessling F., Wu Z. // *Frontiers in pharmacology* – 2019. – T. 10 – № 2 – C. 79.

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

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

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

261. Krylov I. V. Local Overheating of Biotissue Labeled With Upconversion Nanoparticles Under Yb³⁺ Resonance Excitation / Krylov I. V., Akasov R.A., Rocheva V. V., Sholina N. V., Khochenkov D.A., Nechaev A. V., Melnikova N. V., Dmitriev A.A., Ivanov A. V., Generalova A.N., Khaydukov E. V. // *Frontiers in Chemistry* – 2020. – T. 8 – C. 295 - 302.

262. Nagy J.A. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? // *Br. J. Cancer*. – 2009. – T. 100. – № 6. – C. 865–869.

263. Ai F. A core-shell-shell nanoplatform upconverting near-infrared light at 808 nm for luminescence imaging and photodynamic therapy of cancer / Ai F., Ju Q., Zhang X., Chen X., Wang F., Zhu G. // *Scientific Reports* – 2015. – T. 5 – № 1 – C. 1–11.

264. Wang M. Lanthanide-doped upconversion nanoparticles electrostatically coupled with photosensitizers for near-infrared-triggered photodynamic therapy / Wang M., Chen Z., Zheng W., Zhu H., Lu S., Ma E., Tu D., Zhou S., Huang M., Chen X. // *Nanoscale* – 2014. – T. 6 – № 14 – C. 8274–8282.

265. Shirmanova M. Towards PDT with genetically encoded photosensitizer killerred: A comparison of continuous and pulsed laser regimens in an animal tumor model / Shirmanova M., Yuzhakova D., Snopova L., Perelman G., Serebrovskaya E., Lukyanov K., Turchin I., Subochev P., Lukyanov S., Kamensky V., Zagaynova E. // *PLoS ONE* – 2015. – T. 10 – № 12.