

ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ В ОНКОЛОГИИ

Ивашкина М.Д.¹, Миронович А.А.¹, Юдаева А.Д.¹, Смирнов И.В.²,

под редакцией д.м.н. Митрофановой Л.Б.³

¹Образовательный центр Сириус, Сочи

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,

³ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург

Реферат

В настоящее время во всём мире ведутся работы по созданию новых эффективных и безопасных вариантов диагностики и лечения рака, среди которых флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия занимают одно из лидирующих мест. Основная проблема и задача онкологов — это правильный выбор фотосенсибилизаторов и методов их введения. В данном литературном обзоре представлены разрабатываемые, исследуемые и применяемые в клинической практике флюорохромы и фотосенсибилизаторы для флюоресцентной диагностики и фотодинамической терапии опухолей.

Ключевые слова: интраоперационная флюоресцентная навигация, опухоли, флюорохромы, фотодинамическая терапия

FLUORESCENCE IN ONCOLOGY

Ivashkina M.D.¹, Mironovich A.A.¹, Yudaeva A.D.¹, Smirnov I.V.²

edited by Ph.D. Mitrofanova L.B.³

¹Sirius Education Center, Sochi

²Moscow State University named after M.V. Lomonosov

³Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg

Abstract

Currently, all over the world, work is underway to create new effective and safe options for the diagnosis and treatment of cancer, among which fluorescence diagnostics and photodynamic therapy occupy one of the leading places. The main problem and task of oncologists is the correct choice of photosensitizers and the methods of their administration. This

literature review presents fluorochromes and photosensitizers developed, studied and used in clinical practice for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy of tumors.

Key words: intraoperative fluorescence navigation, tumors, fluorochromes, photodynamic therapy

Флуоресцентная навигация

Хирургический метод лечения является предпочтительным для большинства солидных опухолей, но трудности, связанные с определением границ образования, часто приводят к неполной резекции и рецидиву. Полная хирургическая резекция с отрицательными краями может улучшить прогноз заболевания и снизить частоту рецидивов.

Для предоперационной диагностики опухолей используют ультразвуковую диагностику, рентгенологическое исследование, компьютерную и магнитно-резонансную томографию, ангиографию, ПЭТ-КТ с различными радиоизотопами и морфологический анализ биопсийного материала.

Последние достижения в области молекулярной визуализации с использованием оптических зондов произвели революцию. Интраоперационный метод флуоресцентной визуализации дает возможность для полной резекции опухолевой ткани [1]. Оптическая визуализация с использованием флуоресценции ближней инфракрасной области (NIR) стала ценным методом улучшения ранней диагностики преинвазивных и метастатических опухолевых клеток. Сигналы флуоресценции могут предоставлять молекулярную информацию об анатомической структуре и метаболизме опухоли.

В общем случае возбуждающие фотоны должны входить и проходить через ткани до того, как они достигнут и вступят во взаимодействие с флуоресцентными агентами. Свет в видимых областях не проникает глубоко в ткани. Кроме того, фотоны могут поглощаться различными компонентами ткани. Помимо поглощения и рассеивающего свойства света, автофлуоресценция ткани относительно выше в видимом спектре, чем в области NIR. Флуоресцентная визуализация NIR использует флуорофоры, которые излучают свет NIR в диапазоне 650 и 900, испытывают минимальное поглощение в тканях и, таким образом, обладают большей глубиной проникновения. Благодаря пониженному фоновому сигналу, повышенной чувствительности и глубине проникновения флуоресцентная визуализация демонстрирует улучшенное качество изображения [2].

Конструкция таргетирования опухоли

Способность флуоресцентного зонда нацеливаться на опухоль имеет решающее значение для точной диагностики опухоли. В настоящее время для доставки наночастиц широко используются как пассивное накопление опухоли, так и молекулярно-активное таргетирование специфическими конъюгированными лигандами на поверхности наночастиц. По сравнению с нормальными тканями кровеносные сосуды в большинстве злокачественных опухолей нерегулярные, часто атипичного строения вплоть до образования клубочков, артерио-венозных анастомозов, кооптации с опухолевыми клетками, с повышенной проницаемостью крови, что приводит к функциональным нарушениям и некрозам. Селективное накопление трансудата в образованиях дает возможность получить тканеспецифическую визуализацию. Однако, это в значительной степени зависит от состояния ангиогенеза и васкуляризации опухолей. Чтобы обеспечить более точные границы новообразования, активно-целевой способ включает в себя инженерные NIR-флуоресцентные красители, химически конъюгированные со специфическими направленными на опухоль фрагментами, такими как малые молекулы, пептиды, антитела, которые уменьшают доставку к нормальным клеткам и избирательно нацеливаются на аномальные клетки. Это лучший метод, по сравнению с пассивным таргетингом, который обеспечивает высокоспецифичную визуализацию за счет устранения фонового сигнала, связанного с неспецифическим связыванием [3, 4].

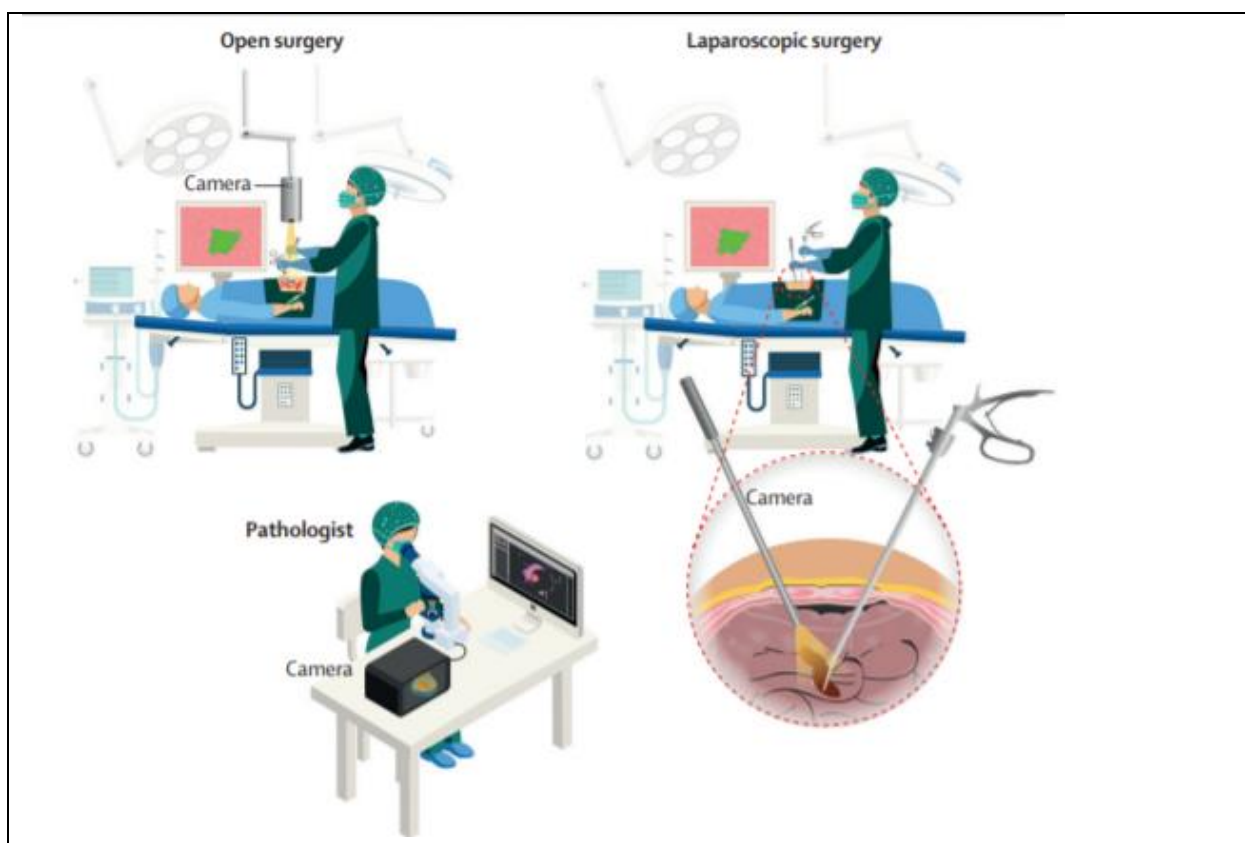
В последнее время широко используется применение белков или мембраносвязанных рецепторов, которые регулируются в раковых клетках, в качестве мишеней для разработки флуоресцентных зондов, нацеленных на опухоль.

Такие зонды направлены на рецептор фолата, рецептор интегрин, простатспецифический мембранный антиген, и фермент циклооксигеназы-2.

В данный момент в оптической визуализации используются три основных типа меток: флуоресцентные белки, биолюминесцентные и флуоресцентные красители. В то время как биолюминесцентные и флуоресцентные белки нуждаются в инженерии клеточных линий или трансгенных животных, флуоресцентные красители могут быть неспецифически или специфически нацелены на соответствующую ткань, что способствует более быстрому применению в клинике, чем подходы, требующие генной инженерии.

Для получения оптимального изображения флуоресцентный краситель должен соответствовать нескольким критериям [5]:

1. длина волны: ниже 700 Нм - краситель проникает только на несколько сотен микрометров, между 700 Нм и 900 Нм (ближняя инфракрасная область, NIR) - поглощение находится на самом низком уровне, длины волн > 900 Нм сильно поглощает вода, резко снижая эффективность передачи света.
2. Минимизация автофлуоресценции. Флуоресцентным красителям NIR не мешает автофлуоресценция, поскольку ткань пациента обычно проявляет незначительное излучение в этой области.
3. Квантовый выход флуоресценции (QY) - отражает эффективность процесса флуоресценции. QY определяется как отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных. Максимальная флуоресценция QY равна 1,0 (100%); каждый поглощенный фотон приводит к излучению фотона. Все агенты с QY между 0,1 и 1 считаются флуоресцентными.
4. Растворимость: очевидно, что краситель должен быть растворим для введения в ткань, например, внутривенно.
5. Низкое фотообесцвечивание (фотохимическое разрушение флуорофора), которое может усложнить наблюдение флуоресцентных молекул, поскольку они в конечном итоге будут разрушены воздействием света (флюенсом). Чем ниже фотообесцвечивание красителя, тем выше его стабильность и потенциал практического применения.
6. Минимальное неспецифическое связывание (связывание с клеточными мембранами и белками экстрацеллюлярного матрикса приводит к фоновой флуоресценции, которая снижает отношение сигнал/фон и ограничивает специфичность и чувствительность метода).



Внедрение флуоресцентного наведения при открытых и лапароскопических операциях. После внутривенного введения фотосенсибилизатора опухоль можно визуализировать с помощью специализированной NIR камеры в режиме реального времени на операционном столе.

Сразу после резекции образец можно визуализировать с помощью флуоресцентной камеры и микроскопа.

Hernot S., van Manen L., Debie P. et al. Latest developments in molecular tracers for fluorescence image-guided cancer surgery. *Lancet Oncol.* 2019; 20:e354–67.

Наиболее используемые флуоресцентные красители NIR: ICG ($C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$), Cy5.5 ($C_{44}H_{46}N_3BF_4O_4$), Cy7 ($C_{43}H_{60}Cl_2N_4O$), Irdye800 CW ($C_{54}H_{67}N_6Na_3O_{17}S_4$) и ProSense750.

ICG имеет длину волны возбуждения 779 Нм, излучения - 806 Нм, квантовый выход 0,13, лишь умеренно растворим в воде; низкое фотообесцвечивание. Это цианин с высоким сродством к белку, вызывающий высокое неспецифическое связывание с белками. ICG - единственный одобренный флуоресцентный краситель FDA (Управлением по контролю за продуктами и лекарствами). Побочные эффекты его очень низкие.

Cy5.5 имеет длину волны возбуждения 675 Нм, излучения - 695 Нм, квантовый выход 0,25, хорошо растворим в воде; низкие фотообесцвечивание и неспецифическое

связывание. Cy5.5 имеет длину волны излучения 695 Нм, поэтому на него может влиять автофлуоресценция. Токсичность до конца не оценена.

Cy7 имеет длину волны возбуждения 794 Нм, излучения - 775 Нм, квантовый выход 0,27, хорошо растворим в воде; низкие фотообесцвечивание и неспецифическое связывание.

Irdye800 CW имеет длину волны возбуждения 775 Нм, излучения - 796 Нм, квантовый выход 0,15, хорошо растворим в воде; низкие фотообесцвечивание и неспецифическое связывание.

ProSense750 имеет длину волны возбуждения 750 Нм, излучения - 780 Нм, квантовый выход трудно измерить, так как он активируется только при расщеплении, хорошо растворим в воде; низкое фотообесцвечивание. Активатор, неподвержен влиянию неспецифического связывания [6].

QDs (квантовые точки) имеют широкий спектр поглощения, длину волны излучения - 808 Нм, квантовый выход 0,5-0,6 (что делает их флуоресцентными). Некоторые имеют внешнюю оболочку, которая делает их нерастворимыми. Новые QDs имеют водно-совместимый органический слой. Многие старые QDs имеют заряженные поверхностные группы и, следовательно, высокое неспецифическое связывание. Гидроксильные QDs имеют 140-кратное снижение неспецифического связывания по сравнению с карбоксилированными QDs и 20-кратное снижение по сравнению с предыдущим поколением QDs. QDs могут быть высокотоксичны из-за низкого почечного клиренса, содержания в составе металлов, кадмия, селена.

Полупроводниковые квантовые точки (QDs) служат превосходными оптически активными наноматериалами для молекулярной визуализации и фотодинамической терапии благодаря большим коэффициентам поглощения, высоким квантовым выходом излучения, высокой фотостабильности, широким полосам поглощения и легкой функционализацией поверхности, но низкий квантовый выход синглетного кислорода ($^1O_2$) и отсутствие селективности опухоли ограничивают их применение для фотодинамической терапии опухолей *in vivo* [7].

ICG имеет самый низкий коэффициент отношения сигнала к фону, в то время как QDs - самый высокий. В то же время, отношение сигнала к фону у ProSense 750 высокое (фон равен нулю, так как он флуоресцирует только при активации).

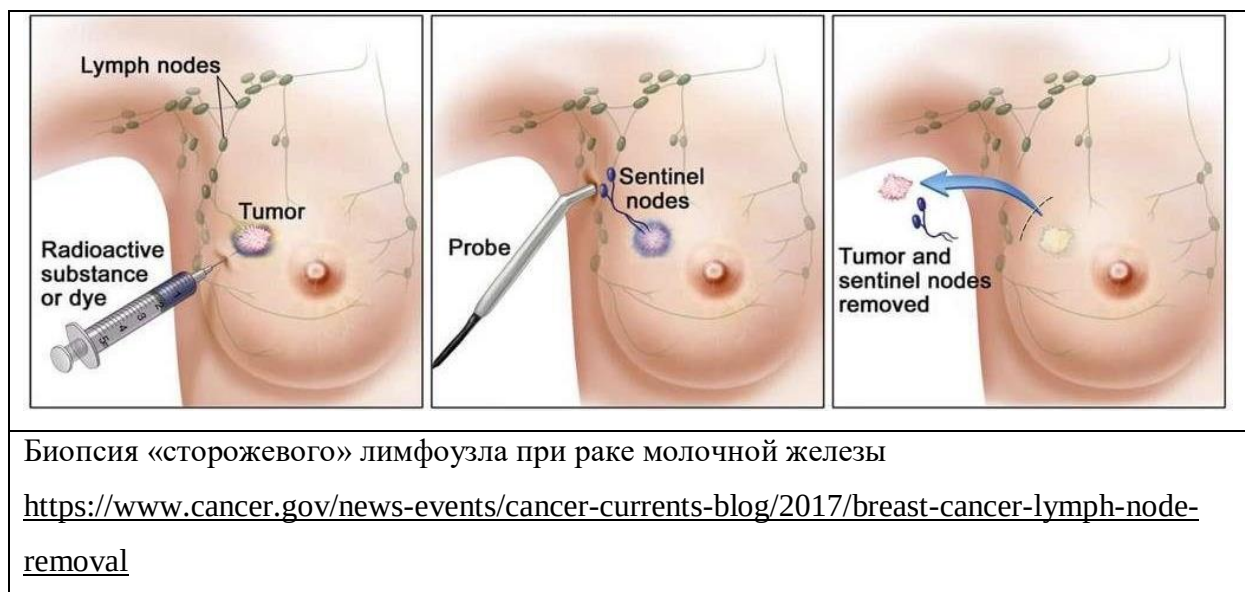
ICG и другие свободные цианины быстро выводятся из крови, их клиренс осуществляется путем почечной фильтрации и выведения через желчь. Период полураспада составляет менее нескольких минут. Период полураспада в крови для ProSense 750 – 24 часа. QDs - крупные структуры гидродинамического диаметра, трудно выводятся.

Флуоресцентные красители могут быть конъюгированы со специфическими субстратами для формирования зондов визуализации специфических опухолевых мишеней. К этим зондам относятся:

- красители и зонды, которые накапливаются в сторожевом лимфатическом узле;
- зонды, визуализирующие повышенный клеточный метаболизм;
- зонды, активируемые опухоль-ассоциированными протеазами;
- зонды, которые связываются с определенной молекулярной мишенью.

Красители и зонды, которые накапливаются в сторожевом лимфатическом узле (SLN)

SLN - это первый лимфатический узел лимфодренажа от солидной опухоли.



При некоторых видах опухоли, таких как карцинома молочной железы и в меньшей степени меланома, обнаружение (биопсия) SLN стало клиническим стандартом. Для картирования всей лимфатической системы зонд должен быть достаточно маленьким, чтобы он мог распространяться по лимфатическим узлам и мелким сосудам. Напротив, чтобы идентифицировать и нанести на карту SLN, краситель должен быть достаточно большим, чтобы удерживаться внутри лимфатических узлов.

Сегодня процедура картирования SLN выполняется с помощью комбинации предоперационных инъекций нанокolloида и интраоперационной инъекции метиленового синего. Визуализация в реальном времени с помощью метиленового синего не всегда очень чувствительна, что может привести к ложноположительным результатам, поскольку мелкие частицы красителя могут легко диффундировать через истинный SLN и пересечь несколько узлов. Метиленовый синий не имеет оптимального тканевого контраста, при введении в дерму окрашивает кожу пациента в течение нескольких месяцев.

Визуализация с помощью индоцианинового зеленого

Индоцианиновый зеленый (ICG) был использован для картирования сосудов, ангиограмм глаза и ангиограмм головного мозга, для идентификации печеночных сегментов и субсегментов при резекции злокачественных новообразований печени. Метод визуализации в реальном времени оказался безопасным и воспроизводимым. ICG вводили в ветвь воротной вены пациента и снимали с помощью специальной камеры [9].

Возможность применения ICG для визуализации лимфатических узлов была продемонстрирована в нескольких исследованиях на животных. Например, были обнаружены поверхностные лимфатические сосуды крысы с минимальным диаметром 0,1 мм с чувствительностью и специфичностью почти 100% [10].

ICG используется в картировании SLN человека при раке молочной железы I или II стадии. ICG вводится в паренхиму молочной железы, окружающую первичную опухоль. Чувствительность составляет 70%; обнаружено неспецифическое связывание (примерно 11%)[11]. В исследовании Kitai T. et al [12] визуализация узлов без камеры была успешной у 50% пациентов, в то время как использование системы визуализации увеличило скорость идентификации до 94%. Эти авторы не сообщили о ложноотрицательных SLN.

Время обнаружения ICG может составлять от нескольких минут до 1 суток. Для его увеличения ICG может быть конъюгирован с человеческим сывороточным альбумином (HSA). HSA имеет длительный период полураспада в крови и, следовательно, показывает накопление в лимфатической системе.

Новый конъюгат с HSA - флуоресцентный краситель HSA800, был протестирован на свиньях в пищеводных SLN и показал высокую флуоресценцию [13].

(ICG)-99mTc-nanocolloid

Гибридный трейсер индоцианиновый зеленый (ICG)-99mTc-nanocolloid был первым гибридным индикатором, испытанным на людях для уточнения процедуры сторожевого лимфатического узла.

Исследование 495 пациентов с новообразованиями головы, шеи, кожи, полового члена, предстательной железы показало преимущество индоцианинового зеленого нанокolloида с точки зрения точного визуального наведения, оценки глубины и обнаружения сторожевых лимфатических узлов вблизи инъекции [14].

Визуализация с помощью Cy5.5 и Cy7

AVB-620 состоит из проникающего в клетку пептида, несущего флуорофор Cy5, и нейтрализующего пептида, несущего флуорофор Cy7. После протеолитического расщепления два пептида разделяются, и пептид, несущий Cy5, проникающий в клетку, становится функционирующим, увеличивая интенсивность флуоресценции Cy5 и уменьшая излучение Cy7.

Использование AVB-620 позволило обнаружить флуоресценцию опухоли молочной железы в образцах ex vivo [15].

Визуализация с помощью QDs

Из-за большого диаметра удержание QDs в SLN составляет 100%. Кроме того, флуоресценция очень высокая, многоцветная и не обесцвечивается настолько, что нет необходимости в конъюгации. Однако, как уже упоминалось ранее, QDs обладают неизвестной токсичностью и состоят из потенциально токсичных металлов, поэтому в настоящее время не имеют потенциала для клинического применения.

Гибридные наночастицы на основе мицелл, представляющие собой предварительно собранный QD-Zn-порфириновый комплекс высоко флуоресцентных органических фотосенсибилизаторов родамина 6G (R6G) и флуорофора NIR775 фолиевой кислоты, обладают большим содержанием порфирина и сильной способностью поглощения света, что способствует чрезвычайно высокому квантовому выходу O₂, благодаря эффективному процессу двойной передачи энергии.

Исследования in vivo показывают, что они предпочтительно могут накапливаться в опухолях через активную доставку фолат-рецепторов. Эти наночастицы продемонстрировали сильную способность поглощать свет, усиливали излучение флуоресценции и повышали квантовый выход O₂ при облучении светом. Кроме того, эти наночастицы, обладающие сильной флуоресценцией NIR, позволили в режиме реального

времени отслеживать транспортный путь и неинвазивно визуализировать опухоли у живых животных [16].

Зонды с отображением повышенного клеточного метаболизма

Оптическая визуализация также может использовать зонды, отображающие повышенный метаболизм глюкозы в опухоли. Одним из биохимических признаков злокачественности является усиленный гликолиз опухоли, который обусловлен сверхэкспрессией транспортеров глюкозы (Glut).

2-Дезоксиглюкоза (2DG) поглощается клетками через Glut и захватывается клеткой после фосфорилирования первым ферментом гликолитического пути - гексокиназой. Поскольку фосфорилированный 2DG не метаболизируется последующими ферментами гликолитического пути, он накапливается в клетках, и уровни захваченного метаболита отражают утилизацию глюкозы.

Целесообразность использования 2DG была доказана ПЭТ-КТ с 18FDG для диагностики опухолей. Однако, ПЭТ-сканирование не может использоваться во время операции.

Для оптической визуализации были синтезированы два аналога NIR-дезоксиглюкозы.

Первый аналог дезоксиглюкозы - Руго-2DG. Зонд накапливается и затем удерживается в опухоли при фосфорилировании гексокиназой. Zhang Z. et al [17] обнаружили в модели глиомы крысы, что Руго-2DG избирательно накапливается в опухоли по сравнению с окружающей нормальной тканью в соотношении 10:1. В сочетании с Cy5.5 способность к таргетированию опухоли аналога дезоксиглюкозы 2DG была протестирована на клеточных культурах, а также на голых мышах, несущих глиобластому. 2DGCy5 накапливается в нескольких линиях опухолевых клеток, таких как A375M, B16F10, C6, U87MG и MDA-MB-435. Коэффициенты T/N для Cy5.5-2DG через 48 ч составляют 1,63 (0,06). Cy5.5-2DG демонстрирует способность накопления в клеточной культуре и живых мышах, но не через путь гексокиназы, т.к. флуоресцентный Cy5.5 имеет слишком большие размеры для захвата Glut. Поэтому его нельзя использовать в качестве маркера для диагностики сверхэкспрессии Glut [18].

Зонды, активируемые опухоль-ассоциированными протеазами

Активация катепсином В

Известно, что многие опухоли имеют повышенный уровень протеолитических ферментов. Опухоль-ассоциированные протеазы функционируют на нескольких стадиях, влияя на образование опухоли, рост, ангиогенез, интравазацию, экстравазацию и метастазирование. Зонды, предназначенные исключительно для активации специфической протеазой, теоретически специфичны для опухоли. Только после взаимодействия с протеазами зонды становятся флуоресцентными.

Cy5.5-PGC

Cy5.5 может быть связан с сополимером трансплантата (PGC - protected graft copolymer) таким образом, что расщепление этого соединения индуцируется опухолевой протеазой катепсин В. В карциномах молочной железы и мелкоклеточного рака голых мышей, выход Cy5.5 из соединения с PGC приводит к 12-кратному увеличению сигнала флуоресценции NIR.

Визуализация лимфатических узлов с помощью NIR Cy5.5-PGC имеет несколько основных преимуществ по сравнению с более ранними методами и реагентами. Cy5.5-PGC можно вводить локально или системно. При внутривенном введении высокий уровень сигнала NIR был получен из узлов в различных анатомических местах, а также в печени и селезенке.

Недостаток внутривенного введения заключается в том, что для визуализации конкретных узлов требовалась более высокая доза из-за более высокого поглощения печенью, селезенкой и узлами в целом. При местном введении можно наблюдать только узлы, дренирующие место инъекции. Выбор между местным и системным введением может основываться на количестве, расположении и физиологии узлов, подлежащих отбору, а также на характере дренирования тканей после местного введения.

Cy5.5-PGC вызывает флуоресценцию в ближнем инфракрасном диапазоне (600-800 нм), которая проникает в кожу и жир, окружающие лимфатические узлы. Это позволяет интраоперационно визуализировать узловую архитектуру через миллиметры жира и соединительной ткани [19].

ProSense 680 и 750

Более поздние препараты, синтезированные по тому же принципу, - ProSense 680 и 750. Процесс их расщепления идентичен Cy5.5-PGC. ProSense состоит из сополимеров, соединенных с флуорохромами, которые высвобождаются после расщепления катепсина В. У мышей селективная визуализация опухоли была получена с помощью визуализации

катепсина ProSense 680. В естественных условиях катепсин В является основной причиной расщепления зонда. Расщепление зонда катепсином В может происходить и при воспалительном процессе [20], что приведет к ложноположительному результату.

ProSense 750 был применен для улучшения выявления малого периферического рака легких в модели карциномы легкого Льюиса. Он также использовался у мышей в сочетании с портативным устройством визуализации для обнаружения остаточной ткани саркомы во время операции. В сочетании с флуоресцентной томографией удалось визуализировать метастазы в легкие резецированных сарком. Благодаря своей чувствительности, молекулярной специфичности, благоприятной фармакокинетике и отсутствию токсичности ProSense 750 является перспективным средством клинической визуализации [21].

Ce6 PGC

Третий флуорофор, хлорин е6 (Ce6), также связывается с PGC. Он накапливается в опухоли и избирательно активируется катепсином В. Ce6 является фотодинамическим агентом, и в теории может, помимо визуализации, использоваться и в терапевтических целях. При освещении соответствующей длиной волны он передает свою энергию соседнему молекулярному кислороду, производя цитотоксический синглетный кислород, который вызывает селективное повреждение тканей (фундаментальный принцип фотодинамической терапии) [22].

Зонды с определенной молекулярной мишенью

Мишень - аннексин A2

Помимо протеаз, существуют молекулы, преимущественно экспрессирующиеся в злокачественных клетках. Tozuleristide (известный как BLZ-100) – модифицированный пептид хлоротоксина, конъюгированный с индоцианиновым зеленым (ICG) [23, 24].

Хлоротоксин (ClTx) - это небольшой пептид, который блокирует хлоридные каналы низкой проводимости. Специфическое связывание ClTx показали глиобластомы, медуллобластомы, нейробластомы, ганглионевромы, меланомы, феохромоцитомы надпочечников, примитивные нейроэктодермальные опухоли, мелкоклеточный рак легких, саркома Юинга и карциномы молочной железы. При одинаковых условиях окрашивания нормальные ткани мозга, кожи, почек и легких были неизменно отрицательными [25]. ClTx связывается непосредственно с аннексином A2, который участвует в ангиогенезе, регулируя активацию плазминогена на сосудах

эндотелиальных клетках. Аннексин A2 чрезмерно экспрессируется во многих типах рака, играет роль в онкогенезе, ангиогенезе и метастазировании опухолевых клеток [26].

Кроме этого, хлоротоксин специфически и селективно взаимодействует с матриксной металлопротеиназой-2 (ММР-2), которая экспрессируется клетками глиомы, но отсутствует в нормальных клетках головного мозга [27].

TM601 - это 36-аминокислотный синтетический пептид, идентичный по структуре и функции хлоротоксину, который был выделен в качестве ингибитора хлорид-ионных каналов из яда *Leirus quinquestriatu*. TM601 связывается с аннексином A2 и эффективно выявляет несколько типов опухолей, включая глиому, медуллобластому, рак предстательной железы, рак кишечника и саркому после внутривенной инъекции.

В I фазе клинических испытаний терапии опухолей головного мозга человека TM-601 был протестирован, синтетическая версия хлоротоксина, и не наблюдалось никаких дозоограничивающих токсичностей [28]. Известно, что TM601 ингибирует фактор роста фибробластов и миграцию клеток глиомы HUVEC и U373-MG [29].

Мишень - интегрин $\alpha v \beta 3$

Интегрины - белки, которые функционируют как рецепторы и играют роль в прогрессии опухоли, ее ангиогенезе и метастазировании.

Интегрин $\alpha v \beta 3$ способствует остеокластоопосредованной резорбции кости, ангиогенезу, патологической неоваскуляризации и метастазированию опухоли. Стратегия блокирования сигнала интегрин $\alpha v \beta 3$ была принята после доказательства его решающей роли в опухолевом ангиогенезе. Кроме того, высокая экспрессия интегрин $\alpha v \beta 3$ на новообразованных кровеносных сосудах опухоли и некоторых опухолевых клетках делает интегрин $\alpha v \beta 3$ подходящим белком для таргетной доставки цитотоксических препаратов [30].

R-Fn-DVDMS

R-Fn-DVDMS состоит из фотосенсибилизатора синопорфирина натрия (DVDMS), связанного с RGD -модифицированным ферритином (R-Fn).

Аргинилглициласпарагиновая кислота (RGD-последовательность) — трипептид, состоящий из L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты. В белке эта последовательность (*RGD-последовательность* или *RGD-пептид*) является распространённым элементом распознавания и белок-белкового взаимодействия

клеточных белков. Интегрины характеризуются наличием участком взаимодействия с RGD-пептидом. Свободный RGD-пептид часто используется в клеточной биологии и биотехнологии благодаря свойству специфически связываться с интегринными и, таким образом, ингибировать межклеточные связи. RGD обладает высоким сродством к интегринам $\alpha_v\beta_3$, биомаркеру опухолевого ангиогенеза, который регулируется на опухолевых эндотелиальных клетках и существует во многих типах опухолевых клеток. Дезинтегрины (англ. disintegrins) — пептиды из яда змей семейства гадюковых. Длина этих пептидов с высоким содержанием цистеина варьирует от 45 до 84 аминокислот. Практически все дезинтегрины содержат RGD-последовательность. Платформа биосовместимых наноматериалов на основе RGD-модифицированного ферритина показывает большой потенциал для фотодинамической и фототермической терапии.

R-Fn-DVDMS, накопленные в опухоли в высоких концентрациях, не только продуцируют активные формы кислорода (ROS), но и генерируют локальную гипертермию, известную как фототермическая терапия (ФТТ), после воздействия лазера с длиной волны 630 Нм. Наноконкомпозиты R-Fn-DVDMS успешно используются для усиленной флуоресцентной визуализации и одноволновой лазерно-мотивированной ФДТ/ФТТ-терапии [31].

IRDye800-PEG4-RGD2

IRDye800-меченный циклический RGD-димер с тетраэтиленгликолем (PEG4) нацеленный на рецептор интегрин $\alpha_v\beta_3$.

IRDye800-PEG4-RGD2 показал более высокие флуоресценцию опухоли, соотношение опухоли и фона, более высокое поглощение опухоли, чем IRDye800, конъюгированный только с RGD2. IRDye800-PEG4-RGD2 обеспечивает лучшее качество изображения опухоли, чем IRDye800-RGD2, через 4 часа после инъекции.

Высокий контраст опухоли был обнаружен через 4 часа при клиренсе трейсеров (индикаторов) в нормальных органах. Избыточная доза RGDfK значительно снижала поглощение опухолью IRDye800-PEG4-RGD2, а поглощение опухолью IRDye800-PEG4-RGD2 было значительно выше, чем у несвязанного IRDye800. Все это свидетельствовало о специфичности таргетирования опухоли зондом. Димерный зонд RGD IRDye800-PEG4-RGD2 показал лучшие свойства, чем меченый IRDye800 димер RGD без PEG4, что частично связано с повышенным сродством к связыванию рецепторов [32].

Cy5.5 RGD

Рецептор-опосредованное связывание меченного Cy5.5 RGD пептида с интегрином $\alpha\beta 3$ было протестировано как *in vitro*, так и *in vivo*. Сигнал флуоресценции первоначально был распределен по поверхности клетки и был связан с плазматической мембраной, тогда как длительное время инкубации приводило к эндоцитозу, причем большая часть флуоресценции накапливалась в перинуклеарной области и почти полностью исчезала с мембраны. Поглощение пептида опухолью достигало максимума через 2 часа после инъекции и медленно вымывалось с течением времени. С другой стороны, нормальная ткань быстро поглощала и относительно быстро очищалась.

Конъюгат флуоресцентного красителя также указывал на интегрин-специфическое поглощение опухолью [33].

QD705-RGD

Вместо цианинов Cai W et al [34] использовали QDs в качестве NIR-метки. QDs, связанные с RGD-пептидами, были протестированы на модели опухоли уха мыши.

QD проявляли селективное связывание с одиночными клетками новообразованных сосудов.

PEG-линкер дает значительно улучшенную стабильность по сравнению с соответствующим карбоксильно-модифицированным QD705, который не обладает PEG-линкером.

Кроме того, QD705-RGD очерчивает опухоль лучше, чем Cy5.5-RGD, вероятно, по нескольким причинам. Во-первых, гораздо более сильное поглощение и более высокий квантовый выход QD давали лучший сигнал при более низких уровнях введенных флуоресцентных зондов; во-вторых, поливалентный эффект лигандов RGD давал лучшую эффективность таргетирования *in vivo*. Однако, поглощение QD705-RGD в других нецелевых органах значительно выше, чем Cy5.5-RGD. Из-за своего гораздо меньшего размера Cy5.5-RGD проявлял более быструю локализацию опухоли, чем QD705-RGD, и связывался с интегрином $\alpha\beta 3$ как в сосудистой сети опухоли, так и на опухолевых клетках, тогда как QDs может связываться только с сосудистым интегрином $\alpha\beta 3$. В целом основными преимуществами QD705-RGD перед Cy5.5-RGD являются лучшая фотостабильность и гораздо более высокая интенсивность сигнала.

NIR-флуоресцентная визуализация с использованием QD705-RGD может помочь дифференцировать интегрин $\alpha\beta 3$ -позитивные опухолевые поражения и нормальные ткани во время операции.

Cy7 RGD

Еще один флуорохром, который был конъюгирован с пептидами RGD - это Cy7. В исследовании Wu Y. et al [35] уровень экспрессии интегрина использовался для оценки антиинтегриновой терапии. Cy7 более глубоко проникал в ткани, чем Cy5.5. Cy5.5, однако, дольше сохранялся в опухоли.

Изобретение гибридной технологии в 70-х гг. позволило создать моноклональные антитела, избирательно воздействующие на клетки злокачественной опухоли. В начале 80-х годов они были объявлены будущими «волшебными пулями» в борьбе с онкологическими заболеваниями [36]. Самыми известными из активно используемых препаратов являются:

Таблица.

Противоопухолевые препараты на основе моноклональных антител

Компания	Препарат	Объект воздействия	Показание к применению	Год выпуска на рынок
Biogen Idec, Genentech, Roche	Ритуксимаб (Rituxan; MabThera)	CD20	Неходжкинская лимфома	1997
Genentech	Трастузумаб (Herceptin)	HER2	Рак молочной железы	1998
Wyeth/UCB	Гемтузумаб (Mylotarg)	CD33	Острая миелоидная лейкемия	2000
ILEX Oncology (сейчас Genzyme), Schering AG	Алеемтузумаб (Mabcampath; Campath)	CD52	Хроническая лимфоцитарная лейкемия	2001
Biogen Idec, Schering AG	Иритумомаб тиуксетан (Zevalin)	CD20	Неходжкинская лимфома	2002
Corixa, GlaxoSmithKline	Тоситумомаб-йод 131 (Bexxar)	CD20	Неходжкинская лимфома	2003
ImClone, Merck KGaA, Bristol-Myers Squibb	Цетуксимаб (Erbix)	Рецептор эпителиального фактора роста (EGFR)	Рак толстой кишки	2003

Genentech, Roche	Бевацизумаб (Avastin)	Сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF)	Рак толстой кишки	2004
------------------	-----------------------	--	-------------------	------

Мишень - EGFR

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) — это онкогенный транс-мембранный рецептор, который сверхэкспрессируется на поверхности раковых клеток человека и может быть выбран в качестве молекулы-мишени.

EGFR играет важную роль в росте опухоли и ассоциируется с более агрессивным течением заболевания. Антитела к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR) были конъюгированы с QD. Эти функционализированные QDs могут идентифицировать специфический биомаркер опухоли головного мозга во время операции. За короткий промежуток времени менее 30 мин клетки, экспрессирующие EGFR в замороженных срезах, были избирательно мечены. Флуоресцентное излучение QDs визуально не уменьшалось при многократном воздействии возбуждающего света, что указывает на отсутствие или минимальное фотообесцвечивание. Флуоресценция QDs была четко обнаружена в клеточной линии U87, которая имеет промежуточный уровень экспрессии EGFR. Было доказано, что количество QDs в введенных клетках зависит от уровня экспрессии мембранного EGFR [37].

Цетуксимаб-IRDye800CW

Человеческое/мышинное химерное моноклональное антитело цетуксимаб, нацеленное на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), было конъюгировано с IRDye800CW [38]. Амплификация EGFR является движущим событием во многих типах рака: немелкоклеточном раке легких, глиобластоме и базальном раке молочной железы.

Цетуксимаб-IRDye800CW был протестирован у трех пациентов с глиобластомой. У двух из них отношение к фону при предоперационной визуализации составило $4,0 \pm 0,5$, тогда как одна опухоль не показала четкого флуоресцентного сигнала (отношение $1,2 \pm 0,3$). Установлено, что флуоресценция является высокочувствительной (73,0% для дозы 50 мг, 98,2% для дозы 100 мг) и специфичной (66,3% для дозы 50 мг, 69,8% для дозы 100 мг) для жизнеспособной опухолевой ткани, в то время как нормальная пери-опухолевая ткань демонстрирует минимальную флуоресценцию.

Панитумумаб-IRDye800CW

Панитумумаб-IRDye800CW представляет собой полностью гуманизированное моноклональное антитело (что снижает вероятность развития антител против панитумумаба) с улучшенными характеристиками связывания EGFR по сравнению с цетуксимабом.

В исследовании пациентов с биопсией плоскоклеточной карциномы головы и шеи показана 95% чувствительность и 89% специфичность для выявления рака в пределах 5 мм ($n = 160$) от поверхности среза. Для обнаружения опухоли в пределах 2 мм от поверхности образца чувствительность оптического картирования образца составляла 100%. Максимальная наблюдаемая глубина проникновения панитумумаб-IRDye800 через ткани человека в исследовании составила 6,3 мм [39]. Побочные эффекты 2 степени тяжести и выше не были выявлены. Панитумумаб-IRDye800CW имеет улучшенный профиль безопасности по сравнению с цетуксимабом-IRDye800CW. Период полураспада, составляющий примерно один день для обоих комплексов антитело-краситель, подходит для инфузии за день до операции [40].

NPs t-BuPITBT-TPE-C225

NPs t-BuPITBT-TPE-C225 – флуоресцентные наночастицы (NPs) на основе флуорофора t-BuPITBT-TPE. Благодаря инкапсуляции t-BuPITBT-TPE с биосовместимым DSPE-PEG и дальнейшему декорированию гуманизированным моноклональным антителом цетуксимабом (C225), полученные T-BuPITBT-TPE-C225 NPs могут быть использованы для таргетной визуализации немелкоклеточных раков легкого с гиперэкспрессии EGFR.

Специфическая таргетная способность NPs t-BuPITBT-TPE-C225 была хорошо подтверждена в эксперименте [41].

Цетуксимаб-OG

Недавно антитело к EGFR (цетуксимаб) конъюгировали с орегоновым зеленым 488 (OG) и использовали для визуализации колоректальных опухолей у мышей SCID. В этом исследовании наблюдалась гетерогенная картина связывания с EGFR опухоли.

Связывание цетуксимаба-OG с EGFR было исследовано *in vitro* в клетках A431, где наблюдалась четкая мембранная локализация.

Клетки A431 демонстрировали высокую экспрессию EGFR, в них наблюдалось четкое связывание цетуксимаба. Клетки T47D демонстрировали ограниченную экспрессию. Связывание с клетками T47D было сопоставимо с фоновыми уровнями.

Клетки U373-vIII(+) показали высокую экспрессию EGFRvIII, связывание с этой клеточной линией было высоким [42].

Цетуксимаб–Cy5.5

Gleysteen JP. et al [43] конъюгировали цетуксимаб с Cy5. 5 и использовали его на мышах SCID в легочной метастатической модели, а также в модели регионарных метастазов в голову и шею. В этом исследовании флуоресценция была успешно подтверждена гистологически у всех мышей. Мыши с метастазами в легкие демонстрировали пятнистый флуоресцентный рисунок на поверхности легких после инъекции цетуксимаба–Cy5.5. Меченное Cy5.5 антитело к EGFR специфически связывается с небольшими островками опухолевых клеток в паренхиме легкого и флуоресцирует, тогда как контрольный IgG–Cy5.5 просто демонстрирует диффузную фоновую флуоресценцию.

Мишень - HER-2

Рецептор HER-2 является членом семейства EGFR и играет важную роль в росте опухоли и прогнозе. EGFR и белок HER-2 экспрессируются в 25-30% опухолей молочной железы и вызывают более агрессивное течение заболевания.

Герцептин - одобренное Управлением по контролю за продуктами и лекарствами гуманизированное антитело к рецептору эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2), широко известно как трастузумаб. Герцептин в настоящее время используется для терапии пациентов с раком молочной железы, у которых наблюдается повышенная экспрессия HER2. Определение HER2/неу-специфической флуоресценции опухоли может иметь значение для ее прогноза [44].

Герцептин + Cy5.5

Флуорохромный зонд Cy5.5, ингибированный с антителами против HER2 вводился мышам, несущим опухоль с разной степенью экспрессией этого белка. Клетки SK-BR-3, сверхэкспрессирующие HER2, показали более интенсивную флуоресценцию in vivo через 16-24 часа, чем клетки PE/CA-PJ34 с умеренной степенью экспрессии белка, что свидетельствует о специфичности зонда.

Герцептин + родамин зеленый

Герцептин, конъюгированный с флуоресцентным красителем родамин зеленый, успешно использовался в качестве зонда для обнаружения метастазов в легкие, экспрессирующих HER2, у мышей через один день после инъекции [45].

Герцептин + Alexa Fluor 750

Hassan M. et al [46] успешно визуализировали сверхэкспрессию HER2 у четырех самок мышей с поверхностным раком молочной железы с помощью конъюгатов Alexa Fluor 750 с трастузамабом (герцептином). Молекулы-мишени возбуждались светом с длиной волны 750 Нм. Эффективная глубина зондирования этих волокон составляла 1-2 мм.

Аффитела + Alexa Fluor

Аффитело имеет молярную массу около 6 кДа, в то время как моноклональное антитело - 150 кДа. Аффитела используются в биохимических исследованиях и разрабатываются как новые потенциальные биофармацевтические препараты. Эти микромолекулы можно использовать для молекулярного распознавания в диагностических и терапевтических целях. В частности, аффитело второго поколения ABY-025 избирательно связывается с рецепторами HER2. Использование аффител находится в стадии клинической разработки для диагностики опухолей. Alexa Fluor был конъюгирован с HER2-специфическими аффителами - мономером ZHER2:342, димером (ZHER2:477)₂ и альбумин-связывающим доменом. Мыши, которым вводили аффитело ABD-(ZHER2:342)₂-Alexa Fluor 750, демонстрировали высокие, интенсивные сигналы вокруг опухоли и в области почек до 8 часов. Накопление сигналов в опухоли становилось очевидным и оставалось интенсивным около 24 часов и достигало пика до 48 часов. После достижения пика сигналы из опухоли постепенно уменьшались и почти исчезали через 72 часа. Период полураспада аффитела ABD-(ZHER2:342)₂-Alexa Fluor 750 составил 45 часов, аффитела ZHER2:342- Alexa Fluor 750 составил 11 часов [47].

Мишень - Альфа-рецептор фолата

Альфа-рецептор фолата (FRa) является перспективной мишенью, поскольку он устойчиво экспрессируется при различных видах карцином эпителиального происхождения, в здоровых тканях экспрессируется на относительно низких уровнях (преимущественно на апикальной мембране эпителиальных клеток, включая фаллопиеву трубу и ткань эндометрия). В результате потери полярности клеток при раке FRa становится легко доступным, что делает его идеальной мишенью. Повышенная экспрессия FRa обнаружена в раках яичников и молочной железы. Более того, экспрессия

не изменяется при химиотерапии, что позволяет использовать эту мишень как в первичных, так и в интервальных циторедуктивных хирургических вмешательствах. Таким образом, при нацеливании на флуоресцентный агент фоновая флуоресценция будет низкой в здоровой ткани [48].

При использовании FRa-EC-17 ограниченное проникновение света и относительно высокий сигнал аутофлуоресценции из богатых коллагеном тканей в этом диапазоне длин волн оказались неоптимальными. Аутофлуоресценция давала ложноположительный результат при раке яичников и затрудняла выделение специфической для рака молочной железы флуоресценции из фонового сигнала [49].

Был также разработан аналогичный флуоресцент OTL-38, обладающий высокой специфичностью и сродством к FRa, который проходил испытание на менингиоме, раке яичников, легких и почек [50].

Мишень - сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF

VEGF индуцирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток сосудов и необходим как для физиологического, так и для патологического ангиогенеза. Фактор активируется во многих опухолях. Бевацизумаб или авастин является синтезированным антителом к VEGF. Бевацизумаб-IRDye800CW - флуоресцентный индикатор ближнего инфракрасного диапазона (NIR), был использован при хирургии рака молочной железы и эндометриоза, при раке поджелудочной железы и холангиокарциноме [51].

Мишень - карциноэмбриональный антиген CEA

Определение уровня ракового эмбрионального антигена используется для диагностики ряда злокачественных опухолей, в первую очередь рака толстой кишки. Кроме того, его уровень повышается при раке желудка, поджелудочной, молочной железы, легких, предстательной железы, яичников, метастазах рака различного происхождения в печень и кости, хотя при последних состояниях чувствительность метода существенно ниже.

SGM-101 нацелен на CEA. Специфичные для опухоли сигналы флуоресценции с наиболее высоким соотношением мишени к фону (in vivo 1·8 и ex vivo 6·1), могут наблюдаться с диагностической точностью 84% при колоректальных опухолях [52]. У пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы флуоресцентная визуализация с использованием SGM-101 из-за наличия плотной стромы результаты были скромными по сравнению с группой колоректального рака (in-vivo 1·6 и ex-vivo 3·2) [53].

Мишень - Карбоангидраза IX (CAIX)

Карбоангидраза IX (CAIX) – медиатор гипоксия-индуцированного стрессового ответа в раковых клетках. Гипоксия обусловлена неспособностью сосудистой системы опухоли адекватно реагировать на повышенные потребности в кислороде растущего новообразования. В таких условиях клетки карцином прибегают к сигнальному каскаду с участием HIF-1/2, что приводит к резкому повышению CAIX. CAIX способствует поддержанию внутриклеточного pH, благоприятного для выживания и роста опухолевых клеток, участвует в формировании более кислой внеклеточной среды. Ингибирование ферментативной активности CAIX приводит к снижению выживаемости, миграции и инвазии клеток карцином [54].

Моноклональное антитело гирентуксимаб-IRDye800CW, связанное с индием 111 (111In) успешно использовали для визуализации светлоклеточного почечно-клеточного рака, в котором сверхэкспрессируется карбоангидраза IX (среднее отношение цели к фону 2:5). У пациентов не было серьезных побочных эффектов, вызванных гирентуксимабом [55]. В настоящее время для хирургии почечно-клеточного рака под визуальным контролем идеальным считается Индий-111-DOTA-гирентуксимаб-IRDye800CW - антитело с двойной меткой.

Мишень - Гастрин-релизинг пептид (GRP)

Гастрин-релизинг пептид (GRP) регулирует многочисленные функции желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы. Эффекты GRP опосредуются через гастрин-релизинг пептидный рецептор GRPR. Рецептор aberrантно экспрессируется при многочисленных раковых заболеваниях, таких как рак легких, толстой кишки и предстательной железы.

68Ga-меченное пептидное производное бомбезина NOTA-Aca-BBN (68Ga-BBN) специфически нацелен на GRPR в глиомах с высоким отношением опухоли к фону [56]. 68Ga-BBN был конъюгирован с IRDye800CW - флуорофором ближнего инфракрасного диапазона, чтобы сформировать 68Ga-IRDye800CW-BBN ПЭТ/NIR - визуализационный индикатор двойной модальности. Препарат также нацелен на гастрин-высвобождающий пептидный рецептор (GRPR).

Первое исследование было проведено на пациентах с глиобластомой с предоперационной оценкой ПЭТ. Исследование у 14 больных со злокачественной глиомой продемонстрировало отличную корреляцию между дооперационным

поглощением препарата (ПЭТ-КТ) и интраоперационным сигналом ближнего инфракрасного диапазона. Сигналы флуоресценции опухоли были значительно выше, чем сигналы от соседних тканей мозга *in vivo* и *ex vivo*. Чувствительность составила 93,9%, а специфичность - 100% [57].

Мишень - EpCAM

Молекула адгезии эпителиальных клеток (EpCAM) – это трансмембранный гликопротеин, высоко экспрессирующийся при новообразованиях эпителия и на более низких уровнях - в нормальном эпителии. При раке желудка сверхэкспрессия EpCAM нарушает межклеточный контакт, обеспечивая клеточную миграцию, необходимую для метастазирования. Этот белок был использован в качестве диагностического/прогностического маркера и терапевтической мишени [58].

Конъюгированные полимерные наночастицы (CPNs), модифицированные антителом к EpCAM и белком-активатором транскрипции (Tat), находящимся в цитоплазме клеток MCF-7, могут не только распознавать опухолевые клетки рака молочной железы (MCF-7) и локализоваться на мембране, но и частично проникать в цитоплазму. На основе способности продуцировать активные формы кислорода (ROS) при облучении белым светом многофункциональные CPNs могут эффективно нацеливаться, ингибировать и убивать опухолевые клетки при фотодинамической терапии [59].

Мишень - поло-подобная киназа 1 (PLK1)

Среди четырех известных PLK человека наиболее изучена Поло-подобная киназа 1 (PLK1). Ее сверхэкспрессия происходит в тканях с высоким пролиферативным потенциалом, например в плаценте, эндометрии, опухолях (в отличие от дифференцированных клеток), и коррелирует с агрессивностью и прогнозом многих типов злокачественных новообразований. Ингибирование PLK1 вызывает остановку митоза и апоптоз *in vivo* в опухолевых моделях и таким образом подавление роста и регрессию новообразования. Терапия рака ингибитором PLK1 приводит к нарушению сборки и созревания веретена деления и, как следствие, к остановке митоза и индукции апоптоза.

Создан флуоресцентный визуализатор с производным кумарина в качестве флуорофора и SBE13 - ингибитора PLK1. Этот зонд биосовместим, и интенсивность флуоресценции в клетках положительно коррелирует с уровнем PLK1 [60].

Мишень – рецептор клеточных линий ASGP

Рецептор клеточных линий ASGP – трансмембранный белок, который играет критическую роль в гомеостазе сывороточных гликопротеинов, опосредуя эндоцитоз и лизосомную деградацию гликопротеинов. Играет роль в связывании углеводов, гомодимеризации белка, получении асиалогликопротеина и доставки асиалогликопротеина в клетку посредством эндоцитоза. Исследовательская группа Sharma A. et al [61] разработала новую систему тераностики на основе малых молекул, которая преимущественно поглощается клетками рака толстой кишки через рецептор-опосредованный эндоцитоз. Тераностическое пролекарство Gal-Dox (нацелен на рецептор клеточных линий ASGP) состоит из β -галактозидазы и доксорубина, преимущественно ассимилируется раковыми клетками толстой кишки через рецептор-опосредованный эндоцитоз. β -галактозидаза – вид лизосомального фермента, который участвует в различных подтипах рака, включая рак печени, легких и яичников. После специфической для рака активации активный препарат Dox (доксорубин) высвобождается с реакцией включения флуоресценции, что позволяет контролировать как локализацию препарата, так и место его воздействия.

Мишень - uPAR

Рецептор активатора урокиназы плазминогена (uPAR) является мишенью для флуоресцентной молекулярной визуализации при глиобластоме. CH1055-4Glu-AE105 – флуоресцентный зонд NIR-II включает флуорофор NIR-II – CH1055 и пептид-мишень uPAR – AE105. Синтезированный зонд CH1055-4Glu-AE105 визуализирует глиобластому у живых мышей с отношением опухоли к фону 2,7, достигающим максимума через 96 часов. Флуоресцентная визуализация во втором окне ближнего инфракрасного диапазона (NIR-II) превосходит традиционную визуализацию NIR-I с лучшим проникновением в ткани, более высоким пространственным и временным разрешением и меньшим количеством автофлуоресценции [62].

Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является эффективным методом с неинвазивной и высокой пространственно-временной точностью при различных злокачественных опухолях. Она включает в себя применение фотосенсибилизаторов, накапливающихся в патологических тканях, которые поглощают свет соответствующей длины волны, инициируя процессы активации, ведущие к селективному разрушению атипичных клеток, генерируя цитотоксически активные формы кислорода, например синглетный кислород $^1O_2$. В конечном счете, опухоль разрушается с помощью многофакторных механизмов.

Механизмы фотодинамической реакции

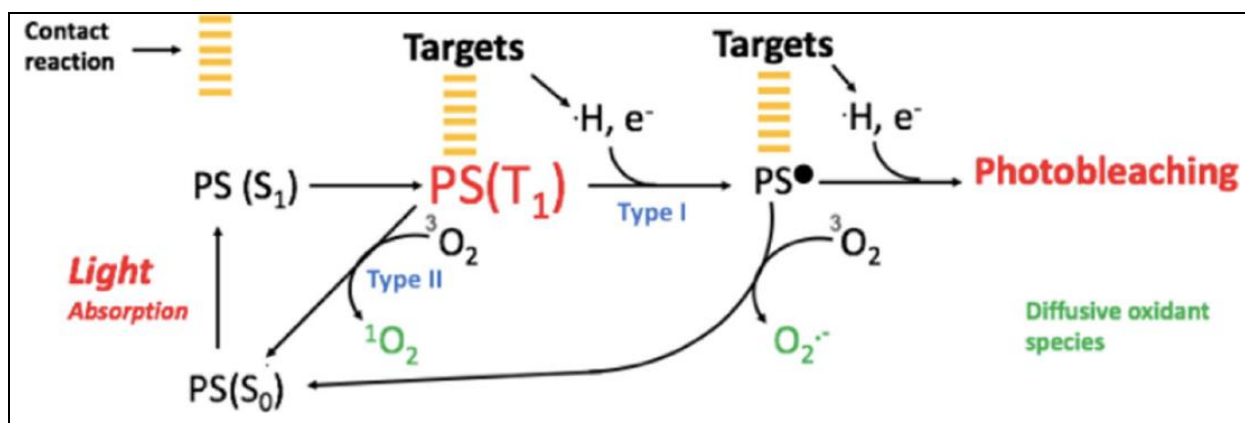
Фотосенсибилизатор попадает в клетку и облучается светом с необходимой длиной волны (совпадающей с длиной волны, поглощаемой фотосенсибилизатором). Фотосенсибилизатор преобразуется из синглетного основного энергетического состояния S^0 в возбужденное синглетное состояние $S1$ из-за поглощения фотона. Часть энергии излучается в виде кванта флуоресценции, а оставшаяся энергия направляет молекулу фотосенсибилизатора в возбужденное триплетное состояние $T1$ - правильную терапевтическую форму соединения.

Tun I

1. В возбужденном триплетном состоянии $T1$ фотосенсибилизатор может передавать энергию биомолекулам из своего окружения. Между фотосенсибилизатором в состоянии $T1$ и опухолевым субстратом передается водород или электрон, что приводит к образованию свободных радикалов и анион-радикалов фотосенсибилизатора и субстрата.
2. Электроны взаимодействуют с молекулами кислорода, которые были в своем основном энергетическом состоянии. Этот процесс приводит к производству реактивного кислорода (ROS) изначально в виде супероксид-анион-радикала, что способствует дальнейшему образованию ROS внутри клеток.
3. Каскад реакций приводит к окислительному стрессу и разрушению атипичных клеток.

Tun II

1. В результате перехода фотосенсибилизатора в состояние $T1$, энергия передается непосредственно молекуле кислорода в основном энергетическом состоянии. Прямая передача энергии между молекулами фотосенсибилизатора $\rightarrow O_2$ возможна, потому что они имеют одинаковые спины.
2. Таким образом образуются возбужденные частицы кислорода - так называемый синглетный кислород $^1O_2$, который обладает чрезвычайно сильными окислительными свойствами. Высокоактивные формы кислорода вызывают фотоповреждение белков, жиров и других молекул в фотосенсибилизированной зоне. Это приводит к прямой гибели опухолевых клеток.



Механизмы фотосенсибилизации.

PS - фотосенсибилизатор поглощает энергию света и переходит из основного состояния PS (S_0) в синглетное PS (S_1) и триплетное состояния PS (T_1).

В этот момент PS(T_1) может реагировать с биомолекулами, такими как белки или липиды (мишени), посредством фотохимической реакции типа I, приводя к образованию радикалов, таких как $PS^\bullet$, способных инициировать радикальные цепные реакции.

В противном случае PS (T_1) может вступать в реакцию с молекулярным кислородом $^3O_2$ посредством фотохимической реакции типа II.

При этом образуются радикальный супероксид $O_2^\bullet$ - синглетный кислород $^1O_2$, способный продлить повреждение опухоли.

Ferreira A., Raquel D., Ferreira L. Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. J Cancer Metastasis Treat. 2019;5:25.

Большинство органических соединений находится в основном синглетном состоянии. Однако, молекулы кислорода характеризуются триплетным состоянием в основной форме и переходом в синглетное состояние при возбуждении. В связи с этим возбужденные частицы фотосенсибилизатора не повреждают структуры органических клеток и реагируют только с молекулами кислорода, растворенными в цитоплазме.

Предполагается, что механизм II типа является важнейшим процессом, определяющим эффективность фотодинамической терапии. Тем не менее, соотношение вклада обоих механизмов зависит от многих факторов, включая: концентрацию кислорода, диэлектрическую проницаемость тканей, pH и структуру фотосенсибилизатора. По мере того, как кислород заканчивается, начинает преобладать первый тип механизма.

Фотодинамическая терапия влияет на сосудистую систему опухоли и стимулирует иммунную систему. Раковые клетки, избежавшие гибели от прямого фотоцитотоксического действия, могут быть уничтожены косвенным влиянием ФДТ на кровеносные сосуды опухоли. Эндотелиальные клетки активируют процессы свертывания, агрегируют тромбоциты и блокируют сосуды за счет образования тромбов. Окклюзия сосудов, стойкая гипоксия опухолевой ткани приводит к гибели клеток. ФДТ разрушает структуру опухоли и тем самым стимулирует взаимодействие между иммунными и атипичными клетками. Прямое разрушение опухоли приводит к развитию воспалительной реакции и инфильтрации лейкоцитами. Фотоповреждения мембран приводят к активации фосфолипаз, а затем циклооксигеназ, вызывая массивное высвобождение медиаторов воспаления - продуктов гидролиза липидов и метаболитов арахидоновой кислоты. Фотоповреждение стенок кровеносных сосудов привлекает нейтрофилы и макрофаги. Дегрануляция нейтрофилов, а также высвобождение лизосомальных ферментов и хемотаксических факторов дополнительно способствуют разрушению опухолевой ткани, усугубляя процесс, инициированный ранее облучением.

Одним из трех важнейших элементов фотодинамической терапии, помимо света и кислорода, является наличие фотосенсибилизаторов. Это вещества, способные поглощать свет с определенной длиной волны, вызывая фотохимические или фотофизические реакции. Можно выделить набор характеристик и условий, характеризующих идеальный фотосенсибилизатор:

- высокая степень химической чистоты;
- стабильность при комнатной температуре;
- фоточувствительный эффект только в присутствии определенной длины волны;
- высокая фотохимическая реактивность;
- максимальное поглощение света должно быть на длинах волн от 600 Нм до 800 Нм. Поглощение света при длине волны свыше 800 Нм не обеспечивает достаточной энергии для стимуляции кислорода в его синглетном состоянии и выработки других активных форм кислорода;
- минимум поглощения в диапазоне от 400 Нм до 600 Нм. Это предотвращает возможную чрезмерную светочувствительность, вызванную солнечным светом;

- полосы поглощения не должны перекрывать полосу поглощения других веществ в организме, включая эндогенные красители, такие как мелатонин, гемоглобин или оксигемоглобин;

- минимальная цитотоксичность в темноте;

- легкая растворимость в тканях организма;

- высокая селективность в отношении опухолевых тканей;

- фотосенсибилизатор должен медленно удаляться из пораженных участков, оставаться там не менее нескольких часов, но при этом быстро выводиться из здоровых тканей; сводя к минимуму фототоксические побочные эффекты терапии;

- недорогой, простой синтез и доступность.

Кроме того, длина волны флуоресцентного света также играет роль в автофлуоресценции. Автофлуоресценция - это флуоресценция, возникающая из внутренних компонентов ткани после возбуждения ультрафиолетовым светом, видимым или NIR-излучением подходящей длины волны. Обнаружение опухоли возможно лишь в том случае, когда сигнал специфической для мишени флуоресценции значительно выше, чем автофлуоресценция. Возникновение аутофлуоресценции определяется типом ткани и длиной волны возбуждения.

Фотосенсибилизаторы 1-го поколения

Порфиновая смесь под названием "производное гематопорфирина" (HrD) была получена путем очистки и химической модификации гемопорфирина (Hr), используемого в качестве фотосенсибилизатора. HrD по сравнению с Hr показал лучшую селективность для опухолей и меньший фотосенсибилизирующий потенциал на коже. Впоследствии смесь димеров порфирина и олигомеров, выделенных из HrD, была доступна под торговым названием Photofrin [63].

В настоящее время наиболее часто используемыми фотосенсибилизаторами 1 поколения являются фотофрин (порфимер натрия), фотохлор (HPPH) и эндогенный протопорфирин IX (PrIX), где клеточный синтез протопорфирина стимулируется применением его метаболического предшественника 5-аминолевулиновой кислоты (5-ALA). Все эти соединения могут обеспечить селективную и длительную противоопухолевую фотодинамику, но каждый из них обладает набором различных фотофизических и фармакологических свойств. Поскольку системная нагрузка PrIX

обычно незначительна после применения 5-ALA (5-АЛК), только на относительно небольшом участке кожи пациента циркулирующие уровни PpIX достигают предела обнаружения прибором в течение одного-двух дней [64].

Недостатки фотосенсибилизаторов 1 поколения

- низкая химическая чистота (представляет собой смесь более 60 молекул);
- плохое проникновение в ткани из-за максимального поглощения на относительно короткой длине волны-630 Нм;
- после фотодинамической терапии фотофрином образуется повышенная чувствительность кожи к свету в течение нескольких недель из-за длительного периода полураспада и его высокого накопления в коже.

Недостатки фотосенсибилизаторов первого поколения обусловили необходимость исследования новых соединений и положили начало разработке фотосенсибилизаторов второго поколения.

Фотосенсибилизаторы 2-го поколения

В настоящее время в группу фотосенсибилизаторов второго поколения входят производные гематопорфирина и синтетические фотосенсибилизаторы: 5-аминолевулиновая кислота, производные бензопорфирина, тексафирины, производные тиопурина, хлорин, аналоги бактериохлорина и фталоцианины.

Важным открытием оказалось применение 5 - аминолевулиновой кислоты (5-АЛК) - предшественника протопорфирина IX. Молекула-предшественник пути синтеза гемоглобина, 5-ALA (5-АЛК) катализирует образование и накопление соединения протопорфирина IX (PpIX) в опухолях. Этот фотосенсибилизатор успешно используется для интраоперационной нейронавигации злокачественных глиом [65]. Но доброкачественные глиомы плохо выявляются.

В настоящее время ведутся разработки по усовершенствованию фотосенсибилизаторов 2 поколения с использованием аналогов пурпуринимида (PPI), кетобактериохлоринов, бензохлоринов, бензобактериохлоринов для фотодинамической терапии [66, 67, 68].

Фотосенсибилизаторы 2 поколения отличаются более высокими химической чистотой и выходом синглетного кислорода, лучшим проникновением в глубоко расположенные ткани за счет их максимального поглощения в диапазоне длин волн 650-

800 Нм; демонстрируют меньшее количество побочных эффектов, что является результатом более высокой селективности в отношении опухоли и более быстрого выведения фотосенсибилизатора из организма. К их недостаткам относят плохую растворимость в воде.

Фотосенсибилизаторы 3-го поколения

Разработка фотосенсибилизаторов третьего поколения основана на синтезе веществ с более высоким сродством к опухолевой ткани, что уменьшает повреждение окружающих, здоровых тканей. С целью повышения селективности препарата используются следующие модификации фотодинамической терапии:

- комбинации фотосенсибилизаторов второго поколения с молекулами, сфокусированными на целевом рецепторе
- комбинации фотосенсибилизаторов с липопротеидами низкой плотности
- конъюгация фотосенсибилизатора с моноклональным антителом, направленным на специфический антиген раковой клетки
- использование поверхностных маркеров опухоли, таких как рецепторы фактора роста, рецепторы трансферрина или гормоны (например, инсулин).

Эти соединения дают возможность снизить дозы препарата при сохранении удовлетворительного терапевтического эффекта.

Конъюгация с сахарами

Разработаны конъюгаты пиррофторбид РРІ и НРРН с различным количеством сахаридов. Есть надежда, что эти конъюгаты будут нацелены на углеводсвязывающие молекулы, такие как галектин-1 и галектин-3, которые, как известно, дифференцированно экспрессируются на поверхности многих опухолевых клеток [69]. Пиррофторбид 2-дезоксиглюкозамид (Руго2DG) избирательно накапливается в опухолях. В результате сравнительных исследований *in vitro/in vivo* ряда позиционных изомеров конъюгатов лактозы-РРІ было обнаружено, что углеводные конъюгаты проявляют более высокое сродство к связыванию, чем соответствующие не конъюгированные РРІ, а эффективность ФДТ демонстрирует заметную разницу в зависимости от положения углеводной части. Среди этих конъюгатов конъюгат, содержащий лактозную часть в трехпозиционной системе РРІ оказался наиболее эффективным [70]. Среди синтезированных углеводных

конъюгатов HPPH-Gal проявлял повышенную противоопухолевую активность по сравнению с HPPH [71].

Конъюгация с пептидами и белками

Stefflova K. et al [72] конъюгировали фолат с пиррофеофорбидом с пептидным линкером (Pyro-peptide-Folate, PPF) или без него и изучали их накопление у мышей, несущих сверхэкспрессирующие или неэкспрессирующие фолатные раковые клетки соответственно. Было обнаружено, что конъюгат с пептидным линкером, по сравнению с конъюгатом без пептидного линкера, имеет тенденцию специфически накапливаться в фолатных рецепторах.

Подобно сахаридам и пептидам, белки могут быть конъюгированы с фотосенсибилизаторами. Себ был конъюгирован с субъединицей Шига-подобного токсина В (SLTB) для нацеливания на гликофинголипидный рецептор клеточной поверхности Gb3, что привело к усилению фотодинамического разрушения раковых клеток *in vitro* в 10 раз по сравнению с хлорином е6. SLTB - это пентамер, состоящий из 5 идентичных субъединиц, который связывается с гликофинголипидным рецептором клеточной поверхности, глоботриаозилцерамидом. Gb3SLTB проникают в клетку через рецептор-опосредованный эндоцитоз, а затем перемещаются к аппарату Гольджи и к эндоплазматическому ретикулуму. Экспрессия Gb3 усиливается при некоторых видах рака, особенно при карциномах яичников и лимфомах Беркитта, что делает SLTB потенциальным средством доставки лекарств в эти опухоли [73].

Конъюгация с липопотеидами низкой плотности (ЛПНП)

Липопотеиды низкой плотности (ЛПНП) участвуют в создании мембран. Стремительно делящиеся раковые клетки демонстрируют их повышенное поглощение. Сродство фотосенсибилизаторов с липопотеинами сыворотки крови играет важную роль в доставке этих препаратов в опухолевую ткань. Синтезирован пиррофеофорбидный конъюгат олеата холестерина, который служит двойным якорем для липидного ядра ЛПНП. Доказано, что конъюгат красителя накапливался в эндосомах или лизосомах атипичных клеток [74].

Модификации фотодинамической терапии

Сочетание фотосенсибилизаторов с наноматериалами позволяет повысить эффективность фотодинамической терапии, а также устранить ее побочные эффекты. Большинство фотосенсибилизаторов - высокогидрофобные вещества, которые

агрегируются в водной среде. Процесс агрегации снижает эффективность фотодинамической терапии. Фотосенсибилизаторы должны оставаться в мономерной форме, чтобы быть фотоактивными. Поддержание такой конфигурации возможно благодаря конъюгации фотосенсибилизаторов с наночастицами.

Использование полимерных наночастиц, например мицелл, в фотодинамической терапии позволяет целенаправленно доставлять большее количество молекул фотосенсибилизатора в область опухоли и предотвращает деградацию фотосенсибилизатора до достижения целевой опухолевой ткани. Кроме того, использование полимеров позволяет одновременно присоединять дополнительные лиганды к молекулам фотосенсибилизатора, например контрастные вещества или флуоресцентные маркеры.

KE108 - это синтетический нанопептид пансоматостатина, который может быть использован в качестве лиганда, нацеленного на нейроэндокринную опухоль. Таргетный лиганд KE108 увеличивает клеточное поглощение мицеллы *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, быстрое высвобождение препарата, вызванное светом NIR, в опухолевых областях обеспечивает генерацию $^1O_2$ для терапии опухолей.

Тераностическая мицелла на основе многофункциональных преобразованных наночастиц (UCNP) предназначена для таргетной и ближней инфракрасной (NIR) комбинированной химиотерапии и фотодинамической терапии. Мицелла образуется UCNP, функционализированными светочувствительными амфифильными блок-сополимерами PNBMA-PEG и фотосенсибилизаторами розовой Бенгалии (RB). Гидрофобный противоопухолевый препарат АВЗ загружается в мицеллы. Активированные NIR UCNP излучают несколько полос люминесценции, включая ультрафиолетовый диапазон, 540 Нм и 650 Нм. Молекулы RB активируются с помощью люминесцентного резонансного переноса энергии для генерации $^1O_2$. Между тем, излучение 650 Нм позволяет получить эффективную флуоресцентную визуализацию [75]. Внутривенно вводимые мицеллы на основе UCNP, нагруженные АВЗ, конъюгированные с RB и KE108, позволяют проводить таргетную комбинированную химио-фотодинамическую терапию.

Исследование молекул мезо-тетра-4-гидроксифенилпорфирина в сочетании с молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ) показало, что образующийся комплекс улучшает растворимость остатков порфирина и снижает их агрегацию в водной среде. Полиакриламид - еще один полимер, препятствующий агрегации фотосенсибилизаторов.

Это нетоксичное вещество, которое может вводиться системно благодаря своим высоко растворимым в воде свойствам. Полиакриламид можно использовать с фотосенсибилизаторами: метиленовым синим и порфиринами. Другой полимер с доказанной эффективностью 2-гидроксипропилметакриламид (HPMA) был эффективно использован при лечении нейробластомы и рака яичников человека *in vitro*.

Таким образом, активное внедрение флуоресцентной интраоперационной навигации и фотодинамической терапии в каждодневную врачебную практику позволит повысить выживаемость и качество жизни онкологических больных.

Список литературы

1. Hernot S., van Manen L., Debie P., et al. Latest developments in molecular tracers for fluorescence image-guided cancer surgery // *The Lancet Oncology*. – 2019. – Vol. 20. – №. 7. – P. e354–e367. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30317-1
2. Dazhuang X., Lei L., Chengchao C., et al. Advances and perspectives in near-infrared fluorescent organic probes for surgical oncology // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2020. – Vol. 12. – №. 5. – P. E1635. <https://doi.org/10.1002/wnan.1635>
3. Juarranz A., Jaen P., Sanz-Rodriguez F., Cuevas J., Gonzalez S. Photodynamic therapy of cancer: basic principles and applications. applications // *Clinical and Translational Oncology*. – 2008. – Vol. 10. – №. 3. – P. 148–154. doi: 10.1007/s12094-008-0172-2
4. Tampa M., Sarbu M., Matei C. et al. Photodynamic therapy: a hot topic in dermatology-oncology. // *Oncology letters*. – 2019. – Vol. 17. – №. 5. – P. 4085–4093. doi: 10.3892/ol.2019.9939
5. Kwiatkowska S., Knap B., Przystupski D., et al. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 106. – P. 1098–1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049
6. Peterson J.D. Non-Invasive Quantitative In Vivo Imaging of Atherosclerosis Disease Progression and Treatment Response in ApoE Deficient Mice using Fluorescence Molecular Tomography and NIR Fluorescent Pre-clinical Imaging Agents. [Электронный ресурс] // PerkinElmer, Inc – URL: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_009971_01%20Atherosclerosis_ProSense750_FMT.pdf
7. Shen Y., Sun Y., Yan R., et al Rational engineering of semiconductor QDs enabling remarkable O-1(2) production for tumor-targeted photodynamic therapy // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 148. – P. 31–40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.026
8. Te Velde E.A., Veerman Th., Subramaniam V., Ruers Th. The use of fluorescent dyes and probes in surgical oncology // *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. – 2010. – Vol. 36. – №. 1. – P. 6–15. doi:10.1016/j.ejso.2009.10.014
9. Alander J.T., Kaartinen I., Laakso A. et al. A Review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery // *International Journal of Biomedical Imaging*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 940585. doi: 10.1155/2012/940585

10. Ogata F., Azuma R., Kikuchi M. et al. Novel lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling // *Annals of plastic surgery*. – 2007. – Vol. 58. – №. 6. – P. 652– 655. doi: 10.1097/01.sap.0000250896.42800.a2
11. Motomura K., Inaji H., Komoike Y. et al. Sentinel node biopsy guided by indocyanin green dye in breast cancer patients // *Japanese Journal of Clinical Oncology*. – 1999. – Vol. 29. – №. 12. – P. 604– 607. doi: 10.1093/jjco/29.12.604
12. Kitai T., Inomoto T., Miwa M., Shikayama T. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer // *Breast cancer*. – 2005. – Vol. 12. – №. 3. – P. 211–215. doi: 10.2325/jbcs.12.211.
13. Ohnishi S., Lomnes S.J., Laurence R.G. et al. Organic alternatives to quantum dots for intraoperative near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping // *Molecular Imaging*. – 2005. – Vol. 4. – №. 3. – P. 172–181. doi.org/10.1162/15353500200505127
14. Klein Jan G.H., van Werkhoven E., van den Berg N.S. et al. The best of both worlds: a hybrid approach for optimal pre-and intraoperative identification of sentinel lymph nodes // *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. – 2018. – Vol. 45. – №. 11. – P. 1915–1925. doi: 10.1007/s00259-018-4028-x
15. Unkart J.T., Chen S.L., Wapnir I.L., Gonzalez J.E., Harootunian A., Wallace A.M. Intraoperative tumor detection using a ratiometric activatable fluorescent peptide: a first-in-human phase 1 study // *Annals of surgical oncology*. – 2017. – Vol. 24. – №. 11. – P. 3167–3173. doi: 10.1245/s10434-017-5991-3
16. Shen Y., Sun Y., Yan R., et al. Rational engineering of semiconductor QDs enabling remarkable 1O₂ production for tumor-targeted photodynamic therapy // *Biomaterials*. – 2017. – Vol. 148. – P. 31– 40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.026
17. Zhang Z., Li H., Liu Q. et al. Metabolic imaging of tumors using intrinsic and extrinsic fluorescent markers // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2004. – Vol. 20. – №. 3. – P. 643–650. doi: 10.1016/j.bios.2004.03.034.
18. Cheng Z., Levi J., Xiong Z., Gheysens O., Keren S., Chen X., Gambhir S.S. Near-infrared fluorescent deoxyglucose analogue for tumor optical imaging in cell culture and living mice // *Bioconjugate chemistry*. – 2006. – Vol. 17. – №. 3. – P. 662–669. doi:10.1021/bc050345c
19. Josephson L., Mahmood U., Wunderbaldinger P. et al. Pan and Sentinel Lymph Node Visualization Using a Near-Infrared Fluorescent Probe // *Molecular imaging*. – 2003. – Vol. 2. – №. 1. – P. 18–23. doi: 10.1162/153535003765276255
20. Figueiredo J.-L., Alencar H., Weissleder R., Mahmood U. Near infrared thoracoscopy of tumoral protease activity for improved detection of peripheral lung cancer // *International journal of cancer*. – 2006. – Vol. 118. – №. 11. – P. 2672–2677. doi:10.1002/ijc.21713
21. Jaffer F.A., Libby P., Weissleder R. Molecular imaging of cardiovascular disease // *Circulation*. – 2007. – Vol. 116. – №. 9. – P. 1052–1061. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.647164>
22. Choi Y., Weissleder R., Tung C.H. Selective antitumor effect of novel protease-mediated photodynamic agent // *Cancer research*. – 2006. – Vol. 66. – №. 14. – P. 7225–7229. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0448.

23. Leary S., Blatt J.E., Cohen A.R. et al. A phase II/III randomized, blinded study of tozuleristide for fluorescence imaging detection during neurosurgical resection of pediatric primary central nervous system (CNS) tumors: PNOC012 (Pacific Pediatric Neuro-oncology Consortium) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 38. – №.15. suppl. – P. TPS2575.
24. Dintzis S.M., Hansen S., Harrington K.M. et al. Real-time visualization of breast carcinoma in pathology specimens from patients receiving fluorescent tumor-marking agent tozuleristide // *Archives of pathology & laboratory medicine*. – 2019. – Vol. 143. – №. 9. – P. 1076–1083. doi:10.5858/arpa.2018-0197-OA.
25. Lyons S.A., O'Neal J., Sontheimer H. Chlorotoxin, a scorpion-derived peptide, specifically binds to gliomas and tumors of neuroectodermal origin // *Glia*. – 2002. – Vol. 39. – №. 2. – P. 162–173. doi: 10.1002/glia.10083.
26. Fidel J., Kennedy K., Dernell W. et al. Preclinical validation of the utility of BLZ-100 in providing fluorescence contrast for imaging spontaneous solid tumors // *Cancer research*. – 2015. – Vol. 75. – №. 20. – P. 4283–4291. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0471
27. Deshane J., Garner C.C., Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2 // *Journal of biological chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – №. 6. – P. 4135–4144. doi: 10.1074/jbc.M205662200
28. Veisheh M., Gabikian P., Bahrami S.B. et al. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5. 5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci // *Cancer research*. – 2007. – Vol. 67. – №. 14. – P. 6882–6888. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3948
29. Kesavan K., Ratliff J., Johnson E.W. et al. Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – №. 7. – P. 4366–4374. doi:10.1074/jbc.M109.066092
30. Liu Z., Wang F., Chen X. Integrin $\alpha\beta 3$ -targeted cancer therapy // *Drug development research*. – 2008. – Vol. 69. – №. 6. – P. 329–339. doi: 10.1002/ddr.20265
31. Huang C., Chu C., Wang X. et al. Ultra-high loading of sinoporphyrin sodium in ferritin for single-wave motivated photothermal and photodynamic co-therapy // *Biomaterials science*. – 2017. – Vol. 5. – №. 8. – P. 1512–1516. doi:10.1039/c7bm00302a
32. Wang W., Ke S., Wu Q. et al. Near-infrared optical imaging of integrin $\alpha\beta 3$ in human tumor xenografts // *Molecular Imaging*. – 2004. – Vol. 3. – №. 4. – P. 343–351. doi: 10.1162/1535350042973481
33. Chen X., Conti P.S., Moats R.A. In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha\beta 3$ in brain tumor xenografts // *Cancer research*. – 2004. – Vol. 64. – №. 21. – P. 8009–8014. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1956
34. Cai W., Shin D.-W., Chen K. et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects // *Nano letters*. – 2006. – Vol. 6. – №. 4. – P. 669–676. doi:10.1021/nl052405t
35. Wu Y., Cai W., Chen X. Near-infrared fluorescence imaging of tumor integrin $\alpha\beta 3$ expression with Cy7-labeled RGD multimers // *Molecular Imaging and Biology*. – 2006. – Vol. 8. – №. 4. – P. 226–236. doi: 10.1007/s11307-006-0041-8

36. Тахира А. «Волшебные пули»: моноклональные антитела в онкологии. [Электронный ресурс] // Провизор. – 2005. – № 17. – URL: www.provisor.com.ua/archive/2005/N17/art_19.php
37. Wang J., Yong W.H., Sun Y. et al. Receptor-targeted quantum dots: fluorescent probes for brain tumor diagnosis // *Journal of Biomedical Optics*. – 2007. – Vol. 12. – №. 4. – P. 044021. doi:10.1117/1.2764463
38. Miller S.E., Tummers W.S., Teraphongphom N. et al. First-in-human intraoperative near-infrared fluorescence imaging of glioblastoma using cetuximab-IRDye800 // *Journal of neuro-oncology*. – 2018. – Vol. 139. – №. 1. – P. 135–143. doi: 10.1007/s11060-018-2854-0.
39. Gao R.W., Teraphongphom N.T., van den Berg N.S. et al. Determination of tumor margins with surgical specimen mapping using near-infrared fluorescence // *Cancer research*. – 2018. – Vol. 78. – №. 17. – P. 5144–5154. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0878
40. Gao R.W., Teraphongphom N., de Boer E. et al. Safety of panitumumab-IRDye800CW and cetuximab-IRDye800CW for Fluorescence-Guided Surgical Navigation in Head and Neck Cancers // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8. – №. 9. – P. 2488–2495. doi:10.2967/jnumed.118.222810.
41. Gao M., Su H., Lin G., Li S. et al. Targeted imaging of EGFR overexpressed cancer cells by brightly fluorescent nanoparticles conjugated with cetuximab // *Nanoscale*. – 2016. – Vol. 8. – №. 32. – P. 15027–15032. doi:10.1039/c6nr04439e
42. Aerts H.J.W.L., Dubois L., Hackeng T. M. et al. Development and evaluation of a cetuximab-based imaging probe to target EGFR and EGFRvIII // *Radiotherapy and oncology*. – 2007. – Vol. 83. – №. 3. – P. 326–332. doi:10.1016/j.radonc.2007.04.030
43. Gleysteen J.P., Newman J.R., Chhieng D. et al. Fluorescent labeled anti-EGFR antibody for identification of regional and distant metastasis in a preclinical xenograft model // *Head & neck*. – 2008. – Vol. 30. – №. 6. – P. 782–789. doi:10.1002/hed.20782
44. Hilger I., Leistner Y., Berndt A. et al. Near-infrared fluorescence imaging of HER-2 protein over-expression in tumour cells // *European radiology*. – 2004. – Vol. 14. – №. 6. – P. 1124–1129. doi:10.1007/s00330-004-2257-9
45. Koyama Y., Hama Y., Urano Y. et al. Spectral fluorescence molecular imaging of lung metastases targeting HER2/neu // *Clinical cancer research*. – 2007. – Vol. 13. – №. 10. – P. 2936–2945. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-2240
46. Hassan M., Riley J., Chernomordik V. Fluorescence Lifetime Imaging System for In Vivo Studies // *Molecular Imaging*. – 2007. – Vol. 6. – №. 4. – P. 229–236. doi:10.2310/7290.2007.00019
47. Lee S.B., Hassan M., Fisher R. Affibody molecules for in vivo characterization of HER2-positive tumors by near-infrared imaging // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14. – №. 12. – P. 3840–3849. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-4076
48. Hoogstins C.E., Tummers Q.R.J.G, Gaarenstroom K.N. et al. A novel tumor-specific agent for intraoperative near-infrared fluorescence imaging: a translational study in healthy volunteers and patients with ovarian cancer // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – №. 12. – P. 2929–2938. doi: 10.1158/1078-0432

49. Tummers Q.R.J.G., Hoogstins C.E., Gaarenstroom K.N. et al. Intraoperative imaging of folate receptor alpha positive ovarian and breast cancer using the tumor specific agent EC17 // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – №. 22. – P. 32144–32155. doi: 10.18632/oncotarget.8282
50. Scaranti M., Cojocaru E., Banerjee S., Banerji U. Exploiting the folate receptor α in oncology // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2020. Vol.17. - №. 6. – P. 349-359. doi: 10.1038/s41571-020-0339-5. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32152484.
51. Harlaar N.J., Koller M., de Jongh S.J. et al. Molecular fluorescence-guided surgery of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a single-centre feasibility study // *Lancet Gastroenterol Hepatol*. - 2016. – Vol.1. – P. 283–90. DOI: 10.1016/S2468-1253(16)30082-6]
52. Boogerd L.S.F, Hoogstins C.E.S., Schaap D.P. et al. Safety and effectiveness of SGM-101, a fluorescent antibody targeting carcinoembryonic antigen, for intraoperative detection of colorectal cancer: a dose-escalation pilot study // *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. – 2018. – Vol. 3. – №. 3. – P. 181–191. doi: 10.1016/s2468-1253(17)30395-3
53. Hoogstins C.E.S., Boogerd L.S.F., Sibinga Mulder B.G. et al. Image-guided surgery in patients with pancreatic cancer: first results of a clinical trial using SGM-101, a novel carcinoembryonic antigen-targeting, near-infrared fluorescent agent // *Annals of surgical oncology*. – 2018. – Vol. 25. – №. 11. – P. 3350–3357. doi: 10.1245/s10434-018-6655-7
54. McDonald P., Dedhar S. Carbonic anhydrase IX (CAIX) as a mediator of hypoxia-induced stress response in cancer cells // *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. – 2014. – P. 255–269. doi: 10.1007/978-94-007-7359-2_13
55. Hekman M.C., Rijpkema M., Muselaers C.H. et al. Tumor-targeted Dual-modality Imaging to Improve Intraoperative Visualization of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A First in Man Study // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8. – №. 8. – P. 2161–2170. doi: 10.7150/thno.23335
56. Zhang J., Li D., Lang L. et al. 68Ga-NOTA-Aca-BBN (7–14) PET/CT in healthy volunteers and glioma patients // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2016. – Vol. 57. – №. 1. – P. 9–14. doi: 10.2967/jnumed.115.165316
57. Li D., Zhang J., Chi C. et al. First-in-human Study of PET and Optical Dual-Modality Image-Guided Surgery in Glioblastoma Using 68 Ga-IRDye800CW-BBN // *Theranostics*. – 2018. – Vol. 8. – №. 9. – P. 2508–2520. doi: 10.7150/thno.25599
58. Carneiro F., Muniz-Junqueira M., Carneiro M. et al. Anti-EpCAM antibodies for detection of metastatic carcinoma in effusions and peritoneal wash // *Oncology Letters*. - 2019. – Vol. 18. - №. 2. – P. 2019-2024. doi:10.3892/ol.2019.10468
59. Feng L., Zhu J., Wang Z. Biological Functionalization of Conjugated Polymer Nanoparticles for Targeted Imaging and Photodynamic Killing of Tumor Cells // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2016. – Vol. 8. - №. 30. – P. 19364–19370. doi:10.1021/acsami.6b06642
60. Hou J.T., Ko K.P., Shi H. et al. PLK1-targeted fluorescent tumor imaging with high signal-to-background ratio // *ACS Sensors*. - 2017. – Vol. 2. - №. 10. – P. 1512–1516. doi:10.1021/acssensors.7b00544]
61. Sharma A., Kim E.J., Shi H. et al. Development of a theranostic prodrug for colon cancer therapy by combining ligand-targeted delivery and enzyme-stimulated activation // *Biomaterials*. – 2018. – Vol.155. – P. 145–151. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.019

62. Kurbegovic S., Juhl K., Chen H. et al.). Molecular targeted NIR-II probe for image-guided brain tumor surgery // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. – Vol. 29. - №. 11. – P. 3833–3840. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00669
63. Zhang J., Jiang C., Longo J.P.F. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy // *Acta Pharm. Sinica B*. - 2018. – Vol. 8. - №. 2. – P. 137–146. doi10.1016/j.apsb.2017.09.003.
64. Bellnier D.A., Greco W.R., Loewen G. M. et al. Clinical Pharmacokinetics of the PDT Photosensitizers Porfimer Sodium (Photofrin), 2-[1-Hexyloxyethyl]-2-Deviny Pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-Induced Protoporphyrin IX // *Lasers in Surgery and Medicine*. - 2006. – Vol. 38. - №. 5. – P. 439–444. doi:10.1002/lsm.20340
65. Olson M., Ly Q., Mohs A. et al. Fluorescence Guidance in Surgical Oncology: Challenges, Opportunities, and Translation // *Mol Imaging Biol.* – 2019. – Vol. 21. - №. 2. – P. 200-218. DOI: 10.1007/s11307-018-1239-2
66. Pandey R.K., Goswami L.N., Chen Y. et al. Nature: a rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy // *Lasers Surg Med*. - 2006. – Vol. 38. – P. 445-467.
67. Mettath S., Shibata M., Alderfer J.L. et al. Synthesis and spectroscopic properties of novel benzochlorins derived from chlorophyll a // *J Org Chem* 1998. – Vol. 63. – P. 1646-1656.
68. Yoon I., Li J.Z., Shim Y.K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy // *Clinical Endoscopy*. - 2013. – Vol. 46. - №. 1. – P. 7-23. doi:10.5946/ce.
69. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Pyropheophorbide 2-Deoxyglucosamide: A New Photosensitizer Targeting Glucose Transporters // *Bioconjugate Chemistry*. – 2003. – Vol. 14. - №. 4. – P. 709–714. doi:10.1021/bc034038n
70. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem J*. – 2016. – Vol. 473. - №. 4. – P. 347-64. doi: 10.1042/BJ20150942. PMID: 26862179; PMCID: PMC4811612.
71. Zheng X., Morgan J., Pandey S.K., Chen Y. et al. Conjugation of 2-(1'-Hexyloxyethyl)-2-devinylpyropheophorbide-a (HPPH) to Carbohydrates Changes its Subcellular Distribution and Enhances Photodynamic Activity in Vivo† // *Journal of Medicinal Chemistry*. - 2009. – Vol. 52. - №. 14. – P. 4306–4318. doi:10.1021/jm9001617.
72. Stefflova K., Li H., Chen J., Zheng G. Peptide-based pharmacomodulation of a cancer-targeted optical imaging and photodynamic therapy agent // *Bioconj Chem*. – 2007. – Vol. - №. 18. – P. 379-388. doi 10.1021/bc0602578
73. Tarragó-Trani M.T., Jiang S., Harich K.C., Storrie B. Shiga-like Toxin Subunit B (SLTB)-Enhanced Delivery of Chlorin e6 (Ce6) Improves Cell Killing // *Photochemistry and Photobiology*. – 2006. – Vol. 82. - №. 2. – 527-37. doi:10.1562/2005-06-20-ra-583
74. Zheng G., Li H., Zhang M. et al. Low-Density Lipoprotein Reconstituted by Pyropheophorbide Cholesteryl Oleate as Target-Specific Photosensitizer // *Bioconjugate Chemistry*. – 2002. – Vol. 13. - №. 3. – P. 392–396. doi:10.1021/bc025516h
75. Chen G., Jaskula-Sztul R., Esquibel C.R., et al. Neuroendocrine tumor-targeted upconversion nanoparticle-based micelles for simultaneous nir-controlled combination chemotherapy and photodynamic therapy, and fluorescence imaging // *Advanced Functional Materials*. – 2017. – Vol. 27. - №. 8. – P. 1604671. doi: 10.1002/adfm.201604671]