

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЬЮГАТА АМИНОАМИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО ХЛОРИНА e_6 С НАНОЧАСТИЦЕЙ БОРА ДЛЯ ЗАДАЧ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

DOI: 10.17691/stm2016.8.1.05
 УДК 577.114.7:546.135:615.015
 Поступила 3.09.2015 г.



А.Б. Воловецкий, аспирант кафедры биофизики¹;
Н.Ю. Шиягина, к.б.н., ассистент кафедры биофизики¹;
В.В. Дуденкова, аспирант кафедры общей физики¹;
С.О. Пасынкова, студент кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского²;
М.А. Грин, д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского²;
А.Ф. Миронов, д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского²;
А.В. Феофанов, д.б.н., руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул³;
И.В. Балалаева, к.б.н., доцент кафедры биофизики¹;
А.В. Масленникова, д.м.н., профессор кафедры онкологии, лучевой терапии и лучевой диагностики⁴;
 профессор кафедры биофизики¹

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

²Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий, Москва, 119571, пр. Вернадского, 86;

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

⁴Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — изучение биораспределения конъюгата аминоксидного производного хлорина e_6 с бис-дикарболлидом кобальта как потенциального транспортера бора для решения задач бор-нейтронозахватной терапии.

Материалы и методы. Работа выполнена на мышах линии Balb/c с привитой опухолью мышинной карциномы толстой кишки СТ-26. Конъюгат аминоксидного производного хлорина e_6 с бис-дикарболлидом кобальта вводили внутривенно в дозе 5 и 10 мг/кг массы тела. Забор образцов для микроскопического исследования накопления препарата в органах и тканях *ex vivo* проводили через 3 ч после введения.

Результаты. Характеристичный пик флуоресценции наноконъюгата обнаружен в большинстве исследованных органов, при этом была отмечена значительная избирательность накопления соединения. Высокий уровень накопления был зарегистрирован в печени, почках, селезенке и легочной ткани. При введении препарата в дозе 5 мг/кг содержание его в опухоли практически не отличалось от содержания в мышечной ткани и коже; максимальное накопление отмечалось в печени. При повышении дозы до 10 мг/кг содержание наноконъюгата в опухоли оказалось сравнимым с его содержанием в печени, а отношение сигналов флуоресценции опухоль/мышца составило ~3.

Заключение. Выявлена перспективность использования конъюгата фотосенсибилизатора (хлорина e_6) с частицами бора в качестве средства доставки бора в опухоль. Уровень накопления препарата в опухолевой ткани зависит от дозы.

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия; хлорин e_6 ; конъюгат; фотосенсибилизатор; лазерная сканирующая микроскопия.

Как цитировать: Volovetsky A.B., Shilyagina N.Y., Dudenkova V.V., Pasynkova S.O., Grin M.A., Mironov A.F., Feofanov A.V., Balalaeva I.V., Maslennikova A.V. Biodistribution of amine-amide chlorin e_6 derivative conjugate with a boron nanoparticle for boron neutron-capture therapy. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(1): 34–40, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2016.8.1.05>.

Для контактов: Воловецкий Артур Борисович, e-mail: voloveckiy91@gmail.com

English

Biodistribution of Amine-Amide Chlorin e_6 Derivative Conjugate with a Boron Nanoparticle for Boron Neutron-Capture Therapy

A.B. Volovetsky, PhD Student, Biophysics Department¹;

N.Y. Shilyagina, PhD, Assistant, Biophysics Department¹;

V.V. Dudenkova, PhD Student, General Physics Department¹;

S.O. Pasynkova, Student, Department of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds named after N.A. Preobrazhensky²;

M.A. Grin, DSc, Professor, Deputy Head of the Department of Chemistry and Technology of Bioactive Compounds named after N.A. Preobrazhensky²;

A.F. Mironov, DSc, Professor, Head of the Department of Chemistry and Technology of Bioactive Compounds named after N.A. Preobrazhensky²;

A.V. Feofanov, DSc, Head of the Laboratory of Optical Microscopy and Spectroscopy of Biomolecules³;

I.V. Balalaeva, PhD, Associate Professor, Biophysics Department¹;

A.V. Maslennikova, MD, DSc, Professor, Oncology Radiotherapy, Radiodiagnosis Department⁴;
Professor, Biophysics Department¹

¹Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

²Moscow Technological University, Institute of Fine Chemical Technologies, 86 Vernadskogo Avenue, Moscow, 119571, Russian Federation;

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

⁴Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation

The aim of the investigation was to study the biodistribution of amino-amide chlorin e_6 derivative conjugate with cobalt bis-dicarbollide as a potential boron transporter for the tasks of boron neutron-capture therapy.

Materials and Methods. The experiments were carried out on Balb/c mice with induced murine colon carcinoma CT-26. Amino-amide chlorin e_6 derivative conjugate with cobalt bis-dicarbollide was administered intravenously, the dose being 5 and 10 mg/kg body mass. The sampling for microscopic study of the drug uptake in *ex vivo* organs and tissues was performed 3 h after the administration.

Results. Characteristic nanoconjugate fluorescent peak was found in most organs under study, significant selectivity of the compound being noticed. A high uptake level was recorded in the liver, spleen and lung tissue. At the dose of 5 mg/kg, the drug content in a tumor was not different from that in muscular tissue and skin; maximum uptake was found in the liver. If the dose was increased up to 10 mg/kg, the nanoconjugate content in a tumor appeared to be comparable with that in the liver, the tumor/muscle ratio of fluorescent signals was ~3.

Conclusion. The study showed the prospects for using photosensitizer conjugate (chlorin e_6) with boron particles as a means to deliver boron into a tumor. The level of the preparation uptake in tumor tissue depends on a dose.

Key words: boron neutron-capture therapy; chlorin e_6 ; conjugate; photosensitizer; laser scanning microscopy.

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) — метод лучевой терапии злокачественных новообразований, характеризующийся чрезвычайно высокой биологической эффективностью за счет целенаправленной доставки энергии излучения непосредственно в опухолевые клетки. Данный метод основан на относительно избирательном накоплении в раковых клетках нерадиоактивного изотопа ^{10}B и его последующей активации потоком тепловых нейтронов [1, 2]. Несмотря на высокую эффективность метода, продемонстрированную в эксперименте и клинике [3], до настоящего времени БНЗТ не может перешагнуть рамки клинических испытаний. Этому есть несколько причин, но одна из основных — отсутствие эффективных методов доставки бора в опухолевые клетки. Единственные разрешенные для клинического применения соединения (L-р-ди-

гидроксисборилфенилаланин — ВРА и динатриевая соль меркаптоундекагидро-клозо-додекабората — BSH) не обладают высокой селективностью накопления в опухолевой ткани [4–7].

Для решения задачи направленной доставки бора в опухолевые клетки предложены различные стратегии синтеза конъюгатов борсодержащих соединений с биологически активными молекулами, способными накапливаться в опухолевых клетках (предшественники нуклеиновых кислот, аминокислоты и пептиды, углеводы, акридины, различные полиамины, а также порфирины и фталоцианины) [1, 2, 8, 9]. Одним из наиболее перспективных направлений в области создания препаратов для БНЗТ является использование конъюгатов порфиринов с полиэдрическими соединениями бора. Изучение борированных порфиринов для

БНЗТ впервые было проведено в 1988 г. G. Oenbrink с соавт. Установлено, что порфирины и их борные производные способны накапливаться во многих солидных опухолях и представляют собой препараты «двойного назначения»: как агенты доставки бора и как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии [10]. Данный класс соединений представляет собой связанные через линкер хлорин и борный полиэдр [11]. Его представители эффективно накапливаются в опухолевых клетках, а использование карборанов в качестве борного элемента в молекуле дает возможность увеличить концентрацию изотопа в опухоли и обеспечивает стабильность борной части [12].

Необходимым этапом, предшествующим клиническим испытаниям, является исследование фармакокинетики борсодержащих порфиринов, оценка их способности накапливаться и задерживаться в опухоли в более высокой концентрации по сравнению с нормальными тканями, а затем выводиться из организма. Поскольку изотоп ^{10}B не является радиоактивным, он не может быть использован в качестве радиоактивной метки и детектирован с помощью соответствующих методов. В этой ситуации ключевым преимуществом борсодержащих порфиринов является их способность флуоресцировать, что значительно облегчает анализ локализации и распределения препарата в клетках и живых организмах с использованием методов флуоресцентного имиджинга *ex vivo* и *in vivo* [13, 14]. Данные методы позволяют исследовать биораспределение флуорофора в организме, оценивая его накопление в опухоли и нормальных тканях.

Цель исследования — изучение биораспределения конъюгата аминоксидного производного хлорина e_6 с бис-дикарболлидом кобальта как потенциального транспортера бора для решения задач бор-нейтронозахватной терапии.

Материалы и методы

Исследуемое соединение, конъюгат аминоксидного производного хлорина e_6 с бис-дикарболлидом кобальта (длина аминоксидного линкера $n=6$) (рис. 1, а),

было синтезировано разработанным нами ранее способом [15].

Спектры поглощения и флуоресценции конъюгата оценивались на спектрофотометре-спектрофлуориметре Synergy MX (BD, США).

Животные и опухолевая модель. Эксперименты *in vivo* проводили в полном соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Исследование было одобрено Этическим комитетом Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Анализ биораспределения борсодержащего конъюгата был выполнен на мышах линии Balb/c (самки, 18–20 г, $n=9$), полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино Московской области). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом дне.

Для получения экспериментальных опухолей использовали линию мышинной карциномы толстой кишки СТ-26 (номер CRL-2638 по каталогу ATCC®). Культивирование клеток проводили в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), при 37°C и 5% CO_2 в культуральных флаконах площадью 75 cm^2 . На каждом этапе пассирования клетки обрабатывали 0,25% раствором трипсина и версена («ПанЭко», Россия). Субкультивирование выполняли через 2–3 сут по достижении культурой 80% конфлюентности [16].

Для выращивания экспериментальных опухолей животным ($n=9$) подкожно в область бедра вводили суспензию 1 млн клеток СТ-26 в 100 мкл 10 мМ фосфатно-солевого буфера («ПанЭко», Россия). Эксперимент начинали на 9–10-й день после введения, когда диаметр опухолевого узла достигал 9 мм.

В исследовании использовали исходный раствор конъюгата в кремофоре с концентрацией активного

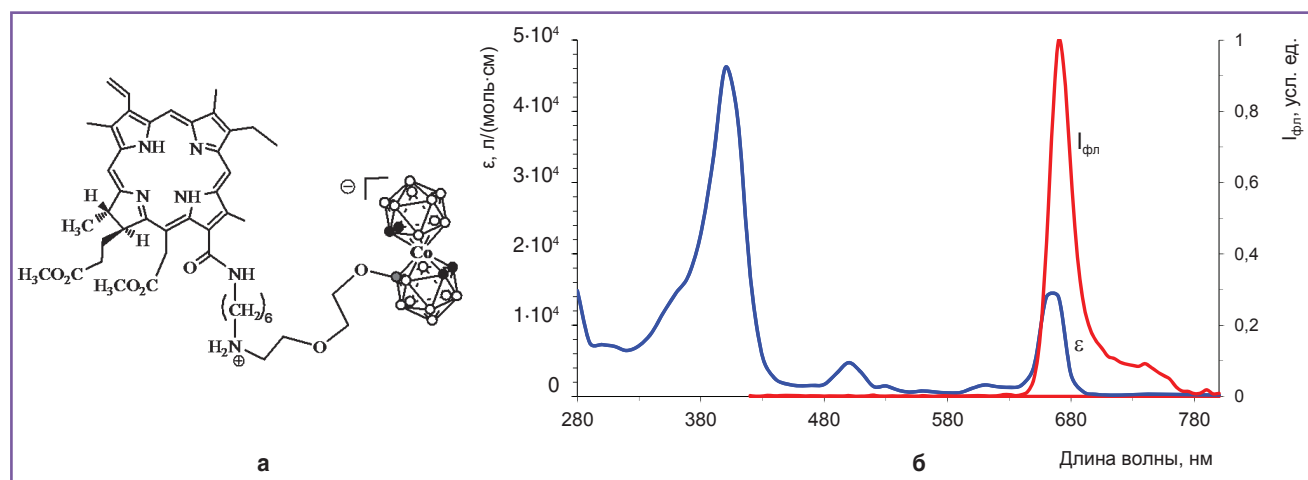


Рис. 1. Структурная формула: черные шарики С-Н, белые шарики В-Н, серый шарик В (а), а также спектры поглощения ϵ и флуоресценции $I_{\text{фл}}$ конъюгата аминоксидного производного хлорина e_6 с бис-дикарболлидом кобальта (б)

вещества 2 мг/мл, который был разбавлен физиологическим раствором до концентрации 1 мг/мл. В контрольной группе ($n=3$) воздействие препаратом не проводилось. Трём мышам вводили исследуемое вещество в дозе 5 мг/кг массы тела, трём мышам — в дозе 10 мг/кг. Раствор вводили в кровоток через хвостовую вену. Объем инъекции составлял 100 мкл. Через 3 ч после введения борсодержащего конъюгата животных умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Для последующего микроскопического исследования получали образцы следующих органов и тканей: опухоли, поперечно-полосатой мышцы, кожи, печени, почки, селезенки, тонкого кишечника, легких.

Приготовление образцов и микроскопическое исследование. Опухоль целиком препарировали из окружающей ткани и рассекали по продольной оси в плоскости, перпендикулярной поверхности бедра. Разрез мышцы бедра производили вдоль направления волокон, разрез почки — по сагиттальной плоскости органа. Продольные срезы печени, легкого и селезенки делали в толще этих органов. Микроскопический анализ образцов выполняли непосредственно после их получения, без процедуры фиксации или заморозки. На протяжении исследования поддерживали влажность препаратов путем смачивания физиологическим раствором.

Изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Axiovert 200M LSM510 META (Carl Zeiss, Германия) с использованием масло-иммерсионного объектива Plan-Apochromat с увеличением $\times 40$ и числовой апертурой 1.3. Латеральное разрешение изображений составило 1024×1024 пикселя, размер пикселя — 0,22 мкм. Флюоресценцию конъюгата возбуждали при длине волны 514 нм, сигнал регистрировали с помощью спектрального модуля META в диапазоне 560–710 нм с шагом 10 нм. Спектральная информация позволяла идентифицировать сигнал наноконъюгата на фоне автофлюоресценции тканей. Все изображения получены при идентичных условиях.

Статистическая обработка данных. С помощью программного обеспечения микроскопа из полученного спектрального изображения выделяли канал, соответствующий принимаемому сигналу флюоресценции в диапазоне 650–693 нм. Используя программу ImageJ (версия 1.47v), определяли средний уровень сигнала по площади каждого изображения исследованных образцов опухоли и нормальных тканей. Для каждого образца нормальных тканей анализировали от 3 до 5 полей зрения. При изучении образцов

опухолевой ткани случайным образом выбирали поля зрения из центральных и периферических участков опухолевого узла (не менее 5 полей зрения для каждого образца). Данные представлены как среднее значение сигнала в условных единицах \pm стандартное отклонение для малых выборок. При сравнении значений использовали однофакторный дисперсионный анализ и критерий Даннета.

Результаты и обсуждение. Первым этапом исследования было изучение оптических свойств полученного конъюгата аминоксидного производного хлорина e_6 с бис-дикарболлидом кобальта. Соединение характеризовалось интенсивным поглощением света в видимой области спектра с пиками при 405, 500 и 665 нм, что близко по значениям к пикам хлорина e_6 (рис. 1, б). Максимум флюоресценции наблюдался при 670 нм. Эксперименты, проведенные ранее на клеточных культурах [14], показали интенсивное поглощение данного конъюгата опухолевыми клетками линии A549 с коэффициентом накопления клетки/среда ≈ 80 . Это свойство позволяет предположить возможность достижения терапевтической дозы, необходимой для проведения БНЗТ, при большем контрасте с нормальной тканью и меньшей итоговой токсичности *in vivo*. Результаты, полученные *in vitro*, послужили основой для начала работы на опухолевых моделях *in vivo*. Выбор экспе-

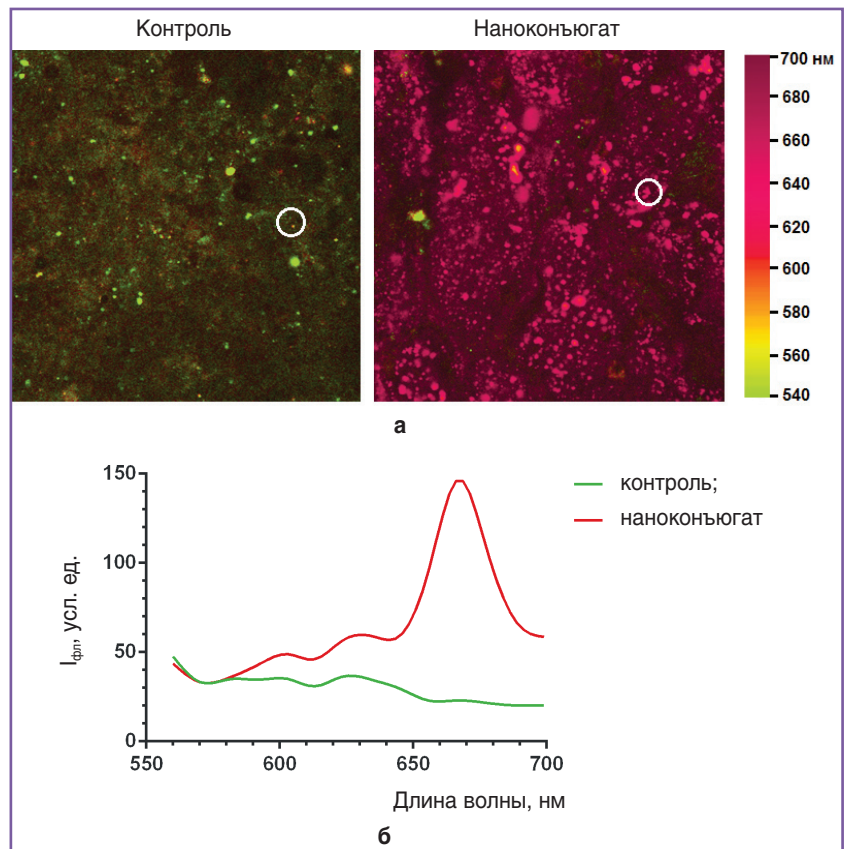


Рис. 2. Изображения образцов ткани опухоли контрольного животного и животного после инъекции наноконъюгата (10 мг/кг, 3 ч после введения) (а), а также спектры флюоресценции $I_{\text{фл}}$ участков, выделенных кружком (б). Размер изображений — 225×225 мкм

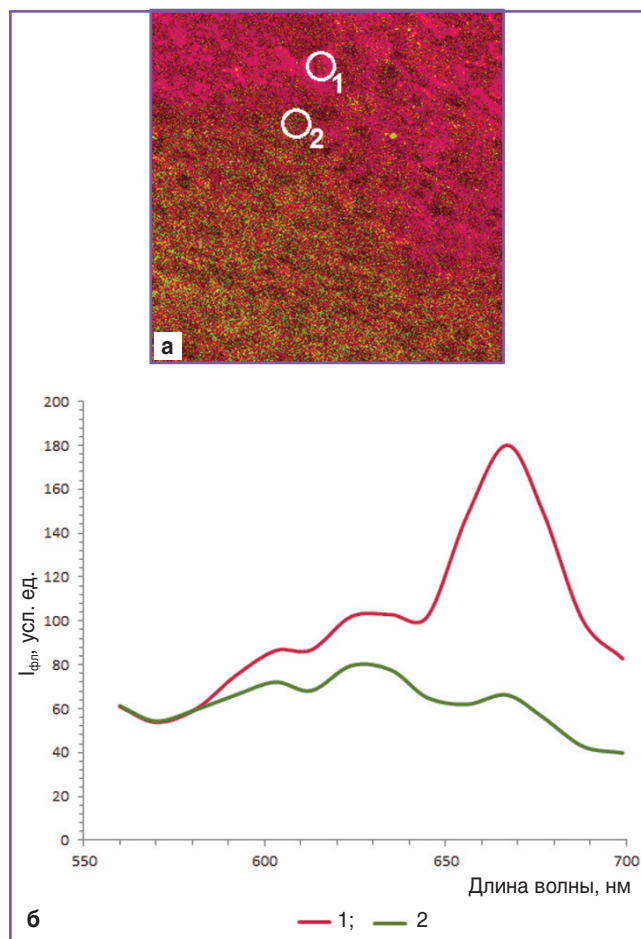


Рис. 3. Изображение участков с различным накоплением наноконъюгата (1, 2) в ткани опухоли животного после инъекции препарата (10 мг/кг, 3 ч после введения), демонстрирующее неоднородность его распределения (а), а также спектры флуоресценции $I_{фл}$ этих участков (б). Размер изображения — 125×125 мкм. Цветовая кодировка, как на рис. 2

риментальной модели СТ-26 был обусловлен высокой васкуляризацией формирующейся опухоли [17].

Изучение образцов опухолевой ткани выявило появление в ней интенсивного сигнала флуоресценции (рис. 2, а) при обеих исследованных дозах наноконъюгата через 3 ч после инъекции. Максимум флуоресценции наблюдался при 665–670 нм (рис. 2, б), что соответствует спектру исследуемого конъюгата.

Характерной особенностью накопления флуорофора в опухоли была неравномерность его распределения в различных участках (рис. 3). Можно предположить, что данный феномен обусловлен так называемым EPR-эффектом (enhanced permeability and retention effect), т.е. особенностями сосудистого русла опухоли, в том числе неравномерностью и хаотичностью формирующихся сосудов [18].

Характеристичный пик флуоресценции конъюгата был обнаружен в большинстве исследованных органов, при этом была отмечена значительная избирательность накопления соединения (рис. 4). Высокий уровень накопления конъюгата зарегистрирован в печени, почках, селезенке и легочной ткани, что соответствует данным фармакокинетики, полученным для препаратов хлоринового ряда, и связано с морфофункциональными особенностями этих органов [19]. Сигнал конъюгата в скелетных мышцах, а также в мышечных стенках полых органов (желудок, кишечник, сердце) был существенно ниже. Кроме того, отмечено практически полное отсутствие накопления конъюгата в образцах кожи. Через 3 ч после инъекции значительное количество вещества оставалось в кровеносном русле и регистрировалось в крупных сосудах различных органов (для примера на рис. 4 показаны сосуды, питающие скелетную мышцу).

Количественный анализ уровня сигнала флуоресценции в образцах тканей позволил выявить зависимость накопления наноконъюгата от введенной дозы

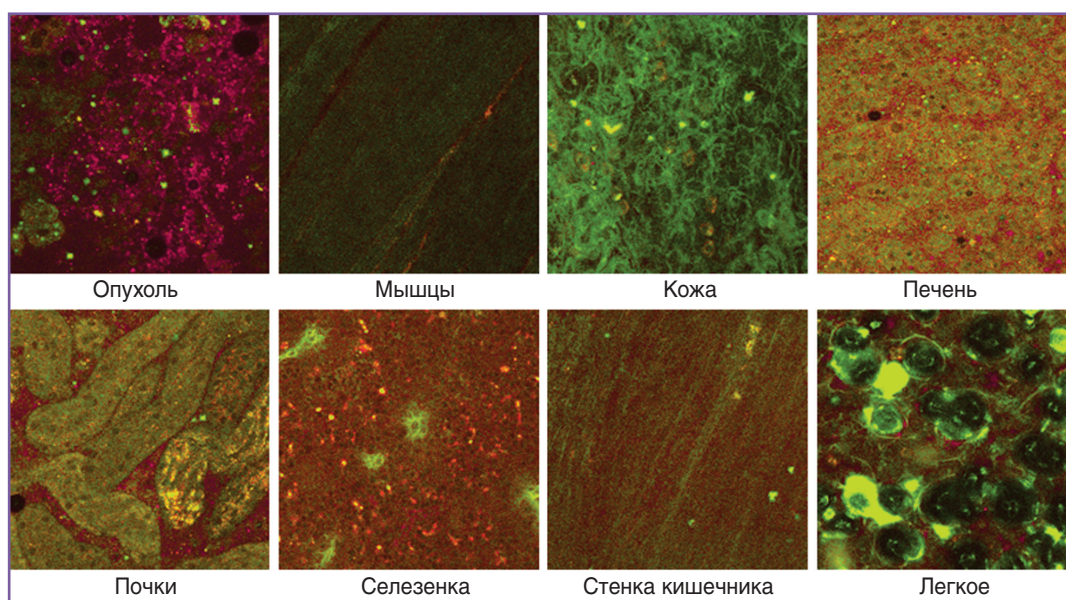


Рис. 4. Изображения образцов тканей животного через 3 ч после введения наноконъюгата (10 мг/кг). Размер изображений — 225×225 мкм. Цветовая кодировка, как на рис. 2

препарата. После введения препарата в дозе 5 мг/кг содержание его в опухоли практически не отличалось от содержания в мышечной ткани и коже; максимальное накопление препарата отмечалось в печени (рис. 5).

При повышении дозы до 10 мг/кг содержание наноконъюгата в опухоли оказалось сравнимым с его содержанием в печени, а отношение сигналов флюоресценции опухоль/мышца составило ~3. Необходимо отметить высокое значение стандартного отклонения уровня сигнала в опухоли при введении наноконъюгата в дозе 10 мг/кг, что соответствует результатам микроскопического исследования, когда в опухоли были выявлены участки как с очень высоким, так и со средним по величине сигналом (см. рис. 3).

Таким образом, предварительное исследование показало, что изученный борсодержащий конъюгат хлорина в достаточной мере отвечает тем требованиям, которые предъявляются к препаратам для БНЗТ [2]. В частности, соединение продемонстрировало способность к относительно селективному накоплению в опухоли с соотношением его содержания «опухоль/ нормальная ткань» как 3:1. Препарат продемонстрировал низкое накопление в коже, что позволяет предположить низкую фототоксичность и безопасность применения препарата на свету. Способность хлорина флюоресцировать дает возможность контроля содержания бора в тканях методами *in vivo*. Данные факты позволяют сделать вывод о перспективности использования борсодержащих конъюгатов в качестве агентов доставки бора для БНЗТ. Следующим этапом работы будет исследование фармакокинетики конъюгата, а также анализ содержания бора в опухоли и нормальных тканях с целью разработки оптимальных режимов введения препарата и последующего радиационного воздействия.

Заключение. Исследование биораспределения конъюгата фотосенсибилизатора (хлорина e_6) с бис-дикарболлидом кобальта продемонстрировало перспективность его использования в качестве средства доставки бора в опухоль. Уровень накопления препарата в опухолевой ткани зависит от введенной дозы.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке проекта РФФИ №14-02-00715.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Sivaev I.B., Bregadze V.I., Kuznetsov N.T. Derivatives of the closo-dodecaborate anion and their application in medicine. *Russian Chemical Bulletin* 2002; 51(8): 1362–1374, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020942418765>.
2. Розуменко В.Д. Бор-нейтронозахватная терапия

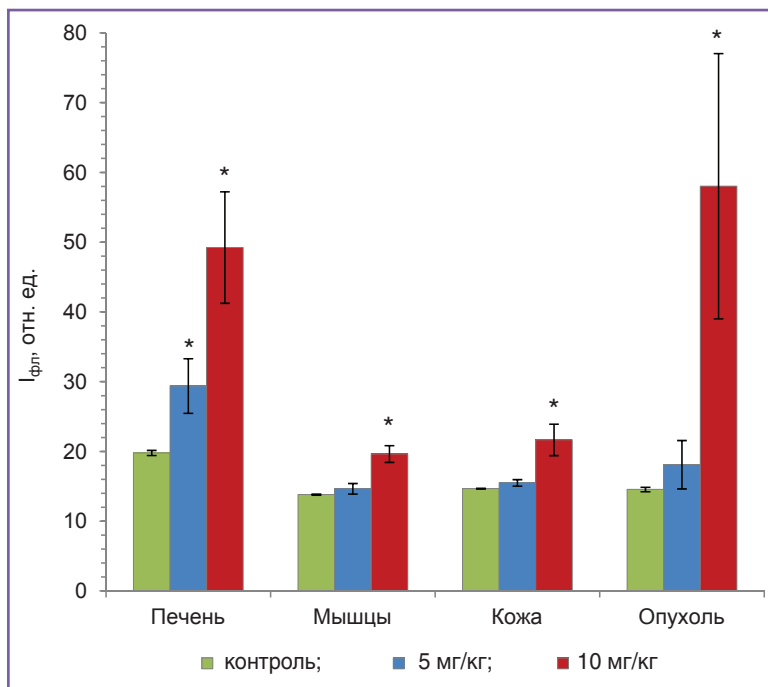


Рис. 5. Уровень сигнала флюоресценции $I_{флн}$ образцов тканей у контрольных животных и животных с введением различных доз наноконъюгата. * — статистически значимое отличие от контроля

опухолей головного мозга. Украинский нейрохирургический журнал 2001; 3: 4–12. Rozumenko V.D. Boron neutron-capture therapy of brain tumors. *Ukrainskiy neyrokhirurgicheskiy zhurnal* 2001; 3: 4–12.

3. Hartman T., Carlson J. Radiation dose heterogeneity in receptor and antigen mediated boron neutron-capture therapy. *Radiother Oncol* 1994; 31(1): 61–75, [http://dx.doi.org/10.1016/0167-8140\(94\)90414-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-8140(94)90414-6).

4. *Boron chemistry at the beginning of the 21st century.* Bubnov Yu.N. (editor). Moscow: Editorial URSS; 2003; 376 p.

5. Soloway A.H., Tjarks W., Barnum B.A., Rong F.G., Barth R.F., Codogni I.M., Wilson J.G. The chemistry of neutron-capture therapy. *Chem Rev* 1998; 98(4): 1515–1562, <http://dx.doi.org/10.1021/cr941195u>.

6. Yokoyama K., Miyatake S., Kajimoto Y., Kawabata S., Doi A., Yoshida T., Asano T., Kirihaata M., Ono K., Kuroiwa T. Pharmacokinetic study of BSH and BPA in simultaneous use for BNCT. *J Neurooncol* 2006; 78(3): 227–232, <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-005-9099-4>.

7. Goudgaon N.M., El-Kattan G.F., Schinazi R.F. Boron containing pyrimidines, nucleosides, and oligonucleotides for neutron capture therapy. *Nucleosides and Nucleotides* 1994; 13(1–3): 849–880, <http://dx.doi.org/10.1080/15257779408013283>.

8. *Neutron capture therapy — principles and application.* Sauerwein W., Wittig A., Moss R., Nakagawa Y. (editors). Springer Science + Business Media; 2012, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-31334-9>.

9. Yamamoto Y., Cai J., Nakamura H., Sadayori N., Asao N., Nemoto H. Synthesis of netropsin and distamycin analogues bearing o-carborane and their DNA recognition. *Journal of Organic Chemistry* 1995; 60(11): 3352–3357, <http://dx.doi.org/10.1021/jo00116a018>.

10. Oenbrink G., Jurgenlimke P., Gabel D. Accumulation of

porphyrins in cells influence of hydrophobicity aggregation and protein binding. *Photochem Photobiol* 1988; 48(4): 451–456, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02844.x>.

11. Grin M.A., Titeev R.A., Brittal D.I., Chestnova A.V., Mironov A.F., Feofanov A.V., Lobanova I.A., Sivaev I.B., Bregadze V.I. Synthesis of cobalt bis(dicarbollide) conjugates with natural chlorins by the Sonogashira reaction. *Russian Chemical Bulletin* 2010; 59(1): 219–224, <http://dx.doi.org/10.1007/s11172-010-0065-8>.

12. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Grin M.A., Mironov A.F., Bregadze V.I., Sivaev I.B., Feofanov A.V. Confocal microscopy and spectral imaging technique: contribution to the development of neutron sensitizers for anticancer BNCT. In: *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Méndez-Vilas A. (editor). Spain: FORMATEX, 2012; p. 84–90.

13. Ol'shevskaya V.A., Zaytsev A.V., Savchenko A.N., Shtil A.A., Cheong C.S., Kalinin V.N. Boronated porphyrins and chlorins as potential anticancer drugs. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 2007; 28(11): 1910–1914.

14. Efremenko A.V., Ignatova A.A., Grin M.A., Sivaev I.B., Mironov A.F., Bregadze V.I., Feofanov A.V. Chlorin e_6 fused with a cobalt-bis(dicarbollide) nanoparticle provides efficient boron delivery and photoinduced cytotoxicity in cancer cells. *Photochem Photobiol Sci* 2014; 13(1): 92–102, <http://dx.doi.org/10.1039/c3pp50226k>.

15. Grin M.A., Titeev R.A., Brittal D.I., Ulybina O.V., Tsiprovskiy A.G., Berzina M. Ya., Lobanova I.A., Sivaev I.B., Bregadze V.I., Mironov A.F. New conjugates of cobalt bis(dicarbollide) with chlorophyll a derivatives. *Mendeleeev Communications* 2011; 21(2): 84–86, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mencom.2011.03.008>.

16. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2010; 691 с. Freshni R.Ya. *Kul'tura zhivotnykh kletok: prakticheskoe rukovodstvo* [Culture of animal cells: practice guidelines]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2010; 691 p.

17. Kuznetsov S.S., Snopova L.B., Karabut M.M., Sirotkina M.A., Buyanova N.L., Kalganova T.I., Elagin V.V., Senina-Volzhsкая I.V., Barbashova L.N., Shumilova A.V., Zagaynova E.V., Vitkin A., Gladkova N.D. Features of morphological changes in experimental CT-26 tumors growth. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2015; 7(3): 32–39, <http://dx.doi.org/10.17691/stm2015.7.3.04>.

18. Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: the EPR effect and beyond. *Journal of Controlled Release* 2012; 164(2): 138–144, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.038>.

19. Juzeniene A. Chlorin e_6 -based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009; 6(2): 94–96, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.06.001>.