

ЛАЗЕРНЫЙ МИКРОСКОП-СПЕКТРОАНАЛИЗАТОР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО НАКОПЛЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА СПЕКТРА IN VITRO

Ю.С. Маклыгина, А.В. Бородин, В.Б. Лощенов
ФГБУН «ИОФ им. А.М. Прохорова» РАН, Москва, Россия

Резюме

Разработан измерительный комплекс на базе бинокулярного микроскопа для анализа внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов ИК-диапазона, который дает возможность получить графическую информацию о состоянии исследуемых объектов, о локализации очагов флуоресценции, а также сведения о спектральном составе флуоресцирующих центров в ИК-области спектра. По картине распределения флуоресцентного сигнала можно точно определить локализацию накопления фотосенсибилизатора внутри клетки и получить спектр флуоресцентного сигнала ближнего ИК-диапазона в заданной точке. Разработанная система достаточно универсальна, поскольку дает возможность выбора технических параметров, режимов работы, методов измерения и анализа. Преимуществом разработанного микроскопа-спектроанализатора является возможность с помощью лазерного источника с малой угловой расходимостью луча сфокусировать излучение и этим создать большую плотность мощности на облучаемом участке, что позволяет проводить сверхтонкие операции на клетках. При этом перестраиваемый размер отверстия диафрагмы в дальнем поле позволяет зарегистрировать сигнал флуоресценции на отдельных органеллах клеток. При помощи разработанной системы на клеточной линии HeLa проведены исследования накопления нового фотосенсибилизатора ряда бактериохлоринов. Система позволила зафиксировать скопления раковых клеток с четко выраженными центрами избирательно накопленного фотосенсибилизатора. Очаги флуоресценции представляли собой центры накопления фотосенсибилизатора бактериохлорина, откуда можно сделать вывод, что исследуемый фотосенсибилизатор имеет тенденцию к локальному накоплению внутри органелл клеток.

Авторы предполагают, что использование разработанной системы позволит осуществлять эффективный и быстрый скрининг новых фотосенсибилизаторов, в частности ИК-фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда.

Ключевые слова: микроскоп-спектроанализатор, флуоресценция, бактериохлорин, фотосенсибилизатор.

Для цитирования: Маклыгина Ю.С., Бородин А.В., Лощенов В.Б. Лазерный микроскоп-спектроанализатор для исследования внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов ближнего инфракрасного диапазона спектра in vitro // *Biomedical photonics*. – 2015. – № 3. – С. 3–9.

Контакты: Лощенов В.Б., e-mail: loschenov@mail.ru

LASER MICROSCOPE-SPECTRUM ANALYZER FOR STUDYING INTRACELLULAR ACCUMULATION OF NEAR INFRARED EMITTING PHOTOSENSITIZERS IN VITRO

Yu.S. Maklygina, A.V. Borodkin, V.B. Loschenov
FSBIS «A.M. Prokhorov Institute of General Physics» of RAS, Moscow, Russia

Abstract

Measuring system based on the binocular microscope for analysis of intracellular accumulation of infrared IR photosensitizers allowing to obtain graphic data about state of analyzed objects, location of fluorescence foci and to obtain details of spectral profile of fluorescence emission centers in IR spectral region was developed. According to image of fluorescence signal distribution the location of photosensitizer accumulation in the cell may be detected accurately and the spectrum of fluorescence signal of near IR-range in the targeted point may be obtained. The developed system is quite comprehensive because there is an opportunity to choose technical parameters, operating modes, measuring methods and analysis. The advantage of the developed microscope-spectrum analyzer is an opportunity to focus emission and create high power intensity on the irradiated area by means of laser source with small-angle beam spreading, all this allow to perform ultra-precise operations with cells. Particularly, tunable size of the diaphragm opening in the far field allows to register fluorescence signal on certain cell organoids. By means of developed system the studies of accumulation of the new bacteriochlorine photosensitizers on HeLa cell line were performed. The system allowed to register accumulation of cancer cells with definite sites of selectively accumulated photosensitizer. The sites of fluorescence were the centers of accumulation of bacteriochlorine photosensitizer, this suggests that studied photosensitizer has a tendency for local accumulation in cellular organoids.

The authors suggested that the developed system allowed to perform the effective and rapid screening of new photosensitizers, particularly IR bacteriochlorine photosensitizers.

Keywords: microscope-spectrum analyzer, fluorescence, bacteriochlorine, photosensitizer.

For citations: Maklygina Yu.S., Borodkin A.V., Loschenov V.B. Laser microscope-spectrum analyzer for studying intracellular accumulation of near infrared emitting photosensitizers in vitro, *Biomedical photonics*, 2015, No. 3, pp. 3–9 (in Russian)

Contacts: Loschenov V.B., e-mail: loschenov@mail.ru

Введение

Фотодинамическая терапия (ФД) и флуоресцентная диагностика (ФД) в последнее время получили широкое применение в диагностике и лечении онкологических заболеваний. Методы основаны на сенсибилизации пораженных участков препаратом – фотосенсибилизатором, и облучении их излучением определенных длин волн. Фотосенсибилизаторы обладают способностью к избирательному накоплению в активно пролиферирующих клетках, таких как опухолевые клетки. Обнаружение участков с повышенной интенсивностью флуоресценции, вызванной повышенной концентрацией молекул избирательно накапливаемого фотосенсибилизатора, составляет основу метода ФД. При проведении ФДТ проводят облучение тканей лазерным излучением с длиной волны, соответствующей полосе поглощения введенного фотосенсибилизатора, что приводит к возбуждению избирательно накопившегося фотосенсибилизатора, который передает энергию возбуждения присутствующему в тканях молекулярному кислороду, переводя его в химически активное состояние. Это запускает фотохимические реакции, приводящие к повреждению структур биомолекул, а впоследствии и к гибели пораженных клеток [1, 2]. Важную роль в обеспечении высокой точности и эффективности метода играет контроль уровня накопления фотосенсибилизатора в клетках [3]. Актуальной задачей является разработка фотосенсибилизаторов, тропных к опухолевым клеткам на ранней стадии развития опухолей, характеризующихся высокой селективностью накопления в них по сравнению с нормальными тканями для обеспечения избирательного и эффективного фотодинамического воздействия. Также важными характеристиками фотосенсибилизатора наряду со способностью накопления в тканях являются его флуоресцентная способность и спектральный диапазон оптического поглощения. Чем больше глубина проникновения в биологическую ткань света с длиной волны, соответствующей спектральному максимуму поглощения фотосенсибилизатора в ткани, тем больше может быть глубина фотодинамического воздействия. Наибольшую глубину могут обеспечить фотосенсибилизаторы с длиной волны спектрального максимума в ближнем инфракрасном (740–1400 нм) и инфракрасном (ИК) диапазонах, где собственное поглощение несенсибилизированной ткани минимально [4]. В связи с этим в последние годы ведется направленный поиск новых фотосенсибилизаторов с улучшенными свойствами, в том числе с наличием интенсивной полосы поглощения в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра [5]. К настоящему времени исследованы десятки веществ различного происхождения, относящихся к разным классам (хлоринов, бактериохлоринов, фталоцианинов и др.), которые, благодаря своим струк-

турным особенностям, физико-химическим и фотофизическим свойствам, могут рассматриваться как перспективные фотосенсибилизаторы для диагностики и лечения онкологических заболеваний [4–13]. На протяжении последних лет особое внимание уделялось фотосенсибилизаторам бактериохлоринового ряда, поглощающим и флуоресцирующим в ближней ИК-области спектра, которые обеспечивают глубокое воздействие на пораженную ткань и тем самым открывают возможности лечения объемных и глубоко залегающих опухолей. Бактериохлорин является наиболее перспективным фотосенсибилизатором ближнего ИК-диапазона [11–13]. Однако исследование наиболее перспективных соединений представляет большие сложности вследствие отсутствия единой методологии их изучения в системе *in vitro*. Несмотря на существование измерительных комплексов и установок, созданных для подобного рода задач, рабочая область большинства из них ограничена спектральной областью до 750 нм. Интерес же представляет ближняя ИК- и ИК-области спектра (от 740 нм) ввиду минимального собственного поглощения биоткани в этом диапазоне. В связи с этим, актуальной задачей на сегодняшний день является не только поиск фотосенсибилизаторов с наличием интенсивной полосы поглощения в инфракрасной области спектра, но и разработка системы скрининга новых субстанций, позволяющей адекватно оценивать свойства фотосенсибилизаторов в ИК-диапазоне.

С целью исследования характера взаимодействия фотосенсибилизатора ближнего ИК-диапазона на основе бактериохлорина с клетками рака был разработан измерительный комплекс лазерного микроскопа-спектроанализатора, который позволяет одновременно наблюдать цветное микроскопическое изображение исследуемых биологических объектов (раковых клеток), их черно-белое микроскопическое изображение с визуализацией центров накопления фотосенсибилизатора в виде очагов флуоресценции и регистрировать спектры флуоресценции с интересующих (выбранных и контролируемых визуально) точек объекта. Важно отметить, что разработанный комплекс позволяет работать практически в любой области спектра, но, что наиболее важно, это его способность работать в ИК-области спектра, которая перспективна в отношении использования фотосенсибилизаторов.

Материал и методы

В ходе работы для исследования внутриклеточного накопления фотосенсибилизатора ближнего ИК-диапазона бактериохлорина был построен измерительный комплекс на базе бинокулярного микроскопа (рис. 1).

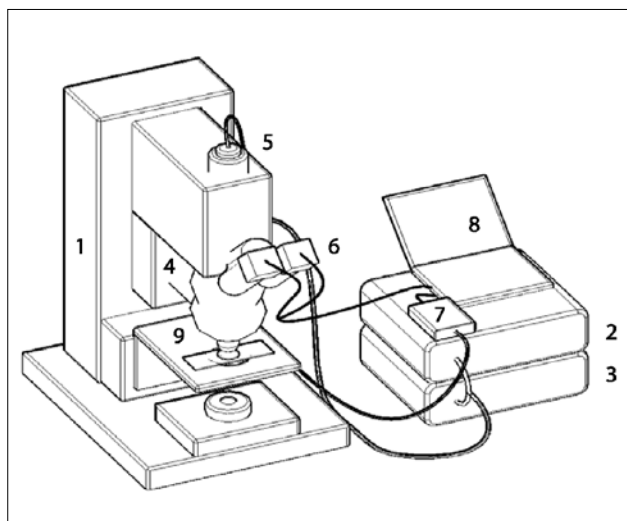


Рис. 1. Измерительный комплекс на базе бинокулярного микроскопа: 1 – бинокулярный микроскоп UMSP-50 (Zeiss), 2 – источник фильтрованного белого света, 3 – источник лазерного излучения ($\lambda = 510,6$ нм, $P = 100$ мВт/см²), 4 – конфокальная диафрагма, 5 – коллиматор, 6 – высоко чувствительные цифровые видеокамеры (цветной и флуоресцентный видеоканалы), 7 – спектрометр ЛЭСА-01-БИОСПЕК, 8 – персональный компьютер, 9 – образец

В процессе создания микроскоп был дополнен системой видеоканалов (6). Видеосистема состоит из канала цветного изображения и флуоресцентного видеоканала. Для активации обоих каналов в микроскоп с помощью Y-образного волоконно-оптического жгута заводится широкополосное излучение от источника фильтрованного белого света (2) и монохроматическое излучение от лазерного источника (3). Для возбуждения флуоресценции необходимо использовать лазерный источник с длиной волны, попадающей в спектральный максимум поглощения исследуемого фотосенсибилизатора. Стоит отметить, что существует возможность менять источники лазерного излучения, соответствующим образом подбирая его длину волны для каждой конкретной задачи, учитывая спектроскопические свойства изучаемого фотосенсибилизатора. С помощью лазерного источника с малой угловой расходимостью луча можно сфокусировать излучение и этим создать большую плотность мощности на облучаемом участке, что позволяет проводить сверхтонкие операции на клетках. Кроме того, перестраиваемый размер открытия диафрагмы в дальнем поле позволяет зарегистрировать сигнал флуоресценции на отдельных оргanelлах клеток. Флуоресцентный видеоканал позволяет получить черно-белое микроскопическое изображение исследуемого объекта и обнаружить очаги флуоресценции, вызванной повышенной концентрацией молекул избирательно накапливающегося фотосенсибилизатора. Монохромная видеокамера предназначена для регистрации флуоресценции и оснащена спектрально-селективной оптической системой, блокирующей излу-

чение источника света и выделяющей флуоресцентное излучение с помощью фильтра Long Pass (OD-4), что в сумме дает диапазон измерения $\lambda = 650-800$ нм. Разработанный комплекс также оснащен системой, которая позволяет осуществлять спектральный анализ. Для измерения спектров флуоресценции предусмотрено подключение электронно-спектральной установки ЛЭСА-01-БИОСПЕК с волоконно-оптическим входом [1, 2]. С помощью коллиматора (5) излучение, прошедшее весь оптический путь, заводится в волоконный зонд спектрометра (7). Наличие спектрометра значительно расширяет возможности созданного комплекса, поскольку дает возможность оценить спектральный состав зондируемой области и провести анализ спектра флуоресценции. Полный диапазон измерения спектров ограничен интервалом 400–1000 нм. При этом спектрометр оснащен спектрально-селективной оптической системой, блокирующей излучение источника света и выделяющей флуоресцентное излучение с помощью фильтра Long Pass (OD-4), что в сумме дает диапазон измерения $\lambda = 650-1000$ нм. Площади зондируемых участков определяются увеличением, используемого объектива и диапазоном зондируемых установкой областей, а именно выбранным размером диафрагмы. Исследования проводились с использованием иммерсионного объектива (масляная иммерсия) с 40- и 60-кратным увеличением при двух различных диаметрах открытия диафрагмы 5 и 2,5. Диаметр зондируемой области составлял от 20 до 60 мкм. При необходимости, меняя увеличение объектива в большую сторону, можно уменьшить площадь зондируемого участка. Исследуемый образец был заключен между двумя покровными стеклами (рис. 2), которые фиксировались на зеркальной поверхности; регистрировался отраженный сигнал, из которого с помощью специально подобранных фильтров выделялся флуоресцентный сигнал на фоне излучения источника возбуждающего флуоресценцию.

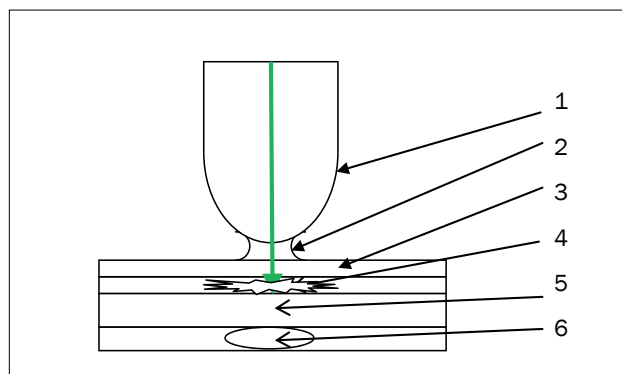


Рис. 2. Схема получения изображения образца: 1 – объектив, 2 – масляная иммерсия, 3 – тонкое покровное стекло (0,13–0,17 мм), 4 – исследуемый образец клеточной культуры и фотосенсибилизатора, 5 – толстое покровное стекло (1,2–1,5 мм), 6 – зеркало

Благодаря ранее специально разработанному программному обеспечению, видео- и спектральная информация обрабатываются компьютером и выводятся на монитор в режиме реального времени. Все эти функциональные части составляют комплекс анализа распределения флуоресцентного сигнала для исследования внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов.

Настоящая работа заключалась в выборе технических параметров, режимов работы, методов измерения для анализа внутриклеточного накопления ИК-фотосенсибилизатора бактериохлорина.

Основной целью в рамках данного исследования являлось изучение спектроскопических свойств, а также характера внутриклеточного накопления раствора активного ИК-фотосенсибилизатора. Объектом исследования являлся фотосенсибилизатор ближнего ИК-диапазона мезо-тетра(3-пиридил) бактериохлорин производства ФГУП «ГНЦ «НИО-ПИК», Москва (далее – бактериохлорин). Химическая формула исследуемого соединения представлена на рис. 3.

В ходе исследования с помощью компьютеризированного спектрофотометра Hitachi U-3400 был получен спектр поглощения раствора бактериохлорина с максимумами 350, 382, 525 и 749 нм

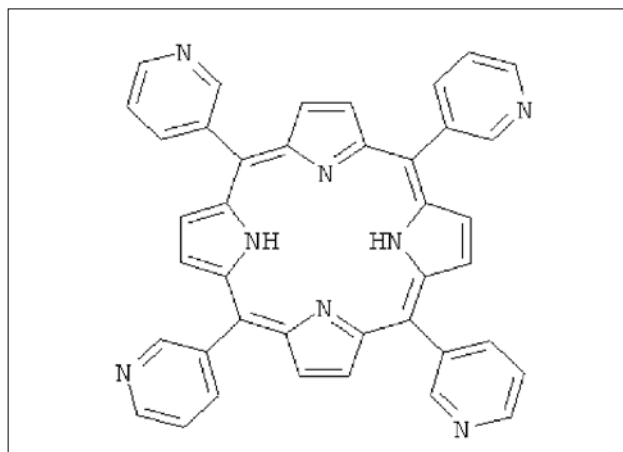


Рис. 3. Химическая формула мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина

(рис. 4). С учетом полученного спектра для возбуждения флуоресценции был выбран источник лазерного излучения с длиной волны 510,6 нм ($P_{\text{вых}}/S \sim 100 \text{ мВт/см}^2$). Выбор длины волны, на которой находится меньший пик поглощения, обусловлен необходимостью снизить деструктивное воздействие на клетки, поскольку уровень плотности мощности сфокусированного возбуждающего излучения довольно высок и быстро приводит к гибели клеток.

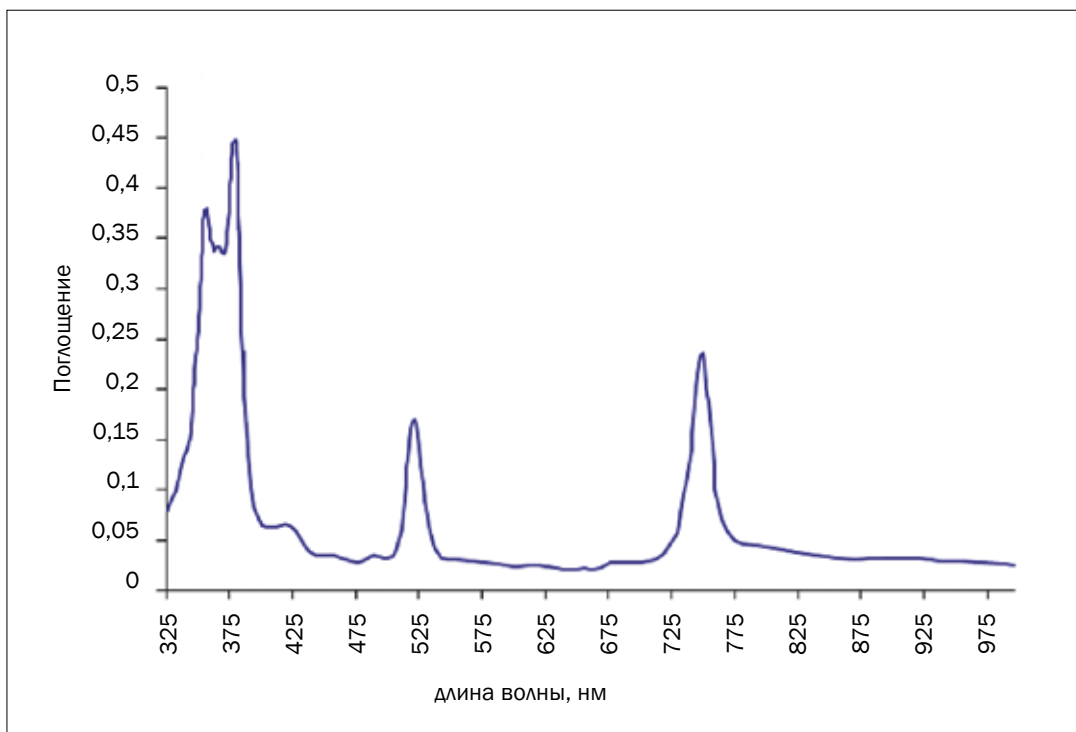


Рис. 4. Спектр поглощения раствора бактериохлорина

Для проведения экспериментов использовали линию раковых клеток HeLa, полученную из раковой опухоли шейки матки человека. Концентрация фотосенсибилизатора в клеточных суспензиях для всех экспериментов составляла 10 мг/л, что соответствует среднестатистической концентрации в экспериментальной раковой опухоли.

Результаты

На рис. 5 представлено микроскопическое изображение скопления раковых клеток линии HeLa в отсутствие фотосенсибилизатора.

На рис. 6 представлены микроскопические изображения суспензии клеток при взаимодействии с фотосенсибилизатором. Изображения имеют разную кратность увеличения (40x и 60x) и получены во флуоресцентном видеоканале во время работы лазера, предназначенного для возбуждения флуоресценции бактериохлорина ($\lambda=510,6$ нм). На этих изображениях видно скопление раковых клеток с четко выраженными центрами избирательно накопленного бактериохлорина. Поскольку очаги флуоресценции представляют собой центры накопления фотосенсибилизатора, можно сделать вывод, что исследуемый фотосенсибилизатор имеет тенденцию к локальному накоплению внутри органелл клеток.

Разработанный лазерный микроскоп-спектроанализатор позволяет получать спектральную информацию о состоянии исследуемого объекта в режиме реального времени. Спектрометр дает возможность

оценить спектральный состав зондируемой области и провести анализ спектра флуоресценции в заданной точке. Из графика (рис. 7) видно, что пик флуоресценции в выбранной точке находится на длине волны 752 нм, что соответствует пику флуоресценции бактериохлорина.

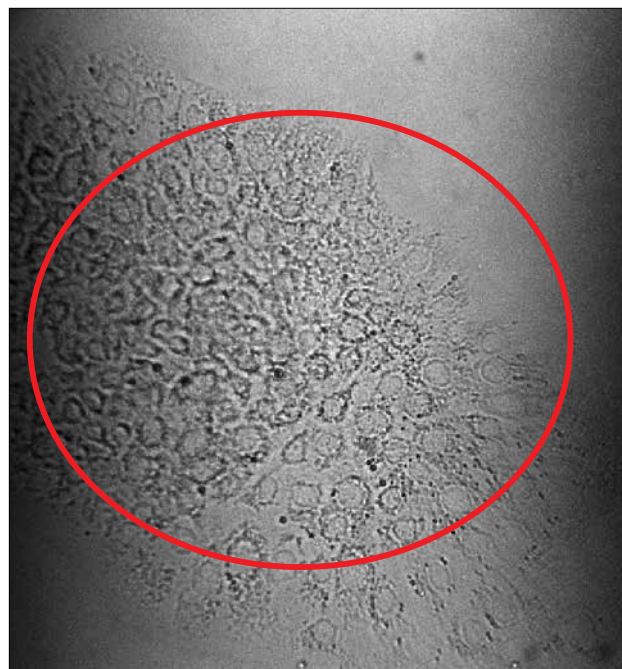
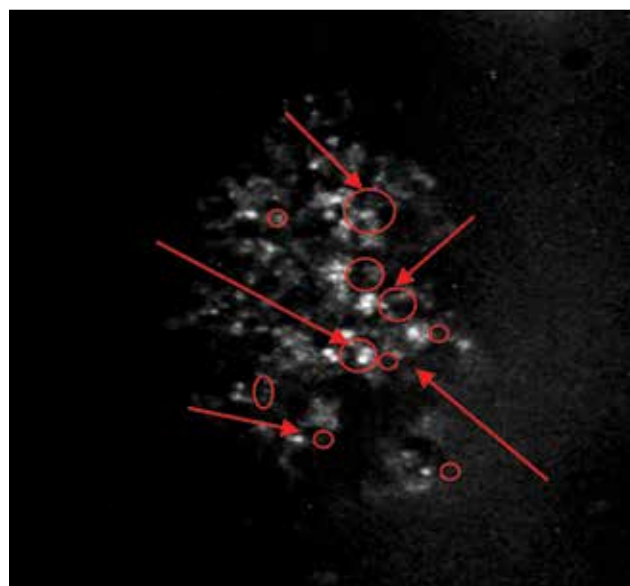
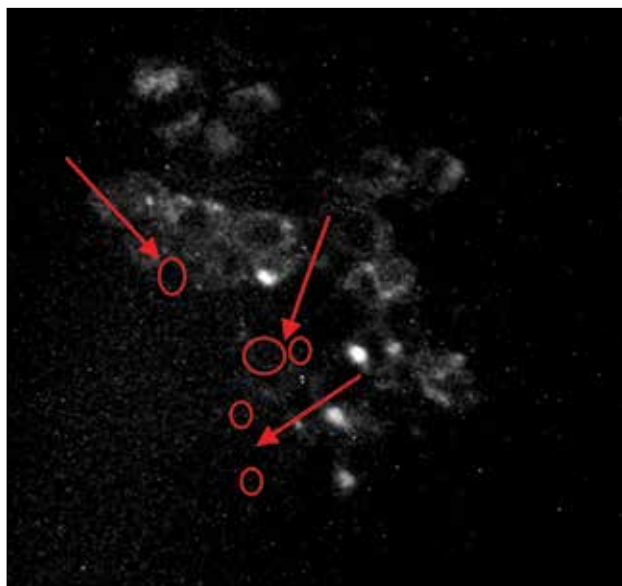


Рис. 5. Микроскопическое изображение скопления раковых клеток линии HeLa (40x) в отсутствие фотосенсибилизатора



а



б

Рис. 6. Микроскопическое изображение очагов флуоресценции, вызванной повышенной локальной концентрацией бактериохлорина в связи с его накоплением внутри органелл клеток HeLa, полученное при возбуждении лазерным излучением $\lambda=510,6$ нм

а – увеличение 40x

б – увеличение 60x

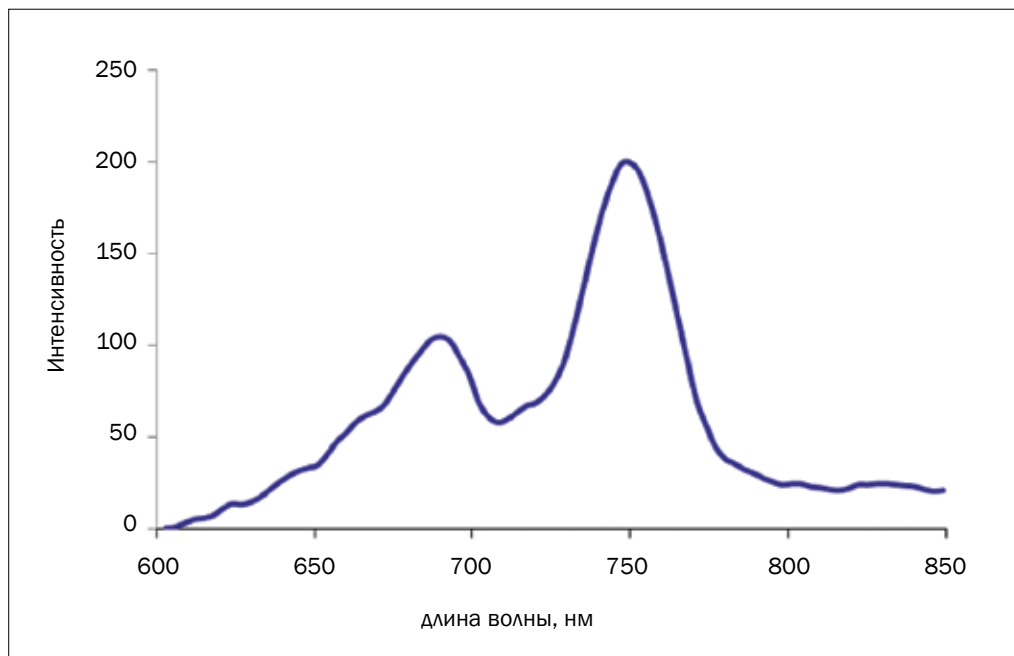


Рис. 7. Спектр флуоресценции в центре накопления фотосенсибилизатора ближнего ИК-диапазона бактериохлорина в раковых клетках HeLa

Таким образом, специально разработанный измерительный комплекс для анализа внутриклеточного накопления фотосенсибилизаторов ИК-диапазона дает возможность получить графическую информацию о состоянии исследуемых объектов, о локализации очагов флуоресценции, а также получить сведения о спектральном составе флуоресцирующих центров в ИК-области спектра.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать выводы, что по картине распределения флуоресцентного сигнала можно точно определить локализацию

накопления фотосенсибилизатора внутри клетки и получить спектр флуоресцентного сигнала ближнего ИК-диапазона в заданной точке с помощью описываемого в данной статье комплекса анализа флуоресцентного сигнала. Поскольку система дает возможность выбора технических параметров, режимов работы, методов измерения и анализа, можно говорить о ее универсальности, что позволит осуществлять скрининг целого ряда новых субстанций, в том числе в ближней ИК- и ИК-областях спектра, позволяя оценивать важнейшие свойства фотосенсибилизаторов, в частности ИК-фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics // *Laser Physics*. – 2000. – Vol. 10, No 6. – P. 1188–1207.
2. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия – обоснование применения и возможности в онкологии // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*. – 2014. – № 1. – С. 3–7.
3. Линьков К.Г., Березин А.Н., Лощенов В.Б. Аппаратура для ФД и ФДТ // *Росс. биотерапевт. журнал*. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 54.
4. Меерович И. Г., Грин М. А., Меерович Г. А. и др. Новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазоне на основе производных бактериохлорина: предварительные результаты изучения in vivo // *Росс. биотерапевт. журнал*. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 73–76.
5. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V. et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation // *J. Biophoton*. – 2010. – Т. 3, No 5–6. – P. 336–346.
6. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Steiner R.W. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles // *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2014 – Vol. 11(3). – P. 380–390.
7. Рябова А.В., Поминова Д.В., Климов А.И. и др. Эффективность генерации синглетного кислорода фталоцианинами Al и Zn и их фотодинамическая активность при конъюгировании с наночастицами Au, Ag, Fe₂O₃, Si // *Российский химический журнал*. – 2013. – Т. LVII, № 5. – С. 25–34.
8. Oertel, M., Schastak S. I., Tannapfel A. et al. Novel bacteriochlorin for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model // *J. Photochem. Photobiol.* – 2003. – Vol. 71. – P. 1–10.
9. Mazor O., Brandis A., Plaks, V., Neumark, E. et al. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution, and vascular targeted photodynamic activity against melanoma tumors // *Photochem. Photobiol.* – 2005. – Vol. 81. – P. 342351.
10. Rovers J. P., de Jode M.L., Rezzoug H., Grahn M.F. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin // *Photochem. Photobiol.* – 2000. – Vol. 72. – P. 358-364.
11. Миронов А.Ф., Грин М.А., Кармакова Т.А. и др. Новые фотосенсибилизаторы для ФДТ рака на основе природного бактериохлорофилла а // *Росс. биотерапевт. журнал*. – 2003. – Т. 2, № 1. – С. 33–34.
12. Якубовская Р.И., Плотникова Е.А., Морозова Н.Б., Грин М.А., Миронов А.Ф. Аминоамиды в ряду бактериохлорофилла а и их фотоиндуцированная активность в системах in vitro и in vivo // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*. – 2013. – № 3. – С. 29–30.
13. Грин М.А., Пантюшенко И.В., Плотникова Е.А. и др. Новые фотосенсибилизаторы на основе бактериопурпуринимида и их фотоиндуцированная противоопухолевая активность // *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика*. – 2013. – № 3. – С. 33–34.

REFERENCES

1. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics, *Laser Physics*, 2000, Vol. 10, No. 6, pp. 1188–1207.
2. Filonenko E.V. Fluorescent diagnostics and photodynamic therapy – justification of use and opportunities in oncology), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2014, No. 1, pp. 3–7.
3. Lin'kov K.G., Berezin A.N., Loshchenov V.B. Apparatura dlya FD i FDT (Devices for FD and PDT), *Ross. bioterapevt. zhurnal*, 2004, T. 3, No. 2, p. 54.
4. Meerovich I. G., Grin M. A., Meerovich G. A. i dr. Noveye fotosensibilizatory blizhnego infrakrasnogo diapazone na osnove proizvodnykh bakteriochlorina: predvaritel'nye rezul'taty izucheniya in vivo (New bacteriochlorine-based photosensitizers of near infrared range: preliminary results of study in vivo), *Ross. bioterapevt. zhurnal*, 2006, T. 5, No. 2, pp. 73–76.
5. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V. et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation, *J. Biophoton.*, 2010, T. 3, No. 5–6, pp. 336–346.
6. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Steiner R.W. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles, *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2014, Vol. 11 (3), pp. 380–390.
7. Ryabova A.V., Pominova D.V., Klimov A.I. i dr. Effektivnost' generatsii singletnogo kisloroda ftalotsianinami Al i Zn i ikh fotodinamicheskaya aktivnost' pri kon'yugirovani s nanochastitsami Au, Ag, Fe₂O₃, Si (Efficiency of singlet oxygen generation by Al and Zn phthalocyanines and its photodynamic activity for conjugation with nanoparticles of Au, Ag, Fe₂O₃, Si), *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 2013, T. LVII, No. 5, pp. 25–34.
8. Oertel, M., Schastak S. I., Tannapfel A. et al. Novel bacteriochlorin for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in a mouse tumour model, *J. Photochem. Photobiol.*, 2003, Vol. 71, pp. 1–10.
9. Mazor O., Brandis A., Plaks, V., Neumark, E. et al. WST11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative; cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution, and vascular targeted photodynamic activity against melanoma tumors, *Photochem. Photobiol.*, 2005, Vol. 81, pp. 342–351.
10. Rovers J. P., de Jode M.L., Rezzoug H., Grahn M.F. In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin, *Photochem. Photobiol.*, 2000, Vol. 72, pp. 358–364.
11. Mironov A.F., Grin M.A., Karmakova T.A. i dr. Noveye fotosensibilizatory dlya FDT raka na osnove prirodnogo bakteriochlorofilla a (New natural bacteriochlorophyll a based photosensitizers for PDT cancer), *Ross. bioterapevt. zhurnal*, 2003, T. 2, No. 1, pp. 33–34.
12. Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Morozova N.B., Grin M.A., Mironov A.F. Aminoamidy v ryadu bakteriochlorofilla a i ikh fotoindutsirovannaya aktivnost' v sistemakh in vitro i in vivo (Aminoamids in the range of bacteriochlorophyll a and its photoinduced activity in systems in vitro and in vivo), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2013, No. 3, pp. 29–30.
13. Grin M.A., Pantyushenko I.V., Plotnikova E.A. i dr. Noveye fotosensibilizatory na osnove bakterio-purpurinimida i ikh fotoindutsirovannaya protivopukhlevaya aktivnost' (New bacterio-purpurinimide-based photosensitizers and its photoinduced anti-cancer activity), *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika*, 2013, No. 3, pp. 33–34.