

КОМБИНИРОВАННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ И ПЛАЗМОННАЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В МОДЕЛИ КРЫС С ПЕРЕВИТЫМИ ОПУХОЛЯМИ

© 2024 г. А.Б. Бучарская*, **, ***, #, Н.А. Наволокин*, **, Д.А. Мудрак*, Г.Н. Маслякова*, **, Б.Н. Хлебцов****, Н.Г. Хлебцов**, ****, В.Д. Генин**, ***, Э.А. Генина**, ***, В.В. Тучин**, ****

*Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России,
Б. Казачья ул., 112, Саратов, 410012, Россия

**Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Астраханская ул., 83, Саратов, 410012, Россия

***Национальный исследовательский Томский государственный университет,
просп. Ленина, 36, Томск, 634050, Россия

****Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»,
просп. Энтузиастов, 13, Саратов, 410049, Россия

#E-mail: allaalla_72@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2024 г.

После доработки 16.03.2024 г.

Принята к публикации 20.03.2024 г.

Целью исследования была разработка комбинированной плазмонной фототермической терапии и фотодинамической терапии у крыс с перевитой холангиокарциномой РС-1. Для фотодинамической терапии крысам внутритуморально вводили в дозе 2 мг/кг индоцианиновый зеленый, разведенный в полиэтиленгликоле в соотношении 1:100. Для плазмонной фототермической терапии внутритуморально вводили покрытые полиэтиленгликолем золотые наностержни (400 мкг/мл) в объеме 30% от объема опухоли. Через час после инъекций опухоль облучали чрескожно диодным инфракрасным лазером с длиной волны 808 нм при плотности мощности 2.3 Вт/см² в течение 15 мин. Животных выводили из эксперимента через 72 ч и 21 сутки после терапии. Морфологические исследования опухоли проводили на срезах, окрашенных стандартными и иммуногистохимическими методами. При комбинированной плазмонной фототермической и фотодинамической терапии отмечали значительный подъем температуры опухоли, вплоть до 60.0 ± 4.1 °C. Через 72 ч наблюдали выраженные некротические изменения в опухолевой ткани, сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли. Через 21 сутки после терапии отмечали значительное торможение роста опухолей, индекс торможения по массе опухоли составил 77.4%.

Ключевые слова: плазмонная фототермическая терапия, фотодинамическая терапия, золотые наностержни, опухоли, комбинированная терапия.

DOI: 10.31857/S0006302924030205, EDN: ODUSTN

Актуальность разработки новых технологий противоопухолевой терапии обусловлена резким ростом заболеваемости раком в мире. По данным Международного агентства по изучению рака (IARC), в 2020 г. в мире было диагностировано 19.3 млн новых случаев, около 10 млн человек умерло от онкологических заболеваний [1]. Необходимость поиска новых методов лечения обусловлена и недостаточной эффективностью стан-

дартной химио- и лучевой терапии при лечении ряда опухолей, в том числе труднодоступных локализаций.

Наряду с традиционными методами лечения изучается возможность медицинского применения лазерной гипертермии для противоопухолевой терапии, однако основным недостатком данного метода является отсутствие селективности воздействия, за счет чего происходит нагрев здоровых тканей вокруг опухоли.

Для увеличения селективности лазерной гипертермии в последние годы активно используются металлические наночастицы. Плазмонная

Сокращения: ПФТ — плазмонная фототермическая терапия, ФДТ — фотодинамическая терапия, ПЭГ — полиэтиленгликоль.

фототермическая терапия (ПФТ) — основана на гипертермии опухолей за счет лазерного нагрева металлических наночастиц, обладающих свойством плазмонного резонанса. Наиболее часто для ПФТ используются золотые наночастицы за счет их низкой токсичности. Поглощение света самими биологическими тканями минимально в ближней инфракрасной области (700–1000 нм), поэтому плазмонный резонанс наночастиц должен быть настроен на данный диапазон [2, 3].

При воздействии на накопившиеся в опухоли наночастицы излучением лазера с определенной длиной волны, близкой к их плазмонному резонансу, происходит термолиз опухолевых клеток из-за денатурации белков и разрушения плазматической мембраны, при этом нагрева и повреждения окружающих здоровых тканей не происходит [4].

Однако нерешенными проблемами ПФТ остаются выбор оптимальных доз и методов введения наночастиц для их эффективного накопления в опухолевой ткани; выбор оптимальной мощности и режимов лазерного излучения для улучшения его проникновения в опухолевую ткань. Известно, что золотые наночастицы способны пассивно накапливаться в опухоли благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания (EPR effect) в сосудистой сети [5]. Кроме того, наночастицы избирательно задерживаются в опухолевых тканях вследствие нарушенной системы лимфатического дренажа. Для достижения эффекта пассивного таргетирования наночастицы, как правило, должны иметь размеры 10–200 нм [6, 7].

В связи с сильным поглощением и рассеянием лазерного излучения клетками и тканями *in vivo* важными задачами ПФТ являются доставка света необходимой мощности к тканям-мишеням и в то же время обеспечение безопасности лазерного облучения для здоровых органов [8]. Возможными решениями являются использование соответствующих световодов и методов оптического просветления биотканей [9].

В последние годы активно развиваются технологии комбинированной ПФТ-терапии, в том числе в сочетании с методами фотодинамической терапии (ФДТ), основанной на взаимодействии лазерного излучения с фотосенсибилизатором. Данный метод применяется в клинике уже более 40 лет для лечения различных видов рака, включая поверхностные поражения кожи, опухоли пищевода и легких [10, 11]. Важными преимуществами данной комбинации методов являются сопряженность обоих методов с использованием оптического излучения, ускорение фотохимических реакций при повышении температуры, использование более низких плотностей мощности для лазерного облучения, синергичное воздей-

ствие на опухолевые кровеносные сосуды, разобщенность максимальных терапевтических эффектов обеих процедур во времени, повышение термочувствительности клеток в условиях гипоксии, вызываемой фотохимической реакцией, и т.д. [12, 13].

Авторы работы [14] отметили значительное торможение роста опухолей у мышей при проведении комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии с использованием золотых наностержней, конъюгированных с тетрасульфонатом фталоцианина алюминия (AuNR-AlPcS₄) [14]. В работе [15] была показана значительная эффективность комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии при внутритуморальном введении золотых нанозвезд, конъюгированных с хлорином е6 (GNS-PEG-Ce6) мышам с опухолью MDA-MB-435 и использовании лазера с длиной волны 671 нм.

В исследовании [16] был продемонстрирован противоопухолевый эффект комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии с использованием золотых наностержней, конъюгированных с гематопорфирином. При внутритуморальном введении наноконструктов крысам с перевитой холангиокарциномой и последовательном облучении опухолей лазерами с длинами волн 808 нм и 633 нм в ткани опухоли развивались выраженные некротические изменения и отмечалось значительное торможение роста опухоли.

В исследовании [17] авторы наблюдали значительное торможение роста опухолей A549 у мышей при проведении комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии с использованием 4-карбоксифенилпорфирина, конъюгированного с золотыми наностержнями, покрытыми кремнеземной оболочкой (AuNR@SiO₂-TCPP), и облучении опухолей лазерами с длинами волн 660 и 808 нм.

Однако из-за частого несовпадения спектров поглощения фототермических и фотодинамических агентов комбинированная ПФТ/ФДТ-терапия требует последовательного облучения опухоли двумя разными лазерами, что удлиняет время лечения и усложняет его. Возможным решением данной проблемы является использование лазера с длиной волны, соответствующей спектрам поглощения фототермического и фотодинамического агентов, что позволит оптимизировать терапевтический протокол комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии и уменьшить ее возможные побочные эффекты.

Целью исследования является разработка эффективной комбинированной технологии ПФТ/ФДТ у крыс с перевитой холангиокарциномой PC-1.

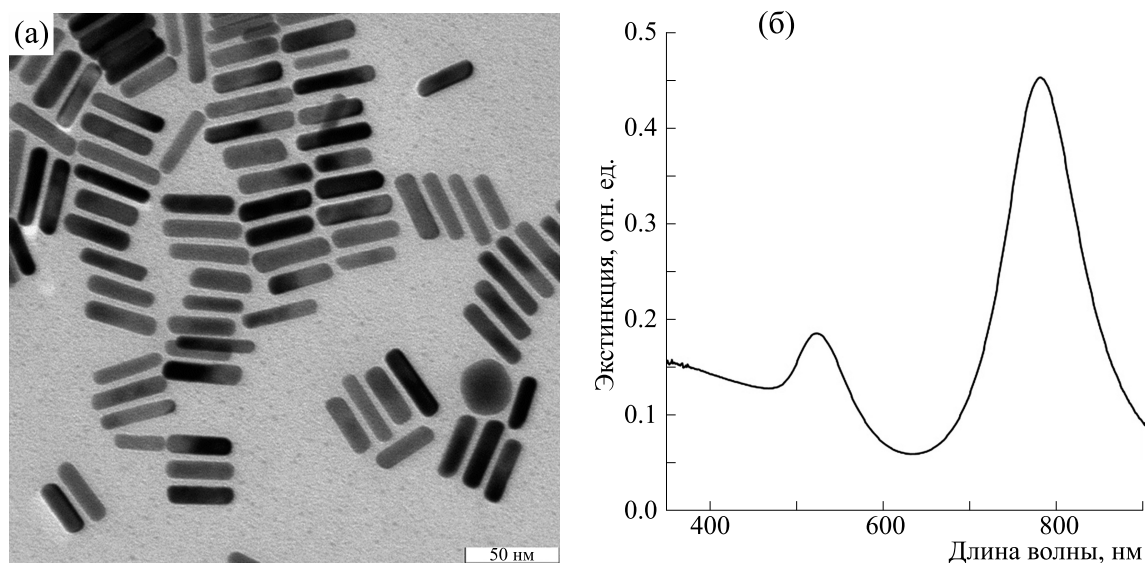


Рис. 1. (а) — ПЭМ-изображения золотых наностержней, (б) — спектр поглощения суспензии золотых наностержней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования на лабораторных животных проводили на базе ЦКП экспериментальной онкологии Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского. Штамм холангиокарциномы РС-1 был получен из коллекции НМИЦ им. Н.Н. Блохина МЗ РФ, 24 крысам-самцам линии Wistar массой 300 ± 30 г вводили подкожно в межлопаточную область по 0.5 мл 25%-ной взвеси опухолевой ткани в растворе Хенкса.

В качестве термосенсибилизатора для ПФТ использовали золотые наностержни, синтезированные в лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН зародышевым методом по методике, описанной в работе [18]. Средняя длина частиц $L_{av} = 44.0 \pm 8.3$ нм, диаметр $d_{av} = 10.9 \pm 2.1$ нм и аспектное отношение $AR_{av} = 4.03 \pm 0.72$ были определены из ПЭМ-изображений (просвечивающий электронный микроскоп Libra-120, Carl Zeiss, Германия) (рис. 1а). Для предотвращения агрегации в крови и тканях и повышения биосовместимости наностержни были функционализированы тиолированным полиэтиленгликолем (молекулярная масса 5000 Да, Nektar, США) [19]. Концентрация наностержней в суспензии составляла 400 мкг/мл.

По данным ПЭМ, средняя толщина наностержней варьирует от образца к образцу значительно меньше, чем средняя длина или отношение осей. В частности, относительное среднеквадратичное отклонение диаметра не превышало 3–5%, а относительное среднеквадратичное отклонение длины наночастиц не превышало 10–12%.

Перед измерением коэффициента экстинкции суспензию разбавляли в соотношении 1:10. Спектр коэффициента экстинкции (рис. 1б) регистрировали с помощью UV-Vis-спектрофотометра Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия).

В качестве фотосенсибилизатора для ФДТ использовали индоцианиновый зеленый (Pulsion Medical Inc., Германия), который разводили в соотношении 1:100 в полиэтиленгликоле 300 («Норкем», Россия). В качестве диагностического средства индоцианин зеленый имеет регистрационное удостоверение РФ для медицинского применения (рег. №: ЛП-008003 от 31.03.22).

При достижении опухолью объема 3.0 ± 0.3 см³ животных случайным образом были разделены на 4 группы по 6 крыс: группа сравнения — без воздействия, группа ПФТ, группа ФДТ, группа ПФТ/ФДТ.

В группах животных с ПФТ и ПФТ/ФДТ суспензию золотых наностержней вводили внутритуморально в объеме 30% от объема опухоли. Индоцианиновый зеленый в качестве фотосенсибилизатора вводили внутритуморально в группах животных с ФДТ и комбинированной терапией внутритуморально в дозе 1 мг/кг.

Через час после внутритуморальных инъекций во всех опытных группах крыс опухоль в течение 15 мин облучали чрескожно излучением диодного инфракрасного лазера 808 нм LS-2-N-808-10000 («Лазерные системы», Россия) с плотностью мощности 2.3 Вт/см². Температуру при локальном нагреве кожи над опухолью измеряли тепловизором IRY4010 (IRYSYS, Великобритания). Вывод животных и отбор образцов тканей опухоли для морфологического исследования проводили

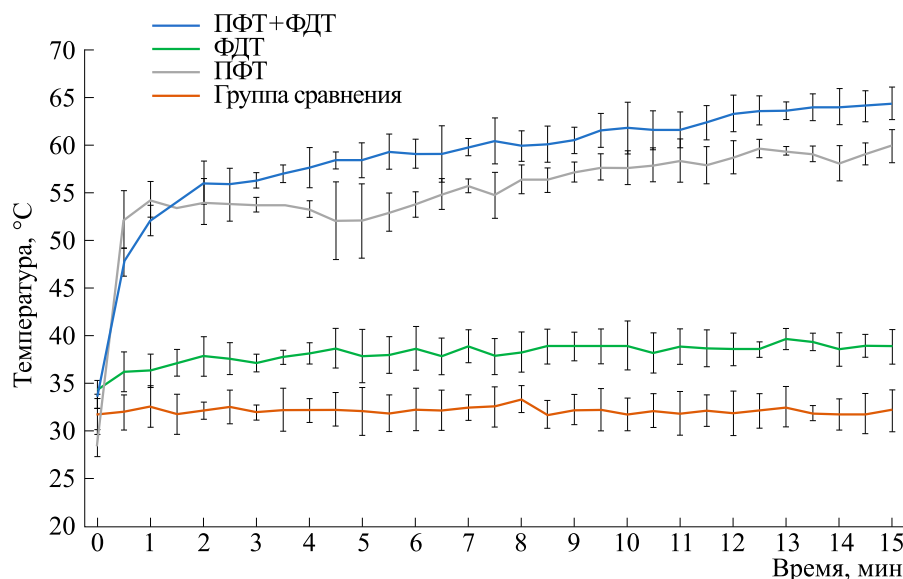


Рис. 2. Динамика температуры локального нагрева опухолей при проведении ПФТ или ФДТ, а также комбинированного ПФТ/ФДТ-воздействия.

через 72 ч и на 21 сутки после проведения терапии. Морфологические исследования проводили на срезах, окрашенных стандартными (гематоксилин-эозин) и иммуногистохимическими методами с использованием системы визуализации UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (Thermo Fisher Scientific, США) с маркером пролиферации Ki-67 (ab15580, Abcam, Великобритания, разведение 1:100) и маркером апоптоза Bax (ab32503, Abcam, Великобритания, разведение 1:250).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе ПФТ золотые наностержни вводили внутритуморально в объеме 30% от объема опухоли, при воздействии инфракрасного лазерного излучения отмечали выраженный подъем температуры локального нагрева опухоли (вплоть до 60°C), сразу после проведения терапии наблюдали ожоговую поверхность на коже в области воздействия лазера. В группе ФДТ внутритуморально вводили индоцианиновый зеленый в дозе 1 мг/кг, при проведении ФДТ температура повышалась незначительно (до $40 \pm 2^\circ\text{C}$), на поверхности кожи выявлялась лишь зона покраснения.

В группе ПФТ/ФДТ вводили внутритуморально золотые наностержни и индоцианиновый зеленый в том же объеме и дозе, при проведении комбинированной терапии отмечали выраженный подъем температуры локального нагрева опухоли, вплоть до $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Ожоговая поверхность на коже была сопоставима с наблюдаемыми изменениями после ПФТ (рис. 2).

Через 72 ч у крыс после ФДТ отмечали наименее выраженные повреждения ткани опухолей по сравнению с другими опытными группами. При морфологическом исследовании поля некроза занимали от 30 до 50% площади среза. В группах животных с ПФТ и комбинированной ФДТ/ПФТ-терапией некрозы занимали до 80% площади среза опухоли, сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли (рис. 3).

Через 21 сутки после ФДТ в холангиокарциноме часть опухолевых клеток сохраняла свои мембраны, хотя были выражены признаки кариорексиса и кариолизиса, т.е. признаков некробиоза. Поля некрозов составляли около 50% от площади среза.

После ПФТ и комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии отмечали выраженное повреждение ткани опухолей, при морфологическом исследовании поля некроза занимали до 90% площади среза опухоли, участки некрозов наблюдали даже под капсулой опухоли. Сохранные опухолевые клетки наблюдали только на периферии опухоли (рис. 4).

При иммуногистохимическом исследовании через 72 ч и 21 сутки после проведения ПФТ и комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии отмечали в сохранных клетках опухоли значительное снижение экспрессии маркера пролиферации Ki-67 (рис. 4) и повышение экспрессии BAX-маркера апоптоза.

Торможение роста опухолей через 72 ч после терапии во всех опытных группах достоверно не отличалось. Через 21 сутки у крыс наибольшее

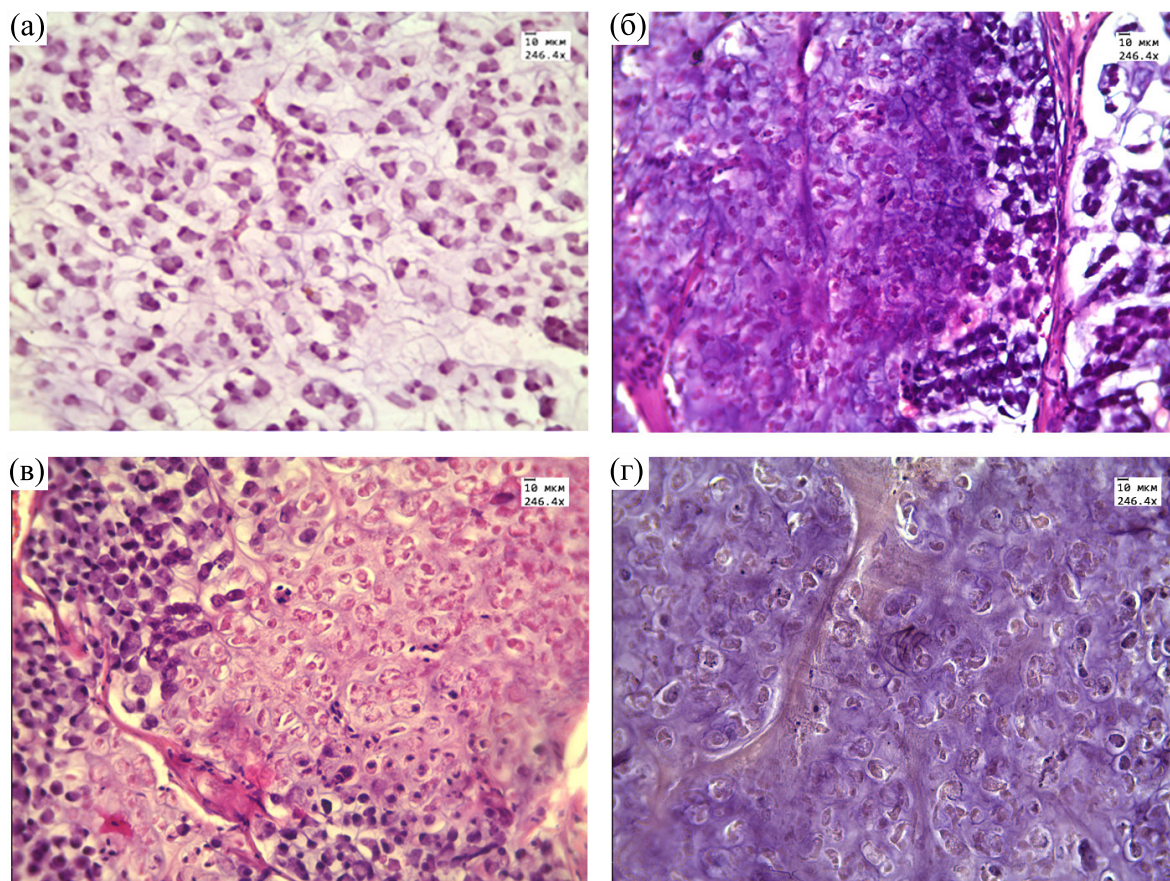


Рис. 3. Морфологическая картина холангиокарциномы через 72 ч после воздействия: (а) — группа сравнения, (б) — после ФДТ-терапии, (в) — после ПФТ-терапии, (г) — после комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии. Окрашивание гематоксилин-эозином. Ув. 246.4.

торможение роста опухолей было отмечено после комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии, индекс торможения роста опухоли по массе составил 77.4% (рис. 5).

Результаты исследования согласуются с данными ряда авторов, которые наблюдали более выраженный эффект на торможение роста опухолей при воздействии комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии при интратуморальном введении золотых наночастиц в сочетании с различными фотосенсибилизаторами: золотых нанозвезд, конъюгированных с хлорином е6 (GNS-PEG-Se6) [15], золотых наностержней, конъюгированных с гематопорфирином [16], золотых наностержней, конъюгированных с 4-карбоксибензил порфирином [17]. Недостатком этих методик является последовательное применение двух типов лазеров для ФДТ и ПФТ из-за несоответствия спектров поглощения используемых фото- и термосенсибилизаторов.

Сочетание фотосенсибилизатор-термосенсибилизатор было выбрано на основе данных о спектрах поглощения индоцианинового зеленого и золотых наностержней. Индоцианиновый зеле-

ный является трикарбоцианиновым красителем, у которого в зависимости от растворителя и концентрации красителя в растворе максимум поглощения может находиться вблизи 650 нм (димерная форма) или 800 нм (мономерная форма). При использовании в качестве растворителя ПЭГ в растворе красителя преобладают мономеры, и максимум поглощения раствора находится на длине волны 794 нм. В результате связывания молекул индоцианинового зеленого с органическими молекулами биологических тканей его пик поглощения смещается в длинноволновую область до 810 нм [20].

Создание multifunctionальных наноконструктов для комбинированной противоопухолевой терапии, содержащих в своем составе золотые наночастицы и фотосенсибилизаторы с близким спектром поглощения, является перспективным направлением наномедицины. Так, в недавнем исследовании [21] была разработана новая наноплатформа на основе инкапсулированных золотых наностержней, конъюгированных с индоцианиновым зеленым, применение которой для комбинированной ПФТ/ФДТ-тера-

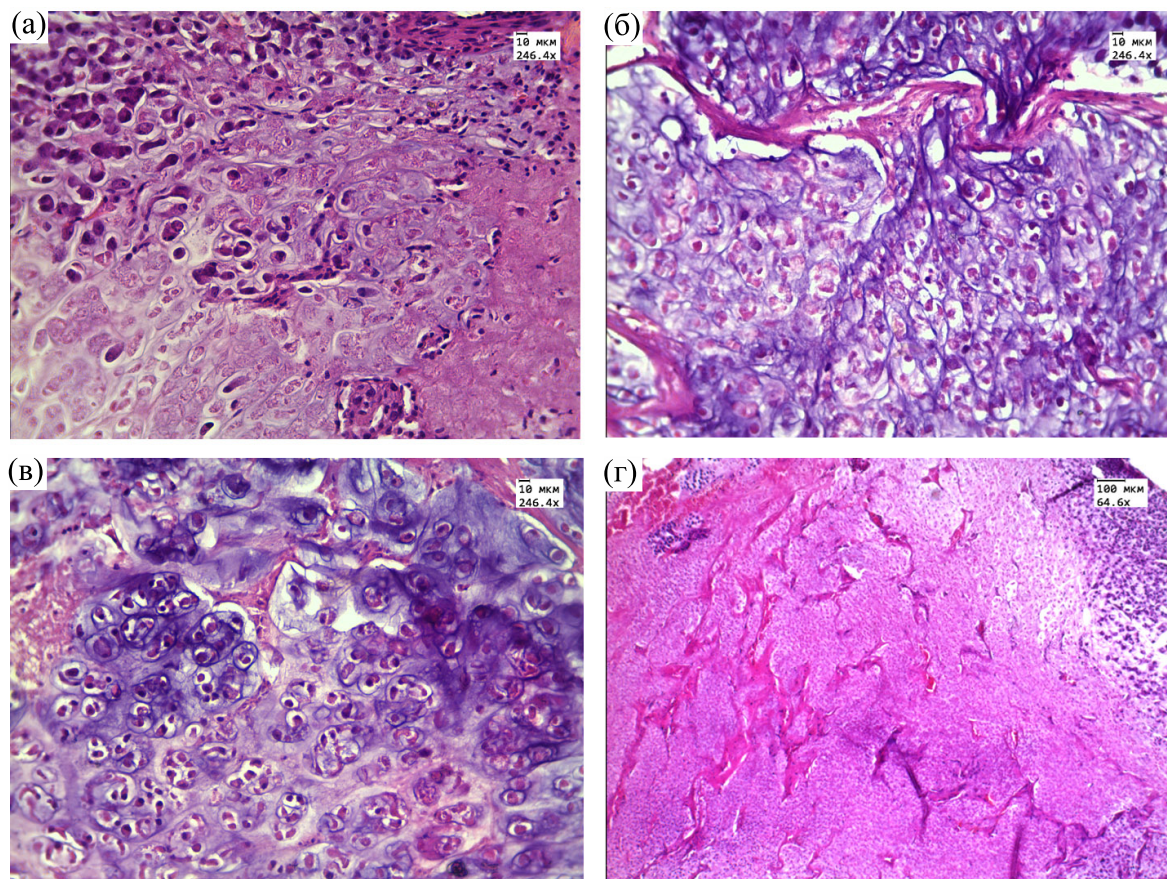


Рис. 4. Морфологическая картина холангиокарциномы через 21 сутки после воздействия: (а) — группа сравнения, ув. 246.4; (б) — после ФДТ-терапии, ув. 246.4; (в) — после ПФТ-терапии, ув. 246.4; (г) — после комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии, ув. 64.6. Окрашивание гематоксилин-эозином.

пии у мышей с перевитой опухолью A549 вызывало значительное торможение роста опухолей, по сравнению с группами животных только с ФДТ или ПФТ-терапией. Возможными ограничениями для синтеза такого вида нанокompозитов яв-

ляются сложности загрузки в них достаточного количества фотосенсибилизатора для достижения его эффективной концентрации в области интереса при внутривенном введении. В нашем ранее проведенном исследовании мы подобрали необходимые дозы и способ многократного внутривенного введения золотых наностержней для достаточного накопления их в опухоли с сформированной сосудистой сетью и протоколы лазерного облучения для эффективного проведения ПФТ [22]. В настоящем исследовании нами были подобраны необходимые для достижения противоопухолевого эффекта при ФДТ дозы фотосенсибилизатора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Близость спектров поглощения фотосенсибилизатора и термосенсибилизатора, имеющих максимумы в области 800–820 нм, позволяет использовать для комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии один инфракрасный лазер (808 нм), что может считаться преимуществом предложенного подхода.

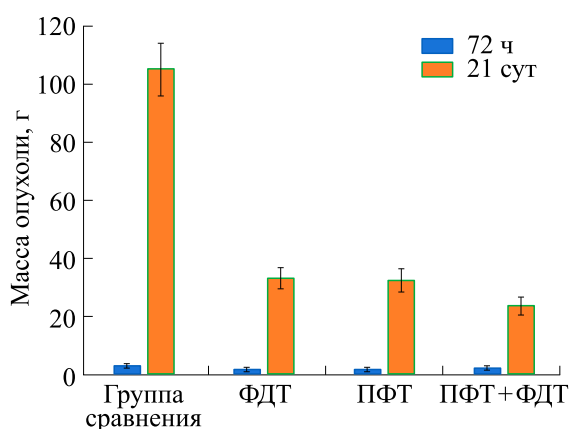


Рис. 5. Масса опухолей через 72 ч и 21 сутки после проведенной терапии.

Разработанная комбинированная технология ПФТ/ФДТ-терапии вызывает выраженное повреждение ткани перевитой холангиокарциномы у крыс за счет резкого локального нагрева при ПФТ и цитотоксического действия ФДТ на опухолевые клетки. Противоопухолевое действие предложенной комбинированной технологии превосходит результаты действия при использовании только ПФТ или ФДТ. Этот синергетический эффект можно связать с усиленной диффузией красителя в клетки при повышенной температуре и более эффективной генерации синглетного кислорода и последующей цепочки радикалов молекулами фотосенсибилизатора в сильном локальном поле наночастиц. Однако необходимы дальнейшие исследования как биофизических механизмов комплексного взаимодействия фото- и термосенсибилизаторов, так и безопасности и отдаленных эффектов предложенной терапии.

Дальнейшим направлением исследований может стать разработка многофункциональных наноконструктов, обладающих свойствами направленной доставки действующих агентов в опухоль, на основе золотых наностержней и индоцианинового зеленого для комбинированной ПФТ/ФДТ-терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось в рамках перспективного научного исследования № SSMU-2022-002 «Разработка технологии комбинированной противоопухолевой плазмонной фототермической и фотодинамической терапии», поддержанного СГМУ им. В.И. Разумовского. Генин В.Д., Генина Э.А. и Тучин В.В. (разработка установки и проведение процедур лазерного облучения опухоли при ПФТ и ФДТ) поддержаны грантом Российского научного фонда № 23-14-00287. Работа Н.Г. Хлебцов и Б.Н. Хлебцова (синтез золотых наностержней) выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр РАН».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на лабораторных животных проводили в соответствии с рекомендациями локального комитета по этике и требованиями международных руководств по использованию лабораторных животных в научных исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cancer today (Globocan 2020) [Electronic resource]. 2020. Mode of access: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. Date of access: 05.01.2024.
2. Huang X., Jain P. K., El-Sayed I. H., and El-Sayed M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers Med. Sci.*, **23** (3), 217 (2008). DOI: 10.1007/s10103-007-0470-x
3. Kim M., Lee J.-H., and Nam J.-M. Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications. *Adv. Sci.*, **6**, 1900471 (2019). DOI: 10.1002/adv.201900471
4. Vines J. B., Yoon J.-H., Ryu N.-E., Lim D.-J., and Park H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.*, **7**, 1 (2019). DOI: 10.3389/fchem.2019.00167
5. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., and Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control Release*, **65** (1–2), 271 (2000). DOI: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5
6. Park J., Choi Y., Chang H., Um W., Ryu J. H., and Kwon I. C. Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment. *Theranostics*, **9** (26), 8073 (2019). DOI: 10.7150/thno.37198
7. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Pers. Med.*, **11**, 771 (2021). DOI: 10.3390/jpm11080771
8. Akhter F., Manrique-Bedoya S., Moreau C., Smith A. L., Yusheng F., Mayer K. M., and Hood R. L. Assessment and Modeling of Plasmonic Photothermal Therapy Delivered via a Fiberoptic Microneedle Device Ex Vivo. *Pharmaceutics*, **13** (12), 2133 (2021). DOI: 10.3390/pharmaceutics13122133
9. Bucharskaya A. B., Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N., Maslyakova G. N., Navolokin N. A., Genin V. D., Genina E. A., and Tuchin V. V. Photothermal and Photodynamic Therapy of Tumors with Plasmonic Nanoparticles: Challenges and Prospects. *Materials*, **15** (4), 1606 (2022). DOI: 10.3390/ma15041606
10. Kwiatkowski S., Knap B., Przysupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., and Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*, **106**, 1098 (2018). DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049
11. Gurcan G., Emre G. M., and Seylan A. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front. Chem.*, **9**, 691697 (2021). DOI: 10.3389/fchem.2021.691697
12. Younis M. R., Wang C., An R., Wang S., Younis M. A., Li Z. Q., Wang Y., Ihsan A., Ye D., and Xia X. H. Low Power Single Laser Activated Synergistic Cancer Phototherapy Using Photosensitizer Functionalized Dual Plasmonic Photothermal Nanoagents. *ACS Nano*, **13** (2), 2544 (2019). DOI: 10.1021/acsnano.8b09552

13. Kong C. and Chen X. Combined Photodynamic and Photothermal Therapy and Immunotherapy for Cancer Treatment: A Review. *Int. J. Nanomedicine*, **17**, 6427 (2022). DOI: 10.2147/IJN.S388996
14. Jang J. Y., Park C. H., Tung Kim I.-H., and Choi Y. Gold Nanorod–Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy In Vivo. *ACS Nano*, **5** (2), 1086 (2011). DOI: 10.1021/nn102722z
15. Wang S., Huang P., Nie L., Xing R., Liu D., Wang Z., Lin J., Chen S., Niu G., Lu G., and Chen X. Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars. *Adv. Mater.*, **1** (2), 90 (2013). DOI: 10.1002/adma.201204623
16. Terentyuk G., Panfilova E., Khanadeev V., Chumakov D., Genina E., Bashkatov A., Tuchin V., Bucharskaya A., Maslyakova G., Khlebtsov N., and Khlebtsov B. Gold nanorods with a hematoporphyrin-loaded silica shell for dual-modality photodynamic and photothermal treatment of tumors in vivo. *Nano Res.*, **7**, 325 (2014). DOI: 10.1007/s12274-013-0398-3
17. Zhang S., Lv H., Zhao J., Cheng M., and Sun S. Synthesis of porphyrin-conjugated silica-coated Au nanorods for synergistic photothermal therapy and photodynamic therapy of tumor. *Nanotechnology*, **30** (26), 265102 (2019). DOI: 10.1088/1361-6528/ab0bd1
18. Khlebtsov B. N., Khanadeev V. A., and Khlebtsov N. G. Observation of Extra-High Depolarized Light Scattering Spectra from Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. C*, **112**, 12760–12768 (2008).
19. Khlebtsov B. N., Tuchina E. S., Khanadeev V. A., Panfilova E. V., Petrov P. O., Tuchin V. V., and Khlebtsov N. G. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin. *J. Biophoton.*, **6**, 338–351 (2013). DOI: 10.1002/jbio.201200079
20. Генина Э. А., Башкатов А. Н., Кочубей В. И., Тучин В. В. и Альтшулер Г. Б. In vivo исследование взаимодействия индоцианина зеленого с эпидермисом человека. *Письма в ЖТФ*, **27** (14), 63 (2001).
21. Gong B., Shen Y., Li H., Li X., Huan X., Zhou J., Chen Y., Wu J., and Li W. Thermo-responsive polymer encapsulated gold nanorods for single continuous wave laser-induced photodynamic/photothermal tumour therapy. *J. Nanobiotechnol.*, **19**, 41 (2021). DOI: 10.1186/s12951-020-00754-8
22. Bucharskaya A. B., Maslyakova G. N., Chekhonatskaya M. L., Terentyuk G. S., Navolokin N. A., Khlebtsov B. N., Khlebtsov N. G., Bashkatov A. N., Genina E. A., and Tuchin V. V. Plasmonic Photothermal Therapy: Approaches to Advanced Strategy. *Lasers Surg. Med.*, **50**, 1025–1033 (2018). DOI: 10.1002/lsm.23001

Photodynamic and Plasmonic Photothermal Combination Therapy in a Rat Model of Transplanted Tumors

A.B. Bucharskaya*, **, *, N.A. Navolokin*, **, D.A. Mudrak*, G.N. Maslyakova*, **,
B.N. Khlebtsov****, N.G. Khlebtsov**, ****, V.D. Genin**, ***,
E.A. Genina**, ***, and V.V. Tuchin**, *****

*V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation,
B. Kazachya ul. 112, Saratov, 410012 Russia

**National Research Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Astrakhanskaya ul. 83, Saratov, 410012 Russia

***National Research Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

****Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, prosp. Enthusiastov 13, Saratov, 410049 Russia

The aim of this study is to develop a combined technology which integrates plasmonic photothermal therapy and photodynamic therapy of transplanted cholangiocarcinoma PC-1 in rats. For photodynamic therapy, rats received intratumoral injection of 2 mg/kg indocyanine green diluted in a 1:100 volume ratio with polyethylene glycol. For plasmonic photothermal therapy, the intratumoral injectate volume of gold nanorods (400 µg/ml) coated with polyethylene glycol for tumor was drawn up to be 30% to the tumor volume. One hour after injections, the tumor was irradiated percutaneously with an 808 nm infrared diode laser at a power density of 2.3 W/cm² for 15 min. Animals were excluded from the experiment 72 and 21 days after therapy. Morphological studies of the tumor were performed on sections stained by standard protocols and immunohistochemical methods. A significant rise in tumor temperature, up to 60 ± 4.1 °C, was noted during plasmonic photothermal therapy combined with photodynamic therapy. In 72 hours, the pronounced necrotic changes in the tumor tissue were observed, the residual tumor cell foci were found only in the periphery of the tumor. A significant inhibition of tumor growth was observed 21 days after therapy; the tumor growth inhibition index by tumor mass was 77.4%.

Keywords: plasmonic photothermal therapy, photodynamic therapy, gold nanorods, tumors, combination therapy