

На правах рукописи



КРЫЛОВА ЛЮБОВЬ ВЛАДИМИРОВНА

**Конъюгаты металлокомплексов хлорина *e6* с ингибиторами
тирозинкиназ как агенты для комбинированной фотодинамической
терапии**

1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2025

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

Научный руководитель: **Балалаева Ирина Владимировна**

кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Мартынов Александр Германович**

доктор химических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории новых физико-химических проблем Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук (ИФХЭ РАН)

Генина Элина Алексеевна

доктор физико-математических наук, доцент, профессор кафедры оптики и биофотоники Института физики Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского"

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Защита диссертации состоится 26 июня 2025 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23. С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2025/1551/diss-Krylova-1551.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Черкасова Елена Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В последние десятилетия одной из наиболее динамично развивающихся областей в создании противоопухолевых препаратов является разработка фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии (ФДТ). Фотосенсибилизаторы сами по себе являются низкотоксичными соединениями. Однако под воздействием света определенной длины волны они способны приводить к запуску серии фотохимических процессов, результатом которых является продукция цитотоксических активных форм кислорода (АФК) [Castano *et al.*, 2004; Kwiatkowski *et al.*, 2018]. Противоопухолевая эффективность достигается за счет прямого цитотоксического воздействия АФК на опухолевые клетки [Abrahamse, Hamblin, 2016]. Помимо этого, ФДТ способна приводить к повреждению сосудистой сети опухоли [Dolmans *et al.*, 2003] и активации иммунного ответа после облучения [Correia *et al.*, 2021].

ФДТ является клинически одобренным методом лечения ряда онкологических заболеваний, включая рак кожи, пищевода, головы и шеи, легких и мочевого пузыря [Correia *et al.*, 2021; Michalak *et al.*, 2023]. Помимо этого, ведутся доклинические и клинические исследования по внедрению ФДТ для лечения рака молочных желез, простаты и глиомы [Kim, Chang, 2023; Aebisher *et al.*, 2024]. Привлекательность данного метода лечения заключается в минимальной инвазивности, отсутствии серьезных побочных эффектов и локальности действия [Grin *et al.*, 2022]. Однако применение ФДТ в качестве монотерапевтического подхода сталкивается с ограничениями эффективности. В частности, неоптимальное биораспределение фотосенсибилизатора и ослабление света при прохождении через ткани могут привести к недостаточной эффективности проводимой терапии [Huis in 't Veld *et al.*, 2023].

Для решения данных проблем был предложен подход, основанный на использовании мультимодальных фотосенсибилизаторов для комбинированной ФДТ. Идея создания таких препаратов заключается в объединении эффективности фотосенсибилизатора и цитотоксического препарата для получения наибольшего терапевтического эффекта (аддитивного или синергического), а также преодоления резистентности. В качестве дополнительного цитотоксического модуля могут выступать ДНК-интеркаляторы, металлосоодержащие цитостатики, антимитотические препараты, модуляторы эстрогена и ингибиторы белков [Otvagin *et al.*, 2022].

Перспективными кандидатами для создания мультимодальных фотосенсибилизаторов являются мультикиназные ингибиторы, специфичные в отношении рецепторных тирозинкиназ, например, вандетаниб и кабозантиниб. Механизм действия этих агентов основан на блокировке связывания АТФ с рецепторами факторов роста, что приводит к подавлению сигнальных каскадов, необходимых для выживания опухолевых клеток [Kumar *et al.*, 2024]. При этом мультикиназные ингибиторы воздействуют на несколько рецепторов, гиперэкспрессируемых в опухолях, что повышает их терапевтическую эффективность [Bedard *et al.*, 2020].

Было показано, что неоптимальные дозы ФДТ приводят к запуску сигнальных путей, приводящих к выживанию опухолевых клеток после терапии и развитию рецидива [Broekgaarden *et al.*, 2015]. Основная роль в запуске этих молекулярных событий принадлежит именно рецепторным тирозинкиназам, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) [Edmonds *et al.*, 2012], рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) [Bhuvaneswari *et al.*, 2009] и рецептор фактора роста гепатоцитов (HGFR) [Vogel *et al.*, 2013]. Имеются экспериментальные данные, что, некоторые молекулярные события, происходящие в опухолевых клетках при действии сублетальных доз ФДТ, можно использовать для сенсibilизации к другим методам лечения [Obaid *et al.*, 2024]. Следовательно, объединение активности фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора в одной молекуле способно предотвратить передачу сигналов о выживании, повысить избирательность действия в отношении опухолевых клеток и усилить общую противоопухолевую эффективность ФДТ за счет реализации сочетанного действия.

Таким образом, исследование эффективности применения мультимодальных агентов на основе фотосенсибилизатора и низкомолекулярного мультикиназного ингибитора является актуальной задачей для дальнейших разработок по улучшению эффективности ФДТ и преодолению существующих ограничений.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы было исследование фотофизических и биологических свойств конъюгатов металлокомплексов хлорина *еб* с различными ингибиторами тирозинкиназ для комбинированной фотодинамической терапии EGFR- и HGFR-положительных опухолей.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести анализ фотофизических и биологических свойств *in vitro* конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и вандетаниба.
2. Оценить противоопухолевую эффективность конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и вандетаниба в экспериментах *in vivo* на лабораторных животных.
3. Исследовать особенности фотофизических свойств фермент-расщепляемого конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и кабозантиниба и его активность в отношении монослойной культуры опухолевых клеток.
4. Проанализировать эффективность конъюгата металлокомплекса хлорина *еб* и кабозантиниба в отношении трехмерной модели опухолевого роста *in vitro* в коллагеновом гидрогеле.

Научная новизна

Впервые были исследованы свойства мультимодальных фотосенсибилизаторов, представляющих собой конъюгаты металлокомплексов хлорина *еб* и ингибиторов тирозинкиназ, в качестве агентов для комбинированной ФДТ.

Впервые показан синергический характер взаимодействия двух терапевтических модулей, производного хлорина и ингибитора киназ, при их включении в состав единой молекулы.

Показана терапевтическая эффективность соединения, в состав которого входят производное хлорина *еб* и вандетаниб, в отношении EGFR-положительных опухолей. Высокая противоопухолевая активность подтверждена как для культуры клеток *in vitro*, так и для экспериментальных опухолей на животных опухоленосителях.

Показана высокая активность соединения, в состав которого входят производное хлорина *еб* и кабозантиниб, в отношении HGFR-положительных опухолевых клеток при двумерном и трехмерном культивировании. При этом установлено, что применение ферментативно расщепляемого линкера приводит к усилению выраженности синергического эффекта компонентов соединения.

Научно-практическая значимость

Получены новые знания об эффективности объединения в единой молекуле фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора тирозинкиназ с целью создания терапевтического агента с мультимодальным действием на клетки. Полученные данные могут быть использованы для создания новых противоопухолевых препаратов для комбинированной ФДТ.

Основные результаты и выводы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов ННГУ им. Н.И. Лобачевского и других вузов, обучающихся по биологическим, химическим и медицинским специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мультимодальные фотосенсибилизаторы на основе металлокомплексов хлорина *еб* и мультикиназных ингибиторов тирозинкиназ являются перспективными соединениями для комбинированной ФДТ онкологических заболеваний за счет синергического противоопухолевого эффекта терапевтических модулей с разными механизмами действия.

2. Применение мультикиназных ингибиторов тирозинкиназ (вандетаниб и кабозантиниб) в качестве дополнительного терапевтического модуля, обеспечивает усиление эффективности фотодинамической терапии, проводимой с производным хлорина еб, в отношении EGFR- и HGFR-положительных опухолей.

3. Применение фермент-расщепляемого линкера при создании мультимодальных фотосенсибилизаторов обеспечивает расщепление конъюгата в присутствии специфического фермента, как следствие, его селективную активацию и повышение эффективности за счет снятия стерического ограничения индивидуальных терапевтических модулей.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных, применением надежных методов исследования, широкой апробацией. Также аргументы и выводы согласуются с результатами независимых исследований в литературе.

Апробация

Основные результаты работы представлялись на международных и российских научных мероприятиях: Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (г. Н. Новгород, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023); Международном научном форуме «Ломоносов-2019» (г. Москва, 2019); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2020, 2022); Молодежной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (г. С.-Петербург, 2020, 2022); Нижегородской сессии молодых ученых (г. Н. Новгород, 2021, 2022); UK-Russia Conference “Advanced biomaterials to combat cancer” (Ланкастер, Великобритания, 2021); 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (виртуальный формат выступления, 2021); Международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (г. Севастополь, 2022); The 3rd International Electronic Conference on Cancers: New Targets for Cancer Therapies (виртуальный формат выступления, 2023); XXXV Зимней молодежной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2023); Международной школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (г. Н. Новгород, 2024); X съезде Российского фотобиологического общества и конференции «Современные проблемы фотобиологии» (пос. Шепси, 2023); 6-й Российской конференции по медицинской химии (г. Н. Новгород, 2024); I региональном собрании РФО и Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» (г. Нижний Новгород, 2024).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 34 работы, включая 7 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в список ВАК. Получен патент РФ на изобретение.

Структура и объем работы

Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов, цитируемой литературы. Объем составляет 160 страниц машинописного текста, иллюстрированного 34 рисунками и 12 таблицами. Список литературы включает 424 источника.

Благодарности

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № FSWR-2023-0032) и РФФ (проекты № 21-73-10230 и № 24-13-00179).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, посвященный физико-химическим свойствам фотосенсибилизаторов, принципам и механизмам их действия, основным мировым тенденциям в области фотодинамической терапии, перспективам комбинированной фотодинамической терапии, в том числе при объединении фотосенсибилизаторов с низкомолекулярными ингибиторами тирозинкиназ.

В главе 2 описаны методики исследований с перечисленными материалами и оборудованием.

Исследуемые соединения представляют собой два различных варианта реализации концепции объединения в одном агенте фотодинамической и таргетной противоопухолевой активности. Структурно исследуемые соединения представляют собой конъюгаты производных хлорина *еб* и мультикиназных низкомолекулярных ингибиторов, соединенных между собой с помощью различных по химическому строению линкеров (рис. 1).

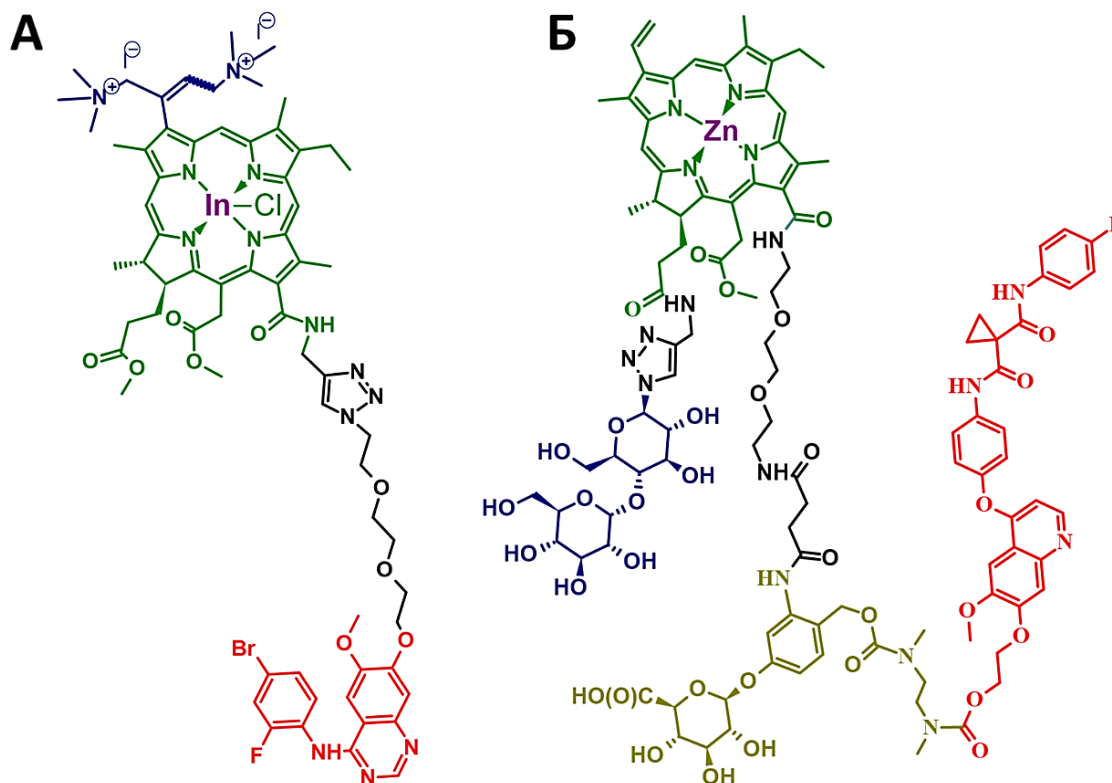


Рисунок 1. Структурные формулы исследуемых мультимодальных фотосенсибилизаторов: (А) InChl-Vnd; (Б) ZnChl-Cbz. Цветом обозначены составляющие модули конъюгатов: зеленый – производное хлорина *еб*, фиолетовый – центральный атом металла, синий – заместительные группы, красный – низкомолекулярный ингибитор, черный – нерасщепляемый линкер, желтый – расщепляемый линкер (глюкуроноидный фрагмент)

Производное хлорина *еб* под действием света запускает фотодинамическую реакцию в опухолевой клетке. Внедрение металла (In или Zn) в тетрапиррольную структуру обеспечивает оптимальные для ФДТ фотофизические характеристики, включая поглощение света в длинноволновой области спектра и высокий выход генерации активных форм кислорода. В качестве дополнительного цитотоксического агента выступали мультикиназные низкомолекулярные ингибиторы для таргетной терапии онкологических заболеваний: вандетаниб и кабозантиниб. Помимо этого, в тетрапиррольную структуру хлорина были введены заместительные группы (тетраалкиламмониевые группы или углеводный фрагмент) для повышения гидрофильности молекул.

InChl-Vnd – конъюгат дикатионного индиевого комплекса хлорина *еб* и вандетаниба. Присоединение вандетаниба к хлориновому ядру осуществлено за счет полиэтиленгликолевого линкера. Вандетаниб является обратимым мультикиназным ингибитором тирозинкиназной активности EGFR, VEGFR-2 и VEGFR-3. В качестве заместительных групп выступают тетраалкиламмониевые группы, представляющие собой два катиона.

ZnChl-Cbz – ферментативно расщепляемый конъюгат цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба. Присоединение кабозантиниба к хлориновому ядру осуществлено за счет β -глюкуронидного линкера, чувствительного воздействию β -глюкуронидазы. Кабозантиниб представляет собой обратимый мультикиназный ингибитор тирозинкиназной активности HGFR, VEGFR-2 и VEGFR-3. В качестве заместительной группы выступает углеводный остаток мальтозы.

Соединения были синтезированы в Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского на кафедре органической химии [Otvagin *et al.*, 2024; Krylova *et al.*, 2025]. В ряде экспериментов использовались соединения сравнения, представляющие собой неконъюгированные металлокомплексы производного хлорина *еб* и ингибиторы тирозинкиназ (рис. 2).

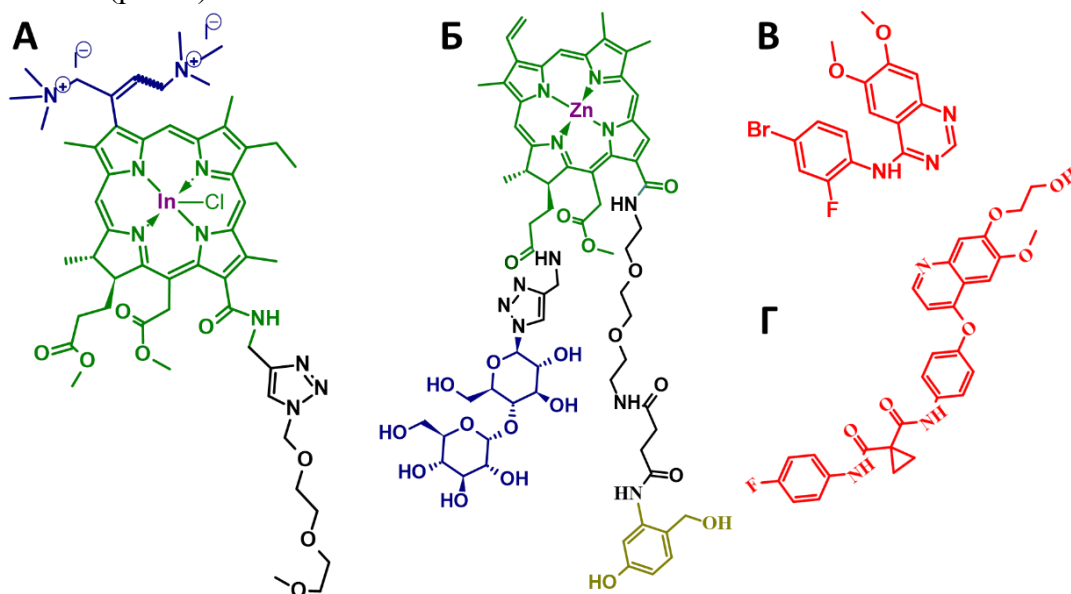


Рисунок 2. Структурные формулы соединений сравнения: А) **InChl** – индиевый комплекс производного хлорина *еб*, Б) **ZnChl** – цинковый комплекс производного хлорина *еб*, В) **Vnd** – вандетаниб, Г) **Cbz** – кабозантиниб

Для исследования фотофизических и биологических свойств *in vitro* сухие навески соединений растворяли до стоковой концентрации 1 мМ. В случае конъюгата **InChl-Vnd** и его соединений сравнения использовали деионизированную воду (dH₂O), содержащую 5% диметилсульфоксида (ДМСО). Для конъюгата **ZnChl-Cbz** и его соединений сравнения использовали dH₂O, содержащую 5% ДМСО и 10% полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для исследования биологических свойств *in vivo* сухие навески соединений растворяли до стоковой концентрации 0,8 мМ в dH₂O, содержащей 20% этанола и 30% ПЭГ.

Оптические и фотохимические свойства исследуемых конъюгатов и соединений сравнения исследовали с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek, США). Для измерения спектров поглощения и флуоресценции использовали водные растворы исследуемых соединений в концентрации 5 мкМ. Спектр флуоресценции регистрировали при возбуждении на 410 нм. Определение квантового выхода флуоресценции производили методом эталонного красителя, в качестве которого использовали родамин В (Sigma, США) в воде (квантовый выход 0,31 [Magde *et al.*, 2008]).

Определение квантового выхода генерации активных форм кислорода производили методом химических ловушек по изменению оптической плотности присутствующего в среде 1,3-дифенилизобензофурана (ДФИБФ) на длине волны 420 нм до и после облучения в полосе поглощения фотосенсибилизатора [Krieg *et al.*, 1993]. В качестве эталона использовали Фотодитазин® (Бета-Гранд ООО, Россия) (квантовый выход 0,56 [Bagrov *et al.*, 2018]). Определение квантового выхода фотовыгорания производили по изменению интенсивности флуоресценции до и после облучения в разных дозах [Shestakova *et al.*, 2022]. Для облучения растворов использовали светодиодный облучатель с длиной волны 655-675 нм и мощностью 32 мВт/см² [Shilyagina *et al.*, 2014].

Клеточные культуры, использованные для оценки биологических свойств *in vitro*, были подобраны исходя из локализаций опухолей, для которых показана ФДТ [Correia *et al.*, 2021; Michalak *et al.*, 2023]. Помимо этого, подбор клеток осуществляли на основании данных об экспрессии целевых рецепторов EGFR, VEGFR-2, VEGFR-3 и HGFR, являющихся мишенями действия таргетных агентов, входящих в состав исследуемых конъюгатов. Данные об экспрессии были взяты из базы данных Human Protein Atlas [Thul, Lindskog, 2017].

Для исследования биологических свойств **InChl-Vnd** были использованы клетки эпидермоидной карциномы кожи человека (A-431) и неканцерогенные кератиноциты человека (HaCat), а для **ZnChl-Cbz** – клетки карциномы мочевого пузыря человека (T-24) и неопухолевые овариальные клетки китайского хомячка (CHO). Все клеточные культуры были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (ИНЦ РАН, Санкт-Петербург; ИБР РАН, Москва).

Динамику накопления и исследование локализации соединений в живых клетках проводили с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия). Оценку внутриклеточного распределения производили с использованием специфических красителей клеточных органелл (LysoTracker Green DND-26, MitoTracker Green FM, ER-Tracker, BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA, CellMask Plasma Membrane Green Stain) в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Fisher Scientific, США).

Фотодинамическую активность соединений исследовали методом МТТ-теста [Mosmann, 1983]. Инкубация с исследуемыми соединениями составляла 24 часа с последующим облучением с помощью светодиодного излучателя в дозе 20 Дж/см² (спектральный диапазон 655-675 нм, интенсивность светового потока 32 мВт/см², время облучения 10 минут 25 секунд) [Shilyagina *et al.*, 2014]. Для оценки темновой цитотоксичности клетки находились в тех же условиях, но не подвергались облучению. Жизнеспособность клеток оценивали через 24 часа после окончания воздействия. Рассчитаны значения полуингибирующей концентрации IC₅₀ для каждого соединения с применением модели логнормального распределения с четырехпараметрической аппроксимацией в программе GraphPad Prism (v. 9.3.1, GraphPad Software, Inc, США).

Оценку сочетанного действия фотосенсибилизатора и ингибитора производили путем расчета индекса комбинации (CI) на основании полученных значений IC₅₀ для конъюгата и отдельных терапевтических модулей [Fu *et al.*, 2016]. Данный индекс применяется для количественной оценки типа лекарственного взаимодействия: синергическое (CI < 1), аддитивное (CI = 1) или антагонистическое (CI > 1).

Исследование внутриклеточной генерации АФК осуществляли с использованием неспецифической ловушки 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин (DCFH-DA) [Yu *et al.*, 2021]. Оценку уровня образования внутриклеточных АФК проводили по изменению интенсивности флуоресценции клеток после фотодинамического воздействия с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy MX. Для нормирования уровня флуоресценции на количество клеток производили дополнительную инкубацию всех образцов через 120 минут после облучения с ДНК-интеркалирующим флуоресцентным красителем Hoechst 33258 (ПанЭко, Россия) (1 мкг/мл, 30 минут).

Ингибиторный анализ для определения типа АФК, генерируемых в живых клетках при фотодинамическом воздействии с исследуемыми соединениями, проводили с использованием специфических ловушек. В качестве ингибитора синглетного кислорода применяли азид натрия [Nsubuga *et al.*, 2021], гидроксильного радикала – D-маннитол [Jennings *et al.*, 1998], а супероксидного анион-радикала – тирон [Meyer *et al.*, 2018].

Оценка противоопухолевой эффективности *in vitro* на трехмерной модели опухолевого роста. Клеточная культура Т-24 не является туморогенной для иммунодефицитных мышей [Flatow *et al.*, 1987]. В связи с этим была использована трехмерная модель опухолевого роста *in vitro* на основе гидрогеля коллагена I типа, а в качестве клеточной компоненты использованы флуоресцентные клетки Т-24-GFPcyto [Otvagin *et al.*, 2024]. Заключение клеток Т-24-GFPcyto в гидрогель происходило на этапе их высадки путем равномерного распределения клеточной суспензии в растворе коллагена I типа и последующей полимеризации геля.

Оценку роста и гибели клеток при различных вариантах лечения проводили с помощью регистрации интегральной флуоресценции геля с заключенными в нем клетками на установке DVS-03 (Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт» Москва, Россия) в соответствии с ранее описанным методом [Sencha *et al.*, 2022].

Животные и опухолевая модель. Исследования биораспределения и противоопухолевой эффективности конъюгата проводили на иммунодефицитных мышах Balb/c nude (самки, возраст 1-2 месяца, количество животных 79), полученных из SPF вивария ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Проводимые эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике (протокол № 85 от 29.07.2024).

Для получения опухолевой модели суспензию опухолевых клеток А-431 (3×10^6 клеток в 0,1 мл фосфатно-солевого буфера) прививали в область правого бедра. Исследования начинали на 10 день после инокуляции клеток, когда размер опухолей достигал $\sim 0,1 \text{ см}^3$.

Определение содержания индия в органах и опухоли животных методом масс-спектрометрии производили через 4 часа после внутривенного введения конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг. Анализ был выполнен на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой PerkinElmer NexION 2000 (Массачусетс, США) в лаборатории молекулярной иммунологии, Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Москва).

Исследование противоопухолевой эффективности соединений на животных-опухоленосителях осуществляли путем анализа динамики изменения объема опухолевых узлов, а также по расчетным коэффициентам торможения роста опухоли (ТОР) и абсолютного прироста опухоли (АПО). Фотодинамическую терапию проводили через 8 часов после инъекции соединений в хвостовую вену в дозе 8 мкмоль/кг. Данная доза соответствует минимально применяемой дозе препарата для человека при внутривенном введении (0,7 мг/кг массы тела) с учетом общепринятых коэффициентов пересчета [Karlan *et al.*, 2014]. Облучение опухоли осуществляли локально в дозе 50 Дж/см^2 (спектральный диапазон 620-655 нм, интенсивность светового потока 100 мВт/см^2) и проводили в 2 сессии по 4 минуты 10 секунд, перерыв между сессиями аналогичной длительности.

Гистологический анализ. Подготовка образцов опухолей на 3-и сутки после проведения ФДТ выполнялась в лаборатории оптической тераностики Центра биофизики Института биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Срезы окрашивали гематоксилином–эозином. Полученные препараты анализировали на микроскопе Zeiss Vert.A1 (Zeiss, Германия) с объективами Zeiss LD A-Plan $\times 10$ и $\times 20$ (Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2007, GraphPad Prism и ImageJ (National Institutes of Health, США). Использованы методы параметрической и непараметрической статистики (t-критерий для сравнения двух групп, дисперсионный анализ, методы множественных сравнений).

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Фотофизические и биологические свойства *in vitro* конъюгата металлокомплекса хлорина еб и вандетаниба

Спектральные свойства конъюгата *InChl-Vnd*

Одним из основных требований, предъявляемых к агентам для ФДТ, является интенсивное поглощение в длинноволновой области спектра (650–800 нм) [Abrahamse, Hamblin, 2017]. Установлено, что конъюгат **InChl-Vnd** и соединение сравнения **InChl** имеют несколько полос поглощения в коротковолновой области (полоса Core) и в длинноволновой области (Q–полоса) (рис. 3А). Наличие пика поглощения в длинноволновой области спектра может свидетельствовать о способности фотосенсибилизатора обеспечивать лечение глубоко локализованных опухолей [Yoon *et al.*, 2013]. Флуоресценция соединений наблюдается в длинноволновой области спектра при 620–730 нм (рис. 3Б). Квантовый выход флуоресценции (Φ_f) для обоих соединений не превышает 2% (таблица 1).

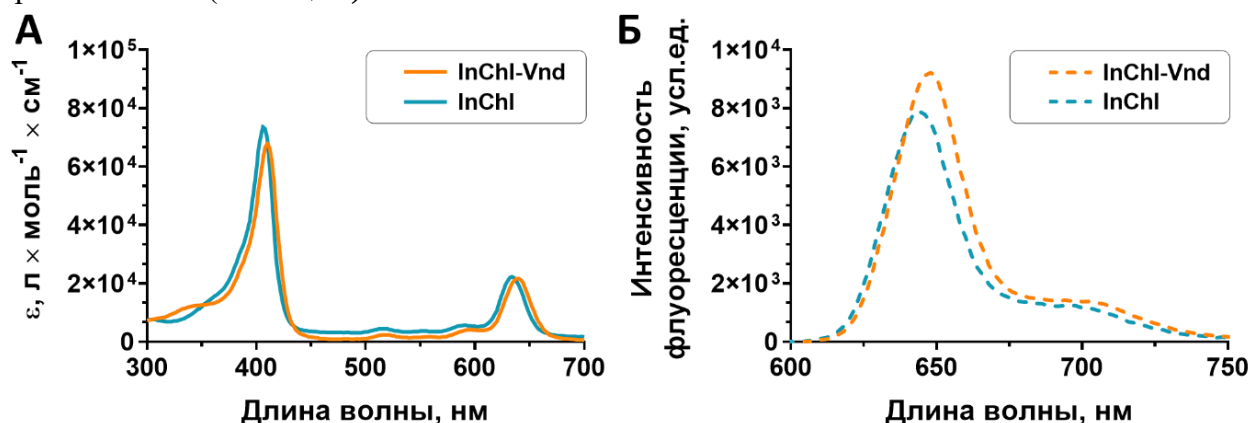


Рисунок 3. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **InChl-Vnd** и соединения сравнения **InChl** в воде, $\lambda_{ex} = 410$ нм, концентрация соединений 5 мкМ

Сравнительный анализ спектральных характеристик конъюгата **InChl-Vnd** и соединения-сравнения **InChl** показал, что присоединение к тетрапиррольной структуре дополнительного терапевтического фрагмента – **Vnd**, по-видимому, привело к изменению общего электронного строения молекулы. При этом отмечается bathochromic сдвиг Q-полосы и увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с неконъюгированным **InChl** (таблица 1).

Таблица 1.

Фотофизические характеристики исследуемых соединений				
Соединение	λ_{abs} (нм) ($\log \epsilon$)	λ_{em} (нм)	Φ_f (%)	Φ_{ROS} (%)
InChl-Vnd	410 (4,8) / 640 (4,3)	648	1,3	51
InChl	406 (4,9) / 634 (4,3)	644	0,9	53,8

Фотохимические свойства конъюгата InChl-Vnd

Важнейшей характеристикой фотосенсибилизатора для ФДТ является способность эффективно генерировать АФК [Correia *et al.*, 2021]. Установлено, что оба соединения способны производить АФК с квантовым выходом (Φ_{ROS}) 53,8% для **InChl** и 51% для **InChl-Vnd** (таблица 1). Данные значения приближены к значениям применяемого в настоящее время в клинической практике фотодитазина (квантовый выход 0,56).

Образующиеся в ходе фотодинамических реакций АФК способны привести к деструкции самих молекул фотосенсибилизатора. В связи с этим, еще одним желаемым свойством агентов для ФДТ является фотостабильность. Показано, что исследуемый конъюгат **InChl-Vnd** характеризуется достаточно высокой фотостабильностью с квантовым выходом фотовыгорания (Φ_{ph}) $2,6 \times 10^{-9}$.

Внутриклеточное распределение конъюгата InChl-Vnd

Поскольку основной областью применения ФДТ являются поверхностные опухоли, в частности, немеланомный рак кожи [Correia *et al.*, 2021], эксперименты по оценке биологических свойств *in vitro* конъюгата **InChl-Vnd** проводились на опухолевых клетках эпидермоидной карциномы человека А-431. Помимо этого, данная линия характеризуется высоким уровнем экспрессии рецептора EGFR, играющим ключевую роль в развитии и прогрессии плоскоклеточного рака кожи [Gaffney *et al.*, 2013] и являющимся мишенью действия вандетаниба [Kitamura *et al.*, 2020]. В недавно опубликованных исследованиях было показано, что вандетаниб является потенциальным терапевтическим агентом для лечения плоскоклеточного рака головы и шеи [Gustafson *et al.*, 2007], а также кожи [Kitamura *et al.*, 2020].

Ключевыми факторами, определяющими успех проведения ФДТ являются способность фотосенсибилизатора накапливаться в клетках, а также подбор оптимального времени для облучения [Allison, Moghissi, 2013]. Установлено, что **InChl-Vnd** способен проникать через клеточную мембрану и накапливаться в живых клетках, культивируемых *in vitro*, в течение 24 часов наблюдения. При этом показаны сопоставимые уровни накопления как для конъюгата, так и для соединения сравнения **InChl** (рис. 4).

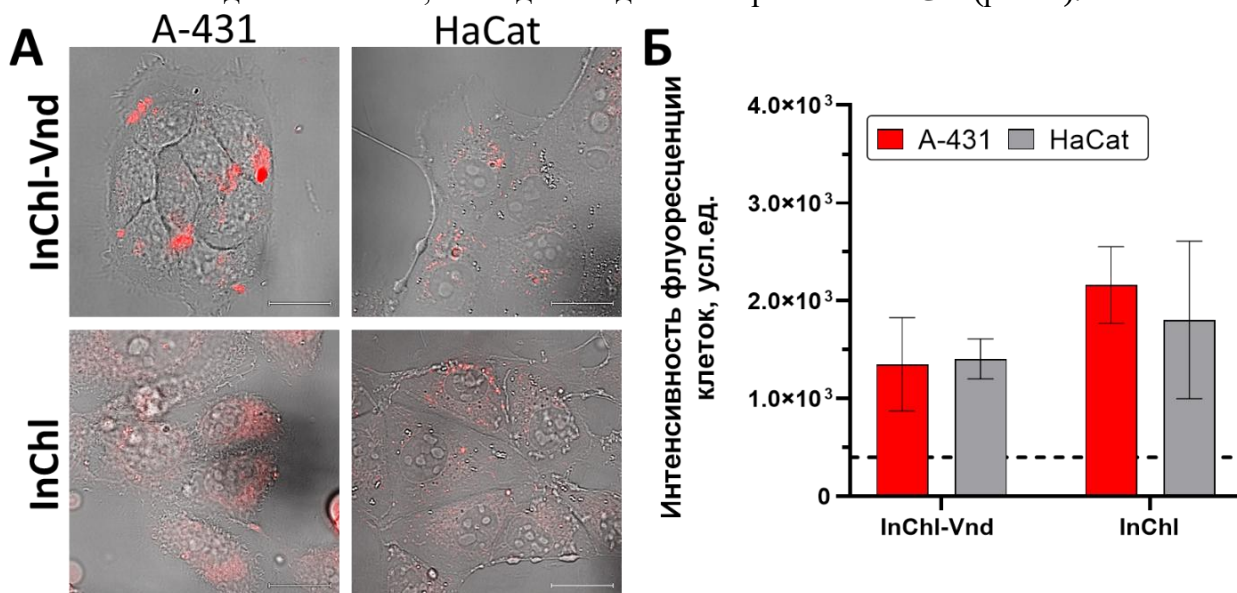


Рисунок 4. Накопление **InChl-Vnd** и **InChl** в клетках А-431 и HaCat: (А) конфокальные изображения клеток через 24 ч инкубации с исследуемым соединением в концентрации 5 мкМ, наложение светлопольного и флуоресцентного каналов, масштабная линейка 20 мкм; (Б) сравнительный анализ интенсивности флуоресценции клеток, уровень автофлуоресценции обозначен пунктирной линией; показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение ($n=10$)

Локализация фотосенсибилизатора внутри клетки определяет мишени, которые в первую очередь будут подвергнуты фотодинамическому воздействию [Sobolev *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2011; Benov *et al.*, 2015]. Показано, что **InChl-Vnd** в основном локализуется в лизосомах и других везикулах (рис. 5). Данная локализация характерна для фотосенсибилизаторов, поступающих в клетку преимущественно посредством эндоцитоза [Kessel *et al.*, 2010]. Последующее фотоповреждение лизосом ведет к высвобождению лизосомальных гидролитических ферментов, вызывая клеточную гибель по пути апоптоза [Berg *et al.*, 2022].

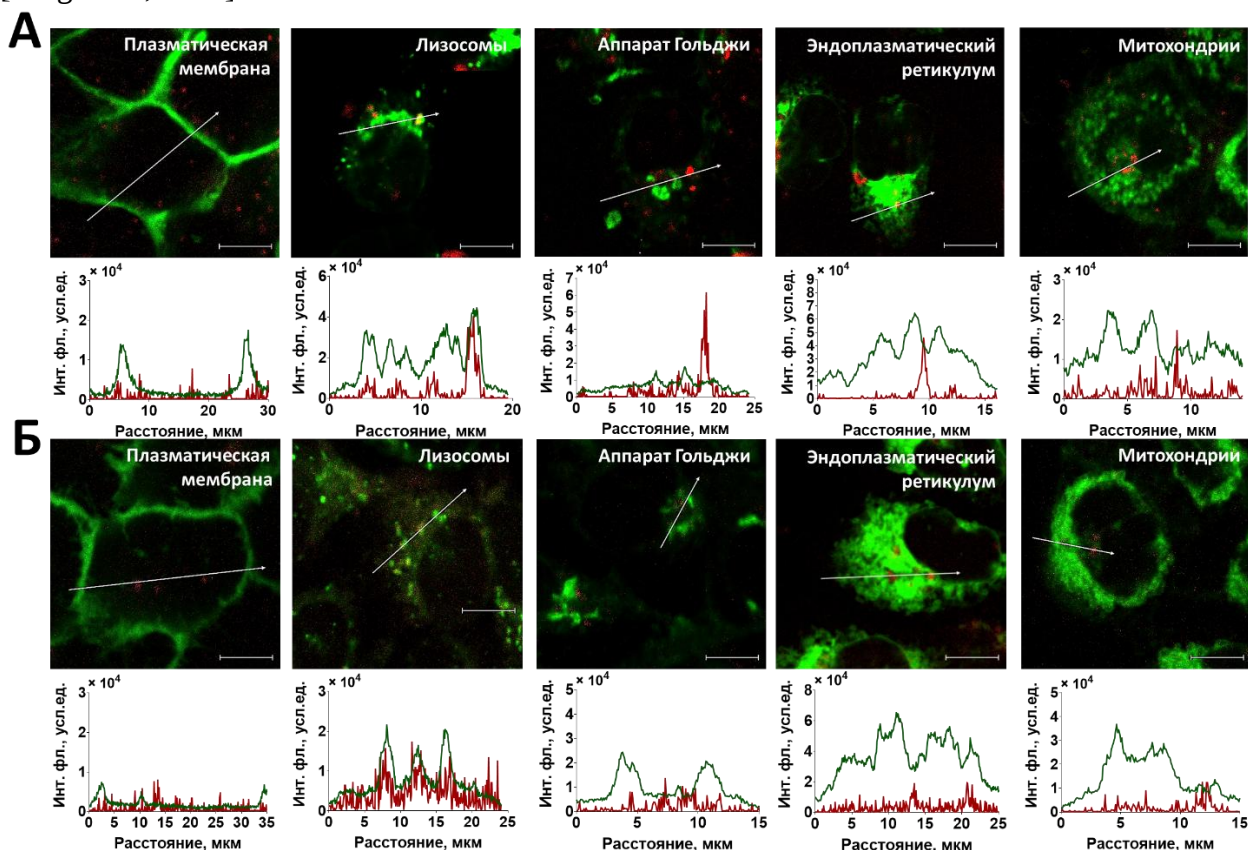


Рисунок 5. Внутриклеточная локализация (А) конъюгата **InChl-Vnd** и (Б) соединения сравнения **InChl** в клетках А-431. Для анализа локализации окрашены плазматическая мембрана клеток (CellMask), лизосомы (LysoTracker), аппарат Гольджи (BODIPY FL C5-ceramide complexed to BSA), митохондрии (MitoTracker), ЭПР (ER-Tracker). Зеленый канал – флуоресценция красителей, красный канал – флуоресценция исследуемых соединений. Масштабная линейка 10 мкм. Профили флуоресцентного сигнала показаны вдоль отрезков, указанных белой стрелкой на изображениях клеток

Исследование цитотоксичности конъюгата

Важнейшими свойствами агента для ФДТ являются фотодинамическая активность (IC_{50} при облучении) и фотодинамический индекс, определяемый как отношение IC_{50} в темноте к IC_{50} при облучении [Gonzalo-Navarro *et al.*, 2024]. Исследование цитотоксичности конъюгата **InChl-Vnd** проводили на клетках с различным уровнем экспрессии EGFR. Данные об экспрессии целевых рецепторов, являющихся мишенью действия вандетаниба, были получены из открытой базы данных Human Protein Atlas (HPA). В результате сопоставления количественных данных транскриптомного профилирования (RNA-seq) клеточных линий А-431 и HaCat было выявлено, что опухолевые клетки характеризуются высоким уровнем, транскриптов гена, кодирующего EGFR, в то время как для неопухолевых клеток данный показатель был значительно ниже. Уровень экспрессии генов, кодирующих VEGFR-2 и -3, в обеих клеточных линиях является крайне низким.

Время инкубации клеток с исследуемыми соединениями составило 24 часа, что соответствует результатам, полученным при оценке скорости их накопления в живых клетках. Облучение клеток проводили в дозе 20 Дж/см².

Установлено, что **InChl-Vnd** способен вызывать фотоиндуцированную гибель клеток (рис. 6). Фотодинамический индекс для клеток A-431 составил более 10^3 , что свидетельствует о значительном возрастании цитотоксичности в отношении EGFR-положительных опухолевых клеток при облучении. В отношении неопухолевых клеток HaCat с низким уровнем экспрессии EGFR конъюгат **InChl-Vnd** продемонстрировал более низкие показатели токсичности как на свету, так и в темноте (таблица 2).

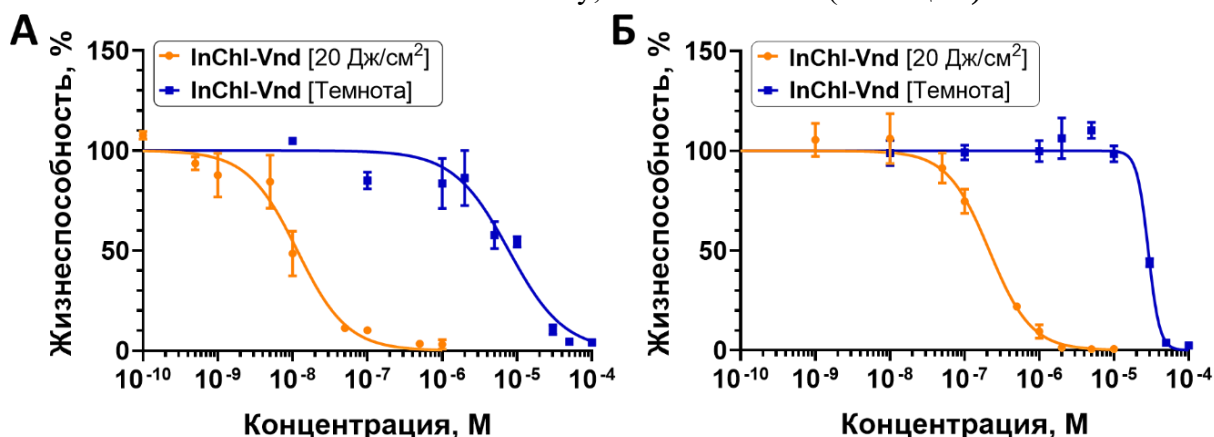


Рисунок 6. Репрезентативные графики зависимости жизнеспособности культур клеток A-431 (А) и HaCat (Б) от концентрации **InChl-Vnd** при облучении в дозе в 20 Дж/см² и в темноте; показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение (n=3)

Для выяснения, является ли наблюдаемый эффект результатом сочетания фотодинамического и таргетного воздействия, было проведено исследование соединений сравнения, **InChl** и **Vnd**, при их монотерапевтическом применении в отношении тех же линий. Клетки A-431 и HaCat продемонстрировали равную чувствительность к фотодинамическому воздействию соединения сравнения **InChl** при облучении в дозе 20 Дж/см² (рис. 7А). При этом, значения IC₅₀ оказались выше по сравнению с таковыми для конъюгата **InChl-Vnd** (таблица 2).

Оценка цитотоксичности **Vnd** показала, что EGFR-положительные клетки A-431 примерно в два раза более чувствительны к действию низкомолекулярного ингибитора (рис.7Б).

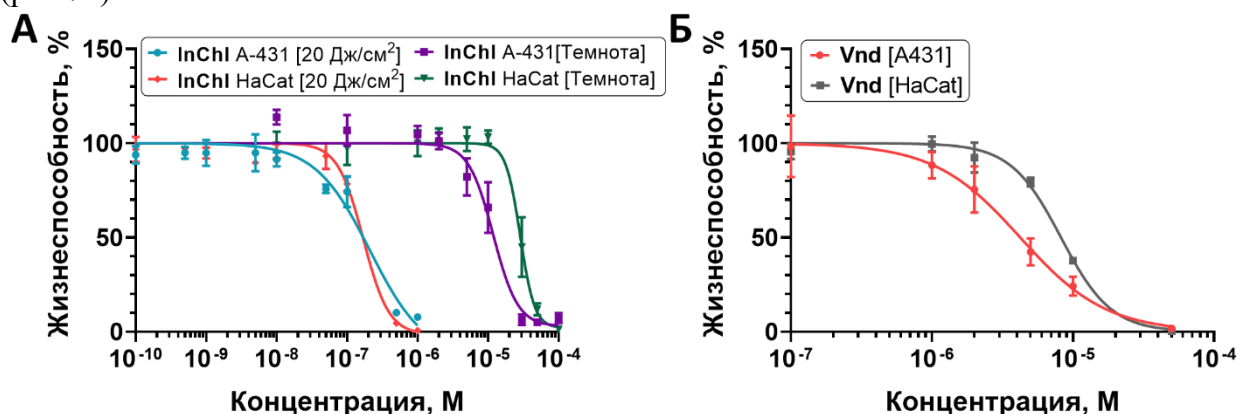


Рисунок 7. Репрезентативные графики зависимости жизнеспособности культур клеток A-431 и HaCat от концентрации **InChl** (А) при облучении в дозе в 20 Дж/см² и в темноте и **Vnd** (Б); показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение (n=3)

Таблица 2

Значения IC ₅₀ для исследуемых соединений, мкМ				
Соединение	А-431		HaCat	
	20 Дж/см ²	Темнота	20 Дж/см ²	Темнота
InChl-Vnd	0,0097** [0,007-0,012]	10,76* [5,1-22,7]	0,2 [0,17-0,26]	28,8 [26,9-30,88]
InChl	0,21 [0,09-0,48]	11,81** [9,4-14,7]	0,2 [0,13-0,23]	28,47 [25,9-31,2]
Вандетаниб		4,3** [2,9-6,2]		8,3 [7,2-9,6]

Показаны средние значения и границы 95% доверительного интервала (n=9) *, ** – статистически значимое отличие от клеток HaCat (* – p<0,01; ** – p<0,0001; t-тест)

Таким образом, полученные данные указывают на реализацию комбинированного взаимодействия двух терапевтических модулей в составе конъюгата **InChl-Vnd**. Для определения типа взаимодействия терапевтических агентов был рассчитан индекс комбинации, который составил 0,5, что свидетельствует о реализации сильного синергического взаимодействия производного хлорина *еб* и вандетаниба. Это согласуется с опубликованными на сегодняшний день данными об эффективности комбинации ФДТ с другими терапевтическими агентами, в том числе и низкомолекулярными ингибиторами [Postiglione *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2023].

Изучение механизма фотодинамического действия конъюгата

Для исследования механизма фотоиндуцированной гибели, вызываемой исследуемыми соединениями, был проведен мониторинг внутриклеточной генерации АФК в клетках А-431 с помощью флуоресцентного зонда DCFH-DA. Показано, что конъюгат **InChl-Vnd** в концентрации равной IC₅₀ при облучении в дозе 5 Дж/см² вызывает значимое накопление окисленной формы АФК-специфичного зонда через 30 минут после облучения (рис. 8А). С помощью ингибиторного анализа было установлено, что основными генерируемыми типами АФК являются синглетный кислород и супероксид анион-радикал (рис. 8Б). Генерация данных типов АФК также наблюдается и при фотодинамическом воздействии клинически применяемого фотодитазина [Krylova *et al.*, 2025].

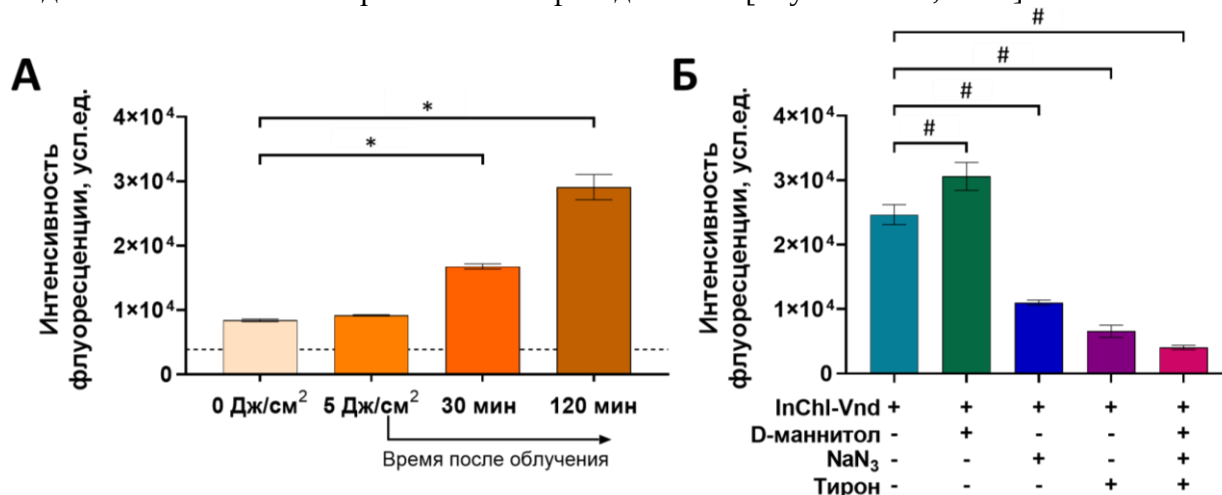


Рисунок 8. Мониторинг внутриклеточной генерации АФК в клетках А-431 после фотодинамического воздействия **InChl-Vnd** в концентрации равной IC₅₀ при облучении в дозе 5 Дж/см²: (А) динамика генерации внутриклеточных АФК, уровень флуоресценции контрольных клеток (без добавления конъюгата) показан пунктирной линией; (Б) ингибиторный анализ генерации внутриклеточных АФК через 120 минут после фотодинамического воздействия. Показаны средние значения ± стандартное отклонение (n=3). Показаны статистически значимые отличия от клеток до облучения (* – p < 0,0001; однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета) и от клеток без ингибиторов (# – p < 0,0001; однофакторный дисперсионный анализ, тест Даннета)

В ходе исследования биологических свойств *in vitro* конъюгат **InChl-Vnd** продемонстрировал селективную цитотоксичность в отношении EGFR-положительных опухолевых клеток. Полученные результаты стали основанием для его дальнейшего исследования в экспериментах *in vivo*.

Противоопухолевая эффективность конъюгата цинкового комплекса хлорина еб и вандетаниба в отношении EGFR-положительных опухолей *in vivo*

Количественная оценка содержания индия в органах и опухоли

Наличие центрального атома металла в тетрапиррольной структуре **InChl-Vnd** позволило провести количественную оценку содержания индия (In) в органах и опухоли, которое рассматривалось как показатель накопления исследуемого соединения. Анализ был выполнен на мышах линии Balb/c-nude с подкожно привитой опухолью А-431 через 4 часа после однократного внутривенного введения конъюгата в дозе 8 мкмоль/кг (рис. 9).

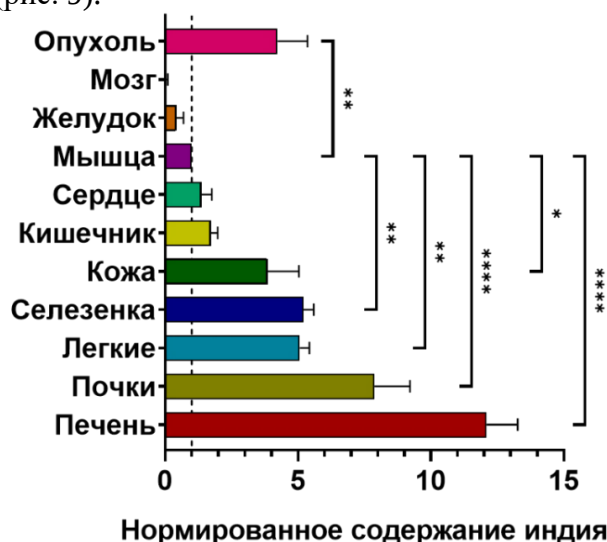


Рисунок 9. Масс-спектрометрический анализ содержания In в извлеченных органах и опухолях через 4 часа после внутривенного введения мышам **InChl-Vnd** в дозе 8 мкмоль/кг. Значения нормированы на концентрацию In в мышце (показана пунктирной линией); показаны средние значения ± стандартное отклонение (n=3). Показаны статистически значимые отличия от содержания индия в мышцах (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$; двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным сравнением, тест Даннета)

Было обнаружено выраженное накопление In в опухоли, контраст между опухолью и мышцей составил около 3,5. Селективное накопление фотосенсибилизаторов на основе хлорина еб в опухоли также было отмечено и другими исследователями [Orenstein *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2013; Gavrina *et al.*, 2018]. Кроме этого, наблюдалось накопление In в печени и почках, ответственных за выведение из организма, а также в легких и селезенке, что согласно данным литературы, может быть следствием применения ПЭГ в качестве растворителя [Liu, Qi *et al.*, 2015].

*Терапевтическая эффективность конъюгата *in vivo**

Оценку терапевтической эффективности конъюгата **InChl-Vnd** проводили на иммунодефицитных мышах Balb/c-nude с подкожно привитой ксенографтной опухолью А-431. Мониторинг размеров опухолевых узлов в контрольной и экспериментальных группах животных показал, что различные варианты лечения вызывают торможение роста опухолей, однако степень выраженности терапевтического эффекта различна (рис. 11).

После введения конъюгата **InChl-Vnd** без проведения ФДТ наблюдалось умеренное торможение роста опухолевого узла, значение коэффициента торможения опухолевого роста (ТОР) на 9 сутки составило примерно 40%.

Для проведения ФДТ был выбран 8-ми часовой лекарственно-временной интервал. Показано, что при облучении в дозе 50 Дж/см² с данным соединением терапевтический эффект был наиболее выражен. Наблюдалось уменьшение объема опухоли в сравнении с исходным, на 9 сутки коэффициент ТОР составил более 90% (рис. 10). Однако необходимо отметить, что впоследствии рост опухоли возобновился, что связано с особенностями используемой опухолевой модели на иммунодефицитных животных.

Для подтверждения, что наблюдаемый эффект является результатом сочетанного действия производного хлорина *еб* и вандетаниба в составе конъюгата **InChl-Vnd**, была проведена оценка противоопухолевой активности соединения сравнения **InChl** и вандетаниба при их монотерапевтическом применении. Установлено, что проведение ФДТ с применением **InChl** также вызывает торможение роста опухоли, однако наблюдаемый эффект значительно ниже по сравнению с конъюгатом **InChl-Vnd**. Так, на 9 сутки после проведения терапии, значение коэффициента TOP составило около 60% (рис. 10). Применение вандетаниба в качестве монотерапевтического лечения оказало незначительное влияние на рост опухоли, значение коэффициента TOP на 9 сутки не превышало 15% (рис. 10).

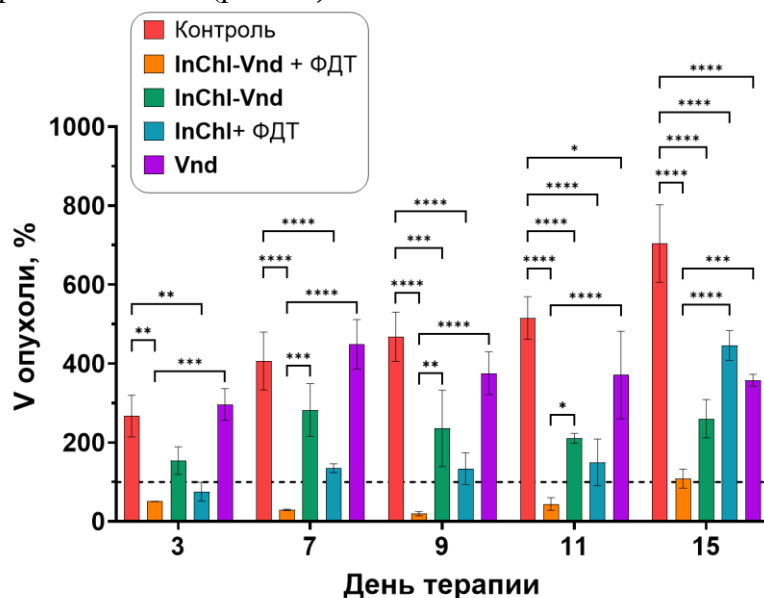


Рисунок 10. Динамика размера ксенографтных опухолей А-431 в контрольной и экспериментальных группах. За 100% принят размер опухолей в момент проведения терапии. Показаны статистически значимые отличия между группами: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,005$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки)

Коэффициент абсолютного прироста опухоли у животных во всех экспериментальных группах был ниже по сравнению с контрольной группой. Максимальный ингибирующий эффект наблюдался при применении конъюгата **InChl-Vnd** в условиях проведения ФДТ. Значение коэффициента на 9 сутки составило -0,8, что свидетельствует о регрессии опухоли по сравнению с исходным объемом.

Гистологический анализ опухолей на 3 сутки после начала терапии выявил значительное уменьшение количества клеток в опухолях животных в экспериментальных группах (рис. 11). При этом морфология клеток была нечеткая, ядра фрагментированные.

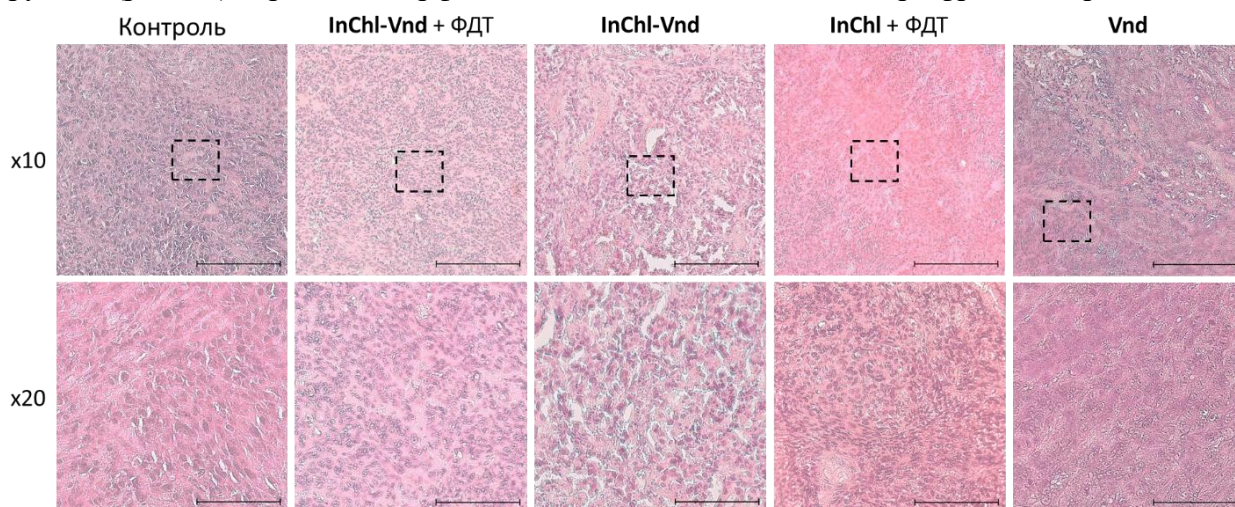


Рисунок 11. Гистологическое исследование опухолей в контрольной и экспериментальных группах на 3 сутки после начала терапии. Окрашивание гематоксилином-эозином

Таким образом, наблюдаемый терапевтический эффект действительно связан с реализацией сочетанного фотодинамического и таргетного воздействия. Полученные экспериментальные данные указывают на эффективность конъюгата **InChl-Vnd** и позволяют рассматривать его в качестве потенциального агента для комбинированной фотодинамической терапии EGFR-положительных опухолей.

Особенность фотофизических и биологических свойств *in vitro* ферментативно расщепляемого конъюгата цинкового комплекса хлорина е6 и кабозантиниба

Спектральные и фотохимические свойства конъюгата ZnChl-Cbz

Конъюгат **InChl-Vnd** стал первым реализованным нами вариантом мультимодального фотосенсибилизатора для комбинированной ФДТ. В проведенных исследованиях он продемонстрировал сочетание уникальных фотофизических и биологических свойств, свидетельствующих о его перспективности. Данный успех послужил поводом для создания другого варианта мультимодального агента, нацеленного на другие молекулярные пути, активирующиеся после сублетального воздействия ФДТ. Кроме того, дизайн второго конъюгата основан на концепции «активируемого фотосенсибилизатора».

Одним из возможных ограничений эффективности конъюгированных соединений может быть снижение активности терапевтических модулей вследствие стерических ограничений, вызванных конъюгацией [Otvagin *et al.*, 2022]. В связи с этим была предложена концепция пролекарственной формы мультимодальных фотосенсибилизаторов. Идея создания данных агентов заключается в их получении в неактивной или малоактивной конъюгированной форме и высвобождении терапевтических модулей в опухолевой ткани под действием различных стимулов (света, изменения pH, воздействия ферментов и т.д.) [Leriche *et al.*, 2012; Tranoy-Opalinski *et al.*, 2014].

В рамках нашего исследования пролекарственная форма была реализована в расщепляемом конъюгате цинкового комплекса хлорина е6 и кабозантиниба (**ZnChl-Cbz**). В этом конъюгате происходит расщепление гликозидной связи в линкере под действием β -глюкуронидазы, что приводит к высвобождению терапевтических модулей конъюгата (рис. 12). β -глюкуронидаза относится к классу лизосомальных гидролитических ферментов. Уровень активности данного фермента является потенциальным биомаркером для диагностики рака и пролекарственной терапии некоторых патологических состояний, в том числе и онкологических [Awolade *et al.*, 2020]. Повышенная активность β -глюкуронидазы была обнаружена в широком спектре злокачественных новообразований, включая карциномы молочной железы, легких, яичников, мочевого пузыря, желудочно-кишечного тракта и меланомы [Tranoy-Opalinski *et al.*, 2014].

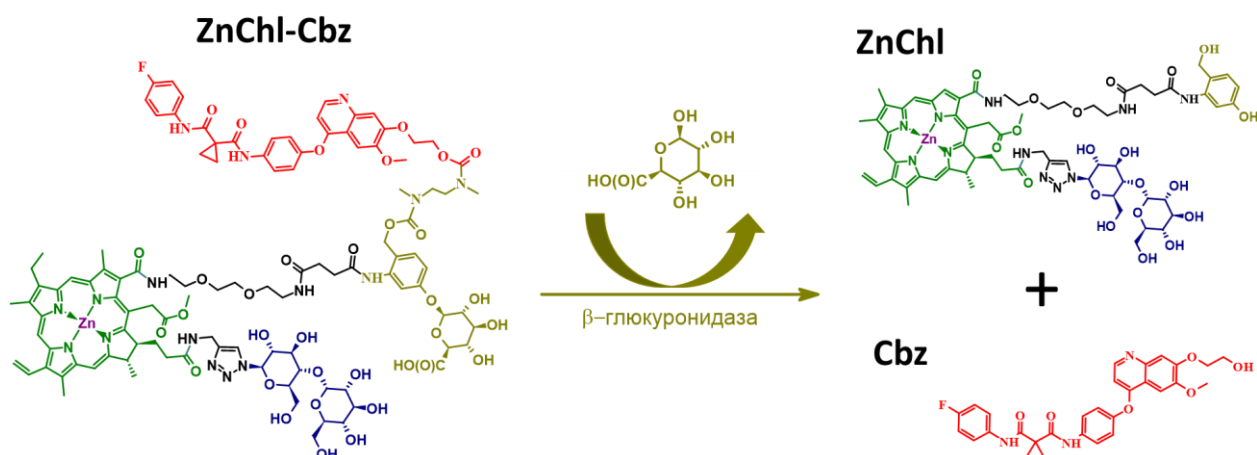


Рисунок 12. Расщепление **ZnChl-Cbz**, опосредованное β -глюкуронидазой, приводит к высвобождению **ZnChl** и **Cbz**

Показано, что конъюгат **ZnChl-Cbz** и соединение сравнения **ZnChl** характеризуются наличием двух пиков поглощения в коротко- и длинноволновой области и способностью флуоресцировать (рис. 13). Однако отмечено существенное различие в спектральных характеристиках соединений.

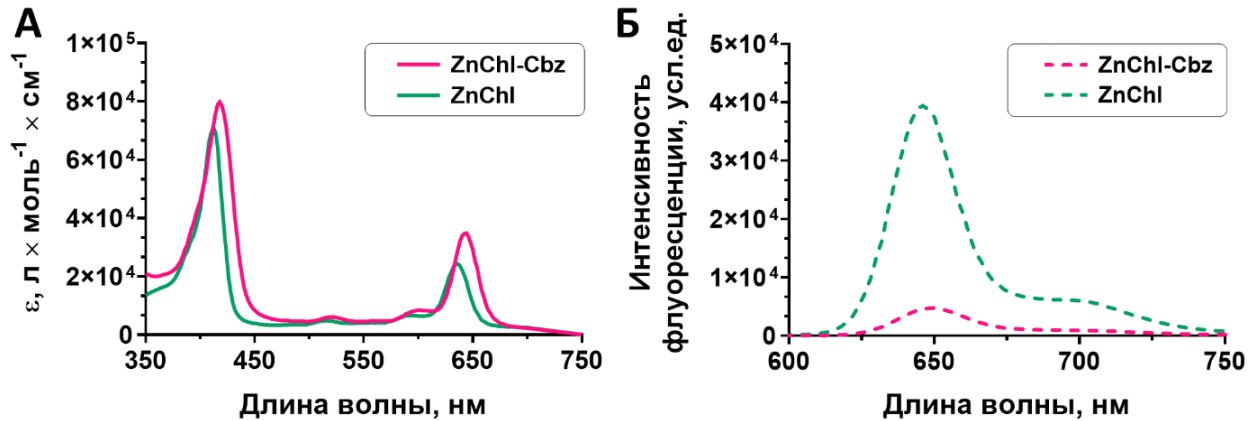


Рисунок 13. Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) конъюгата **ZnChl-Cbz** и соединения сравнения **ZnChl** в воде, $\lambda_{\text{ex}} = 410$ нм, концентрация соединений 5 мкМ

Несмотря на то, что для **ZnChl-Cbz** показан батохромный сдвиг полос поглощения и увеличение коэффициента молярной экстинкции по сравнению с неконъюгированным соединением, для него наблюдается значительное уменьшение квантового выхода флуоресценции (таблица 3).

Таблица 3

Фотофизические характеристики ZnChl-Cbz и ZnChl				
Соединение	λ_{abs} (нм) (log ε)	λ_{em} (нм)	Φ_{fl} (%)	Φ_{ROS} (%)
ZnChl-Cbz	416 (4,7) / 642 (4,3)	648	0,1	5
ZnChl	412 (4,5) / 636 (3,9)	646	1,2	5

Мы предполагаем, что снижение квантового выхода конъюгата может быть обусловлено тушением флуоресценции хлоринового фрагмента за счет взаимодействия с присоединенным кабозантинином. Это подтверждается ростом флуоресценции **ZnChl-Cbz** при его инкубации с β -глюкуронидазой, по-видимому, вследствие расщепления конъюгата с высвобождением **ZnChl** (рис. 14). Ферментативное расщепление исследуемого конъюгата в присутствии β -глюкуронидазы было подтверждено с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии [Otvagin *et al.*, 2024]. Такое «разгорание» соединения при его ферментативном расщеплении дает принципиальную возможность отслеживать активацию конъюгата в организме в режиме реального времени с использованием методов флуоресцентной диагностики.

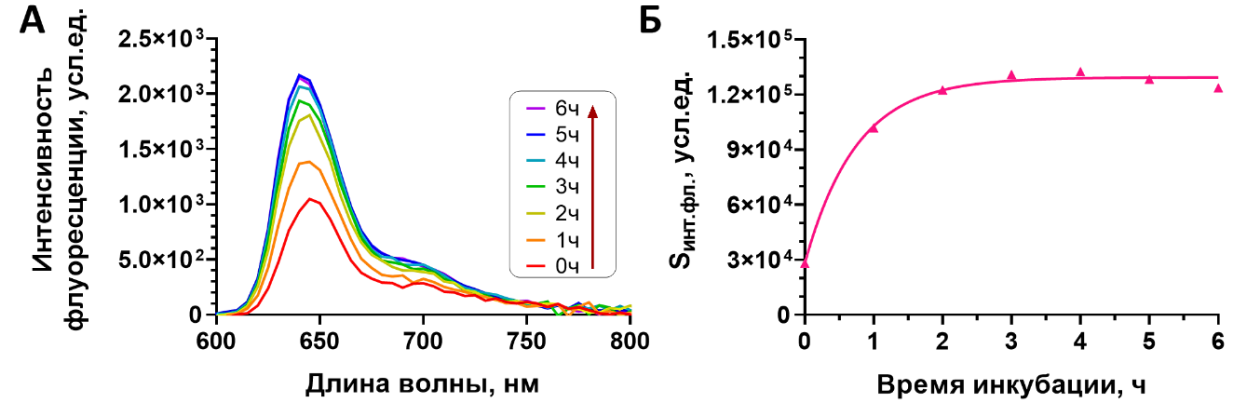


Рисунок 14. Изменение интенсивности флуоресценции **ZnChl-Cbz** (5 мкМ) при инкубации с β -глюкуронидазой (40 ЕД/мл) при $t = 37^\circ\text{C}$ в фосфатно-солевом буфере: (А) изменение спектра флуоресценции на протяжении 6 ч инкубации, $\lambda_{\text{ex}} = 410$ нм; (Б) кинетическая кривая изменения площади под пиком флуоресценции (Синт. фл.) от времени инкубации, модель однофазного распада

Квантовый выход генерации АФК для обоих соединений составил 5%. Однако при инкубации **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** с β -глюкуронидазой происходит увеличение значения Φ_{ROS} , до 14% и 29% соответственно.

Таким образом, при расщеплении **ZnChl-Cbz** не только увеличивается интенсивность его флуоресценции, но и возрастает фотодинамическая эффективность. Это позволяет рассматривать **ZnChl-Cbz** как пролекарственный агент, активность которого существенно увеличивается при активации за счет селективного расщепления линкера с участием β -глюкуронидазы.

Накопление и локализация конъюгата ZnChl-Cbz в клетках

Наряду с поверхностными опухолями, ФДТ показана также для лечения опухолей полых органов, в частности мочевого пузыря [Rahman *et al.*, 2022]. В связи с этим, исследование биологических свойств *in vitro* конъюгата **ZnChl-Cbz** проводили на клеточной культуре карциномы мочевого пузыря Т-24. Данная клеточная культура характеризуется высоким уровнем экспрессии рецептора HGFR, участвующего в запуске сигнальных путей выживания [Barzaman *et al.*, 2022], и являющегося мишенью для кабозантиниба. Кроме того, кабозантиниб продемонстрировал клиническую эффективность у пациентов с рефрактерным метастатическим раком мочевого пузыря во II фазе клинических исследований [Apolo *et al.*, 2020].

Установлено, что исследуемые соединения накапливаются в клетках в течение 24 часов наблюдения (рис. 15А, 15Б). При этом отмечен более высокий флуоресцентный сигнал от клеток, инкубируемых с **ZnChl-Cbz** по сравнению с соединением контроля **ZnChl**; через сутки зарегистрировано превышение сигнала примерно в 5 раз.

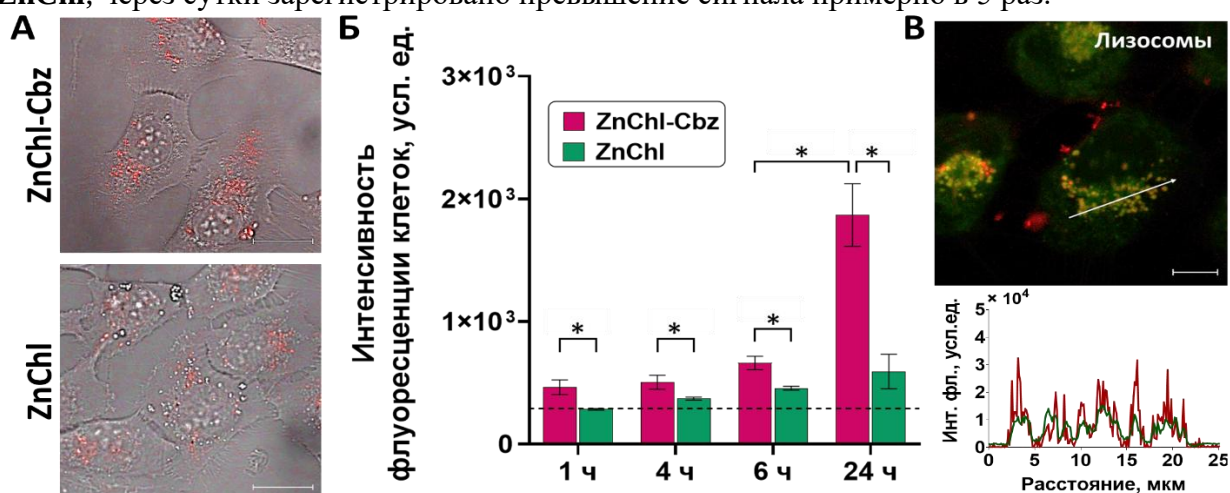


Рисунок 15. Внутриклеточное распределение **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** в клетках Т-24: (А) конфокальные изображения клеток после 24-х часовой инкубации с исследуемыми соединениями в концентрации 5 мкМ, наложение светлопольного и флуоресцентного каналов, масштабная линейка 20 мкм; (Б) сравнительный анализ интенсивности флуоресценции клеток, уровень автофлуоресценции обозначен пунктирной линией; показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение по 30 клеткам в трех биологических повторностях. Показано статистически значимое различие между группами, * – $p < 0,0001$, двухфакторный дисперсионный анализ с критерием множественного сравнения Тьюки; (В) солокализация **ZnChl-Cbz** (красный канал) с лизосомами, окрашенными LysoTracker (зеленый канал), масштабная линейка 10 мкм. Профиль флуоресцентного сигнала показан вдоль отрезка, указанного белой стрелкой на изображении клеток

Разница накопления между соединениями может быть следствием большей липофильности **ZnChl-Cbz**, что облегчает транспорт конъюгата через липидный бислой. Кроме того, дополнительно присоединенный кабозантиниб способен противодействовать оттоку лекарственных средств в результате нацеливания на АТФ-связывающий кассетный транспортер ABCG2 [Zhang *et al.*, 2017]. Стоит отметить, что фотосенсибилизаторы хлоринового ряда являются известными субстратами для ABCG2, выкачивающего их из клеток и таким образом ответственного за формирование устойчивости к ФДТ [Robey *et al.*, 2005].

Показано, что **ZnChl-Cbz** локализуется в основном в лизосомах и других везикулах в живых клетках (рис. 15B). Основываясь на полученных результатах возможно предположить, что исследуемый конъюгат поступает в клетки посредством АТФ-зависимого эндоцитоза.

Фотодинамическая активность конъюгата *in vitro*

При инкубации клеток Т-24 с **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** в темноте показано отсутствие выраженной темновой токсичности соединений (IC_{50} более 10 мкМ). Облучение клеток в дозе 20 Дж/см² приводило к увеличению цитотоксичности как конъюгата, так и соединения сравнения, однако фотодинамическая активность соединений различалась и в случае **ZnChl-Cbz** была выше более чем на порядок. Фотодинамический индекс для **ZnChl-Cbz** составил более 380, в то время как для **ZnChl** не превышал 15 (рис. 16А, таблица 4).

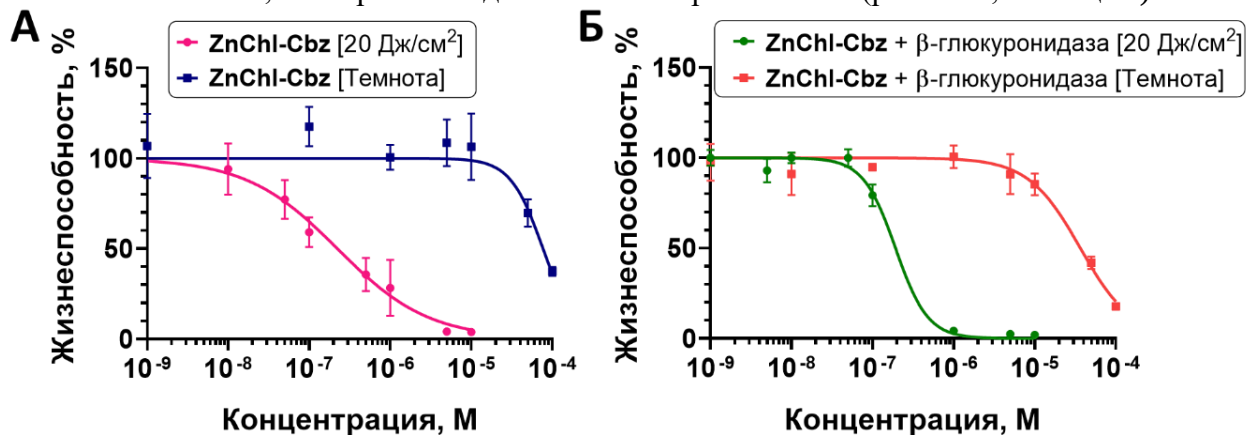


Рисунок 16. Репрезентативные графики зависимости жизнеспособности клеток Т-24 от концентрации **ZnChl-Cbz** (А) и **ZnChl-Cbz** при экзогенном добавлении β-глюкуронидазы (40 Ед) (Б) при облучении в дозе 20 Дж/см² и в темноте

Поскольку уровень β-глюкуронидазы обычно повышен в опухолевых клетках [Robey *et al.*, 2005], то в качестве контрольной клеточной культуры были выбраны неопухолевые клетки CHO, которые также характеризуются отсутствием экспрессии HGFR. При инкубации клеток CHO с **ZnChl-Cbz** и **ZnChl** с последующим облучением в дозе 20 Дж/см² оба соединения вызвали фотоиндуцированную гибель клеток в практически одинаковой концентрации, при этом значение IC_{50} **ZnChl-Cbz** для клеток CHO было на порядок выше такового для опухолевых клеток Т-24 (таблица 4).

Таблица 4

Соединение	Значения IC_{50}^2 , мкМ			
	Т-24		CHO	
	20 Дж/см ²	Темнота	20 Дж/см ²	Темнота
ZnChl-Cbz	0,2 [0,13-0,33]	> 10	2,2 [#] [0,4-11,94]	> 10
ZnChl	3,3* [1,04-4,89]	> 10	2,05 [1,1-3,8]	> 10
Cbz		1,2 [0,97-1,6]		3,3 [#] [1,8-4,5]
ZnChl-Cbz + β-глюкуронидаза	0,19 [0,14-0,26]	> 10		

Показаны статистические отличия от клеток Т-24 (# – $p < 0,0001$; t-тест) и от группы **ZnChl-Cbz** (* – $p < 0,01$; t-тест)

Таким образом показана селективность действия **ZnChl-Cbz** по отношению к HGFR-положительным опухолевым клеткам. Индекс комбинации составил 0,23, что свидетельствует о реализации сильного синергического взаимодействия производного хлорина *еб* и кабозантиниба. Стоит отметить, что значение индекса комбинации существенно превосходило таковое для нерасщепляемого конъюгата **InChl-Vnd**. Этот факт согласуется с предположением о более высокой эффективности расщепляемых соединений, в которых нет стерических препятствий для отдельных терапевтических модулей.

Противоопухолевая эффективность ферментативно расщепляемого конъюгата цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба в отношении HGFR-положительной трехмерной модели опухолевого роста *in vitro*

Для всесторонней оценки эффективности **ZnChl-Cbz** необходимо проведение исследований на экспериментальных опухолях. Однако, линия Т-24 не способна вызывать формирование опухоли у мышей balb/c-nude [Naito *et al.*, 2020]. В связи с этим, исследование противоопухолевой эффективности проводилось на трехмерной модели клеточного роста *in vitro* на основе коллагенового гидрогеля. В качестве клеточной компоненты были использованы клетки Т-24-GFPcyto со стабильной экспрессией зеленого флуоресцентного белка GFP [Otvagin *et al.*, 2024]. Выбор флуоресцентной клеточной линии обусловлен использованием регистрации ответа клеток на терапевтическое воздействие в режиме реального времени с помощью флуоресцентной макровизуализации [Sencha *et al.*, 2022]. Регистрацию интегрального флуоресцентного сигнала гидрогелей проводили ежедневно. Исследование противоопухолевой эффективности соединений начинали на третий день роста клеток в геле.

После 24 часовой инкубации гелей в среде, содержащей **ZnChl-Cbz** в концентрациях IC_{50} и $10 \times IC_{50}$, гели с клетками облучали в дозе 20 Дж/см². На следующий день после светового воздействия с **ZnChl-Cbz** наблюдалось выраженное дозозависимое ингибирование роста клеток. Однако через 4 дня после проведения ФДТ рост клеток восстановился (рис. 16А), что, вероятно, является следствием их большей устойчивости к проводимой терапии при культивировании в трехмерной модели.

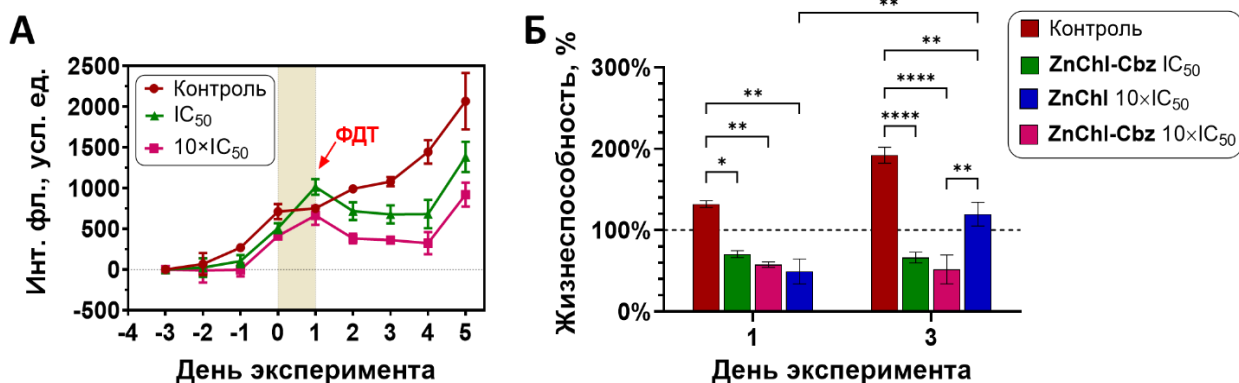


Рисунок 16. Противоопухолевая активность **ZnChl-Cbz** в отношении клеток Т-24 в трехмерной модели опухолевого роста *in vitro*: (А) динамика изменения флуоресцентного сигнала от клеток, заключенных в коллагеновый гель, при 24-х часовой инкубации с **ZnChl-Cbz** (период инкубации выделен цветом) и последующем облучении в дозе 20 Дж/см²; (Б) зависимость жизнеспособности клеток Т-24-GFP cyto в трехмерной культуре на 1-й и 3-й день после проведения ФДТ с **ZnChl-Cbz** в концентрациях IC_{50} и $10 \times IC_{50}$ и **ZnChl** в концентрации $10 \times IC_{50}$. Показаны статистически значимые отличия между группами: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,005$; *** – $p < 0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с критерием множественных сравнений Тьюки)

Применение **ZnChl-Cbz** в концентрациях IC_{50} (0,2 мкМ) и $10 \times IC_{50}$ (2 мкМ) на монослойной культуре приводило к 50% и 10-15% выживаемости клеток через 24 часа. В тоже время, на следующий день после проведения ФДТ при тех же концентрациях **ZnChl-Cbz** в трехмерной модели, процент жизнеспособных клеток составил 70,5% и 57,7% соответственно (рис. 16Б).

Схожие результаты были получены и для неконъюгированного **ZnChl**, применение которого в концентрации $10 \times IC_{50}$ (33 мкМ) приводило к выживанию около 50% клеток в геле на следующий день после ФДТ (рис. 16Б), в то время как для монослойной культуры схожий процент ингибирования был показан для концентрации в 10 раз меньшей ($IC_{50} = 3$ мкМ). Таким образом, наблюдаемые эффекты согласуются с ранее опубликованными многочисленными данными о повышении устойчивости опухолевых клеток при культивировании в условиях, приближенных к опухолям *in vivo* [Kutova *et al.*, 2020; Kucinska *et al.*, 2021].

Установлено, что на следующий день после проведения ФДТ с **ZnChl-Cbz** в концентрациях IC_{50} и $10 \times IC_{50}$, а также с **ZnChl** в концентрации $10 \times IC_{50}$, наблюдается значимое ингибирование роста клеток в обработанных гелях, процент ингибирования составил более 30% (рис.16Б). Однако на 3-й день после проведения ФДТ с соединением сравнения был зафиксирован рост флуоресцентного сигнала от гелей, обработанных **ZnChl**, превысив значения до начала исследования. В то же время, для конъюгата был показан более продолжительный ингибирующий эффект. Через трое суток после проведения ФДТ с **ZnChl-Cbz**, как в концентрации IC_{50} , так и в концентрации $10 \times IC_{50}$, роста флуоресцентного сигнала в гелях с клетками зафиксировано не было. Процент ингибирования роста клеток в геле составил около 40%. Значительная разница ответа клеток на терапевтическое воздействие конъюгата **ZnChl-Cbz** и соединения сравнения **ZnChl**, вероятно обусловлена дополнительной ингибирующей активностью кабозантиниба, входящего в состав конъюгата.

Таким образом, **ZnChl-Cbz** представляет собой мультимодальный фотосенсибилизатор в виде пролекарства с низкой исходной активностью. Активация соединения происходит за счет расщепления линкера, чувствительного к действию β -глюкуронидазы, уровень которой часто повышен в опухолевых клетках. Высвобождение производного хлорина *еб* и кабозантиниба приводит к усилению флуоресценции, что может использоваться в диагностических целях, а также к комбинированному терапевтическому воздействию на клетки-мишени за счет фотодинамического действия и последующего ингибирования клеточной сигнализации, опосредованной рецепторами HGFR и VEGFR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Потребность в инновационных подходах к лечению онкологических заболеваний вызвана ограниченной эффективностью существующих методов лечения. Перспективным направлением для повышения эффективности противоопухолевой терапии является разработка мультимодальных терапевтических агентов, объединяющих два или более способа воздействия на опухолевые клетки [Mokhtari *et al.*, 2017; Gilad *et al.*, 2021; Grin *et al.*, 2022]. В условиях высокой гетерогенности опухолей такой подход обеспечивает достижение максимального эффекта, а кроме того, снижает вероятность формирования приобретенной лекарственной устойчивости [Liu *et al.*, 2022; Doostmohammadi *et al.*, 2024]. Важной задачей при создании мультимодальных агентов является достижение синергического взаимодействия входящих в их состав модулей. В этом случае становится возможным достижение наилучших терапевтических результатов при невысоких действующих концентрациях противоопухолевого препарата, а значит, и снижение рисков тяжелых побочных эффектов [Szumilak *et al.*, 2021; Doostmohammadi *et al.*, 2024].

В работе были исследованы новые мультимодальные агенты, совмещающие активность фотосенсибилизатора и ингибитора рецепторных тирозинкиназ. Было исследовано два конъюгата, по-разному реализующие одну идею: объединение металлокомплексов хлорина *еб* с низкомолекулярными мультикиназными ингибиторами тирозинкиназ. На сегодняшний день соединения из группы хлоринов являются наиболее востребованными при разработке мультимодальных фотосенсибилизаторов [Boscencu *et al.*, 2023]. Производные хлорина *еб* обладают желаемыми свойствами в качестве агента для ФДТ, включая низкую темновую токсичность, высокую эффективность генерации АФК

и оптимальные фотофизические свойства [Xu *et al.*, 2022]. В качестве таргетного агента мы использовали вандетаниб и кабозантиниб, имеющие различные профили активности в отношении рецепторных тирозинкиназ клетки [Gustafson *et al.*, 2008; Kwilas *et al.*, 2014].

Оба конъюгата успешно зарекомендовали себя в проведенных исследованиях, что свидетельствует о перспективности предложенного нами подхода. Установлено, что при объединении в одну молекулярную структуру сохраняются как химические свойства, так и биологическая активность агентов. А исследования по определению противоопухолевой активности подтвердили синергическое повышение эффективности ФДТ с применением данных соединений. Отметим, что наиболее выраженный синергический эффект получен при объединении агентов с помощью фермент-расщепляемого линкера. Было показано, что исследуемые мультимодальные фотосенсибилизаторы проявляют наибольшую активность в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем целевых рецепторов EGFR или HGFR, что делает их применимым для ФДТ опухолей с определенным молекулярным профилем.

Механизм действия мультимодальных фотосенсибилизаторов, по-видимому, обусловлен двойным воздействием на опухолевые клетки. Окислительное повреждение, индуцируемое в ходе фотодинамического воздействия, приводит к гибели опухолевых клеток. Однако сублетальные дозы ФДТ способны активировать молекулярные механизмы, направленные на выживание опухолевых клеток. Эти механизмы включают регуляторные каскады, опосредованные факторами транскрипции (например, STAT3, NF- κ B), белками теплового шока (HSP), факторами роста (EGF, VEGF, HGF) и соответствующими рецепторными тирозинкиназами [Broekgaarden *et al.*, 2015]. В случае применения мультимодального агента действие низкомолекулярного ингибитора, входящего в его состав, блокирует сигналы выживания, способствуя гибели клеток и предотвращая последующее развитие рецидива.

Известно, что в ответ на фотодинамическое воздействие опухолевые клетки активируют сигнальные пути выживания, включающие EGFR, VEGFR и HGFR [Rapozzi, 2015; Le *et al.*, 2021]. Пик активации данных путей наблюдается в первые 24 часа после облучения, что может оказаться критичным для своевременного подавления сигналов [Spring *et al.*, 2015]. Например, аутофосфорилирование EGFR регистрируется уже через 5 минут после ФДТ, достигая максимума через 30–60 минут, с последующей ядерной транслокацией рецептора и активацией STAT3-зависимого транскрипционного ответа [Edmonds *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013]. Повышение уровня VEGF в ответ на гипоксию после ФДТ отмечается через 6–24 часа [Otrock *et al.*, 2009]. Помимо этого, в резистентности к ФДТ существенную роль может играть микроокружение опухоли. Так, активация HGFR обусловлена паракринной секрецией HGF стромальными фибробластами (CAF) и погибающими опухолевыми клетками [Vogel *et al.*, 2013]. Это приводит к активации сигнальных путей PI3K/Akt, MAPK/ERK и STAT3, усиливающих пролиферацию и резистентность [Gomer *et al.*, 2006]. Таким образом, целенаправленное подавление адаптивных молекулярных процессов, запускаемых ФДТ, может приводить к повышению эффективности проводимой терапии.

Помимо этого, важным аспектом при разработке противоопухолевых препаратов является снижение токсичности для нормальных тканей. Для традиционных фотосенсибилизаторов и их производных характерно накопление в коже, что приводит к кожным реакциям, включая боль, отек, эритему и образование пустул [Borgia *et al.*, 2018]. Один из способов решения данной проблемы заключается в использовании пролекарственной формы мультимодальных фотосенсибилизаторов. Ферментативное расщепление исходного малоактивного конъюгата в опухолевой ткани может обеспечить его избирательную активацию и снизить негативное воздействие на нормальные клетки с низким уровнем экспрессии соответствующего фермента. В нашей работе такой подход показан для линкера, чувствительного к β -глюкуронидазе, уровень которой обычно повышен в опухолях [Awolade *et al.*, 2020].

Результаты проведенной работы свидетельствуют о перспективности подхода, основанного на создании мультимодальных конъюгатов, и эффективности исследованных соединений, **InChl-Vnd** и **ZnChl-Cbz**, как потенциальных агентов для комбинированной фотодинамической терапии EGFR- и HGFR-положительных опухолей. Дальнейшее изучение механизма синергического взаимодействия при сочетании ФДТ и ингибирования сигнальных путей клетки может стать основой для разработки новых более эффективных противоопухолевых агентов.

ВЫВОДЫ

1. Дикатионный конъюгат индиевого комплекса хлорина *еб* и вандетаниба, **InChl-Vnd**, обладает высоким квантовым выходом генерации АФК при поглощении в красной области спектра и индуцирует в клетках фотодинамическую реакцию с образованием синглетного кислорода и супероксидного анион-радикала. Данное соединение демонстрирует выраженное синергическое взаимодействие терапевтических модулей и эффективно в отношении опухолевых клеток с гиперэкспрессией рецептора EGFR, проявляя цитотоксичность в наномолярном диапазоне концентраций.

2. Показано селективное накопление **InChl-Vnd** в ксенографтных опухолях по сравнению с мышечной тканью при внутривенном введении. Использование данного соединения без облучения светом приводит к торможению роста опухоли, а при фотодинамическом воздействии – к выраженной регрессии опухолевых узлов, что значительно превосходит терапевтический эффект в случае использования фотосенсибилизатора и вандетаниба по отдельности.

3. Установлено, что ферментативно расщепляемый конъюгат цинкового комплекса хлорина *еб* и кабозантиниба, **ZnChl-Cbz**, обладает свойствами пролекарства: расщепление под действием β -глюкуронидазы сопровождается увеличением как квантового выхода флуоресценции, так и генерации синглетного кислорода. Данное соединение обладает селективностью действия в отношении опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии HGFR. Наличие фермент-расщепляемого линкера обеспечивает высвобождение активных фрагментов молекулы в клетке и увеличение синергизма их действия.

4. Показано, что культивирование опухолевых клеток в коллагеновом гидрогеле приводит к существенному повышению их устойчивости к действию как **ZnChl-Cbz**, так и неконъюгированного **ZnChl** по сравнению с монослойной культурой. При этом в случае обработки неконъюгированным фотосенсибилизатором рост культуры быстро восстанавливается после фотодинамического воздействия, тогда как в случае **ZnChl-Cbz** эффект ингибирования роста является пролонгированным и сохраняется в течение не менее трех дней. Такой эффект может быть объяснен дополнительным действием мультикиназного ингибитора кабозантиниба на клетки, получившие сублетальную дозу фотодинамического воздействия.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК:

1) Krylova L.V., Otvagin V.F., Gribova G.P., Kuzmina N.S., Fedotova E.A., Zelepuhin I.V., Nyuchev A.V., Kustov A.V., Morshnev P.K., Berezin D.B., Koifman M.O., Vatsadze S.Z., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. Developing Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugates with Nanomolar Activity for Targeted Photodynamic Therapy: Design, Synthesis, SAR, and Biological Evaluation. J. Med. Chem. – 2025. – Vol. 68. – Is. 2. – P. 1901–1923. – DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c02643.

2) Otvagin V.F., Krylova L.V., Peskova N.N., Fedotova E.A., Nyuchev A.V., Romanenko Yu.V., Koifman O.I., Vatsadze S.Z., Hans-Gunther S., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. A first-in-class β -glucuronidase responsive conjugate for selective dual targeted and photodynamic therapy of bladder cancer. European Journal of Medicinal Chemistry. – 2024. – Vol. 269. – DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116283.

3) **Krylova L.V.**, Peskova N.N., Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Nyuchev A.V., Fedorov A.Yu., Balalaeva I.V. Novel chlorine e6 conjugate with dual targeting to cancer cells. *Opera Medica et Physiologica*. – 2022. – Vol. 9 (3). – P. 5-14.

4) Balalaeva I.V., **Krylova L.V.**, Karpova M.A., Shulga A.A., Konovalova E.V., Guryev E.L., Academician Deyev S.M. Synergistic Effect of the Combined Action of Targeted and Photodynamic Therapy on HER2-Positive Breast Cancer. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2022. – Vol. 507. – P. 330-333. – DOI: 10.1134/S1607672922340038.

5) Kutova O. M., Pospelov A. D., **Krylova L.V.**, Gorshkova E. N., Balalaeva I. V. Adhesion proteins profile and localization in ovarian carcinoma cell lines. *Opera Medica et Physiologica*. – 2021. – Vol. 8 (2). – P. 43-54.

6) Kuzmina N.S., Otvagin V.F., **Krylova L.V.**, Nyuchev A.V. Romanenko Yu.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. Synthesis and antiproliferative activity of new chlorin e6 glycoconjugates. *Mendeleev Commun.* – 2020. – Vol. 30. – Is.2. – P. 159-161. – DOI: 10.1016/j.mencom.2020.03.009.

7) Otvagin V.F., Kuzmina N.S., **Krylova L.V.**, Volovetsky A.B., Nyuchev A.V., Gavryushin A.E., Meshkov I.N., Gorbunova Yu.G., Romanenko Yu.V., Koifman O.I., Balalaeva I.V., Fedorov A.Yu. Water-Soluble Chlorin/Arylaminoquinazoline Conjugate for Photodynamic and Targeted Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2019. – Vol. 62. – Is. 24. – P. 11182–11193. – DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01294.

Другие статьи:

1) **Krylova L.V.**, Karpova M.A., Shulga A.A., Konovalova E.V., Guryev E.L., Deyev S.M., Balalaeva I.V. Synergistic Effect of the Combination of the Recombinant Toxin DARPIn-LoPE and PDT against HER2-Positive Breast Cancer *In Vitro* // *Med. Sci. Forum*. – 2023. – Vol. 20(1). – P. 1-3. DOI: 10.3390/IECC2023-14225.

2) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Воловецкий А.Б., Пронина С.Ю., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование противоопухолевой активности конъюгата хлорина еб с вандетанибом как агента для комбинированной фотодинамической и таргетной терапии // *Гены & Клетки*. – 2020. – Т. 15. – № S3. – С.54.

Патенты на изобретение:

1) Федоров А.Ю., Нючев А.В., Балалаева И.В., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., **Крылова Л.В.** Производное цинкового металлокомплекса хлорина-еб и его применение. Номер патента: RU 2691754 C1. Номер заявки: 2018140240. Дата регистрации: 15.11.2018. Дата публикации: 18.06.2019. Патентообладатели: ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Тезисы докладов:

1) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование фотодинамической активности ряда производных хлорина еб как фотосенсибилизаторов с повышенной селективностью накопления в опухолевых клетках // Тезисы докладов 71-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2018. С. 115.

2) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Воловецкий А.Б., Пронина С.Ю., Отвагин В.Ф., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование конъюгата хлорина еб с вандетанибом как противоопухолевого агента с комбинированным действием // Тезисы докладов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2019. С. 127.

3) **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф. Исследование таргетного конъюгата хлорина еб как агента для фотодинамической терапии онкологических заболеваний // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс. 2019.

4) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Воловецкий А.Б., Пронина С.Ю., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование конъюгата хлорина *e6* с вандетанибом как противоопухолевого агента для фотодинамической терапии с комбинированным действием // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2020. С. 115.

5) Пронина С.Ю., **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Федоров А.Ю., Балалаева И.В., Шилягина Н.Ю. Исследование фотосенсибилизаторов третьего поколения на основе конъюгата хлорина *e6* с вандетанибом и его цинкового комплекса // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2020. С.173.

6) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Воловецкий А.Б., Пронина С.Ю., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Оценка эффективности конъюгата хлорина *e6* с таргетным агентом для применения в фотодинамической терапии опухолей с комбинированным действием // Сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА». 2020. С. 288.

7) **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Карпова М.А., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование конъюгата хлорина *e6* с кабозантинибом как комбинированного противоопухолевого агента для фотодинамической терапии // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2021. С.125.

8) Молодцова Д.С., **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование фототоксичности конъюгата хлорина *e6* с кабозантинибом в отношении клеток карциномы мочевого пузыря // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2021. С. 125.

9) **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Агент для комбинированной терапии рака на основе конъюгата хлорина *e6* с кабозантинибом // Материалы конференции XXVI Нижегородской сессии молодых ученых (Технические, естественные науки). 2021. С. 169-171.

10) **Krylova L.V.**, Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Nyuchev A.V., Fedorov A.Yu., Balalaeva I.V. Synergistic effect of photodynamic and targeted threatment of bladder cancer cells with chlorin *e6*-cabozantinib conjugate // Materials of the UK-Russia Conference “Advanced biomaterials to combat cancer”. 2021

11) **Krylova L.V.**, Otvagin V.F., Kuzmina N.S., Nyuchev A.V., Fedorov A.Yu., Balalaeva I.V. Anticancer effect of a chlorine *e6* conjugate with vandetanib for combined photodynamic and targeted therapy // Materials of the 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. 2021.

12) **Крылова Л.В.**, Петрушина С.А., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование эффективности цинкового и палладиевого комплексов конъюгата хлорина *e6* и вандетаниба в качестве потенциальных агентов для фотодинамической терапии с комбинированным действием // Тезисы докладов 75-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2022. С. 120.

13) Карпова М.А., **Крылова Л.В.**, Зорин В.П., Балалаева И.В. Сочетанное воздействие таргетной и фотодинамической терапии на клетки рака молочной железы *in vitro* // Тезисы докладов 75-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. 2022. С. 98.

14) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Воловецкий А.Б., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование свойств фотосенсибилизатора нового поколения для комбинированной терапии онкологических заболеваний // Цитология. – 2022. – Т.64. – № 7. – С. 652.

15) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование противоопухолевого действия конъюгата хлорина *еб* с вандетанибом *in vitro* и *in vivo* // Материалы конференции XXVII Нижегородской сессии молодых ученых (Технические, естественные науки). 2022. С. 220-222.

16) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование фотофизических и биологических свойств *in vitro* гликоконъюгатов хлорина *еб* для фотодинамической терапии онкологических заболеваний // Сборник тезисов 25-й Пущинской школы конференции молодых ученых с международным участием "Биология - Наука XXI века". 2022. С. 70.

17) **Крылова Л.В.**, Горохова А.А., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование противоопухолевой активности конъюгата хлорина *еб* с кабозантинибом как агента с комбинированным действием // Материалы XVII международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии». 2022. С. 142.

18) **Krylova L.V.**, Karpova M.A., Shulga A.A., Konovalova E.V., Guryev E.L., Deyev S.M., Balalaeva I.V. Synergistic Effect of the Combination of the recombinant toxin DARPin-LoPE and PDT against HER2-positive breast cancer *in vitro* // Materials of the 3rd International Electronic Conference on Cancers: New Targets for Cancer Therapies (IECC 2023).

19) Карпова М.А., **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Цитотоксический эффект конъюгата хлорина *еб* и кабозантиниба на клетки рака мочевого пузыря *in vitro* // Материалы III Всероссийской конференции. Под редакцией И.В. Мухиной, Т.Е. Потеминной, О.М. Широковой. 2022. С.33-34.

20) **Крылова Л.В.**, Пескова Н.Н., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Оценка эффективности противоопухолевого агента с комбинированным фотодинамическим и таргетным действием // Материалы X Съезда Российского фотобиологического общества Конференция «Современные проблемы фотобиологии». 2023. С. 139-140.

21) Карпова М.А., **Крылова Л.В.**, Гурьев Е.Л., Деев С.М., Балалаева И.В. Двухэтапное токсическое воздействие таргетной и фотодинамической терапии на клетки аденокарциномы молочной железы *in vitro* // Тезисы докладов 76-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. 2023. С. 155.

22) **Крылова Л.В.**, Карпова М.А., Шульга А.А., Коновалова Е.В., Гульев Е.Л., Деев С.М., Балалаева И.В. Исследование комбинированного действия таргетной и фотодинамической терапии в отношении клеток аденокарциномы молочной железы человека // Сборник тезисов XXXV Зимней молодежной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2023. С.205.

23) **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Оценка противоопухолевой эффективности конъюгатов на основе хлорина *еб* для фотодинамической терапии с комбинированным действием // Сборник тезисов 6-й Российской конференции по медицинской химии. 2024. С. 240.

24) Пначина Е.М., **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Балалаева И.В. Исследование конъюгата индиевого комплекса хлорина *еб* с вандетанибом как противоопухолевого агента для комбинированной фотодинамической и таргетной терапии *in vivo*. Тезисы докладов 77-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. 2024. С. 288.

25) **Крылова Л.В.**, Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С., Нючев А.В., Федоров А.Ю., Балалаева И.В. Исследование эффективности конъюгата двойного действия для фотодинамической терапии онкологических заболеваний // Сборник тезисов I регионального собрания РФО и Всероссийская конференция с международным участием "Современные проблемы фотобиологии и биофотоники". 2024. С. 136.