

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.2.340.06,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО АВТОНОМНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ЛОБАЧЕВСКОГО»
МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26.06.2025 г. № 12

О присуждении Крыловой Любови Владимировне, гражданину России, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Конъюгаты металлокомплексов хлорина *еб* с ингибиторами тирозинкиназ как агенты для комбинированной фотодинамической терапии» по специальности 1.5.2. — биофизика принята к защите 21.04.2025 г., протокол № 8, диссертационным советом 24.2.340.06, созданным на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, приказ Минобрнауки РФ от 14 октября 2016 года № 1256/нк).

Соискатель, Крылова Любовь Владимировна, 27.09.1995 года рождения, в 2024 г. окончила аспирантуру ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского» по направлению подготовки «06.06.01 – Биологические науки». Диплом об образовании № 105204 0057982, регистрационный номер 18/37-08 выдан 02 октября 2024 года федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского». Сдала кандидатские экзамены по специальности 1.5.2. – биофизика (биологические науки). Справка о сдаче кандидатских экзаменов №032/А от 03.04.2025 г. выдана ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского».

В период подготовки диссертации соискатель Крылова Л.В. работала с 2020 по 2024 годы в должности лаборанта на кафедре биофизики и в должности младшего научного сотрудника в лаборатории оптической тераностики Центра биофизики

Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского».

Диссертация Крыловой Любови Владимировны «Конъюгаты металлокомплексов хлорина *еб* с ингибиторами тирозинкиназ как агенты для комбинированной фотодинамической терапии» выполнена на базе кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского», и была рекомендована к защите на расширенном заседании кафедры биофизики 06.03.2025г.

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

Генина Элина Алексеевна – д.ф.-м.н., доцент, профессор кафедры оптики и биофотоники Института физики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

дали положительные отзывы на диссертацию.

В положительном отзыве официального оппонента д.х.н., **Мартынова Александра Германовича**, отмечается, что диссертационная работа Крыловой Любови Владимировны посвящена решению актуальной задачи, а именно созданию новых комбинированных фотодинамических агентов для повышения избирательности действия фотосенсибилизаторов в отношении опухолевых клеток и усиления общей противоопухолевой эффективности ФДТ. Впервые проведено исследование фотофизических и биологических свойств конъюгатов металлокомплексов хлорина *еб* с различными ингибиторами тирозинкиназ для комбинированной фотодинамической терапии. Показано, что данная комбинация позволяет достичь синергического терапевтического эффекта за счет подавления адаптивных молекулярных процессов, при этом природа соединяющего линкера определяет синергизм полученных комбинированных препаратов. Высокая противоопухолевая активность наблюдается не только для двух- и трехмерных культур клеток *in vitro*, но и для животных опухоленосителей. Также отмечена высокая степень научной новизны и практической

значимости работы. Полученные данные могут быть использованы для создания новых мультимодальных противоопухолевых препаратов для комбинированной ФДТ.

Несмотря на то, что принципиальных замечаний к диссертационному исследованию нет, при изучении работы возник ряд уточняющих вопросов:

1. Автором проведено исследование стабильного в биологической среде конъюгата InChl-Vnd и фермент-расщепляемого конъюгата ZnChl-Cbz, содержащего разные по своей активности ингибиторы тиразинкиназ – вандетаниб и кабозантиниб. Было бы методологически более правильно рассмотреть активность конъюгатов, содержащих одинаковые фотоактивные части и ингибиторы, связанные стабильными или расщепляемыми линкерами.

2. Из рисунка 28 не понятно, каким образом β -глюкуронидаза расщепляет карбаматную группу, приводя к высвобождению производного кабозантиниба. Насколько биологическая активность полученного производного с 2-гидроксиэтоксильной группой в 7-м положении хинолинового ядра тождественна активности самого кабозантиниба, содержащего в данном положении метокси-группу?

3. В разделе 1.4.3 приведены литературные данные по исследованию примеров комбинированных препаратов на основе тетрапиррольных фотосенсибилизаторов и низкомолекулярных ингибиторов. Было бы интересно сравнить количественные показатели активности данных препаратов с активностью InChl-Vnd и ZnChl-Cbz.

4. Рисунок 1 и подпись к нему представляются неудачными как с точки зрения концепции сопряжения в тетрапиррольном макроцикле, так и с точки зрения представленных формулировок, таких как «энергетические конформации тетрапиррольного макроцикла», «электронное пространство внутри макроцикла». Но, справедливости ради, надо сказать, что такое же неудачное графическое и терминологическое представление имеется в работе [49], откуда и было адаптировано представленное в работе изображение.

5. В работе имеется минимальное количество опечаток и неудачных выражений.

Выводы и научные положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют поставленным цели и задачам и сформулированы диссертантом на основе собственных данных. Результаты получены с использованием современных высокотехнологичных научных методов и подходов, с применением релевантных методов статистического анализа, что позволяет говорить об их достоверности. Обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения. Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее научная значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Крыловой Л.В. на тему «Конъюгаты металлокомплексов хлорина *еб* с ингибиторами

тирозинкиназ как агенты для комбинированной фотодинамической терапии» является законченной научно-квалификационной работой.

Диссертационная работа Крыловой Л.В. соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

В положительном отзыве официального оппонента д.ф.-м.н., **Гениной Элины Алексеевны**, отмечается, что диссертационная работа Крыловой Л.В. посвящена исследованию перспективности применения мультимодальных агентов на основе фотосенсибилизатора и низкомолекулярного мультикиназного ингибитора для комбинированной фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний. За последние десятилетия ФДТ утвердилась как клинически одобренный метод лечения ряда злокачественных новообразований. Накопленный опыт позволил выявить недостатки существующих фотосенсибилизаторов, включая их неоптимальное биораспределение, поглощение света за пределами «окна прозрачности» биотканей, недостаточную фотодинамическую эффективность, а также возможность формирования резистентности опухоли. Одной из возможных причин формирования резистентности считается активация защитных механизмов в клетках, расположенных в глубоких слоях опухоли. Вследствие ограничения проникновения оптического излучения в биоткани эти клетки подвергаются сублетальному фотодинамическому воздействию, а их выживание связано с запуском определенных молекулярных сигнальных путей. Перспективным решением этой проблемы может быть разработка агентов, объединяющих несколько действующих модулей, например, фотосенсибилизатор и ингибитор активности рецепторов факторов роста, участвующих в выживании облученных клеток. В настоящее время в мире получены единичные соединения с таким сочетанием активностей, однако, несмотря на отсутствие к настоящему моменту большого количества систематизированных данных, эти единичные работы продемонстрировали перспективность подхода для повышения эффективности ФДТ. В связи с этим, актуальность исследования, проведенного диссертантом, не вызывает сомнения. В представленной работе впервые комплексно исследованы фотофизические, фотохимические и биологические свойства двух новых мультимодальных агентов на основе фотосенсибилизатора хлоринового ряда и низкомолекулярного мультикиназного ингибитора для комбинированной фотодинамической терапии. Впервые продемонстрирован синергический характер взаимодействия двух терапевтических модулей в составе исследуемых агентов. Показана высокая противоопухолевая активность соединений в отношении опухолевых моделей с повышенной экспрессией рецепторов, являющихся мишенью действия

низкомолекулярных ингибиторов. Автор диссертационной работы провел детальный анализ и систематизацию результатов собственных научных изысканий, выполненных с соблюдением методологических стандартов. Полученные данные были подвергнуты тщательному статистическому анализу, что обеспечило их объективную интерпретацию и достоверность. Практическая значимость полученных результатов обусловлена получением в ходе исследования новых фундаментальных сведений об особенностях комбинированного действия на опухолевые клетки фотосенсибилизатора и таргетных агентов. Полученные данные могут быть использованы для создания новых противоопухолевых препаратов. Перспективы внедрения связаны с дальнейшими доклиническими и клиническими испытаниями предложенных соединений. Кроме этого, установленные закономерности будут полезны при рациональном дизайне новых противоопухолевых агентов. Полученные результаты также могут быть включены в специализированные курсы и лекции по биофизике, биомедицине, медицинской химии. Диссертация Крыловой Л.В. выполнена в соответствии с классическими требованиями. Также отмечена полнота и высокое качество анализа современного состояния проблемы, выполненного в обзорной части. В обсуждении автор детально анализирует полученные результаты, сопоставляя их с данными мировой литературы, что позволяет сформировать целостное представление о проделанной работе и определить место полученных выводов в контексте современных исследований по данной проблематике.

Материал диссертации оставляет положительное впечатление, к незначительным недостаткам можно отнести только присутствие опечаток в тексте. Однако возникло несколько вопросов, в частности:

1. На чём основывается выбор времени между инъекцией фотосенсибилизатора InChl-Vnd и облучением. Автор пишет, что «для проведения ФДТ был выбран 8-ми часовой лекарственно-временной интервал с целью оптимизации баланса между эффективностью лечения и минимизацией побочных эффектов». Однако оценка накопления агентов в опухоли проводилась через 4 и 24 часа.

2. В какой момент наступал максимальный контраст содержания фотосенсибилизатора в опухоли?

3. Какие побочные эффекты имелись в виду?

4. Автор также пишет: «При проведении ФДТ через 8 часов после инъекции в дозе 50 Дж/см² с данным соединением терапевтический эффект был наиболее выражен». Исследовались ли автором другие лекарственно-временные интервалы, которые показали менее эффективные результаты или этот вывод основан на литературных данных?

Следует заключить, что диссертационная работа Крыловой Любови Владимировны «Конъюгаты металлокомплексов хлорина еб с ингибиторами тирозинкиназ как агенты для комбинированной фотодинамической терапии», выполненная под научным руководством

Балалаевой Ирины Владимировны, кандидата биологических наук, доцента, является оригинальным законченным научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и методическом уровне. По новизне полученных результатов, их фундаментальной и практической значимости диссертационная работа Крыловой Любови Владимировны соответствует требованиям действующей редакции «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а её автор Крылова Любовь Владимировна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», в своем положительном отзыве, подписанном д.б.н., заведующей кафедрой биохимии, биотехнологии и фармакологии Киямовой Рамзией Галлямовной; д.б.н., главным научным сотрудником НИЛ Центра аналитической биофотоники и инженерии клеточной поверхности Фахруллиным Равилем Фаридовичем, указывает, что диссертационная работа Крыловой Любови Владимировны посвящена исследованию новых мультимодальных агентов для комбинированной фотодинамической терапии EGFR- и HGFR-положительных опухолей. Актуальность диссертационной работы Крыловой Л.В. обусловлена необходимостью разработки новых терапевтических подходов для лечения онкологических заболеваний и повышения эффективности существующих методов лечения. Фотодинамическая терапия (ФДТ) зарекомендовала себя как малоинвазивный метод локального воздействия на опухоли с минимальным количеством побочных эффектов. Однако её широкое применение ограничивается рядом факторов, включая возможность формирования резистентности опухолей, в первую очередь за счет клеток, получающих сублетальную дозу воздействия. Перспективным решением этой проблемы выступает создание мультимодальных агентов, объединяющих фотосенсибилизатор с дополнительным терапевтическим модулем. Особый интерес в качестве дополнительного цитотоксического модуля представляют низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ, блокирующие ключевые сигнальные пути выживания опухолевых клеток, активирующиеся в ответ на сублетальные дозы ФДТ. Включение данных агентов в состав конъюгатов не только позволяет повысить эффективность лечения, но и способно обеспечить подавление адаптационных механизмов опухоли, минимизируя таким образом риск рецидивирования. В связи с вышесказанным, актуальность проведенного в работе исследования не вызывает сомнений. В диссертационной работе обобщены и проанализированы результаты собственных исследований автора. Экспериментальные данные получены с использованием современных методов биофизики, включая спектроскопические исследования

фотофизических свойств соединений, оценку их фотохимической активности *in vitro*, а также тестирование противоопухолевой эффективности на клеточных культурах и животных моделях. Применение комплексного статистического анализа обеспечило объективную интерпретацию результатов, исключив случайные отклонения и подтвердив воспроизводимость экспериментов. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, соответствуют поставленным целям и задачам, корректны, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений.

Выполненное диссертантом исследование имеет важное фундаментальное и прикладное значение. Важным результатом с точки зрения фундаментальной науки является расширение представлений о механизмах ответа клеток на фотодинамическое воздействие и блокаду передачи сигналов от рецепторов факторов роста. Практическое значение результатов проведенного исследования обусловлено тем, что получены новые знания об эффективности объединения фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора в состав единой молекулярной структуры для повышения эффективности проводимой терапии. Данные результаты могут быть использованы для создания новых противоопухолевых препаратов для комбинированной ФДТ. Полученные в диссертации Крыловой Любови Владимировны результаты и выводы могут быть включены в специализированные образовательные курсы по биофизике, биомедицине, медицинской химии, в частности, для студентов вузов, обучающихся по медицинским и биологическим специальностям.

В ходе ознакомления с работой возникли следующие вопросы и замечания:

1. Учитывая известные ограничения МТТ-теста, связанные с его зависимостью от метаболической активности клеток, использование в диссертационном исследовании исключительно этого метода анализа цитотоксичности, без дополнительного подтверждения, требует обоснования.

2. На основании представленных в работе данных, полученных с помощью конфокальной микроскопии (рис. 4, рис. 15 автореферата; рис. 13, рис. 31 диссертации) диссертант делает заключение о накоплении соединений в клетках. Проводился ли анализ возможности присоединения исследуемых соединений или их агрегатов к клеточной мембране без проникновения в цитоплазму? Если нет, флуоресценция таких адсорбированных соединений могла привести к завышенной оценке эффективности интернализации конъюгатов.

3. На стр. 87 диссертации (стр. 16 автореферата) автор утверждает: «Гистологический анализ опухолей на 3 сутки после начала терапии выявил значительное уменьшение количества клеток в опухолях животных в экспериментальных группах (рис. 24).» По-видимому, имеется в виду клеточность опухоли. Проводилась ли количественная оценка её изменения в результате терапии? Также сообщается о наличии

фрагментированных ядер, однако размер и увеличение приведенных изображений не позволяют оценить верность этого утверждения.

4. Диссертант обосновывает отличия в свойствах исследуемых соединений, среди прочего, разницей в их липофильности. Каким методом была определена липофильность соединений в исследовании? Хотелось бы услышать мнение диссертанта о том, может ли высокая степень липофильности привести к аккумуляции молекул в плазматической мембране и снижению эффективности их проникновения в цитоплазму клеток.

5. В разделе 2.16 диссертации (сведения о статистической обработке результатов) следовало бы более детально указать, в частности, в каких случаях использованы методы параметрической и непараметрической статистики, а также какие методы множественных сравнений применены диссертантом.

6. Текст диссертационной работы содержит ряд опечаток и неточностей. Например, на стр. 76 диссертации имеется ошибка в нумерации рисунков (указан рис. 6 вместо рис. 16); на стр. 77 «молочной желеты человека» и т.п.

Высказанные замечания ни в коей мере не затрагивают основных положений диссертационной работы и не снижают значимость полученных результатов.

Диссертационная работа Крыловой Любови Владимировны «Конъюгаты металлокомплексов хлорина еб с ингибиторами тирозинкиназ как агенты для комбинированной фотодинамической терапии» соответствует требованиям пунктов 9-10 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика.

Соискатель имеет 34 опубликованных научных работы по теме диссертации: 7 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК, 2 статьи в иных изданиях, а также 25 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях. Помимо этого, получен патент РФ на изобретение.

Опубликованные работы посвящены исследованию фотофизических, фотохимических и биологических свойств мультимодальных агентов для фотодинамической терапии онкологических заболеваний и особенностям биологии опухолевых клеток, обеспечивающим эффективность предложенного диссертантом подхода. Опубликованные работы в полной мере отражают результаты диссертационного исследования.

Недостовверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, в диссертации Крыловой Л.В. отсутствуют.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

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 // *Journal of Medicinal Chemistry*, 2025. V. 68 (2). P. 1901–1923.

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. V. 269, 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. V. 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. V. 62 (24). P. 11182–11193.

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов, все положительные. В отзывах указывается, что представляемая работа характеризуется высоким теоретическим и экспериментальным уровнем, по своей новизне и актуальности имеет большое научное и практическое значение, соответствует требованиям Высшей аттестационной комиссии. Отзывы получены:

1. от **Клапшиной Ларисы Григорьевны**, к.х.н., старшего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева Российской академии наук. Без замечаний.

2. от **Кузнецовой Дарьи Сергеевны**, к.б.н., заведующей лабораторией омиксных и регенеративных технологий Института Регенеративной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). Без замечаний.

3. от **Турубановой Виктории Дмитриевны**, к.б.н., заместителя руководителя научной группы Научного центра генетики и наук о жизни Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус». Без замечаний.

4. от **Березина Дмитрия Борисовича**, д.х.н, профессора кафедры органической химии, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановский государственный химико-технологический университет». В отзыве имеются замечания. В тексте автореферата имеются опечатки и неудачные выражения, например, в заголовке на стр. 15 ошибочно указан конъюгат цинкового комплекса хлорина e_6 , тогда как в тексте идет речь о комплексе индия, а на стр. 18 дано выражение «разгорание соединения» вместо «разгорание флуоресценции соединения». В названии «хлорин e_6 » цифру следует приводить в подстрочном индексе.

5. от **Петровой Дарьи Вадимовны**, к.х.н., научного сотрудника отдела многослойной рентгеновской оптики Института физики микроструктур РАН филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр Институт прикладной физики им. А.В. Гапонова-Грехова Российской Федерации. В отзыве имеется замечание. На рис. 4, на графике, демонстрирующем интенсивность флуоресценции клеток, показано, что для соединения сравнения этот показатель имеет большую интенсивность, чем для конъюгата. В тексте автореферата эти данные никак не обсуждаются, как и причины подобного явления.

6. от **Сироткиной Марины Александровны**, к.б.н., директора НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства Здравоохранения Российской Федерации. В отзыве присутствуют некоторые замечания и вопросы:

1. В разделе «Материалы и методы» не хватило обоснования выбранного режима ФДТ: если это общепринятый режим, необходимо указать соответствующую ссылку на источники или обосновать выбранный режим.

2. На рисунке 11 представлен результат гистологического исследования, однако из текста не понятно, что именно оценивали на гистологических препаратах – опухолевый патоморфоз? В разделе Материалы и Методы было бы полезно указать какие параметры анализировались на гистологических препаратах.

3. Гистологическое исследование проводилось на 3 сутки после ФДТ. Это стандартный срок при оценке противоопухолевой эффективности новых препаратов? Если нет, то необходимо обосновать выбранный период.

4. Коэффициент торможения роста опухоли имеет общепринятое сокращение ТРО. В тексте автореферата ошибочно написано сокращение ТОР.

7. от **Велегжанинова Ильи Олеговича** к.б.н., старшего научного сотрудника отдела радиоэкологии и ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии и **Белых Елены Сергеевны** к.б.н., научного сотрудника отдела радиоэкологии Института биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук». В отзыве имеется ряд вопросов и комментариев:

1. Результаты, представленные в таблицах 2 и 4, кажется, ведут к противоречивым выводам. С одной стороны, разница в эффектах между клетками различающимся по уровню экспрессии EGFR и HGFR соответственно, и прирост фототоксичности конъюгатов относительно молекул хлоринов в клеточных линиях А-431 и Е-24 свидетельствует, как и говорят авторы, о синергическом действии фотосенсибилизирующего и ингибиторного модулей конъюгатов. С другой стороны, полное отсутствие разницы в уровне токсичности между конъюгатом и исходным хлорином в условиях темноты, и при этом выраженное отличие от токсичности свободных ингибиторов тирозинкиназ, свидетельствует о том, что ни Вандетаниб в составе конъюгированной молекулы, ни Кабозантиниб высвобождаемый из конъюгата после ферментативного разложения, не проявляют своих ингибирующих свойств по отношению к тирозинкиназам. Это, конечно, лишь предположение на основе косвенных показателей, но оно указывает на необходимость отдельной оценки ингибиторной активности конъюгата InChl-Vnd и продукта ферментативного разложения ZnChl-Cbz, которого, в работе, увы проведено не было (как следует из автореферата). Эта необходимость становится ещё более явной учитывая третье положение, выносимое на защиту, которое, по всей видимости, опирается на результатах измерения свойств хлорина при ферментативном разложении ZnChl-Cbz. Таким образом, представлена доказательная основа только части выносимого на защиту положения

2. Уровни экспрессии целевых рецепторов (EGFR, VEGFR-2,3 и HGFR в использованных культурах клеток, судя по автореферату, оценивались на основе информации из баз данных, полученной на тех же линиях, но из совсем других коллекций.

Существуют наглядные иллюстрации (Ben-David et al., 2018 doi:10.1038/s41586-018-0409-3.), что длительное культивирование приводит к тому, что по уровню экспрессии разных генов и количеству и положению делеций/инсерций, клетки одной и той же линии из разных лабораторий могут значительно различаться между собой. В связи с этим возникает вопрос, оценивался ли уровень экспрессии (мРНК) соответствующих генов в культурах клеток, использованных в экспериментах в вашей лаборатории? Какова степень этих различий?

3. Вызывает удивление, что при исследовании конъюгата ZnChl-Cbz в качестве пары клеточных линий, различающихся по экспрессии рецепторов ростовых факторов взяты клетки двух разных видов: человека (линия Т-24) и хомяка (линия СНО). Учитывая, что это даже не клетки одного и того же органа, то возникает вопрос почему был сделан именно такой выбор?

4. Оценка накопления InChl-Vnd в клетках была проведена через 24 часа инкубации клеток с веществом (рисунок 4), а исследование накопления ZnChl-Cbz (рисунок 15) в промежутке от 1 до 24 ч показало, что наибольшее количество вещества в клетках наблюдается через 24 часа после внесения в среду. В связи с этим возникает вопрос, почему анализ накопления субстанции InChl-Vnd (рисунок 9) в тканях мышей был выполнен через 4 часа после внутривенного введения?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их соответствием критериям требований, изложенных в пп. 22 и 24 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842: являются компетентными по заявленной в диссертации соискателя специальности, имеют профильные публикации по проблеме диссертационного исследования и способны объективно оценивать актуальность темы диссертации, а также достоверность, теоретическую значимость и научно-практическую ценность полученных в работе результатов (сведения о них размещены на официальном сайте ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»: <https://diss.unn.ru/1551>).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

проведено комплексное исследование фотофизических, фотохимических и биологических свойств двух новых мультимодальных фотосенсибилизаторов на основе металлокомплексов хлорина *еб* и ингибиторов тирозинкиназ;

показано, что применение ингибитора тирозинкиназ в качестве дополнительного терапевтического модуля в составе мультимодального фотосенсибилизатора обеспечивает увеличение эффективности противоопухолевой терапии;

доказана эффективность мультимодальных фотосенсибилизаторов на основе металлокомплексов хлорина *еб* и ингибиторов тирозинкиназ для лечения EGFR- и HGFR-положительных опухолей;

обнаружено преимущество использования ферментативно расщепляемого линкера для объединения терапевтических модулей в составе мультимодальных фотосенсибилизаторов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

выявлен синергический характер взаимодействия производного хлорина *еб* и ингибитора тирозинкиназ в составе единой молекулярной структуры;

показано, что разработка мультимодальных фотосенсибилизаторов является перспективным направлением для повышения эффективности фотодинамической терапии и преодоления ограничений монотерапевтического воздействия.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс методов: методы спектроскопии, оптической и флуоресцентной микроскопии, флуоресцентного макроимиджинга, ингибиторного анализа, работа с клеточными культурами и лабораторными животными;

изложены положения об эффективности применения мультимодальных фотосенсибилизаторов, в которых в качестве дополнительного терапевтического модуля использованы ингибиторы тирозинкиназ;

раскрыты особенности действия мультимодальных соединений на опухолевые клетки.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

получены новые знания о перспективах использования мультимодальных агентов на основе фотосенсибилизатора и низкомолекулярного ингибитора для повышения эффективности фотодинамической терапии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

использовано высокотехнологичное оборудование, апробированные экспериментальные методы и стандартные методы статистического анализа;

проведено достаточное количество экспериментов, позволяющих оценить воспроизводимость результатов исследований;

установлено соответствие результатов работы с данными других авторов, представленных в независимых источниках по исследуемой тематике, объем исследования достаточен для получения детальной и объективной информации, необходимой для обоснования выводов.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и

проведение экспериментальных исследований, статистическую обработку данных, анализ и обобщение результатов, подготовку и публикацию статей и докладов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Диссертация является целостным, законченным научным исследованием, охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы и соответствует критериям внутреннего единства, что подтверждается четкой логикой и соответствующей содержанию работы структурой исследования, формулировками цели работы и выводов на основании полученных результатов. Диссертация соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Учитывая, что вандетаниб и кабозантиниб имеют двойные связи, могут ли они атаковаться активными формами кислорода?
2. Насколько конъюгат токсичен в отношении других тканей?
3. Почему оценка терапевтической эффективности была завершена на 15 день, когда рост опухоли восстановился?
4. Какой метод Вы использовали для анализа жизнеспособности клеток?

Соискатель Крылова Л.В. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию, указав, что:

1. Да, действительно активные формы кислорода способны нарушать структуру ингибиторов, снижая их активность. В связи с этим проводят модификации длины линкера, кроме того, создание расщепляемых конъюгатов способно решить данную проблему.

2. Предварительную оценку токсичности конъюгата проводили на мышах обоих полов линии balb/c. На протяжении 10 дней после внутривенной инъекции проводили фиксацию общего состояния, веса животных. В заключительный день была проведена оценка гематологических и биохимических показателей крови, а также гистопатологическое исследование органов. В результате показано, что в течение 10 дней не наблюдалось летальных исходов животных. Отсутствовало изменение веса тела, которое указывает на то, что животные чувствовали себя удовлетворительно. Оценка гематологических и биохимических показателей крови не выявило никаких признаков системной токсичности; при гистопатологическом исследовании основных органов также не обнаружено токсических эффектов.

3. Рост опухоли на 15 сутки мы связываем с тем, что исследование проводилось на иммунодефицитных мышах. Известно, что для реализации полного фотодинамического воздействия и долгосрочного ответа опухоли необходимо сочетание 3 компонентов: прямой токсичности фотосенсибилизатора, за счет производства активных форм

