



УДК 577.35

АДРЕСНЫЕ НАНОЛИПОСОМЫ, ЗАГРУЖЕННЫЕ КРАСИТЕЛЕМ IR780, КАК МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНАЯ НАНОПЛАТФОРМА ДЛЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКОЙ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

© 2025 г. Г. М. Прошкина^{*, #}, Е. И. Шрамова^{*}, А. С. Согомонян^{*, **}, С. М. Деев^{*, **, ***}

^{*} ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

^{**} Московский инженерно-физический институт, Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31

^{***} Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Россия, 430005 Саранск, Большевицкая ул., 68

Поступила в редакцию 10.05.2025 г.

После доработки 21.05.2025 г.

Принята к публикации 22.05.2025 г.

При лечении раковых заболеваний комбинированное действие фототермической и фотодинамической терапии обладает уникальными преимуществами по сравнению с каждым из этих методов в отдельности. В данном исследовании разработана многофункциональная адресная наноплатформа для одновременной комбинированной фототермической и фотодинамической терапии при облучении инфракрасным лазером 808 нм. Разработанная система представляет собой липосомы размером ~140 нм, специфичные к опухоль-ассоциированному антигену HER2 и загруженные гептаметинцианиновым красителем ближнего инфракрасного диапазона IR780. Тропность липосом к HER2 определяется HER2-специфичным скаффолдным белком DARPIn₉₋₂₉ на внешней поверхности липосом. Установлено, что, находясь в составе липосом, IR780 сохраняет фототермические и фотодинамические свойства: под действием облучения в растворе липосом, загруженных IR780, происходит быстрое повышение температуры раствора (до 60°C за 60 с), а также идет выработка активных форм кислорода. В опытах *in vitro* установлено, что HER2-специфичные липосомы, содержащие IR780, обладают фотоиндуцированной цитотоксичностью в отношении HER2-суперэкспрессирующих клеток, вызывая гибель 50% клеточной популяции при концентрации 2.85 мкМ. Результаты исследования позволяют заключить, что HER2-специфичные липосомы, содержащие IR780, обладают отличными таргетными характеристиками, а IR780 может использоваться в качестве действующего вещества для одновременной фототермической и фотодинамической терапии.

Ключевые слова: фототермическая терапия, фотодинамическая терапия, HER2-специфичные липосомы, таргетная терапия, IR780

DOI: 10.31857/S0132342325050132

ВВЕДЕНИЕ

Рак продолжает оставаться одной из лидирующих причин смертности во всем мире, представляя собой серьезную проблему для общественного здравоохранения [1]. Радикальное уда-

ление опухолевых образований, наряду с химио- и лучевой терапией, – ведущие методы лечения рака на сегодняшний день. Однако стоит отметить, что для поздних стадий солидных опухолей применение химио- и лучевой терапии де-

Сокращения: Ce6 – хлорин e6; DARPIn (Designed Ankyrin Repeat Proteins) – белки на основе анкириновых повторов; HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) – рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека; IC₅₀ – концентрация, при которой происходит ингибирование роста 50% клеток; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид; АФК – активные формы кислорода; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФТТ – фототермическая терапия.

[#] Автор для связи: (эл. почта: gmb@ibch.ru).

монстрирует ограниченный успех, с общими показателями ответа 20–30% [2]. Кроме того, при химиотерапии у 70–80% пациентов проявляются значительные побочные эффекты (тошнота, выпадение волос, иммуносупрессия, быстро развивающаяся лекарственная устойчивость) [3, 4], и у 5–10% пациентов, получавших лучевую терапию, развиваются вторичные онкологические заболевания [5].

Эти проблемы подчеркивают настоятельную необходимость в создании инновационных лекарственных формуляций и новых подходов, призванных обеспечить селективность лекарств по отношению к раковым клеткам, минимизировать системную токсичность и, по возможности, обеспечить синергизм (многофакторность) воздействия.

Фототермическая (ФТТ) и фотодинамическая терапия (ФДТ) – многообещающие методы лечения рака, которые, используя свет ближнего инфракрасного диапазона (700–1000 нм), позволяют избирательно устранять очаги поражения с помощью фотореактивных соединений, способных преобразовывать свет в тепло (ФТТ) и генерировать активные формы кислорода (ФДТ) [6]. Селективность фототоксического воздействия на опухолевый очаг определяется локальным облучением клеток-мишеней [7–10]. Как правило, фототермические и фотодинамические агенты могут использоваться в сочетанной ФТТ/ФДТ только при использовании лазеров с разными длинами волн из-за несовпадения оптических характеристик. Для сочетанной ФТТ/ФДТ в условиях одноволнового облучения описаны системы на основе полимерных структур, содержащих золотые наночастицы и фотосенсибилизатор хлорин е6 (Ce6) [11], углеродные нанотрубки в комплексе с фталоцианином цинка [12], модифицированный полиэтиленгликолем оксид графена в комплексе с Ce6 [13], самособирающихся частиц на основе трансферрина, загруженных красителем IR780 [14]. Описанные системы отличаются сложностью получения и пассивным накоплением в опухоли. Таким образом, разработка простой, но вместе с тем адресной и эффективной системы для одновременного фототермического и фотодинамического воздействия на раковые клетки по-прежнему остается актуальной задачей.

Целью данного исследования была разработка адресной наноплатформы на основе HER2-специ-

фичных липосом малого размера, загруженных гептаметинцианиновым красителем IR780, и изучение возможности применения данной платформы для адресной и одновременной фототермической и фотодинамической терапии в отношении HER2-положительных раковых клеток *in vitro* в условиях одноволнового лазерного облучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика HER2-специфичных липосом, загруженных IR780. В качестве мишени для нацеливания липосом на раковые клетки нами был выбран опухоль-ассоциированный антиген HER2 (рецептор второго типа эпидермального фактора роста человека), сверхэкспрессия которого характерна для многих опухолей эпителиального происхождения человека: рака молочной железы, легких, желудка, яичников и предстательной железы [15]. Высокий уровень экспрессии в раковой клетке и низкий уровень экспрессии в нормальной эпителиальной ткани позволяют рассматривать HER2 как оптимальную мишень для адресной терапии рака. В современной медицинской практике онкомаркер HER2 используется в качестве терапевтической мишени для моноклональных антител (Пертузумаб, Трастузумаб) и ингибиторов киназ (Лапатиниб) при лечении HER2-положительных опухолей молочной железы [16].

В качестве векторной молекулы мы использовали искусственно созданный скаффолдный белок на основе анкириновых повторов DARPin_9-29 (Designed Ankyrin Repeat Protein), представляющий собой миметик антитела и взаимодействующий с субдоменом I HER2 с высокой аффинностью ($K_D = 3.8$ нМ) [17].

Липосомы представляют собой отличные наноконтейнеры для доставки лекарств, поскольку, обладая бислойной структурой, похожей на состав биологических клеточных мембран, способствуют повышению биосовместимости препаратов. Кроме того, фосфолипидный состав липосом позволяет инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные препараты.

Липосомы, загруженные IR780 и модифицированные по внешней поверхности HER2-специфичным адресным модулем DARPin_9-29 (рис. 1а), получали, как описано в “Эксперим. части”. Для определения концентрации IR780 в водном растворе первоначально строили калибро-

вочную кривую (рис. 1б), как описано в “Эксперим. части”. Интенсивность поглощения IR780 возрастает линейно с увеличением концентрации (рис. 1б). Как видно из данных, приведенных на рис. 1в, при загрузке IR780 в липосомы (синяя кривая), происходит смещения максимума поглощения в длинноволновую область относительно свободного красителя в водном растворе (сиреневая кривая). Чтобы иметь возможность оценить концентрацию красителя, включенного в липосомы, DARP-Lip(IR780) инкубировали 10 мин при комнатной температуре с 0.5%-ным раствором Triton X-100. Triton X-100, растворяющий фосфолипидные мембраны, восстанавливает исходный спектр красителя (зеленая кривая на рис. 1в), о чем свидетельствует совпадение максимумов поглощения свободного красителя и красителя, высвобожденного из липосом. Как видно из рис. 1в (зеленая кривая), поглощение на 773 нм IR780 в этом случае равно 0.899, что, исходя из калибровочной кривой, составляет, 2.58 мкг/мл (3.9 мкМ). Учитывая коэффициент разбавления образца (x31), концентрация IR780 в липосомах составляет 120.9 мкМ. Спектр DARP-Lip(IR780) совпадает со спектром пустых

липосом (оранжевая кривая на рис. 1в), полученных 17-кратным продавливанием суспензии фосфолипидов (0.2 мг/мл) через фильтр с диаметром пор 100 нм. Ранее с использованием гидрофильного мембранонепроницаемого красителя фталоцианин-3,4',4'',4'''-тетрасульфоната меди мы показали, что 1 мг/мл суспензии липидных везикул соответствует 1.1 нМ [18]. Таким образом, концентрация HER2-специфичных липосом, загруженных IR780, составляет 6.82 (0.22×31) нМ, и, следовательно, молярное соотношение красителя к липосомам ($120\,900/6.82$) равно $\sim 17\,727$.

Размер и ζ -потенциал липосом, загруженных IR780, и липосом, модифицированных DARPIn, измеряли с помощью анализатора Zetasizer. Конъюгация липосом с DARPIn_9-29 приводит к увеличению их гидродинамического диаметра от 90.7 ± 32.3 до 143.7 ± 49.4 нм и изменению ζ -потенциала с 1.7 ± 7.9 до -11.9 ± 5.2 мВ.

Анализ специфичности взаимодействия адресных липосом с HER2. Способность адресного модуля DARPIn_9-29 в составе конъюгата DARP-Lip(IR780) специфически взаимодействовать с HER2 на поверхности клеток была подтверждена с помощью проточной цитомет-

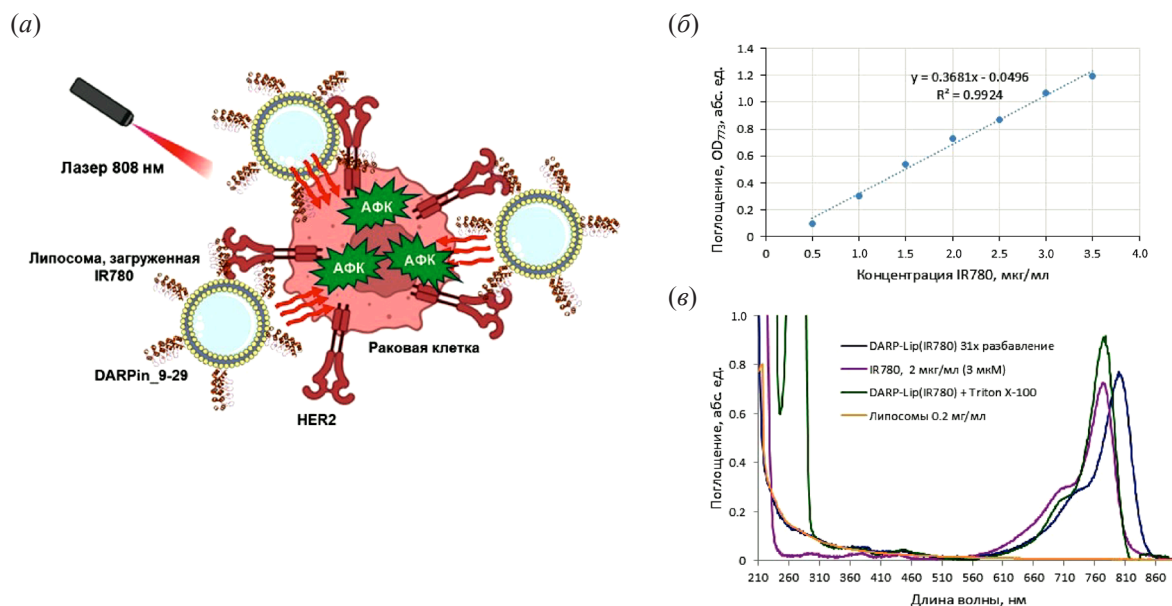


Рис. 1. Физико-химические характеристики DARP-Lip(IR780). (а) – Принцип действия адресной наноплатформы на основе HER2-специфичных липосом, загруженных IR780; (б) – калибровочная кривая IR780 в водном растворе. Показана линейная зависимость интенсивности поглощения IR780 (OD_{773}) от концентрации; (в) – спектры поглощения в водном растворе пустых липосом (оранжевая кривая), DARP-Lip(IR780) (синяя кривая), свободного IR780 (2 мкг/мл, сиреневая кривая) и DARP-Lip(IR780) после обработки Triton X-100 (зеленая кривая).

рии и конфокальной микроскопии (рис. 2). Чтобы иметь возможность визуализировать DARP-Lip(IR780) с учетом лазерного оснащения имеющихся в лаборатории проточного цитометра и конфокального микроскопа, DARP-Lip(IR780) были конъюгированы с флуоресцентным красителем AF-488-NHS, как описано в “Эксперим. части”. Как видно из данных проточной цитометрии (рис. 2а), значение средней интенсивности флуоресценции HER2-суперэкспрессирующих клеток SKOV-3, обработанных DARP-Lip(IR780)-AF-488 (красная кривая), превосходит в ~7.4 раза среднее значение интенсивности флуоресценции клеток SKOV-3, не обработанных DARP-Lip(IR780)-AF-488 (синяя кривая). В то же время клетки HeLa, для которых характерен нормальный уровень HER2, не обнаруживают сильного сдвига интенсивности флуо-

ресценции клеток, обработанных адресными липосомами (красная кривая), относительно контрольных клеток (синяя кривая). Эти результаты указывают на специфическое связывание DARP-Lip(IR780) с клетками, сверхэкспрессирующими HER2.

Специфичность связывания DARP-Lip(IR780) с HER2 на поверхности раковых клеток также была подтверждена конфокальной микроскопией: после 20-минутной инкубации клеток SKOV-3 с DARP-Lip(IR780)-AF-488, наблюдалось характерное окрашивание клеточной мембраны (рис. 2б, левая фотография). Дальнейшая инкубация в течение 90 мин приводила к интернализации DARP-Lip(IR780)-AF-488, о чем свидетельствуют зеленые пиксели в цитоплазме клеток (рис. 2б, правая фотография).

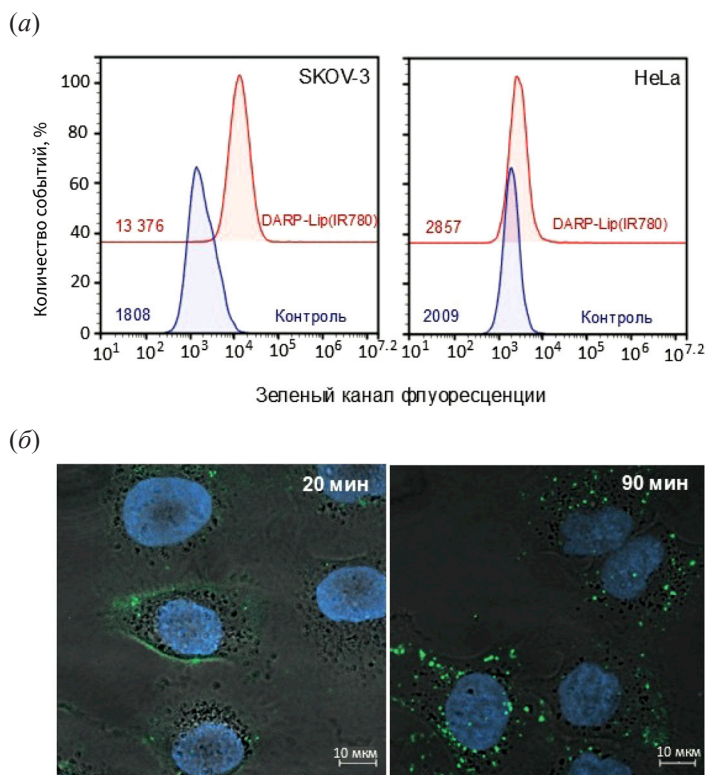


Рис. 2. Взаимодействие DARP-Lip(IR780) с HER2 *in vitro*. (а) – Оценка HER2-специфичности DARP-Lip(IR780) в отношении HER2-положительных клеток SKOV-3 и клеток HeLa (нормальный уровень экспрессии HER2) методом проточной цитометрии. На пиктограммах указана средняя интенсивность флуоресценции для клеток, не обработанных DARP-Lip(IR780) (синяя кривая), и клеток, обработанных DARP-Lip(IR780) (красная кривая); (б) – изучение взаимодействия DARP-Lip(IR780) с клетками SKOV-3 методом конфокальной микроскопии. На фотографиях указано время инкубации клеток с DARP-Lip(IR780) до съемки. Ядра окрашены Hoechst 33342.

Фототоксические характеристики DARP-Lip(IR780) *in vitro*. Фототермические свойства IR780 в составе липосом оценивали по изменению температуры раствора DARP-Lip(IR780), подвергнутого облучению лазером 808 нм (1 Вт/см^2) в течение 3 мин. Мониторинг температуры, выполненный в режиме реального времени, показал строгую температурную зависимость от концентрации раствора липосом, загруженных красителем IR780. Как видно из рис. 3а, под действием облучения температурный подъем происходит в течение короткого временного периода ($<60 \text{ с}$), крутизна подъема зависит от концентрации красителя в липосомах и достигает максимума к 120 с облучения. Температура раствора липосом

с концентрацией красителя IR780 130 мкМ составляла 68°C через 120 с облучения. Отметим, что PBS, подвергнутый облучению лазером в таких же условиях, не показал изменения температуры.

Фотодинамические свойства адресных липосом оценивали по способности IR780, включенного в липосомы, образовывать активные формы кислорода (АФК) в живых клетках под действием облучения. Для этого использовали нефлуоресцирующий зонд карбокси- H_2DCFDA , который, проникнув в клетку, подвергается деацетилированию неспецифическими внутриклеточными эстеразами с образованием восстановленного продукта флуоресцеина карбокси-DCFH.

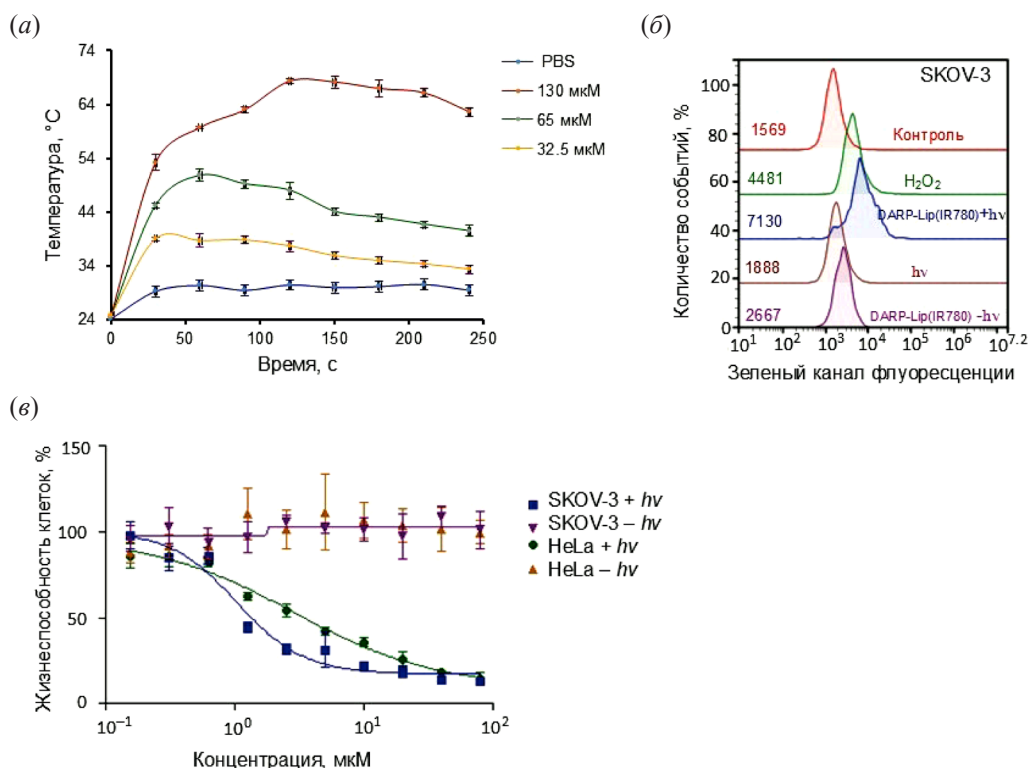


Рис. 3. Фототоксические характеристики DARP-Lip(IR780) *in vitro*. (а) – Зависимость температуры от времени облучения растворов DARP-Lip(IR780) разной концентрации лазером с длиной волны 808 нм (1 Вт/см^2); (б) – детекция АФК методом проточной цитометрии в живых клетках SKOV-3, обработанных DARP-Lip(IR780) и подвергнутых облучению (808 нм, 1 Вт/см^2 , 2 мин). На пиктограмме указаны значения средней интенсивности флуоресценции в зеленом канале для клеток, не обработанных DARP-Lip(IR780) и не подвергнутых облучению (красная кривая, контроль), клеток, обработанных DARP-Lip(IR780) и подвергнутых облучению (синяя кривая), обработанных DARP-Lip(IR780) и не облученных (сиреневая кривая), облученных, но не инкубированных с DARP-Lip(IR780) (коричневая кривая), и обработанных перекисью (зеленая кривая); (в) – фотоиндуцированная цитотоксичность в отношении клеток SKOV-3 (синяя кривая) и HeLa (зеленая кривая), инкубированных с DARP-Lip(IR780), и клеток, не инкубированных с DARP-Lip(IR780) (SKOV-3 – сиреневая кривая, HeLa – коричневая кривая). Планки погрешностей на диаграммах (а) и (в) представлены стандартной ошибкой среднего ($n = 3$).

В присутствии АФК карбокси-DCFH окисляется и флуоресцирует в зеленой области спектра. Согласно данным проточной цитометрии (рис. 3б), сдвиг интенсивности флуоресценции (в 4.5 раза) в зеленом канале относительно контрольных клеток SKOV-3 (красная кривая) наблюдается лишь для клеток, инкубированных с DARP-Lip(IR780) в течение 3 ч и подвергнутых облучению (808 нм, 1 Вт/см², 2 мин) (синяя кривая). Клетки SKOV-3, обработанные DARP-Lip(IR780), но не подвергнутые облучению (сиреневая кривая), равно как и клетки, подвергнутые только облучению без инкубации с DARP-Lip(IR780) (коричневая кривая), не дают сдвига флуоресценции в зеленом канале относительно контрольных клеток. В качестве положительного контроля использовали клетки SKOV-3, обработанные 50 мкМ раствором H₂O₂ (зеленая кривая), для которых также наблюдали сдвиг интенсивности флуоресценции относительно контроля.

Таким образом, результаты экспериментов по изучению фототермических и фотодинамических свойств DARP-Lip(IR780) однозначно доказывают, что данный препарат может быть использован для одновременной сочетанной ФТТ/ФДТ-терапии, индуцируемой одномоментным облучением инфракрасным лазером.

Для оценки HER2-специфичной фотоиндуцированной цитотоксичности адресных липосом, загруженных IR780, клетки SKOV-3 и HeLa инкубировали в течение 3 ч с различными концентрациями DARP-Lip(IR780), после чего подвергали облучению лазером 808 нм (1 Вт/см², 3 мин), как описано в “Эксперим. части”. Как видно из рис. 3в, DARP-Lip(IR780) проявляют дозозависимую фотоиндуцированную цитотоксичность относительно клеток SKOV-3, суперэкспрессирующих HER2, IC₅₀ = 2.85 мкМ (синяя кривая на рис. 3в). В отношении клеток HeLa, характеризующихся нормальным уровнем экспрессии HER2, цитотоксический эффект (IC₅₀ = 1.05 мкМ) оказался в ~2.7 раза слабее (зеленая кривая на рис. 3в). При инкубации клеток SKOV-3 и HeLa с DARP-Lip(IR780) в отсутствие облучения существенной цитотоксичности *in vitro* не наблюдалось (бордовая и коричневые кривые соответственно).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение HER2-специфичных липосом, загруженных красителем IR780. Стоковый раствор (6.7 мг/мл) IR-780 (Merck, США) готовили в ди-

метилсульфоксиде (DMSO, Sigma-Aldrich, США) с последующим разбавлением водой до получения растворов с концентрацией 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 и 3.0 мкг/мл. Спектры поглощения регистрировали на УФ-спектрофотометре Ultrospec 7000 (GE, США) и строили калибровочную кривую зависимости концентрации от поглощения на длине волны 773 нм.

Загрузку липосом проводили, как описано в работе [18]. Вкратце, 0.125 мл суспензии фосфолипидов (Avanti Polar Lipids, США; конечная концентрация 4 г/л), приготовленной из гранул L-α-фосфатидилхолина (40%), фосфатидилэтаноламина (16%) и фосфатидилинозитола (11%), смешивали с 0.575 мл водного раствора IR780 (конечная концентрация 500 мкМ). Суспензию быстро замораживали (–150°C)/оттаивали (30°C) (10 циклов) и многократно (17 раз) пропускали через экструдер (диаметр пор фильтра 100 нм). Краситель, не включенный в липосомы, отделяли с помощью гель-проникающей хроматографии на колонке, упакованной сорбентом сефароза CL-2B (Cytiva, США).

Функционализацию внешней поверхности липосом HER2-специфичным DARP_{in}_9-29 проводили по аминок группам фосфотидилэтаноламина. Для этого липосомы, загруженные IR780, инкубировали с 5-кратным молярным избытком сульфо-EMCS (эфир N-ε-малеимидокапроилокси сульфосукцинимид). Параллельно DARP_{in}_9-29 (100 мкМ в 20 мМ NaPi, pH 7.5) инкубировали с 2-иминотиолом (6 мМ, реагент Траута, позволяющий ввести SH-группу по первичным аминам белка). Обе реакции проводили при комнатной температуре в течение 40 мин, после чего продукты отделяли от несвязавшихся модифицирующих агентов на колонке NAP5 (Cytiva, США). Конъюгацию сульфо-EMCS-протеолипосом с DARP_{in}-SH проводили в течение 40 мин при комнатной температуре; DARP-Lip(IR780) отделяли от несвязанного DARP_{in}_9-29 гель-фильтрацией на колонке, упакованной сефарозой CL-2B.

Клеточные линии. В работе использовали клеточную линию аденокарциномы яичников человека SKOV3 (коллекция ИБХ РАН) со сверхэкспрессией HER2 (10⁶ молекул/клетка), а также клеточную линию карциномы шейки матки HeLa (коллекция ИБХ РАН) с нормальным уровнем экспрессии HER2 (10⁴ молекул/клетка). Клетки культивировали в стандартных условиях

(37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂) в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и антибиотик (10 ед./мл пенициллина, 10 мкг/мл стрептомицина; ПанЭко, Россия).

Анализ специфичности взаимодействия адресных липосом с HER2. HER2-специфичную активность адресного модуля DARP_{in}_9-29 в составе липосом DARP-Lip(IR780) оценивали методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Поскольку набор лазеров и детекторов проточного цитометра NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США) и конфокального микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss, Германия) не позволяют детектировать IR780, липосомы DARP-Lip(IR780) были конъюгированы с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром флуоресцентного красителя AF488-NHS (Lumiprobe, Россия). Конъюгацию DARP-Lip(IR780) с 10-кратным молярным избытком AF488-NHS проводили при комнатной температуре в течение 1 ч в растворе 20 mM NaPi, pH 7.5, 150 mM NaCl. Непореагировавший AF488-NHS отделяли от DARP-Lip(IR780) гель-фильтрацией на колонке NAP5 (Cytiva, США).

Для анализа взаимодействия DARP-Lip(IR780) с HER2 на поверхности раковых клеток методом проточной цитометрии клетки SKOV-3 и HeLa (10⁵ клеток в 200 мкл полной ростовой среды) инкубировали 7 мин при 37°C с 300 nM DARP-Lip(IR780)-AF488 (концентрация указана по красителю AF488). Клетки трижды промывали PBS и анализировали на приборе NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США). Флуоресценцию AF488 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм и детектировали в канале 530 ± 30 нм (канал FITC-H).

Для оценки взаимодействия DARP-Lip(IR780) с HER2 на поверхности раковых клеток методом конфокальной микроскопии 5000 клеток линии SKOV-3 высевали в лунки 96-луночного планшета со стеклянным дном (Eppendorf, США) и культивировали в течение ночи. На следующий день к клеткам добавляли 500 nM DARP-Lip(IR780)-AF488 (концентрация указана по AF488). Инкубацию клеток с конъюгатом проводили в течение 10 мин при 37°C. Ядра окрашивали 10 nM Hoechst 33342 (Invitrogen, США) в течение 10 мин при 37°C. Клетки трижды промывали

PBS и анализировали с помощью конфокального микроскопа LSM 980 (Carl Zeiss, Германия), используя следующие параметры: масляный иммерсионный объектив 63× Plan-Apochromat, возбуждение Hoechst 33342 – 405 нм, детекция флуоресценции – 410–520 нм, возбуждение AF488 – 488 нм, детекция флуоресценции – 497–562 нм.

Фототермические и фотодинамические свойства HER2-специфичных липосом, нагруженных IR780. DARP-Lip(IR780) (с концентрацией 130, 65 и 32.5 мкМ в объеме 300 мкл), растворенные в PBS, подвергали лазерному облучению при длине волны 808 нм (1 Вт/см²). Количество повторов для каждой концентрации равно трем. Изменение температуры отслеживали с помощью тепловизора (FLIR Systems, Wilsonville, США). В качестве контроля использовали раствор PBS.

Образование АФК под действием облучения в клетках, обработанных DARP-Lip(IR780), проводили с использованием чувствительного к АФК зонда 5,6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (carboxy-H₂DCFDA, Invitrogen, США). Карбокси-H₂DCFDA растворяли в DMSO для получения 10 mM исходного раствора и дополнительно разбавляли перед использованием до концентрации 1 мкМ. Клетки SKOV-3, за сутки рассеянные в лунки 24-луночного планшета, инкубировали в течение 3 ч с 1 мкМ раствором DARP-Lip(IR780), облучали 3 мин лазером с длиной волны 808 нм (1 Вт/см²), после чего инкубировали в темноте 30 мин при 37°C с 1 мкМ раствором H₂DCFDA. Клетки собирали с подложки с помощью 0.05%-ного раствора трипсин-EDTA, суспендировали в PBS и немедленно анализировали с помощью проточного цитометра NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США), используя для возбуждения флуоресценции лазер с длиной волны 488 нм. Детекцию флуоресценции проводили в диапазоне 497–562 нм (канал FITC-H). В качестве положительного контроля в опыте использовали клетки, обработанные 50 мкМ раствора H₂O₂ в течение 1 ч.

Размер и ζ-потенциал липосом. Гидродинамические размеры и ζ-потенциалы адресных/безадресных липосом, содержащих IR780, определяли с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Измерения проводили в 0.1%-ном растворе PBS,

pH 7.5, при 25°C. Для расчета ζ -потенциалов использовали приближение Смолуховского.

Анализ светоиндуцированной цитотоксичности DARP-Lip(IR780) *in vitro*. Клетки SKOV-3 и HeLa высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 3.5×10^4 и 2.5×10^4 кл./мл соответственно и инкубировали в течение ночи. К клеткам добавляли DARP-Lip(IR780) в различных концентрациях (от 150 нМ до 80 мкМ, концентрация указана по красителю IR780), инкубировали 3 ч, после чего облучали лазером с длиной волны 808 нм (1 Вт/см², 3 мин). Далее клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч и проводили оценку цитотоксичности с помощью МТТ-теста. Для этого удаляли культуральную среду и добавляли по 100 мкл раствора МТТ (ПанЭко, Россия) (0.5 г/л) в каждую лунку. Клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч, удаляли раствор МТТ и добавляли по 100 мкл DMSO в каждую лунку для растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм с помощью планшетного ридера Infinite M100 Pro (Tecan, Австрия). Относительную жизнеспособность определяли с помощью GraphPad Prism (версия 9.4.0). Данные представлены стандартной ошибкой среднего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана мультифункциональная платформа на основе HER2-специфичных нанолипосом, содержащих краситель ближнего инфракрасного диапазона IR780, для сочетанной фототермической и фотодинамической терапии в условиях одноволнового лазерного облучения. Методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии установлено, что разработанная платформа обладает HER2-опосредованной тропностью к клеткам, характеризующимися суперэкспрессией опухоли-ассоциированного антигена HER2.

Показано, что HER2-специфичные липосомы характеризуются высокой степенью загрузки красителя IR780; инкапсулированный в липосомы в высокой концентрации IR780 проявляет фототермические и фотодинамические свойства. В опытах *in vitro* установлено, что разработанная система проявляет дозозависимую фотоиндуцированную цитотоксичность относительно HER2-суперэкспрессирующих клеток.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что HER2-специфичные липосомы, загруженные IR780, представляют собой многообещающую формуляцию для одновременной сочетанной фототермической и фотодинамической терапии. Принимая во внимание оптические характеристики IR780 (возбуждение и флуоресценция в ближнем ИК-диапазоне), в перспективе данная система также может использоваться в биомедицинских исследованиях для визуализации опухолевых образований *in vivo* и рассматриваться как тераностическая наноплатформа.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (грант № 24-14-00088 “Таргетированные флуоресцентные липосомы как система для неинвазивной оптической детекции первичных опухолей и удаленных метастазов HER2/ЕpCAM-положительных карцином”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – ГМП, ЕИШ, СМД; экспериментальные работы – ГМП, ЕИШ, АСС; написание статьи – ГМП; анализ данных – ГМП, ЕИШ; администрирование проекта – ГМП.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. // CA Cancer J. Clin. 2021. V. 71. P. 209–249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>

2. Goto T., Saito H., Sasajima J., Kawamoto T., Fujinaga A., Utsumi T., Yanagawa N., Hiramatsu K., Takamura A., Sato H., Fujibayashi S., Fujiya M. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 597813.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.597813>
3. *Nausea and Vomiting Related to Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version* // PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD), 2002.
4. Wikramanayake T.C., Haberland N.I., Akhundlu A., Laboy Nieves A., Miteva M. // *Curr. Oncol.* 2023. V. 30. P. 3609–3626.
<https://doi.org/10.3390/curroncol30040275>
5. Demoor-Goldschmidt C., de Vathaire F. // *Br. J. Radiol.* 2019. V. 92. P. 20180390.
<https://doi.org/10.1259/bjr.20180390>
6. Yoo S.W., Oh G., Ahn J.C., Chung E. // *Biomedicines*. 2021. V. 9. P. 113.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9020113>
7. Han H.S., Choi K.Y. // *Biomedicines*. 2021. V. 9. P. 305.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9030305>
8. Sun J., Zhao H., Xu W., Jiang G.Q. // *Front. Chem.* 2022. V. 10. P. 1024177.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1024177>
9. Шрамова Е.И., Котляр А.Б., Лебедеенко Е.Н., Деев С.М., Прошкина Г.М. // *Act. Nat.* 2020. V. 12. P. 81–91.
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.11028>
10. Proshkina G.M., Shramova E.I., Serova E.V., Myachchev E.A., Mirkasymov A.B., Deyev S.M., Kotlyar A.B. // *J. Nanotheranostics*. 2025. V. 6. P. 2.
11. Lin J., Wang S., Huang P., Wang Z., Chen S., Niu G., Li W., He J., Cui D., Lu G., Chen X., Nie Z. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. P. 5320–5329.
<https://doi.org/10.1021/nn4011686>
12. Zhang M., Murakami T., Ajima K., Tsuchida K., Sandanayaka A.S., Ito O., Iijima S., Yudasaka M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 14773–14778.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0801349105>
13. Tian B., Wang C., Zhang S., Feng L., Liu Z. // *ACS Nano*. 2011. V. 5. P. 7000–7009.
<https://doi.org/10.1021/nn201560b>
14. Wang K., Zhang Y., Wang J., Yuan A., Sun M., Wu J., Hu Y. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 27421.
<https://doi.org/10.1038/srep27421>
15. Gutierrez C., Schiff R. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2011. V. 135. P. 55–62.
<https://doi.org/10.5858/2010-0454-RAR.1>
16. Blumenthal G.M., Scher N.S., Cortazar P., Chatopadhyay S., Tang S., Song P., Liu Q., Ringgold K., Pilaro A.M., Tilley A., King K.E., Graham L., Relahan B.L., Weinberg W.C., Chi B., Thomas C., Hughes P., Ibrahim A., Justice R., Pazdur R. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. P. 4911–4916.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1212>
17. Steiner D., Forrer P., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 1211–1227.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085>
18. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.026>

Targeted Nanoliposomes Loaded with IR780 Dye as a Multifunctional Nanoplatform for Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy

G. M. Proshkina^{*, #}, E. I. Shramova^{*}, A. S. Sogomonyan^{*, **}, and S. M. Deyev^{*, **, ***}

[#] E-mail: gmb@ibch.ru

^{*} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^{**} Moscow Institute of Engineering Physics, National Research Nuclear University “MEPhI”,
Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

^{***} Ogarev National Research Mordovian State University,
ul. Bolshevistskaya 68, Saransk, 430005 Russia

During cancer treatment the combined effect of photothermal and photodynamic therapy has unique advantages over each of these methods alone. In this study, a multifunctional targeted nanoplatform for simultaneous combined photothermal and photodynamic therapy under 808 nm infrared laser irradiation was developed. The developed system consists of ~140 nm liposomes specific to the tumor-associated HER2 antigen and loaded with the near-infrared heptamethincyanine dye IR780. The targeting of liposomes to the HER2 is determined by the HER2-specific scaffold protein DARPIn_9-29 located on the outer surface of liposomes. It has been established that IR-780, loaded in liposomes, retains photothermal and photodynamic properties: upon irradiation, the temperature of IR780-loaded liposome solution rapidly increases (up to 60°C within 60 s), and the production of reactive oxygen species is also detected. *In vitro* experiments have shown that HER2-specific liposomes containing IR780 have photoinduced cytotoxicity against HER2-overexpressing cells, causing the death of 50% of the cell population at a concentration of 2.85 μM. The results of the study suggest that HER2-specific liposomes containing IR780 have excellent targeted characteristics, and IR780 can be used as an active substance for simultaneous photothermal and photodynamic therapy.

Keywords: photothermal therapy, photodynamic therapy, HER2-specific liposomes, targeted therapy, IR780