

**Воловецкий Артур Борисович**

**КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ  
БОРСОДЕРЖАЩИХ КОНЬЮГАТОВ  
АМИНОАМИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА  $E_6$   
В КАЧЕСТВЕ АГЕНТОВ ДЛЯ БОР-  
НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ**

03.01.02 — биофизика (биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

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:**

**Масленникова Анна Владимировна**

доктор медицинских наук  
профессор кафедры биофизики ИББМ ФГАОУ ВО  
«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

профессор кафедры онкологии ФГБОУ ВО  
«Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Шарапов Марс Галиевич**

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки Российской академии наук - обособленного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

**Романко Юрий Сергеевич**

доктор медицинских наук, заведующий научно-организационного отдела, профессор отдела последипломного образования в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

**Ведущая организация:**

ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Защита диссертации состоится «16» мая 2019 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.21 при Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2018/889/diss-Volovetskiy-889.pdf>

Автореферат разослан «      »        2019 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Соколова Евгения Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ) является на сегодняшний день одним из наиболее перспективных методов лучевой терапии злокачественных новообразований. Метод основан на использовании реакций, возникающих между ядрами  $^{10}\text{B}$  и потоком нейтронов, обладающими энергией в диапазоне  $5 \times 10^{-3}$ - $10^4$  эВ. Одной из наиболее существенных проблем, препятствующей широкому внедрению БНЗТ в онкологическую клинику, является отсутствие борсодержащих соединений, отвечающих всем требованиям, предъявляемым к данному классу препаратов. «Идеальный» агент для БНЗТ должен быть безопасным и обеспечивать адекватную концентрацию атомов бора в опухолевой ткани. Кроме того, для корректного дозиметрического планирования необходима возможность его *in vivo* детектирования в опухоли и окружающих тканях (Takahara, 2015). Поскольку отдельные атомы бора детектируются только дорогостоящими и неприменимыми *in vivo* прямыми методами (масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, быстрая гамма-спектрометрия, альфа-спектрометрия, масс-спектрометрия с ионной ловушкой), большой интерес вызывают тераностические концепции, основанные на использовании борсодержащих соединений, свойства которых позволяют как получать информацию о содержании соединения в тканях, так и проводить эффективную БНЗТ.

В настоящее время ведется активная разработка и исследование борсодержащих соединений, имеющих в своем составе метку для магнитно-резонансной томографии и позитронно-эмиссионной томографии ( $^{18}\text{F}$ , гадолиний, парамагнитные включения железа) (Alberti, 2015; Deagostino, 2016; Nakamura, 2014; Bendel, 2002; Porcari, 2009). Такой подход позволяет *in vivo* проводить оценку распределения, накопления и выведения соединений в опухоли и окружающих тканях (Alberti, 2015; Nakamura, 2014). Указанные методы визуализации являются весьма дорогостоящими, а позитронно-эмиссионная томография требует использования в качестве метки радиоактивных изотопов. Кроме того, ни в одной из опубликованных до настоящего времени работ не обсуждается вопрос стабильности борсодержащих тераностических комплексов после их введения в кровеносное русло, поскольку в случае их распада в биологических тканях результаты диагностики и количественной оценки становятся некорректными.

В течение последних нескольких лет были опубликованы исследования, посвященные синтезу борсодержащих препаратов, обладающих флуоресцентными свойствами (González-Campo, 2013; Kashino, 2009), что открывает возможность их прижизненного биоимиджинга оптическими методами. Среди всех классов соединений, перспективных в отношении решения задач БНЗТ и обладающих способностью к флуоресценции, следует выделить производные хлоринов (Hiramatsu, 2015). Многие представители данного класса веществ продемонстрировали высокий коэффициент накопления в опухолевых клетках в экспериментах *in vitro* (Efremenko, 2012). Использование хлоринов в качестве агентов доставки позволяет детектировать соединения с глубины до 9 мм, поскольку их спектр поглощения и флуоресценции находится в красной и дальне-красной области спектра (Efremenko, 2012).

Таким образом, производные хлоринов являются перспективными агентами БНЗТ, сочетающими в себе свойства диагностического модуля и агента доставки бора в опухоль. Актуальной задачей является детальное изучение их свойств, а также доказательство возможности использования флуоресценции в качестве метода визуализации соединения в опухоли и нормальных тканях.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы является комплексный анализ свойств конъюгатов бис(дикарболлид)а кобальта и производных хлорина еб с различной длиной аминокисламидного линкера как потенциальных агентов для бор-нейтронозахватной терапии.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучение особенностей биораспределения и фармакокинетики конъюгатов бис(дикарболлид)а кобальта и производных хлорина еб.
2. Подбор временного интервала, оптимального для проведения процедуры БНЗТ, при использовании данного класса соединений.
3. Определение концентрации бора в тканях прямым методом и изучение возможности определения содержания бора в тканях по уровню сигнала флуоресценции соединений.
4. Построение и решение математической модели фармакокинетики бора в составе конъюгата бис(дикарболлид)а кобальта и производного хлорина еб с длиной аминокисламидного линкера  $n=6$
5. Изучение влияния длины аминокисламидного линкера на накопление и биораспределение соединений в тканях животных.

### **Научная новизна работы**

Впервые проведено *in vivo* исследование биораспределения и фармакокинетики конъюгатов бис(дикарболлид)а кобальта и производных хлорина еб с длиной аминокисламидного линкера  $n=2,6,8$ . Впервые для соединения с длиной линкера  $n=6$  выявлена зависимость выхода препарата в ткани от времени и рассчитан период полувыведения из крови (~45 мин).

Впервые доказана стабильность соединения Chl(6)V в организме в течение минимум 24 часов после введения в кровоток. Продемонстрировано соответствие уровня флуоресцентного сигнала соединения, детектируемого в тканях *ex vivo*, и концентрации бора, измеренной прямым методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, что дает возможность непрямого определения содержания бора в биологических тканях.

Определены оптимальные условия визуализации флуоресцентного сигнала для микроскопического исследования биораспределения конъюгатов бис(дикарболлид)а кобальта и производных хлорина еб с длиной аминокисламидного линкера  $n=6, 8$ .

Впервые показано, что отношение накопления соединений Chl(6)V и Chl(8)V в опухолевой ткани по сравнению с мышцами составляет ~3:1 для обоих соединений через 3 часа после введения соединений в кровоток.

Впервые построена и решена простая многокамерная модель, описывающая фармакокинетику соединения Chl(6)V в течение 30 часов в крови, мышцах, опухоли и печени, определены константы процессов обмена препаратом между этими тканями.

Показано, что длина аминокисламидного линкера соединения влияет на биораспределение, в частности, на накопление препарата в опухоли.

### **Научно-практическая значимость работы**

Изученные конъюгаты бис(дикарболлид)а кобальта и производных хлорина еб с различной длиной аминокисламидного линкера при проведении процедуры БНЗТ могут служить тераностическими агентами «двойного» назначения, поскольку отвечают требованиям к борсодержащим препаратам и одновременно позволяют косвенно определять содержание бора в тканях по уровню флуоресцентного сигнала соединения.

Разработанная и решенная математическая модель позволяет предсказывать динамику биораспределения исследуемого соединения при изменении дозы препарата. Макет модели может быть применен и для других соединений данного класса.

Полученные результаты позволяют сформулировать протокол исследования при работе с другими соединениями данного класса и использовать его в дальнейших исследованиях по разработке агентов для задач БНЗТ.

Результаты фармакокинетического исследования соединений позволяют обоснованно рассчитывать оптимальный временной промежуток для проведения процедуры БНЗТ в момент максимального накопления препарата в опухоли при максимальном уровне контраста опухоль/нормальная ткань

Наиболее перспективными агентами для БНЗТ являются конъюгаты с длиной аминокислотного линкера  $n=6, 8$ . Показано, что соединение с длиной линкера  $n=2$  не накапливается в опухолевой ткани.

### **Собственный вклад автора в исследования**

Автор лично принимал участие в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, анализ и интерпретацию полученных результатов, а также подготовку научных статей и докладов.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Соединение Chl(6)В является стабильным в организме в течение 24 часов после введения.
2. Возможно косвенное определение содержания бора в тканях после введения соединения Chl(6)В в организм по уровню его флуоресцентного сигнала.
3. Изученные соединения после внутривенного введения обеспечивают достаточное отношение концентрации в опухоли и нормальных тканях для проведения БНЗТ.
4. Изменение длины линкера влияет на биораспределение соединений данного класса.
5. Разработанная и решенная многокамерная модель корректно описывает фармакокинетику исследованных соединений и позволяет рассчитать концентрацию бора в опухоли и нормальных тканях в течение 24 часов после введения соединения.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (Москва, 20-21 марта 2014 года), Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Москва, 15-19 сентября 2014 года), V International Symposium “Topical Problems of Biophotonics” (Нижний Новгород, 20-24 июля 2015 года), V съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015 года), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 11-16 апреля 2016 года), 70-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 26–28 апреля 2017 года), VI International Symposium “Topical Problems of Biophotonics” (С. Петербург – Н. Новгород, 28 июля – 3 августа 2017 года). Основные результаты и выводы использованы в учебном процессе при разработке спецкурсов для студентов ВУЗов и аспирантов биологического профиля.

## Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 4 – статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК.

## Конкурсная поддержка работы

Проведенные исследования были выполнены при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 14-02-00715А «Комплексный анализ биораспределения борсодержащих наноконъюгатов – агентов для бор-нейтронзахватной терапии», № 13-03-00577А «Разработка таргетных препаратов для фотодинамической и бор-нейтронзахватной терапии рака на основе природных хлорофиллов»).

## Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста и содержит 33 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 134 источников, из них 109 иностранных.

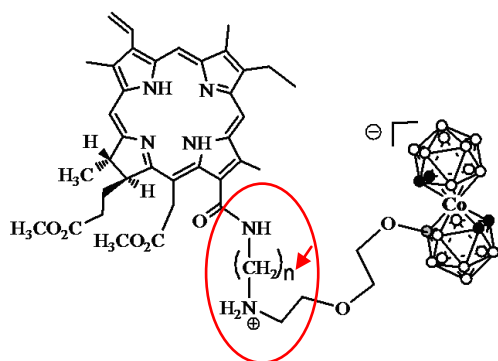
## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

#### Изученные соединения бора

Использованные в работе соединения были синтезированы и предоставлены Московским государственным университетом тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова (М.А. Грин) и лабораторией алюминий- и борорганических соединений (ЛАБОС) Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова научной группой В.И. Брегадзе и И.Б. Сиваева. Результаты, полученные *in vitro* (Efremenko, 2014), послужили основой для начала работы на опухолевых моделях *in vivo*. В работе были исследованы следующие соединения (общая структурная формула соединений представлена на рисунке 1):

- 1) **Chl(6)V** – конъюгат бис(дикарболлид)а кобальта и производного хлорина  $e_6$  с длиной аминокиламидного линкера  $n=6$
- 2) **Chl(8)V** – конъюгат бис(дикарболлид)а кобальта и производного хлорина  $e_6$  с длиной аминокиламидного линкера  $n=8$
- 3) **Chl(2)V** – конъюгат бис(дикарболлид)а кобальта и производного хлорина  $e_6$  с длиной аминокиламидного линкера  $n=2$



**Рис. 1.** Общая структурная формула конъюгатов бис(дикарболлид)ом кобальта и производных хлорина  $e_6$  с различной длиной аминокиламидного линкера  $n=2;6;8$ . Стрелочкой отмечено  $n$  – количество  $(CH_2)$ -групп в линкере, сам линкер выделен красным овалом.

Все соединения обладают одинаковыми характеристиками поглощения, а именно интенсивным поглощением света в видимой области спектра с максимумами на длинах волн 405 нм, 500 нм и 665 нм, что близко по значениям к спектру хлорина  $e_6$ . Максимум флуоресценции наблюдается при 670 нм у соединений Chl(6)V и Chl(2)V. Спектр флуоресценции соединения Chl(8)V сдвинут в более длинноволновую область на ~5 нм.

В исследовании использовали растворы соединений Chl(6)V, Chl(8)V и Chl(2)V в физиологическом растворе и кремофоре в качестве солюбилизатора. Растворы

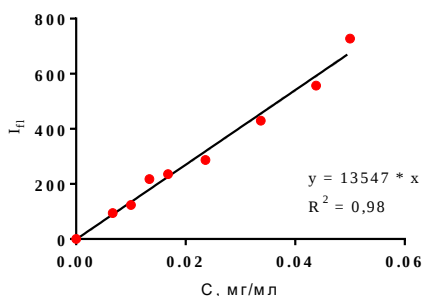
соединений готовили в концентрациях 1 мг/мл и 2 мг/мл, так, чтобы объем инъекции при введении соединений в дозировках 5 мг/кг и 10 мг/кг был одинаковым. Объем инъекции рассчитывался на основе данных о весе животных и составлял 90-110 мкл. Раствор соединений вводили в кровоток через хвостовую вену. Контрольным животным вводился аналогичный объем физиологического раствора.

#### *Животные и опухолевая модель*

Исследования биораспределения и фармакокинетики соединений были выполнены на самках мышей линии Balb/c (всего 41 животное). Животных получали из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН (г. Пущино). Вес животных на момент начала эксперимента составлял 18–22 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом дне. Для получения экспериментальных опухолей использовали линию мышинной карциномы толстой кишки СТ-26 (номер по каталогу ATCC® CRL-2638™). Культивирование клеток проводилось в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, в культуральных флаконах площадью 75 см<sup>2</sup>. На каждом этапе пассирования клетки обрабатывались 0,25% раствором трипсина-версена (ПанЭко, Россия). Субкультивирование выполняли через 2–3 суток по достижении культурой восьмидесятипроцентной конfluence (Freshni, 2010). Для получения экспериментальных опухолей животным подкожно в область бедра вводили суспензию одного миллиона клеток СТ-26 в 100 мкл 10 mM фосфатно-солевого буфера (ПанЭко, Россия). Эксперимент начинали на 9-11 день после инокуляции, когда диаметр опухолевого узла достигал 9-10 мм.

#### *Спектрофлуориметрическое исследование плазмы крови*

Для флуоресцентного анализа борсодержащего соединения с длиной линкера  $n=6$  в плазме у пяти животных кровь забирали из ретроорбитального синуса непосредственно перед введением соединения в кровоток, через 5 минут, а также через 1, 3, 6 и 24 часа после инъекции. Центрифугированием (5 минут при 1000g) из крови получали плазму, разводили 10 мкл плазмы в 2 мл физраствора и проводили спектрофлуориметрическое исследование на спектрометре Shimadzu RF-5301PC (Shimadzu, США). Возбуждение флуоресценции проводили на длине волны 505 нм, регистрацию сигнала – на длинах волн (в диапазоне) 650-690 нм. Калибровка концентрации соединения проводилась с помощью растворов соответствующей концентрации с добавлением фиксированного количества плазмы крови контрольного животного (рис. 2). На основе данных калибровки значение уровня флуоресцентного сигнала пересчитывалось в значение концентрации.



**Рис. 2.** Зависимость интенсивности флуоресцентного сигнала от концентрации соединения Chl(6)В в физиологическом растворе с фиксированным объемом плазмы крови контрольного животного.

#### *Ex vivo исследование и количественная оценка изображений*

Для микроскопического исследования накопления соединения при препарировании животного забирали опухоль, печень, почки, селезенку, образцы мышц, кожи (область правого бедра) и тонкого кишечника. Образцы смачивали физиологическим раствором, замораживали и хранили при температуре –20°C до

востребования. Опухоль целиком препарировалась из окружающей ткани и рассекалась по продольной оси в плоскости, перпендикулярной поверхности бедра. Образец кожи брали в области правого бедра и растягивали по покровному стеклу. Разрез мышцы бедра проводили вдоль направления волокон, разрез почки – по коронарной плоскости органа. Продольные срезы печени, легкого и селезенки делали в толще этих органов.

На протяжении исследования препараты поддерживали влажными путем смачивания физиологическим раствором. В исследовании влияния длины аминокислотного линкера на биораспределение соединений, а также при подборе дозы препарата для визуализации анализируемые изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Axiovert 200M LSM510 META (Carl Zeiss, Германия) при возбуждении флуоресценции конъюгата на длине волны 514 нм, спектральной регистрации сигнала в диапазоне 550-700 нм с шагом 10 нм. В исследовании образцов тканей для корреляционного анализа соответствия флуоресцентного сигнала концентрации бора в тканях анализируемые изображения получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 DUO (Carl Zeiss, Германия) при возбуждении флуоресценции конъюгата на длине волны 514 нм, спектральной регистрации сигнала в диапазоне 520-725 нм с шагом 10 нм. Латеральное разрешение изображений составило 1024×1024 пикселя, размер пикселя 0,22 мкм. Спектральная информация позволяла идентифицировать сигнал соединений на фоне автофлуоресценции тканей. На полученных спектральных изображениях с помощью программного обеспечения микроскопа выделялся канал, соответствующий принимаемому сигналу флуоресценции исследуемого соединения в диапазоне 648-687 нм для соединений Chl(6)B и Chl(2)B и 650-693 нм для соединения Chl(8)B.

Всего было получено и обработано 573 изображения органов, полученных у 27 экспериментальных и 9 контрольных животных. С использованием программы ImageJ (v. 1.47, National Institutes of Health, США) выбирали области интереса (ROI, region of interest), однотипные по принимаемому сигналу флуоресценции от тканей образца, без перекрывания между собой, при этом в ROI не включали сосуды, периферию микроскопического образца, области, соответствующие перфорациям ткани (пустота в фокальной плоскости) и артефакты, обусловленные наличием сильно рассеивающих чужеродных элементов или пузырьков газа. В каждом полученном изображении анализировали от одной до четырех областей интереса. Далее значения интенсивности сигнала флуоресценции по всем областям интереса усредняли для каждого органа или ткани и рассчитывали стандартное отклонение.

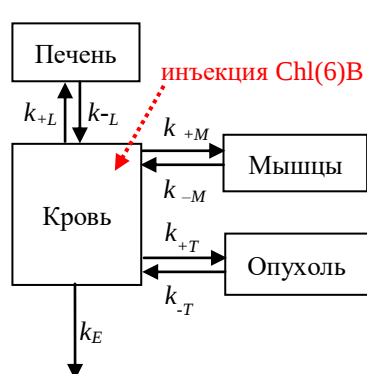
#### *Элементный анализ содержания бора в образцах тканей*

Образцы органов и тканей (опухоль, печень, мышцы) для элементного анализа готовили в процессе препарирования животного, замораживали и до проведения анализа хранили при температуре -20°C. Анализ содержания бора в сохраненных образцах тканей был проведен в ООО «Микронутриенты» (г. Москва) прямым методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (МС-ИСП) с использованием квадрупольного масс-спектрометра Nexion 300D (Perkin Elmer, США). Результаты исследования были предоставлены в протоколах и выражены в единицах ppm (от англ. parts per million). После проведения количественного анализа микроскопических изображений и прямой оценки содержания бора, данные двух методов сопоставляли, и проводили корреляционный анализ.

### Математическое моделирование

Для анализа динамики распределения соединений бора в тканях животного использовали простую многокамерную модель (Kabalka, 1998), в которой в качестве различных камер принимались кровь и исследованные органы (печень, мышцы, опухоль и кровь). Выбор органов и тканей в качестве камер при построении многокамерной математической модели основывался на том, что кровь является первой тканью, взаимодействующей с веществом, основным транспортером его в организме и участником стока ксенобиотиков. Печень является основным депо ксенобиотиков, а мышца была выбрана в качестве образца нормальной ткани. Таким образом, в качестве камер были выбраны кровь, печень, мышца, опухоль, а в качестве пути стока – кровь.

Такая модель описывалась системой дифференциальных уравнений (рис. 3):



$$\begin{aligned}\frac{dB}{dt} &= k_{-L}L - k_{+L}B + k_{-M}M - k_{+M}B + k_{-T}T - k_{+T}B - k_E B \\ \frac{dL}{dt} &= (k_{-L}L - k_{+L}B) \frac{V_B}{V_L} \\ \frac{dM}{dt} &= (k_{-M}M - k_{+M}B) \frac{V_B}{V_M} \\ \frac{dT}{dt} &= (k_{-T}T - k_{+T}B) \frac{V_B}{V_T}\end{aligned}$$

**Рис. 3.** Схема простой многокамерной модели, использованной в исследовании (слева) и описывающая ее система дифференциальных уравнений (справа). В, L, М и Т – концентрации соединения бора в крови, печени, мышцах и опухоли, соответственно,  $k_+$  и  $k_-$  – константы скорости поглощения и выделения борсодержащего соединения различными органами (L, М или Т),  $k_E$  – константа скорости необратимого выведения содержащего бор соединения из крови,  $V_B$ ,  $V_L$ ,  $V_M$  и  $V_T$  – объемы крови, печени, мышц и опухоли. Для расчета полного содержания борсодержащего соединения в органах были использованы выражения  $V_B B$ ,  $V_L L$ ,  $V_M M$  и  $V_T T$ .

Значения объемов были предложены, исходя из данных о весе исследованных образцов соответствующих органов, и составили 1 мл, 3 мл, 10 мл и 1 мл для крови, печени, мышц и опухоли, соответственно. Остальные константы варьировались с целью поиска наибольшего соответствия с экспериментальными результатами. Полученную систему уравнений решали численно. Для проверки гипотезы адекватности модели использовали коэффициент детерминации.

### Статистическая обработка данных и корреляционный анализ

Для оценки возможности определения содержания бора в тканях по уровню сигнала флуоресценции от хлорина еб в составе молекулы борсодержащего соединения проводился корреляционный анализ между уровнем интенсивности сигнала флуоресценции, полученным микроскопическим и спектрофлуориметрическим методами, и концентрации бора, полученным методом МС-ИСП для части исследованных органов и тканей (мышца, печень, опухоль). Было построено одно корреляционное облако и с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (v. 6.01, GraphPad Software, Inc, США) подобрана линия аппроксимации, отражающая линейную зависимость. После этого был рассчитан коэффициент ранговой корреляции Спирмена и определялся уровень значимости по таблице критических значений.

### Результаты и их обсуждение

#### Подбор дозы для эффективной визуализации биораспределения соединения

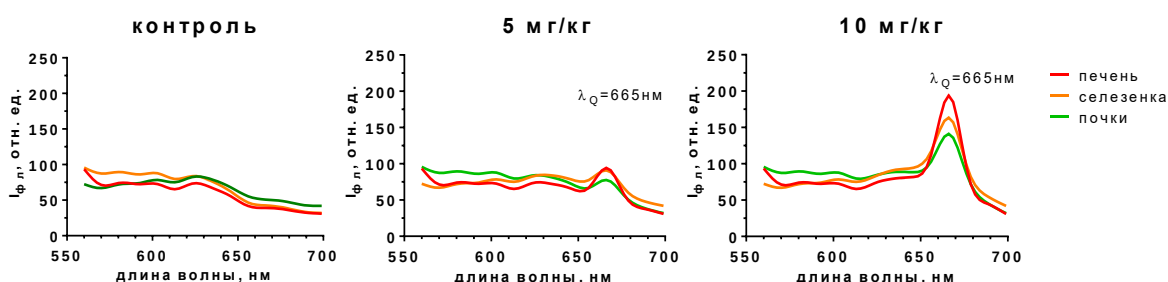
Поскольку изучение свойств данного класса соединений *in vivo* было проведено впервые, первым этапом исследования стал подбор дозы препарата, оптимальной для

эффективной визуализации препарата в тканях методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Дизайн исследования представлен на рис. 4.



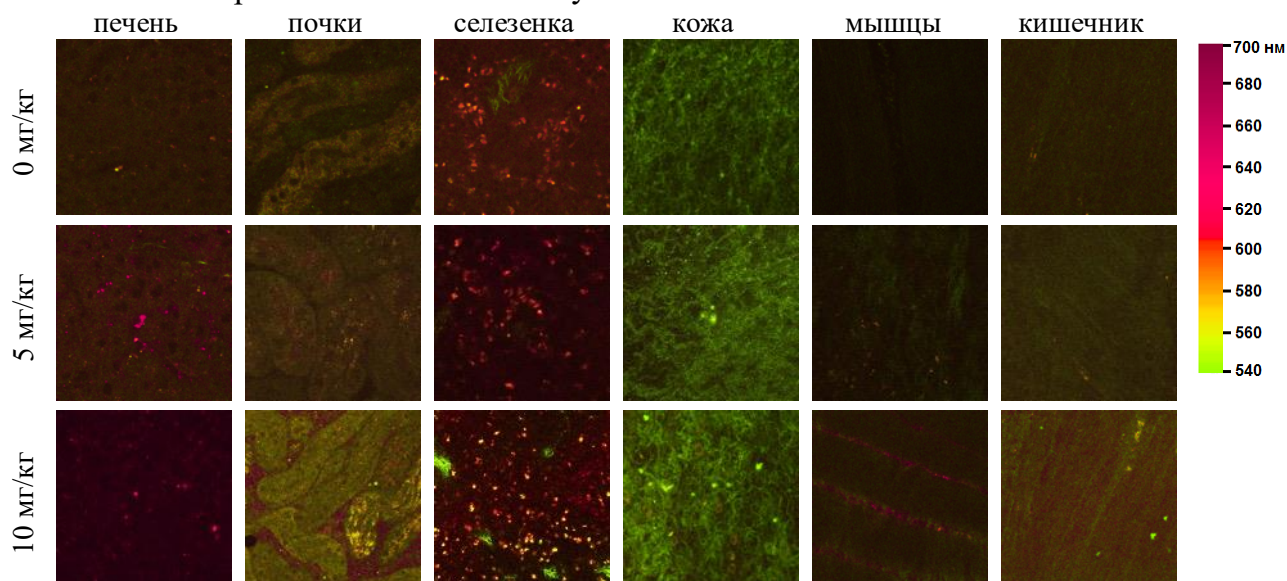
**Рис. 4.** Дизайн исследования по выбору дозы препарата для эффективной визуализации биораспределения соединения Chl(6)V.

Было проведено исследование зависимости накопления соединения Chl(6)V в опухоли и нормальных тканях после введения в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг веса животного. Через три часа после инъекции в ряде органов и тканей наблюдалось появление пика, соответствующего спектру исследуемого соединения Chl(6)V на длине волны 665 нм, существенно более высокого при введении препарата в дозе 10 мг/кг (рис. 5).



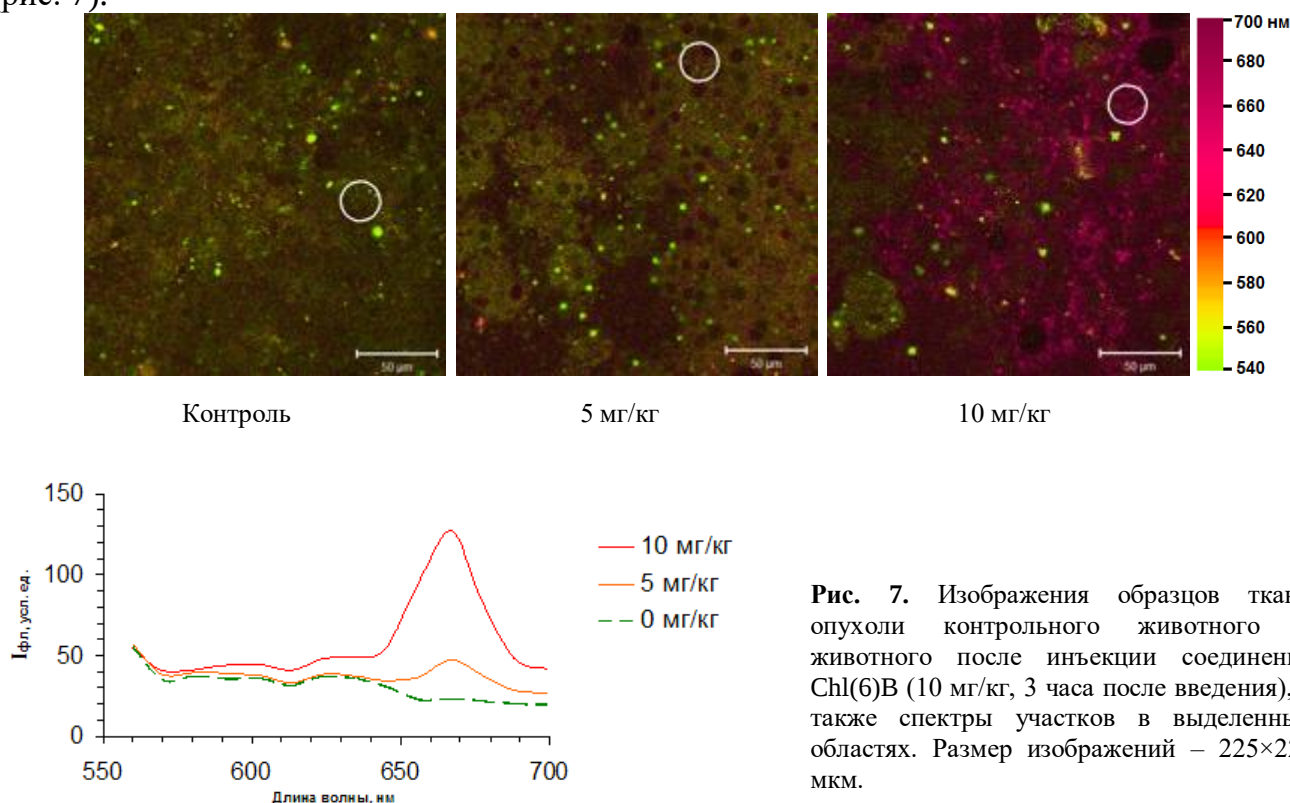
**Рис. 5.** Спектры флуоресценции тканей контрольного животного и тканей животных через 3 часа после введения соединения Chl(6)V в дозе 5 мг/кг и 10 мг/кг.

Была отмечена значительная избирательность накопления препарата (рис.6). Отмечался высокий уровень его накопления в печени, почках, селезенке, что соответствует данным фармакокинетики, полученным для препаратов хлоринового ряда (Juzeniene, 2009). Сигнал флуоресценции соединения в скелетных мышцах, а также в мышечных стенках полых органов (кишечник) был существенно ниже. Кроме этого, было отмечено практически полное отсутствие накопления конъюгата в коже.



**Рис. 6.** Изображения образцов тканей контрольного животного и животных через 3 часа после введения соединения Chl(6)V в дозах 5 мг/кг и 10 мг/кг. Размер изображений – 225×225 мкм. Возбуждение флуоресценции на длине волны 514 нм, спектральная регистрация сигнала в диапазоне 540-700 нм.

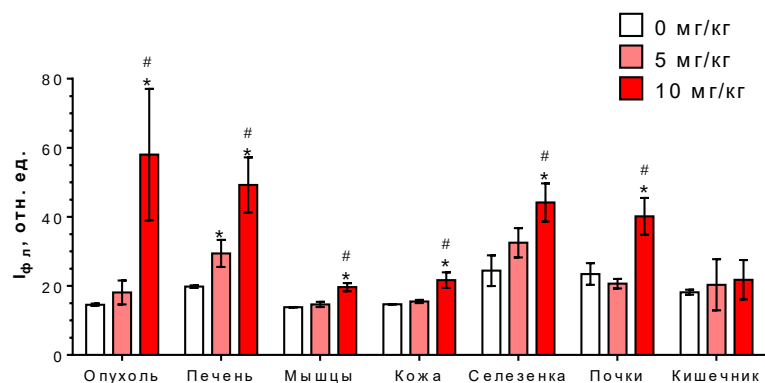
В опухоли отмечался интенсивный пик флуоресценции на соответствующей длине волны при введении конъюгата в дозе 10 мг/кг веса. При введении соединения в дозе 5 мг/кг в тканях регистрировалось существенно более низкое значение сигнала (рис. 7).



**Рис. 7.** Изображения образцов ткани опухоли контрольного животного и животного после инъекции соединения Chl(6)В (10 мг/кг, 3 часа после введения), а также спектры участков в выделенных областях. Размер изображений – 225×225 мкм.

Количественный анализ уровня сигнала флуоресценции в образцах тканей подтвердил зависимость накопления конъюгата от дозы введенного препарата. После введения препарата в дозе 5 мг/кг содержание его в опухоли практически не отличалось от содержания в мышечной ткани и коже; максимальное накопление препарата отмечалось в печени (рис. 8).

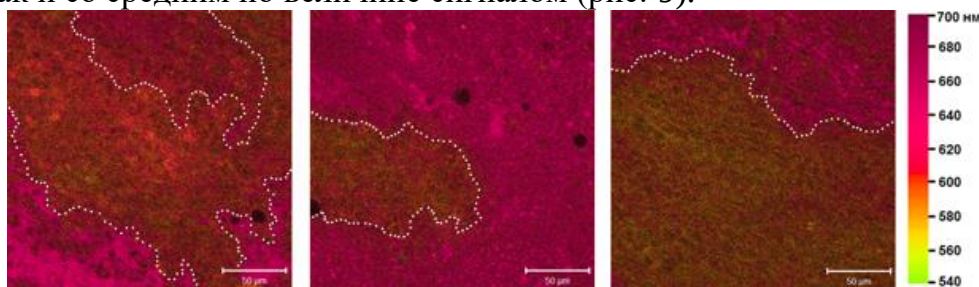
При повышении дозы до 10 мг/кг содержание конъюгата в опухоли оказалось сравнимым с его содержанием в печени, а отношение сигнала флуоресценции опухоль/мышца составило ~3 (рис. 8), что является хорошим результатом, поскольку такое соотношения для допущенных в клинику соединений BSH и ВРА составляет лишь 2:1 (Hattori, 2012; Lin, 2014; Sauerwein, 2012).



**Рис. 8.** Уровень сигнала флуоресценции образцов тканей животных в контрольной группе и группах с введением различных доз соединения Chl(6)В. Звездочкой помечено статистически значимое отличие от контроля. Решеткой помечено статистически значимое отличие между группами 5 мг/кг и 10 мг/кг веса.

Необходимо отметить высокое значение стандартного отклонения уровня сигнала в опухоли при введении конъюгата в дозе 10 мг/кг, что соответствует результатам

микроскопического исследования, когда в опухоли были выявлены участки как с очень высоким, так и со средним по величине сигналом (рис. 9).

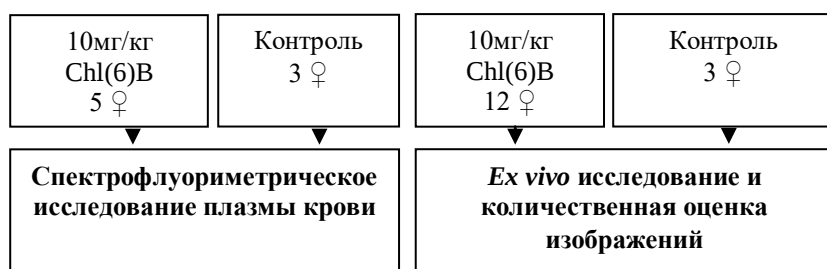


**Рис. 9.** Изображения образцов ткани опухоли животного после инъекции соединения Chl(6)V (10 мг/кг, 3 часа после введения), демонстрирующее неоднородность распределения препарата. Возбуждение флуоресценции на длине волны 514 нм, спектральная регистрация сигнала в диапазоне 540-700 нм.

Проведенное исследование показало, что доза соединения, введенного внутривенно, может существенно повлиять на возможность визуализации соединения на фоне автофлуоресценции. Дозировка 10 мг/кг позволила достоверно выявить накопление препарата во всех изученных органах. При введении соединения в дозе 5 мг/кг оно отчетливо визуализировалось только в печеночной ткани (рис. 8). Соответственно, для дальнейших исследований была выбрана доза 10 мг/кг веса.

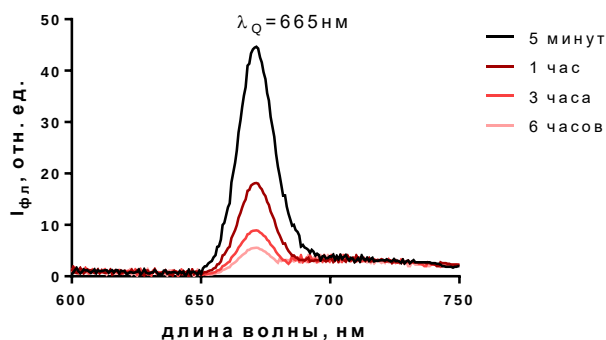
*Подбор оптимального временного интервала для сравнения накопления препарата в тканях животного*

Изучение динамики биораспределения борсодержащего соединения Chl(6)V в организме было начато со спектрофлуориметрического исследования плазмы крови экспериментальных животных. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 10.



**Рис. 10.** Дизайн исследования по подбору оптимального временного интервала для сравнения накопления соединений.

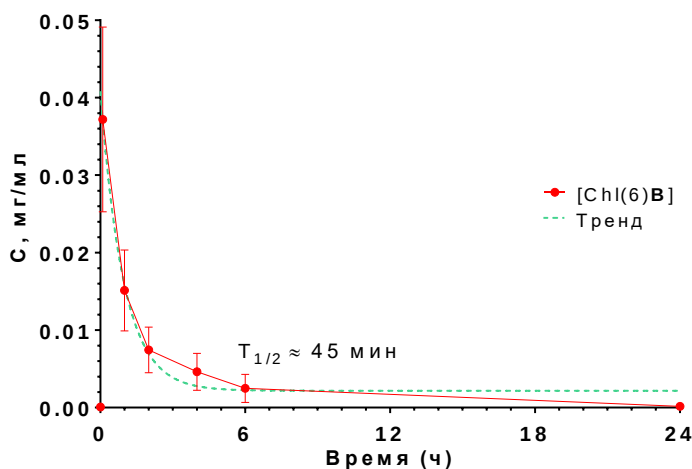
После введения в хвостовую вену конъюгата Chl(6)V в дозе 10 мг/кг в сыворотке крови в течение всего времени мониторинга регистрировался пик флуоресценции с максимумом на длине волны 665 нм (рис. 11), соответствующий спектру исследуемого соединения.



**Рис. 11.** Спектры флуоресценции разбавленных физиологическим раствором образцов плазмы крови животных через 5 минут, 1, 2 и 4 часа после введения соединения Chl(6)V в дозе 10 мг/кг.

Через 5 минут после инъекции концентрация соединения в плазме, рассчитанная по данным калибровочного исследования, составила  $0,037 \pm 0,012$  мг/мл. Далее мы наблюдали быстрое снижение концентрации соединения в крови в течение последующих двух часов. Через час после введения концентрация соединения составила

$0,015 \pm 0,005$  мг/мл, а через два –  $0,0074 \pm 0,003$  мг/мл. Далее концентрация препарата в плазме менялась более медленно: через 4 часа она составила  $0,005 \pm 0,002$  мг/мл, а через 6 часов –  $0,0015 \pm 0,0001$  мг/мл (рис. 12).



**Рис. 12.** Концентрация соединения Chl(6)В в крови животных при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг.  $T_{1/2}$  - время полувыведения соединения из крови.

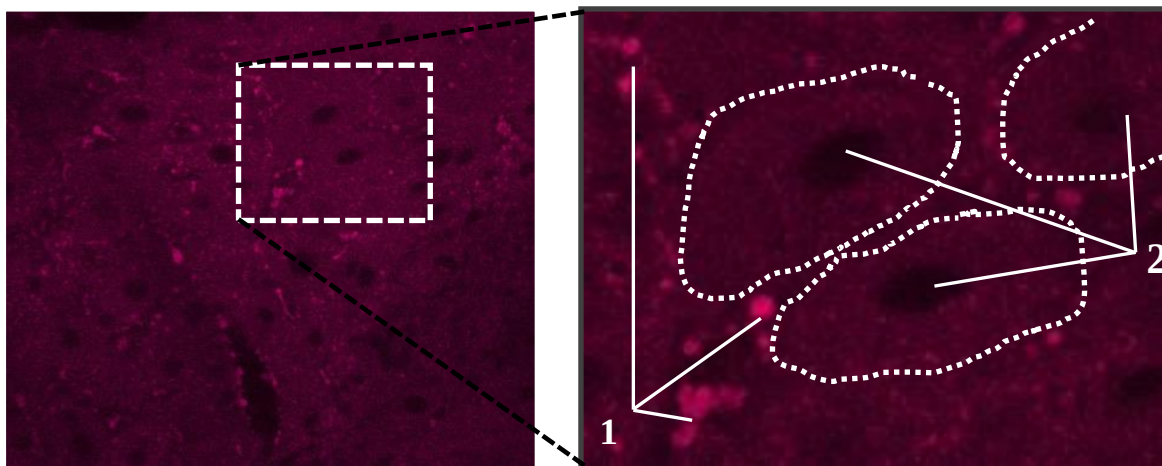
Спектрофлуориметрическое исследование плазмы крови продемонстрировало одноэкспоненциальную зависимость содержания соединения в плазме от времени (рис. 12). Это косвенным образом свидетельствует, что есть только один путь релаксации экспоненты – свободный выход соединения в ткани без дальнейшего перераспределения или наличия особых механизмов связывания или биodeградации препарата. Рассчитанный методом интерполяции период полувыведения соединения составил ~45 минут. Эта величина означает время, необходимое для снижения концентрации исследуемого соединения в два раза в любой временной точке после введения. В свою очередь у разрешенных для клинического использования препаратов ВРА и BSH данная зависимость является двухэкспоненциальной с периодом полувыведения быстрой компоненты  $\leq 20$  минут и медленной – примерно 8 часов (Kiger, 2003; Mehta, 1995). Авторы связывают данную особенность с перераспределением и, главным образом, с почечной элиминацией (Kiger, 2003).

Вторым этапом изучения распределения, накопления и выведения соединения Chl(6)В в организме стали *ex vivo* анализ флуоресцентного сигнала в органах и тканях (печень, мышцы, опухоль) и количественная оценка полученных данных.

После внутривенной инъекции соединения Chl(6)В животных в сроки 1 час, 3 часа, 6 часов и 24 часа после введения конъюгата выводили из эксперимента и препарировали с сохранением образцов соответствующих органов, после чего проводили микроскопический анализ.

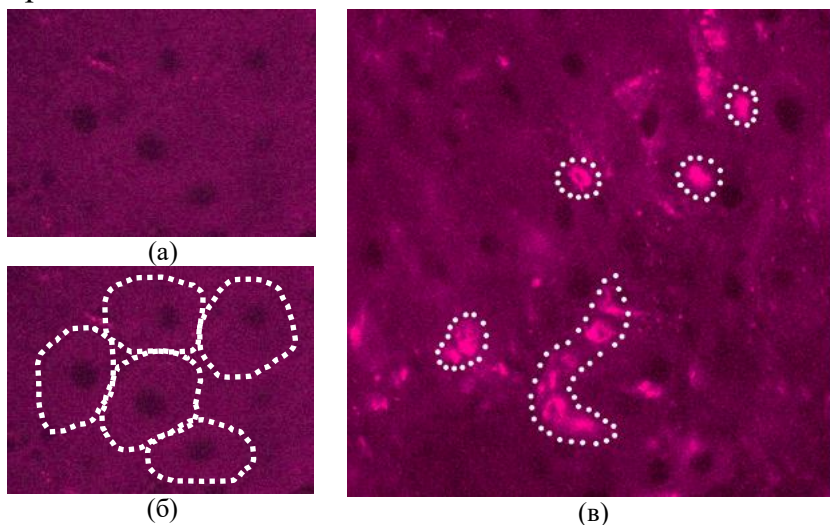
Данные временные точки были выбраны на основе данных о фармакокинетике соединения Chl(6)В в крови (рис. 12). Временная точка 1 час соответствовала середине интервала с резким спадом концентрации соединения в крови по сравнению с исходным уровнем; временная точка 3 часа соответствуют середине промежутка времени (2-4) с высоким и относительно стабильным содержанием соединения; через 6 часов отмечается значительное снижение (в 25 раз по сравнению с исходным уровнем) концентрации соединения в плазме крови; через 24 часа – практически полное его выведение.

Исследование опухолевой ткани показало, что сигнал флуоресценции соединения Chl(6)В появлялся в ней уже через 1 час после инъекции, а его максимальное значение регистрировалось через 3 часа после инъекции. Соединение обнаруживалось как в межклеточном веществе, так и в цитоплазме опухолевых клеток (рис. 13).



**Рис. 13.** Флуоресцентное изображение опухоли животного через 3 часа после введения Chl(6)B в дозе 10 мг/кг,  $\lambda_{ex}=514$  нм,  $\lambda_{em}=648-687$  нм. Увеличенная область (справа) демонстрирует накопление препарата в межклеточном веществе в виде очагов (1), внутриклеточную локализацию препарата и практически нулевое накопление в ядрах (2). Яркость изображения и кодировка изменены для наглядности. Размер основного изображения 221x182  $\mu\text{m}$ , размер выделенной области 78 x 46  $\mu\text{m}$ .

В печени, так же, как и в опухоли, препарат обнаруживался уже через 1 час после введения. Накопление достигало максимума через 3 часа. Дальнейшее снижение было небольшим, однако изменился характер накопления – в течение первых 3 часов препарат имел преимущественно внутриклеточную локализацию (рис. 14 а, б), тогда как через 6 часов обнаруживались области с очень высоким содержанием препарата вне клеток, которые с большей степенью вероятности соответствуют областям печеночных протоков.

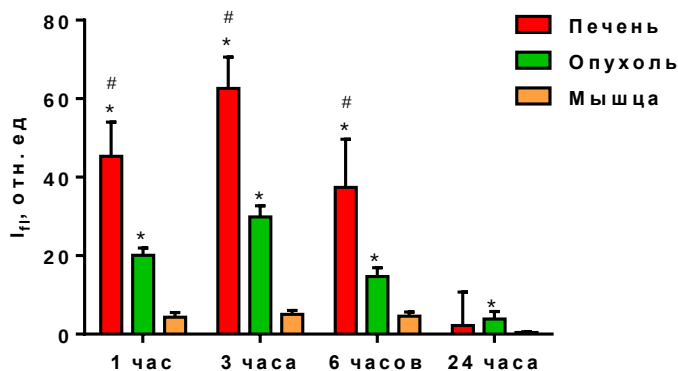


**Рис. 14.** Флуоресцентные изображения образцов печени животного через 1 час (а, б) и 24 часа (в) после введения Chl(6)B в дозе 10 мг/кг,  $\lambda_{ex}=514$  нм,  $\lambda_{em}=648-687$  нм. На рисунке (б) отображены предполагаемые границы клеток участка печеночной ткани (а), что демонстрирует равномерность накопления и внутриклеточную локализацию препарата. Пунктиром на рисунке (в) выделены участки внеклеточной локализации препарата. Яркость изображения как на рисунке 24. Масштаб изображений (а, б, в) одинаковый. Размер изображения (в) 177x177 мкм.

Через 24 часа соединение присутствовало в ткани печени неравномерно, с очагами высокого накопления предположительно вне клеток и с минимальным сигналом от областей с внутриклеточной локализацией (рис. 14 в). Накопление соединения в мышцах было существенно ниже, чем в печени и в опухоли независимо от времени после инъекции, что также характерно для соединений хлоринового ряда (Сапин, 2012).

Количественный анализ динамики содержания препарата в органах позволил более детально изучить зависимость его биораспределения от времени (рис. 15). Содержание соединения в печени было более высоким по сравнению с остальными исследованными органами в течение всего срока наблюдения (рис. 15). Максимум накопления соединения отмечался через 3 часа после введения в печени и опухоли.

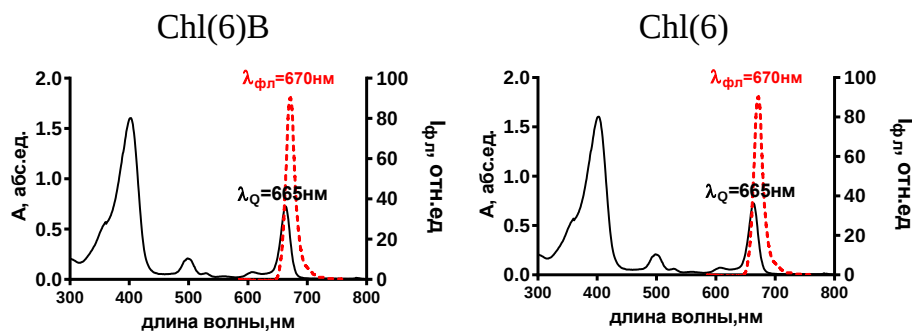
Через 6 часов после введения уровень сигнала от препарата в опухоли и печени был меньше, чем через 3 часа, и практически на одном уровне с временной точкой 1 час после инъекции. После этого интенсивность сигнала постепенно снижалась, однако через 24 часа после введения все еще не достигала исходных значений в опухоли. Уровень накопления соединения в мышцах сохранялся на практически постоянном уровне в течение первых 6 часов. После введения соединения Chl(6)В отношение между его накоплением в опухолевой ткани и в мышцах было равно 3:1 на протяжении всего времени исследования.



**Рис. 15.** Уровень сигнала флуоресценции образцов тканей животных через 1, 3, 6, 24 часа после введения соединения Chl(6)В в дозе 10 мг/кг веса. Звездочкой помечены статистически значимые отличия печени и опухоли от мышц. Решеткой помечено статистически значимое отличие между печенью и опухолью. Сигнал флуоресценции органа до введения соединения вычитался из результата.

*Определение концентрации бора в тканях прямым методом и сопоставление содержания бора и уровня сигнала флуоресценции соединений*

Соединение Chl(6)В и его аналог, не содержащий бис(дикарболлид)а кобальта Chl(6), имеют одинаковый спектр флуоресценции (рисунок 16). Опираясь только на данные спектрального исследования, невозможно быть уверенным в том, что борсодержащий агент (бис(дикарболлид) кобальта) сохраняется в составе молекулы в момент детектирования флуоресцентного сигнала.

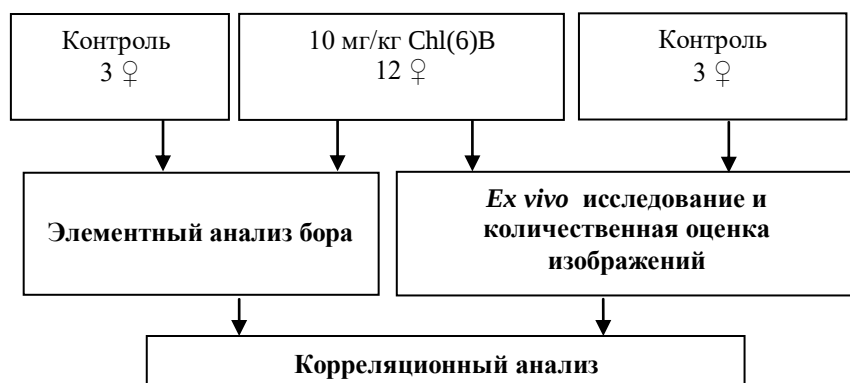


**Рис. 16.** Спектры поглощения и флуоресценции соединения Chl(6)В и его аналога без бис(дикарболлид)а кобальта (Chl(6)). Обоим соединениям свойственно поглощение света в видимой области спектра с максимумами на длинах волн 405 нм, 500 нм и 665 нм. Максимум флуоресценции наблюдается при 670 нм.

Поэтому для использования уровня флуоресцентного сигнала в качестве индикатора содержания бора в ткани необходимо доказать стабильность исследуемых препаратов в кровеносном русле и в тканях, а также показать соответствие уровня флуоресцентного сигнала в тканях содержанию в них бора. Данный подход основан на предположении, что при условии стабильности борированного соединения в кровеносном русле будет наблюдаться корреляция между уровнем сигнала флуоресценции и содержанием бора в тканях и органах. В случае, если соединение «по дороге» теряет борированный элемент молекулы и накопления бора не происходит, не будет наблюдаться корреляции между уровнем флуоресценции соединения и концентрацией элемента в тканях.

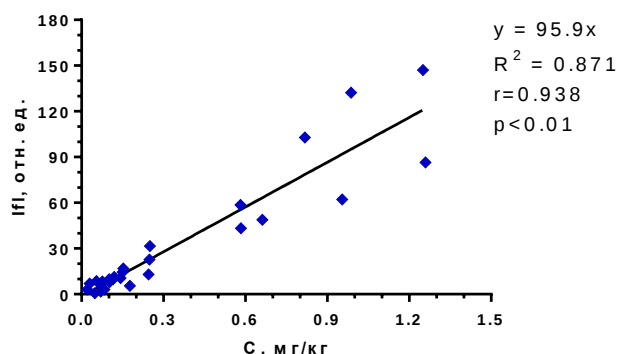
С целью подтверждения данной гипотезы в дополнение к количественному исследованию флуоресцентного сигнала, детектированного от микроскопических

образцов тканей и органов (рис. 15) был проведен элементный анализ тех же образцов на предмет содержания в них бора. Для этого согласно дизайну исследования (рисунок 17) части всех образцов, участвовавших в исследовании, были отправлены в ООО «Микронутриенты» для получения данных о содержании бора, регистрируемого прямым методом МС-ИСП.



**Рис. 17.** Дизайн исследования по определению концентрации бора в тканях прямым методом и верификации содержания бора по уровню сигнала флуоресценции соединений

Представление результатов исследования обоими методами в виде корреляционного облака и дальнейший анализ показали высокую положительную корреляцию между уровнем флуоресцентного сигнала от препарата и содержанием бора в тканях (рис. 18). Анализ линейной аппроксимации показал удовлетворительное значение достоверности аппроксимации ( $R^2 > 0,8$ ). Коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил  $r = 0,938$  с уровнем значимости  $p < 0,01$ .



**Рис. 18.** Корреляционное облако соответствия флуоресцентного сигнала значениям концентрации бора в опухоли и нормальных тканях. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена  $r = 0,938$ . Уровень значимости  $p < 0,01$ .

Поскольку бор в виде карборанов не накапливается селективно в опухолевой ткани, то его повышенное содержание по сравнению с контрольным уровнем возможно только в случае, когда бор находится в составе конъюгата и вместе с ним доходит до опухолевых клеток. Таким образом, высокий уровень корреляции свидетельствует о стабильности конъюгата после введения в кровоток на протяжении как минимум 24 часов и позволяет использовать уровень флуоресценции в качестве маркера концентрации бора в ткани. Информация о стабильности соединения Chl(6)V в течение 24 часов и повышенном его содержании в опухолевой ткани в течение 6 часов после введения препарата имеет большое значение, поскольку время проведения процедуры БНЗТ может быть достаточно большим, особенно в случае соединений, обладающих высоким клиренсом (Пахомова, 2009; Hamblin, 1999).

При использовании конъюгата аминоксидного производного хлорина еб с бис(дикарболлидом) кобальта был достигнут необходимое (3:1) соотношение накопления соединения в опухоли по сравнению с мышечной тканью, однако показатели содержания бора в тканях (порядка 0,1-1,5 мкг бора на 1 грамм ткани) оказались существенно ниже тех, что требуются для эффективного проведения БНЗТ (10

мкг бора на 1 грамм опухоли) (Sauerwein, 2012). Пересчет общего количества введенного соединения в животное (~200 мкг) в количество бора (~18 мкг) показывает, что этой дозы бора в составе соединения недостаточно для использования изученных комплексов в решении задач БНЗТ. Очевидно, что полученные результаты должны стать основой для разработки подходов к синтезу соединений данного класса с более высоким содержанием бора в составе молекулы.

*Математическое моделирование фармакокинетики бора в составе борсодержащего производного хлорина еб с длиной линкера  $n=6$ .*

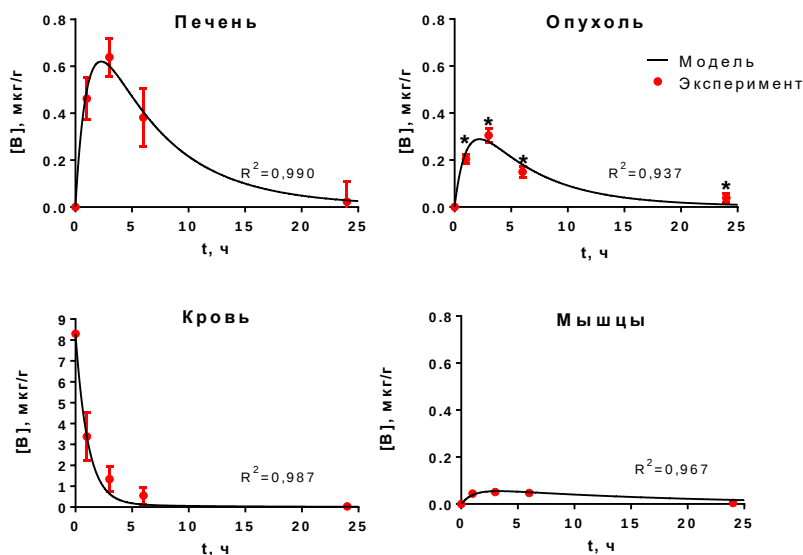
С помощью метода математического моделирования был проведен более детальный анализ динамики биораспределения бора в опухоли и нормальных тканях. При построении многокамерной математической модели мы исходили из того, что кровь является первой тканью, взаимодействующей с веществом, основным транспортером его в организме и участником стока ксенобиотиков. Печень является основным депо ксенобиотиков, а мышца была выбрана в качестве образца нормальной ткани. Таким образом, в качестве камер были выбраны кровь, печень, мышца, опухоль, а в качестве пути стока кровь.

В крови концентрацию бора рассчитывали исходя из известного количества элемента в составе вводимого соединения (8,3 мкг/г крови) (рис. 12). Решение математической модели проводили путем подбора констант скоростей  $k$  в системе уравнений (рис. 3) до достижения максимального соответствия экспериментальным данным. Значения параметров, приведенные в таблице 1, обеспечивают максимальное соответствие экспериментальных и имитированных моделью динамик содержания препарата.

**Таблица 1.** Значения констант, при которых модель максимально точно соответствует экспериментальным данным

| Константа | $k_{+L}$ | $k_{-L}$ | $k_{+M}$ | $k_{-M}$ | $k_{+T}$ | $k_{-T}$ | $k_E$ |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
| Значение  | 0,41     | 0,54     | 0,09     | 2,4      | 0,02     | 0,28     | 0,35  |

Динамика концентрации бора, рассчитанная на основе регистрации уровня сигнала флуоресценции в различных органах, позволила впервые разработать модель, описывающую накопление и распределение в тканях исследуемого соединения и позволяющая предсказать содержание бора в любой временной точке. На графиках (рис. 19) приведено соответствие решенной математической модели фармакокинетики бора в опухоли и нормальных тканях экспериментальным данным.

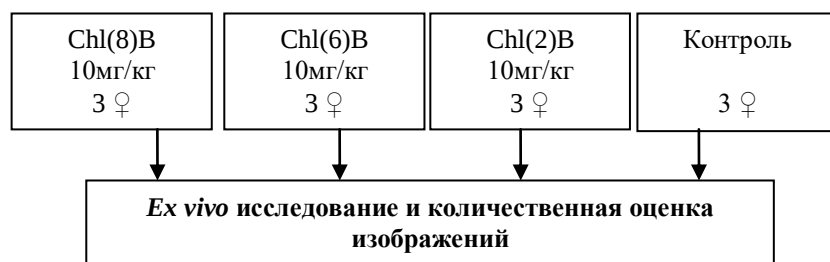


**Рис. 19.** Фармакокинетика соединения Chl(6)В введенного в кровотоки в дозе 10 мг/кг. Точками обозначены экспериментальные данные, линией – результаты решения математической модели. Звездочкой обозначено достоверное отличие в эксперименте концентрации бора в опухоли от таковой в мышце. Коэффициенты детерминации  $R^2_{\text{Blood}}=0,997$ ,  $R^2_{\text{Liver}}=0,950$ ,  $R^2_{\text{Muscle}}=0,982$ ,  $R^2_{\text{Tumor}}=0,916$ .

Рассчитанные значения коэффициентов детерминации ( $R^2 > 0,91$ ) (рис. 19) свидетельствуют о высоком уровне соответствия модели экспериментальным данным. Это означает, что модель адекватно описывает кинетику перераспределения борированного соединения между исследованными органами и тканями (Пронин, 2016) и может стать инструментом для прогнозирования динамики концентрации бора в различных органах при дальнейших исследованиях при изменении дозы препарата.

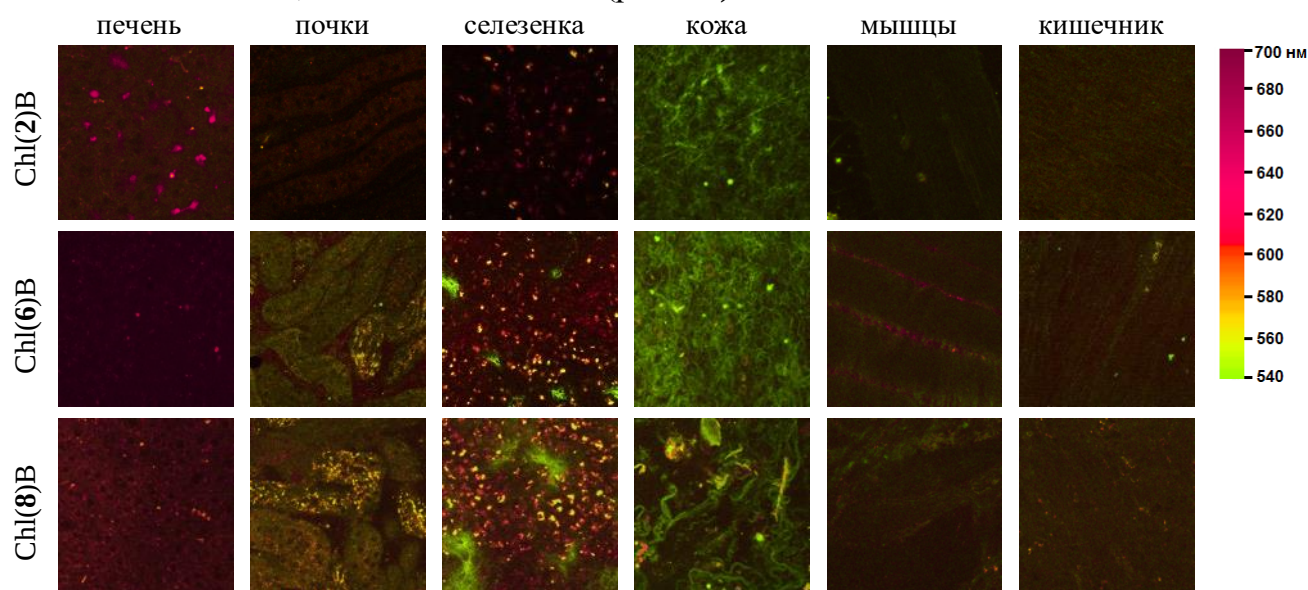
*Изучение влияния количества  $CH_2$ -групп в составе аминоклиламидного линкера на накопление и биораспределение препаратов*

В рамках поставленной задачи 4 были исследованы различия, вносимые длиной линкера, в особенности биораспределения соединений. Мы выбрали для сравнения временную точку 3 часа, поскольку в ней наблюдается максимальное накопление препарата Chl(6) в опухолевой ткани и незначительное накопление в нормальных тканях (мышцы). Исследование проходило согласно схеме 3 во временной точке 3 часа после введения соединений в дозе 10 мг/кг. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 20. Визуальный анализ микроскопических изображений нормальных органов и тканей животных показал значительную избирательность накопления исследуемых соединений, похожую для всех трех соединений. Такое распределение соответствует данным фармакокинетики, полученным для препаратов хлоринового ряда.



**Рис. 20.** Дизайн исследования по изучению влияния количества  $CH_2$ -групп в составе аминоклиламидного линкера на накопление и биораспределение препаратов.

Через 3 часа после введения соединения Chl(2)B было отмечено его повышенное накопление в печени, почках и селезенке (рис. 21).

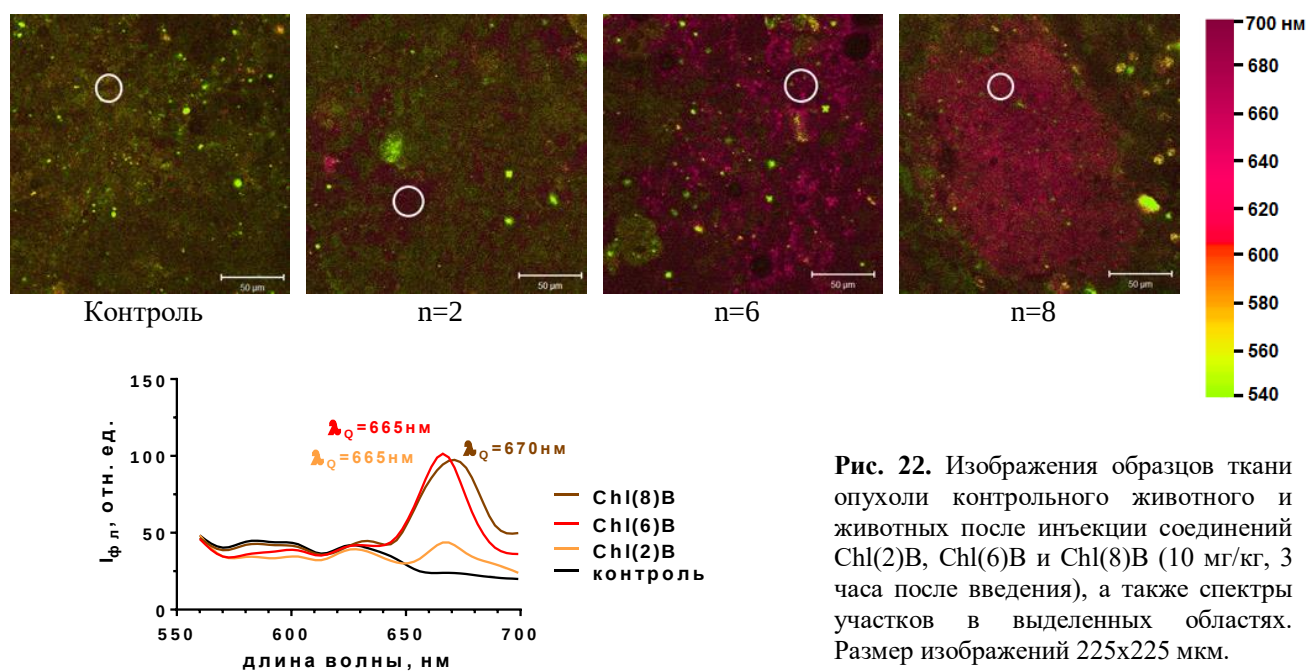


**Рис. 21.** Изображения образцов тканей животных через 3 часа после введения соединений Chl(2)B, Chl(6)B и Chl(8)B в дозе 10 мг/кг. Размер изображений – 225×225 мкм. Возбуждение флуоресценции соединений Chl(2)B и Chl(6)B на длине волны 514 нм, спектральная регистрация сигнала в диапазоне 540-700 нм. Возбуждение флуоресценции соединения Chl(8)B на длине волны 514 нм, спектральная регистрация сигнала в диапазоне 560-710 нм.

Селезенка аккумулировала введенные соединения в виде очагов. В почках соединения накапливаются в почечных канальцах. Соединение Chl(2)В уже через 3 часа накапливалось в областях, соответствующих печеночным протокам. Практически полное отсутствие препарата было отмечено в мышцах и коже, а так же стенках полых органов (тонкий кишечник). Появление характеристичного пика флуоресценции на длине волны 665 нм в опухолевой ткани не было зафиксировано.

Соединение Chl(6)В, введенное в дозировке 10 мг/кг, через 3 часа демонстрирует высокое накопление в опухолевой ткани (рис. 22). Отмечено неравномерное накопление препарата в опухолевой ткани. Так же отмечена схожая избирательность накопления в нормальных тканях: соединение было в большом количестве обнаружено в печени, почках и селезенке (рис. 21). Селезенка аккумулирует введенные соединения в виде очагов. В печени соединение Chl(6)В накапливаются одинаково, преимущественно с локализацией в цитоплазме клеток, с небольшими очагами накопления вне клеток. В почках соединение накапливается в почечных канальцах. В мышцах и коже, а так же стенках полых органов (тонкий кишечник) накопление было минимальным (рис. 21). В коже препарат Chl(6)В аккумулируются только в одиночных клетках, которые предположительно являются макрофагами.

Соединение Chl(8)В введенное в кровоток через 3 часа демонстрирует высокое накопление в печени, почках и селезенке (рис. 21). Селезенка аккумулирует введенные соединения в виде очагов. В печени соединение Chl(8)В, как и Chl(6)В, накапливается преимущественно с локализацией в цитоплазме клеток, с небольшими очагами накопления вне клеток. В почках соединение Chl(8)В накапливается в почечных канальцах. Высокое значение флуоресценции в опухоли сопровождается неравномерностью распределения препарата. В мышцах и коже, а так же стенках полых органов (тонкий кишечник) накопление было минимальным (рис. 21). В коже препарат Chl(8)В аккумулируется только в одиночных клетках, которые предположительно являются макрофагами.

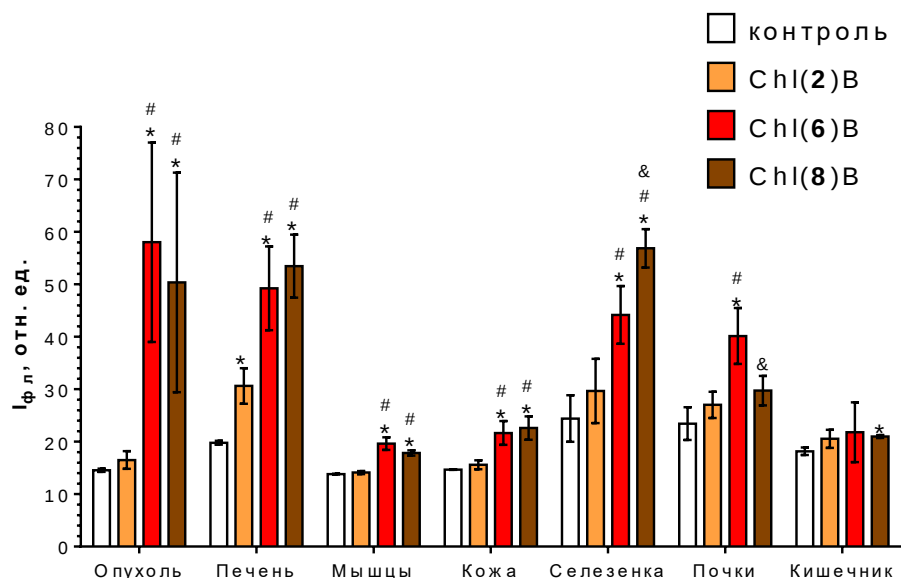


**Рис. 22.** Изображения образцов ткани опухоли контрольного животного и животных после инъекции соединений Chl(2)В, Chl(6)В и Chl(8)В (10 мг/кг, 3 часа после введения), а также спектры участков в выделенных областях. Размер изображений 225x225 мкм.

На основе этого можно предположить, что соединение Chl(2)В имеет более быстрый выход из крови в ткани и, соответственно, более высокий клиренс, из-за чего максимальное накопление в опухолевой ткани наступает намного раньше. Так же это может свидетельствовать о том, что соединение Chl(2)В принципиально не способно к

накоплению в опухолевой ткани. Данный предположение может быть обосновано тем, что в ряде конъюгатов бисдикарболлида кобальта с аминоксидными производными хлорина еб с разной длиной линкера коэффициент внутриклеточного накопления повышается с увеличением длины линкера (Efremenko, 2014). С помощью визуальной оценки не было выявлено существенных различий характера накопления соединений Chl(6)В и Chl(8) в опухоли и нормальных тканях.

Количественный анализ позволил выявить более точные различия в накоплении соединений с разной длиной линкера. Его результаты представлены на рисунке 23.



**Рис. 23.** Уровень сигнала флуоресценции образцов тканей животных в контрольной группе и группах с введением исследуемых соединений Chl(2)В, Chl(6)В и Chl(8)В в дозе 10 мг/кг. \* – статистически значимое отличие от контроля. # – статистически значимое отличие от соединения Chl(2)В. & – статистически значимое отличие между соединениями Chl(6)В и Chl(8)В.

При введении соединения Chl(2)В достоверного различия накопления в опухоли по сравнению с контрольными образцами не наблюдается, тогда как соединения с более длинными линкерами ( $n=6$ ,  $n=8$ ) имеют высокое накопление в опухоли с достоверным различием от контроля. Как в случае соединения Chl(6)В, для Chl(8)В характерно высокое значение стандартного отклонения, что вызвано наличием областей как с очень высоким накоплением препарата, так и средним (рис. 8, 23). Так же для этих соединений характерно наличие отношения накопления в опухолевой ткани по сравнению с мышечной, порядка 3. Соединение Chl(2)В достоверно удалось выявить только в печеночной ткани. В остальных органах и тканях данное соединение демонстрирует очень невысокое значение изменения уровня сигнала по сравнению с контролем.

Поскольку картина накопления препарата Chl(2)В в печени через 3 часа была идентична картине распределения соединения Chl(6)В через 24 часа (рис. 14в, 21), можно предположить, что соединение Chl(2)В имеет более высокий клиренс. Это означает более быстрый выход вещества из крови, из-за чего максимальное накопление в опухолевой ткани наступает намного раньше, и сравнение с соединениями с более длинными линкерами необходимо проводить в динамике.

Несмотря на схожий характер накопления в опухоли и нормальных тканях, соединения Chl(6)В и Chl(8)В имеют различия в количественном распределении внутри организма. Соединение Chl(8)В обладает более высоким накоплением в селезенке, но соизмеримо меньшим в почках. Кроме того, соединение Chl(8)В удается достоверно выявить в стенках полых органов (тонкий кишечник).

Таким образом, соединения Chl(6)В и Chl(8)В демонстрируют очень похожее накопление, однако с увеличением длины линкера изменяется распределение препарата между почками и селезенкой. Соединение Chl(2)В во временной точке 3 часа после

введения обладает существенными различиями в накоплении в органах и тканях животного. Предположительно, это может быть связано с иной динамикой перераспределения соединения в организме. Помимо этого, не исключено, что Chl(2)В может иметь более высокий клиренс, из-за чего сравнение накопления данного препарата с Chl(6)В и Chl(8)В следует проводить в динамике.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка эффективных агентов доставки бора в опухоль является одним из условий внедрения метода БНЗТ в клиническую практику. Одним из требований к данному классу препаратов является возможность оценки содержания бора в опухоли и нормальных тканях в режиме реального времени. В работе для этой цели были использованы флуоресцентные свойства борсодержащих производных. Было продемонстрировано, что доза соединения Chl(6)В 10 мг/кг веса животного является достаточной для визуализации его в опухоли и нормальных тканях при микроскопическом исследовании. При внутривенном введении его в данной дозировке удается достичь соотношения накопления в опухоли и нормальной ткани (мышцы) в ~3:1 с преимущественно внутриклеточной локализацией соединения. Показано, что препарат после инъекции в кровоток сохраняет свою стабильность в организме животного в течение, как минимум, 24 часов. Доказанное соответствие значения флуоресцентного сигнала соединения количеству бора в тканях позволяет решить проблему количественной оценки содержания бора, в том числе и *in vivo*. Разработанная и решенная простая многокамерная модель корректно описывает динамику распределения соединения между тканями животного. Использование данной модели позволяет рассчитать содержание бора в течение 24 часов после введения препарата. Показано, что изменение длины аминокиламинового линкера молекулы приводит к изменению характера накопления соединения. При увеличении длины линкера до 8  $\text{CH}_2$ -групп, через 3 часа после введения наблюдается изменение в распределении соединения между почками и селезенкой. Накопление препарата с длинной линкера 8 в опухолевой ткани, а так же соотношение с накоплением в нормальной ткани, в этой временной точке не изменяется. При уменьшении количества  $\text{CH}_2$ -групп до 2 соединение через 3 часа после инъекции не накапливается в опухолевой ткани.

#### ВЫВОДЫ

1. Введение соединения Chl(6)В в дозе 10 мг/кг позволяет достичь контраста флуоресцентного сигнала опухоль/норма ~3:1.
2. Оптимальной временной точкой для визуализации соединений Chl(6)В и Chl(8)В является момент времени три часа после инъекции.
3. Наблюдается сильная достоверная положительная корреляция между содержанием бора в опухоли, определенным прямым методом, и сигналом флуоресценции от препарата. Это дает возможность судить о содержании бора в тканях по интенсивности сигнала флуоресценции.
4. Разработанная и решенная модель адекватно описывает кинетику перераспределения борированного соединения между исследованными органами и тканями.
5. Соединения с аминокиламидными линкерами, содержащими шесть и восемь  $\text{CH}_2$ -групп, демонстрируют аналогичное биораспределение в организме животных.
6. Биораспределение соединения с аминокиламидным линкером, содержащим две  $\text{CH}_2$ -группы, существенно отличается от биораспределения и накопления соединений с длиной линкера шесть и восемь. Данное соединение способно накапливаться в опухоли в существенно меньшем количестве по сравнению с соединениями с длиной линкера шесть и восемь  $\text{CH}_2$ -групп.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1. Skalyga V., Izotov I., Golubev S., Razin S., Sidorov A., Maslennikova A., **Volovecky A.**, Kalvas T., Koivisto H., Tarvainen O. Neutron generator for BNCT based on high current ECR ion source with gyrotron plasma heating. *Appl Radiat Isot.* 2015. V.106. P. 29–33.
2. **Воловецкий А.Б.**, Шилягина Н.Ю., Дуденкова В.В., Пасынкова С.О., Игнатова А.А., Миронов А.Ф., Грин М.А., Брегадзе В.И., Феофанов А.В., Балалаева И.В., Масленникова А.В. Изучение тканевого распределения потенциальных агентов для бор-нейтронозахватной терапии на основе конъюгатов аминоксидных производных хлорина е<sub>6</sub> с наночастицами бора. *Биофизика.* 2016. Т.61. №1. С. 158–164.
3. **Воловецкий А.Б.**, Шилягина Н.Ю., Дуденкова В.В., Пасынкова С.О., Грин М.А., Миронов А.Ф., Феофанов А.В., Балалаева И.В., Масленникова А.В. Исследование биораспределения конъюгата аминоксидного производного хлорина е<sub>6</sub> с наночастицей бора для задач бор-нейтронозахватной терапии. *Современные Технологии в Медицине.* 2016. Т.8. №2. С. 34–40.
4. **Volovetsky A.B.**, Sukhov V.S., Balalaeve I.V., Dudenkova V.V., Shilyagina N.Y., Feofanov A.V., Efremenko A.V., Grin M.A., Mironov A.F., Sivaev I.B., Bregadze V.I., Maslennikova A.V. Pharmacokinetics of Chlorin e<sub>6</sub>-Cobalt Bis(Dicarbollide) Conjugate in Balb/c Mice with Engrafted Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2017. V.18. №12. pii: E2556.

### Материалы конференций:

5. Шилягина Н.Ю., **Воловецкий А.Б.**, Балалаева И.В., Масленникова А.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Феофанов А.В. Изучение биораспределения наноконъюгатов производных хлорина е<sub>6</sub> с наночастицами бора для задач фотодинамической и бор-нейтронзахватной терапии. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике». Москва, 20-21 марта 2014 г.
6. **Воловецкий А.Б.**, Шилягина Н.Ю., Балалаева И.В., Масленникова А.В., Грин М.А., Миронов А.Ф., Феофанов А.В. Изучение особенностей распределения бор-содержащего конъюгата хлорина Е<sub>6</sub> для задач фотодинамической и бор-нейтронзахватной терапии. Сборник материалов Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения Ю.А. Овчинникова, Москва, 15-19 сентября 2014 г.
7. **Voloveckiy A.B.**, Shilyagina N.Y., Balalayeva I.V., Maslennikova A.V., Grin M.A., Mironov A.F., Feofanov A.V. The study of biodistribution of chlorin e<sub>6</sub> with aminoalkylamide linker and its boron-comprising nanoconjugate for boron-neutron capture therapy. Сборник материалов V International Symposium “Topical Problems of Biophotonics 2015” (TPB-2015), Нижний Новгород, 20-24 июля 2015 г.
8. **Воловецкий А.Б.**, Шилягина Н.Ю., Дуденкова В.В., Юшко Я.А., Феофанов А.В., Балалаева И.В., Масленникова А.В. Исследование биораспределения конъюгата аминоксидного производного хлорина е<sub>6</sub> с бисдикаболлидом кобальта. Сборник материалов V съезда биофизиков России, Ростов-на-Дону, 4-10 октября 2015 г.

9. **Воловецкий А.Б.**, Шилягина Н.Ю., Дуденкова В.В., Юшко Я.А., Брегадзе В.И., Пасынкова С.О., Феофанов А.В., Балалаева И.В., Масленникова А.В. Изучение накопления и биораспределения конъюгатов аминоксидного производного хлорина е6 с бис(диксрболлид)кобальтом для задач БНЗТ. Материалы XXIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва 11-15 апреля 2016 г.
10. **Воловецкий А.Б.**, Сухов В.С., Шилягина Н.Ю., Дуденкова В.В., Феофанов А.В., Балалаева И.В., Масленникова А.В. Математическое моделирование фармакокинетики конъюгата аминоксидного производного хлорина е6 с бис-диксрболлидом кобальта. Сборник материалов 70-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Н. Новгород, 26-28 апреля 2017 г.
11. **Voloveckiy A.B.**, Sukhov V.S., Shilyagina N.Y., Dudenkova V.V., Feofanov A.V., Balalayeva I.V., Maslennikova A.V. Fluorescent analysis of pharmacokinetics of chlorine E6 conjugate with Bis(dicarbollide) cobalt for boron neutron capture therapy. Сборник материалов VI International Symposium “Topical Problems of Biophotonics 2017” (TPB-2017), С. Петербург – Н. Новгород, 28 июля - 3 августа 2017 г.