

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

М.Г. Шарапова на диссертационную работу Воловецкого Артура Борисовича «Комплексный анализ биораспределения борсодержащих конъюгатов аминоамидных производных хлорина в качестве агентов для бор-нейтронозахватной терапии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук в специализированный диссертационный совет Д 212.166.21 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского, по специальности 03.01.02 – «Биофизика».

Несмотря на очень высокую биологическую эффективность, бор-нейтронозахватная терапия все еще не перешагнула рамки доклинических исследований и клинических исследований I фазы. Причиной этого, в том числе, является отсутствие борсодержащих соединений, которые бы эффективно аккумулировали бор в опухолевых клетках. Диссертационная работа Воловецкого А.Б. посвящена исследованию новых препаратов на основе хлоринов для бор-нейтронозахватной терапии. Актуальность работы обусловлена тем, что уже существуют прототипы компактных источников нейтронных пучков с регулируемыми параметрами, что делает поиск препарата, отвечающим всем требованиям, первостепенной задачей. Поскольку хлорины способны эффективно накапливаться в опухолевой ткани по сравнению с нормальными тканями, предполагается, что это позволит обеспечить и селективность накопления бора. Помимо этого использование хлорина в качестве носителя бора позволяет в качестве метода детекции использовать флуоресцентные методы, которые по сравнению с прямыми методами определения содержания бора в тканях более доступны и открывают возможность исследования процессов накопления, выведения препаратов методами *in vivo*.

Воловецким А.Б. впервые получены зависимости биораспределения конъюгатов бис(дикарбоната)кобальта и аминоамидных производных с различным количеством  $\text{CH}_2$ -групп в линкере ( $N=2,6,8$ ), на основе полученных результатов были рассчитаны некоторые фармакокинетические параметры, а также впервые для этих соединений разработана и решена многокамерная математическая модель. Данное исследование продемонстрировало стабильность конъюгата ( $N=6$ ) в кровеносном русле животного минимум в течение 24 часов, что означает возможность детектирования бора в составе конъюгата по уровню сигнала флуоресценции хлориновой части молекулы. Таким образом, новизна диссертационной работы не вызывает сомнений.

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.

## **Анализ содержания диссертации**

Во введении присутствует хорошо обоснованная актуальность и новизна работы, четко поставлена цель и сформулированы задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Глава 1 содержит обзор литературы, в котором описано современное состояние бор-нейтронозахватной терапии, ее актуальные проблемы и их решения. Имеются разделы, в которых представлены физические основы метода и требования к борсодержащим препаратам для ее проведения, краткая история развития бор-нейтронозахватной терапии, а также методы детектирования бора. Помимо этого, представлен раздел с подробным описанием современных подходов к доставке борсодержащих соединений в опухолевые клетки. Значительная часть литературных источников, использованных для написания обзора, представлена публикациями последних пяти лет. Обзор дает исчерпывающее представление об изучаемой проблеме и свидетельствует о большой проделанной работе, и, соответственно, умении анализировать и обобщать значительное количество материала из литературных источников.

Материалы и методы, использованные в работе, подробно описаны в главе 2. Современность методов исследования не вызывает сомнения, они оптимальны и хорошо апробированы для решения задач, поставленных автором диссертационной работы.

Результаты представлены в главе 3, которая содержит несколько разделов. Раздел 3.1. посвящен подбору дозы для эффективной визуализации биораспределения соединения. Поскольку работа с данными соединениями в эксперименте *in vivo* проводилась впервые, данный раздел играет важную роль в грамотной постановке методики исследования. Установлено, что доза 10 мг/кг веса животного при внутривенном введении является достаточной для эффективной визуализации препарата в тканях.

В разделе 3.2. автор описывает результаты изучения временной зависимости биораспределения препарата с длиной линкера (N=6) и дает качественную характеристику распределения в изученных органах. В работе продемонстрировано повышенное накопление соединения в опухолевой ткани, печени и селезенке, притом практически полное отсутствие препарата в коже и скелетных мышцах. Показано, что максимальное накопление препарата наблюдается через 3 часа после введения препарата. Полученные результаты позволяют

корректно определить оптимальный промежуток времени для проведения БНЗТ.

В разделе 3.3. представлены результаты определения концентрации бора в тканях прямым методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой и сопоставления содержания бора и уровня сигнала флуоресценции соединения с длиной линкера (N=6). Автором показано, что существует сильная положительная и достоверная корреляция между уровнем сигнала флуоресценции и концентрацией бора в тканях. Данный факт подтверждает возможность детектирования содержания бора в тканях, а также свидетельствует о стабильности препарата в кровеносном русле. Автор указывает, что достигнутые концентрации бора в опухолевой ткани (до 0,5-1 мкг/г опухоли) являются недостаточными для эффективной БНЗТ. Однако необходимо отметить, что основной задачей исследования было изучение возможности детектирования бора в тканях по флуоресценции хлориновой части молекулы, а также подбор дозировки для визуализации препарата в тканях. В работе отмечается, что для увеличения содержания бора в опухоли возможно повысить дозу вводимого препарата, поскольку повышение дозировки в ~15 раз (до 20 мкг/г бора в опухоли) находится в пределах терапевтического интервала для некоторых борированных препаратов хлоринового ряда. Кроме того, полученные результаты являются основанием для продолжения работ для создания соединений данного класса с более высоким содержанием бора в молекуле.

В разделе 3.4 представлено математическое моделирование фармакокинетики бора в составе борсодержащего конъюгата аминоамидного производного хлорина e6 (N=6). Была разработана и решена простая многокамерная модель, были подобраны константы, при которых модель описывает фармакокинетику препарата с высоким значением коэффициента детерминации. Это позволяет предсказывать концентрацию бора и динамику биораспределения исследуемого соединения в тканях при введении его в других дозировках.

В разделе 3.5 было изучено влияние количества  $\text{CH}_2$ -групп в составе аминоалкиламидного линкера на накопление и биораспределение препаратов. Было продемонстрировано, что при увеличении длины линкера наблюдается увеличение накопления препарата в опухолевой ткани. Помимо этого, было проведено сравнительное описание и количественный анализ биораспределения препаратов в тканях животных во временной точке 3 часа после введения. Было показано, что длина линкера молекулы влияет на распределение препарата в организме животных. В частности, молекула с коротким линкером из двух  $\text{CH}_2$ -групп не накапливается в опухолевой ткани, тогда как молекула с шестью и восемью накапливается с большим (~3) контрастом по сравнению с нормой.

Обсуждение результатов вынесено в отдельную главу 4. Обсуждение проведено грамотным языком, является логичным и последовательным. Рассуждения согласовываются с задачами исследования.

В заключении автор кратко приводит основные этапы работы и обобщает полученные результаты. Выводы полностью соответствуют поставленным целям и задачам работы и логично вытекают из полученных результатов.

В целом, работа является законченным научным исследованием, которое базируется на современных методиках и теоретической базе. Изложенные результаты корректно оформлены и грамотно описаны. Достоверность исследования не вызывает сомнений. Полученные подходы к исследованию новых препаратов в области бор-нейтронозахватной терапии, а также идея аналогового математического моделирования являются ценным практическим знанием, и могут быть использованы как для продолжения исследования изучаемого в работе класса соединений борированных хлоринов, так и может для исследований в других областях.

Тем не менее, диссертационная работа Воловецкого А.Б. содержит ряд недостатков:

- 1) В некоторых таблицах и рисунках (таблица 4, Рис.3, Рис.5а, Рис.6а, Рис.7б) химические структуры соединений представлены небрежно. Желательно было использовать программы для создания графического изображения химических структур, например, таких как ChemSketch, ChemDraw или другие аналоги.
- 2) В обзоре литературы (Глава 1, раздел 4) по смыслу не хватает сравнительного резюме по всем существующим подходам и методикам доставки бора в опухоль, особенно на каком этапе продвижения в клинику находятся те или иные группы.
- 3) В работе недостаточно данных о статистическом анализе. В некоторых подписях к рисункам отсутствуют данные о количестве использованных экспериментальных животных.
- 4) В материалах и методах, в разделе «2.3 Животные и опухолевая модель» следовало указать нормативно-правовые акты, регламентирующие вопросы содержания и использования лабораторных животных.
- 5) В работе присутствует незначительное количество опечаток и стилистических ошибок.

Указанные замечания относятся, в основном, к оформлению диссертации и не снижают научную значимость работы.

## Степень обоснованности полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации

Считаю, что автором выполнено законченное научно-практическое исследование, основанное на достаточном количестве результатов, степень достоверности которых не вызывает сомнений и подтверждается корректностью постановки экспериментов. Выводы в полной мере отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам. Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и правильно отражают смысловую наполненность работы. Основные результаты работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях (11 работ), из них 4 – статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), рекомендованных ВАК.

### Заключение

Диссертационная работа Воловецкого Артура Борисовича «Комплексный анализ биораспределения борсодержащих конъюгатов аминоамидных производных хлорина в качестве агентов для бор-нейтронозахватной терапии» представляет собой актуальное, тщательно выполненное научное исследование, имеющее важное значение для биофизики. Работа отвечает требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор Воловецкий Артур Борисович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Ведущий научный сотрудник Лаборатории механизмов рецепции

Института биофизики клетки Российской академии наук –

обособленного подразделения Федерального государственного

бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский

центр «Пущинский научный центр биологических исследований

Российской академии наук»,

Кандидат биологических наук,



Шарапов Марс Галиевич

«22» апреля 2019

142290, г. Пущино Московской области, ул. Институтская, д. 3,

Телефон: +79164226880



Заведующий лабораторией  
Марс Галиевич Шарапов  
Генеральный директор  
Института биофизики клетки  
Российской академии наук  
Марс Галиевич Шарапов