

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

М.Г. Шарапова на диссертационную работу Воловецкого Артура Борисовича «Комплексный анализ биораспределения борсодержащих конъюгатов аминоксидных производных хлорина еб 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(дикарболлида)кобальта и аминоксидных производных с различным количеством 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 аминокамидного производного хлорина еб ($N=6$). 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 CH_2 -групп в составе аминокамида 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 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

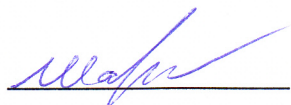
Считаю, что автором выполнено законченное научно-практическое исследование, основанное на достаточном количестве результатов, степень достоверности которых не вызывает сомнений и подтверждается корректностью постановки экспериментов. Выводы в полной мере отражают полученные результаты и соответствуют 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 аминоксидных производных хлорина еб 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



М.Шарапов
Секретарь ИИХ ИИХ
/Мавлюков К.С./