

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

23 мая 2018 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата химических наук

Алексеевой Анной Сергеевной

«Механизмы взаимодействия с клетками противоопухолевых липосом с липофильными
пролекарствами»

по специальности 02.00.10 — Биоорганическая химия

Москва – 2018

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

23 мая 2018 года

Заместитель председателя диссертационного совета
доктор физико-химических наук

Р.Г. Ефремов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-химических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствовали 21 человек, из них докторов по профилю диссертации — 6. Кворум имеется.

1. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
2. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
7. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
8. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
9. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
10. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
11. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
12. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
14. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
16. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
17. Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
19. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
20. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

Ефремов Р.Г.:

Доброе утро, уважаемые коллеги. Предлагаю считать открытым заседание нашего Диссертационного совета. Насколько я понимаю, Владимир Александрович, кворум есть, и мы можем начать работу. Предлагаю начать заседание диссертационного совета по рассмотрению диссертационной работы Алексеевой Анны Сергеевны. Ученый секретарь, Владимир Александрович, сейчас расскажет о состоянии дел соискателя и после этого мы заслушаем доклад.

Олейников В.А.:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя и все необходимые документы в деле есть).

Ефремов Р.Г.:

Уважаемые коллеги, есть ли у кого-нибудь вопросы по личному делу соискателя, по процедуре? Вопросов нет, тогда слово предоставляется Анне Сергеевне, в Вашем распоряжении 20 минут. Представьте основные результаты работы.

Алексеева А.С.:

(Излагает основные положения диссертационной работы).

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Анна Сергеевна, пожалуйста, вопросы. Да, Виталий Павлович.

Зубов В.П.:

Скажите, как вы полагаете, молекулярный механизм проникновения липосом внутрь клетки, там что, сначала образуется четырехслойная липосома, эндосома или что там образуется?

Алексеева А.С.:

Да, спасибо за вопрос, липосома поступает в клетку с участием плазматической мембраны клетки, то есть в принципе в какой-то момент образуется и четырехслойная структура, но она будет включать в себя не только одну липосому, их может быть несколько липосом, потом они все равно будут сливаться, укрупнятся и после этого включаться в другие компартменты клетки.

Ефремов Р.Г.:

Так, еще вопросы, пожалуйста.

Свищевская Е.В.:

Пара вопросов. Как Вы считаете, почему метотрексат-нагруженные липосомы более активны?

Алексеева А.С.:

Да, наверное на этот вопрос исчерпывающих мы ответов не получили, но проверили по крайней мере фолатный рецептор и транспортер-восстановленных фолатов, которые не участвуют. Может быть участие и других молекулярных механизмов, то есть каких-то определенных рецепторов, но не исключено и наличие неспецифических взаимодействий — образования водородных связей, гидрофильно-гидрофобных взаимодействий. То есть, это тоже может вносить свой вклад в увеличение накопления метотрексатных липосом. Пока у нас такое направление мысли.

Свищевская Е.В.:

А вообще, по литературе, липосомы каким путем проходят в клетку?

Алексеева А.С.:

Это зависит от состава и свойств липосом. Им присуще и просто слияние непосредственно с клеточной мембраной и рецептор-опосредованный эндоцитоз, как клатрин-зависимый, так и клатрин-независимый, флотиллин-зависимый тоже часто фигурирует для липосом, то есть единого механизма нет. Поэтому надо изучать конкретно для своего объекта.

Свищевская Е.В.:

И еще. У Вас есть два различных набора данных, в случае первых липосом, мелфаланом, кажется, нагруженных, там при внутриклеточной локализации идет укрупнение, было явное, в органеллах липосомы собираются. Может эндосомы, потом лизосомы. А во втором случае, с метотрексатом, они оставались такими мелкими-мелкими. Означает ли это, что по-разному эти два варианта липосом проходят внутрь?

Алексеева А.С.:

Да, я бы сказала, что да, означает. И в случае с мелфалановыми липосомами, оснащенными тетрасахаридом сиалил Льюис X — он задает основное направление транспорта в клетке. И тут, по моему мнению, вступает специфика самих липосом и эндотелиальных клеток. Потому что для E-селектина, транспорт через который идет самый большой процент липосом с SiaLe^x, он задает распределение в клетке и, вероятно, потом может быть накопление в эндоплазматическом ретикулуме, либо трансцитоз. Потому что для эндотелиальных клеток такой механизм тоже характерен, по природе они через себя как бы пропускают. Так что эти укрупнения связаны вот с такими моментами.

Алимов Андрей Анатольевич, Медико-генетический научный центр:

В рамках дискуссии, скажите, пожалуйста, просто ради любопытства, вот у Вас там всегда идет одна доза липосом, которую Вы вносите в среду? Не игрались с концентрацией, с разными дозами? Как выглядят клетки?

Алексеева А.С.:

С концентрацией мы, да, игрались. То, что представлено на слайдах, это те случаи, когда удалось добиться хорошего сигнала, не чрезмерного, потому что если их слишком много накапливается, то просто невозможно ничего разглядеть, слишком сильный сигнал, но при этом чтобы накопление было не слишком низким. Я могу сказать, что если увеличивать дозу и сохранять время, то сигнал растет пропорционально.

Алимов Андрей Анатольевич, Медико-генетический научный центр:

А паттерн роста изменяется?

Алексеева А.С.:

Мы работали на достаточно малых временах. Если говорить о сиалил Льюис X и эндотелиальных клетках, то там не более 1,5 часов. Для метотрексатных липосом время больше — до 20 часов. После этого мы не исследовали. Да, конечно, если оставить еще большее время, то уже будут цитотоксические эффекты, и они будут дозо-зависимыми. Но поскольку мы работали на меньших временах, этого эффекта не было.

Ефремов Р.Г.:

Так, еще есть вопросы? Я себе позволю тогда пару вопросов. Насколько я понимаю, метотрексат интегрирован в липидный бислой, есть жирнокислотная часть, а почему разгрузка тогда в клетке происходит поэтапно? Сначала он выходит, а затем уже компоненты матрицы?

Алексеева А.С.:

Да, это, собственно, было и нашим вопросом — как проходит эта разгрузка и как себя липосомы ведут в клетке. Происходит ли разделение компонентов или разгрузка липосом [идет] на этапе [взаимодействия] с мембраной, или они как-то интернализуются, скапливаются, а потом уже происходит разгрузка. Ответа заранее мы знать не могли. И сейчас показали, что происходит именно так. Если сравнивать с сиалил Льюис X липосомами: у них есть определенная мишень, у них есть E-селектин, который задает их распределение, транспортировку в клетке. А для метотрексатных такого яркого механизма нет, такого доминирующего механизма нет. И поэтому, я считаю, разгружаться они начинают [иначе], то есть природа липидов задает механизм разгрузки.

Ефремов Р.Г.:

Ну, а вытекание кальцеина, оно происходит раньше, чем метотрексат выходит из состава липосом, или одновременно?

Алексеева А.С.:

Ну вот примерно одновременно. Практически одновременно. То есть они сидят на плазматической мембране, потом они с ней как-то сливаются ли, какими-то отдельными кусочками проходят и в этот момент уже, пройдя гликокаликс и плазматическую мембрану, открывается бислой и начинается разделение метотрексатного производного и фосфолипидов.

Ефремов Р.Г.:

Ну, это Ваше представление. То есть это не подтверждено.

Алексеева А.С.:

Оно подтверждено двумя нашими экспериментами: один по разделению компонентов липосом, когда мы на конфокале смотрели это, а второй по цитометрии с липосомами, когда липосомы были загружены кальцеином внутри, то есть тут мы целостность бислоя отслеживали. Эти данные согласуются. Я покажу на слайде. Вот здесь разделение компонентов примерно с 4-х часов начинается, разделение липидов и пролекарства примерно с 4-х часов. А для эксперимента, когда мы отслеживали целостность бислоя, активно высвобождаться кальцеин начинает в этом же диапазоне.

Ефремов Р.Г.:

Я бы сказал с получаса.

Алексеева А.С.:

Ну здесь не очень большая разница просто. Наверное если дальше еще наблюдать, но мы не могли экспериментально это осуществить из-за нежизнеспособности клеток в этих условиях, оно бы шло выше. Это процесс не слишком интенсивный. Это интегральный [сигнал] для всех клеток.

Ефремов Р.Г.:

Понятно, следующий вопрос связан с однородностью той картины, которую Вы наблюдаете, распределения липосом. На фотографиях видно, что на одних клетках локализуется большое число, на других практически ничего. За счет чего такая гетерогенность, с чем это связано, как вы объясняете?

Алексеева А.С.:

Ну, это специфика биологического объекта. Клетки все-таки живые... Я могу сказать о накоплении метотрексатного производного в околоядерной области, мы все-таки наблюдали это для разных типов клеток и не единичные случаи в эксперименте. То есть это, действительно, репрезентативно, что к 20 часам пролекарство попадает в околоядерную

область. Всегда в эксперименте есть клетки, которые демонстрируют немножко другую окраску.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Еще вопросы?

Бовин Н.В.:

У Вас метотрексатные липосомы устроены таким образом, что метотрексатная часть частично расположена снаружи липосомы, частично внутри. Рассматривали ли Вы такие механизмы, что та часть метотрексата, которая находится снаружи, неспецифически отщепляется от липосом, и это первая волна действия, а затем уже, после того, как липосома полностью разгружается, выходит метотрексат из внутренней части? По видимому, это должно осложнять изучение механизма действия. С другой стороны, с точки зрения практической, это может быть интересно, потому что два механизма и пролонгация действия.

Алексеева А.С.:

Спасибо, я поняла Ваш вопрос. Действительно интересно. Мы такого изучения пока не проводили, это не исключено. Естественно, та часть остатков метотрексата, что обращена во внешнюю среду, она может подвергаться гидролизу и он может высвобождаться, этого исключать нельзя. У нас есть исследования по стабильности: в плазме крови человека порлекарство сохраняет свою структуру до 24 часов. Это с одной стороны. С другой стороны, у нас есть данные фармакокинетики, которые немного другие уже, в живом организме. То есть такое развитие событий исключать нельзя. Как его изучить в дальнейшем, мы постараемся выяснить.

Ефремов Р.Г.:

Еще вопросы, коллеги, есть? Если вопросов больше нет, тогда, Анна Сергеевна, пожалуйста, отдохните пока, а мы приступаем к оглашению письменных отзывов поступивших в совет.

Олейников В.А.:

Во-первых, отзыв ведущей организации. *(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).*

Ведущей организацией является Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова. Отзыв полностью положительный. Вот что пишут. Эффективная доставка противоопухолевых средств, способных селективно действовать на больные органы и ткани, является фундаментальной проблемой биоорганической и медицинской химии. Использование адресных наноразмерных систем доставки лекарств представляется одним из наиболее рациональных подходов к решению этой проблемы. Собственно, это определяет актуальность данной работы. Диссертационная

работа объемом 105 страниц, традиционный вид: введение, обзор литературы, результаты и их обсуждения, описание материалов и методов, выводы, благодарности и т. д. Список литературы включает 178 ссылок. Работа иллюстрирована 22 рисунками и 3 таблицы. Введение: общая оценка актуальности исследования. Обзор литературы посвящен вопросам направленного транспорта наноразмерных систем доставки лекарств. Глава «Результаты и обсуждение» является логическим изложением и анализом экспериментальных данных. Научная новизна работы состоит в синтезе нового зонда — флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата, несущего BODIPY-метку. Теоретическая значимость состоит в получении новых данных о взаимодействии с опухолевыми клетками липосом с липофильным производным метотрексата. Показано, что при переходе к супрамолекулярной липосомальной системе изменяется механизм проникновения в клетку пролекарства метотрексата по сравнению с метотрексатом как таковым. Исследования по теме диссертации выполнены на высоком научном уровне с использованием современных подходов к синтезу флуоресцентно-меченного липофильного производного метотрексата. Достоверность и обоснованность сомнений не вызывают, автором проведен анализ большого массива экспериментального материала. Выводы теоретически обоснованы, подтверждены экспериментально и все результаты получены самостоятельно. Могут быть использованы... и перечислена серия организаций, где могут быть использованы. Публикации: три статьи в научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для диссертаций. И вот недостатки. По диссертации имеется несколько вопросов и замечаний, которые относятся, главным образом, к изложению и представлению результатов исследования. 1) Не приведены значения поверхностного потенциала для липосом с различным количеством SiaLe^{X} -лигандов (стр. 38). Не указаны причины 2-х кратного снижения индекса полидисперсности для липосом после инкубации с культуральной средой. 2) Не указана причина, по которой изучение взаимодействия липосом, нагруженных липофильным производным метотрексата, проводили на клетках, культивируемых на среде со стандартной концентрацией фолиевой кислоты, а не на фолат-дефицитной среде. 3) Рисунок 11 следовало представить в виде таблицы с процентным содержанием интернализированных липосом и липосом, связанных с мембранной клеток, а не в виде столбчатых диаграмм. 4) В тексте присутствуют неудачные формулировки, например, «изучения влияния введения SiaLe^{X} -лиганда ... на взаимодействие...»; "концевой метилен" следует заменить на "концевую метильную группу". Олигосахарид SiaLe^{X} именуется «конъюгатом», «вектором» и «лигандом», что затрудняет восприятие результатов. 5) Подпись к рисунку 12 не содержит расшифровки сокращения «Trf». На схеме 1 для соединения V не

указан «хлоргидрат». б) В тексте диссертации содержится некоторое количество опечаток (например и перечислены страницы). Но приведенные замечания не снижают общего высокого уровня исследования, а приведенные замечания не влияют на теоретические и практические результаты и не изменяют исключительно положительного впечатления о работе. Далее оговаривается, что все соответствует критериям и сама автор заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 — биоорганическая химия. Обсужден на заседании кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Преображенского, Институт тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Московский технологический университет. Подписан зав. кафедрой М.А. Грин и утвержден первым проректором Панковым.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Владимир Александрович. Анна Сергеевна, ответьте, пожалуйста, на замечания.

Алексеева А.С.:

Спасибо. По поводу первого замечания, что не приведены потенциалы для липосом с различным содержанием SiaLe^x. Поверхностный потенциал для всех наших липосом лежит в отрицательной области и задает его фосфатидилинозит. Поверхностный потенциал SiaLe^x должен был быть еще более отрицательным, поскольку сиаловая кислота добавляет отрицательного заряда. Безусловно, это наше упущение, что нет полной характеристики, но в начале нашей работы такой мотивации у нас не стояло. Все липосомы отрицательны, и SiaLe^x с различным его содержанием еще чуть-чуть более отрицательны.

По поводу различий в полидисперсности. Ответ кроется в использовании разных приборов для измерений и в диссертации эти данные приведены в разных таблицах и между собой не сравниваются. Безусловно, упущение, что в экспериментальной части я это упустила.

Следующее замечание по поводу фолат-дефицитной среды и культивирования клеток. Мы сознательно пошли на использование стандартной среды с нормальным количеством фолиевой кислоты потому что в литературе были противоречивые данные об экспрессии фолатного рецептора на А549. Но, тем не менее, мы уже даже закупили и планируем провести эксперименты на фолат-дефицитной среде, но пока мы сознательно пошли на стандартную среду.

По поводу следующих замечаний: рисунок, который лучше бы выглядел в виде таблицы; неудачных формулировок, опечаток и отсутствия расшифровки к рисунку — я, конечно, соглашусь. Это мое упущение. Спасибо, что ведущая организация это заметила.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Слово предоставляется научному руководителю Анны Сергеевны, Водовозовой Елене Львовне.

Водовозова Е.Л.:

Глубокоуважаемые слушатели, члены диссертационного совета, я не знаю входит ли в мою компетенцию кроме характеристики диссертанта какие-то еще по работе...

Ефремов Р.Г.:

Нет, только по характеристике диссертанта. В дискуссии можно высказаться.

Водовозова Е.Л.:

Я могу сказать, что, конечно, работа Ани Алексеевой явилась для всей лаборатории очень большим подарком. Потому что случилось то, что называется переход от solid chemistry. Как нас все время позиционировали в научном сообществе и внутри Института, и те работы, которые мы в основном публиковали, касались, действительно, в основном химико-синтетических разработок и физико-химических исследований. Дело в том, что работа с клеточной средой, с клеточной системой, с которой Ане пришлось работать — с эндотелиальными клетками — очень тонкая, и то, что Ане удалось получить такие стройные результаты, подобрать такие условия эксперимента, что удалось выявить закономерности, о которых она рассказала — это результат очень кропотливой, огромной, тщательной работы. Но главное, что я хотела сказать, эта работа, что называется, с огоньком была сделана. Это исключительно приятно и было тем более приятно, что, в частности, по работе с SiaLe^x липосомами и клетками эндотелиальными, международные рецензенты в BBA-Biomembranes в начале написали такую фразу «a good piece of work». Это очень приятная характеристика, несмотря на другие мелкие замечания. Поэтому впечатления, безусловно, самые положительные. Отношение к работе чрезвычайно серьезное, заинтересованное, по-хорошему эмоциональное, исключительно конструктивное. У меня только самые положительные характеристики.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Следующий пункт — это отзывы на автореферат. Поступили, Владимир Александрович?

Олейников В.А.:

Для нашего Института это некий рекорд получился. У меня в руках шесть отзывов на автореферат, если вы позволите я не буду их зачитывать целиком.

(Зачитывает отзывы, отзывы положительные, отзывы прилагаются).

Отзывы все полностью положительные, отрицательных отзывов нет. Ну вот характерные вещи. Алексеева применила в своем исследовании современные методы и оригинальные подходы, в частности новый зонд для изучения внутриклеточного распределения липосом. Автором впервые получены интересные экспериментальные данные об особенностях реализации специфических взаимодействий SiaLe^X липосом в клетках эндотелиальной природы. Принципиальных замечаний по автореферату нет, хотя полагаю, что идентификация в автореферате положений выносимых на защиту, а также представление схемы, интегрирующей обнаруженные автором механизмы взаимодействия липосом с клетками-мишенями, способствовало бы повышению его информативности. Это пишет главный научный сотрудник, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, зав. каф. биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, проректор по инновационному развитию и международной деятельности ФГБУВО Красноярский государственный медицинский университет, профессор Алла Борисовна Салмина.

Следующий отзыв на автореферат: диссертационная работы соответствует паспорту специальности и так далее. Подписано к.х.н., науч. сотр., Жданов Андрей Петрович, это ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова. Отзыв без замечаний. Далее. Алексеева впервые продемонстрировала, что ... и так далее. Подписано к.б.н. Бобылёва Полина Ивановна, ФГБУН ГНЦ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва. Отзыв также положительный, абсолютно без замечаний.

Черняев Андрей Львович подписал, зав. отделом фундаментальной пульмонологии ФГБУ "НИИ пульмонологии" ФМБА России, д.мед.н., профессор.

А вот отзыв с недостатками. В части замечаний к работе позволю отметить следующие. 1) При оценке количества связанных с мембраной и интернализированных SiaLe^X-липосом делается вывод, что «... при избытке липосом в среде активированные клетки HUVEC накапливают около 15000 SiaLe^X-липосом на одну клетку за 1 час инкубации». Несложный расчет покажет, что объем 15000 SiaLe^X-липосом составит лишь около 1% от объема клетки. Возникает вопрос: не является ли это расчетное количество заниженным, исходя из заметно высокой интенсивности сигнала внутриклеточной флуоресценции по данным конфокальной микроскопии? 2) Считаю, что было бы очень выигрышно представить результаты конфокальной микроскопии, соответствующие точке «20 минут». В этом случае, заметный (более чем на треть от максимального) сигнал от связавшихся липосом сопровождался бы низким сигналом от «разгрузившихся» липосом. Представленные на рисунке данные в точке «40 минут» описывают одновременно оба события (связывание и «разгрузку»). Однако,

представленные замечания ни коем образом не снижают ценности и так далее. К.б.н., вед. науч. сотр. отдела медицинской химии и токсикологии Институт им. Н.И. Пирогова, подписал Малахов Михаил Валентинович.

И, наконец, последний отзыв. Полностью положительный, Торховская, вед.н.с. лаборатории фосфолипидных транспортных систем и нанолекарств НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича.

Вот шесть отзывов.

Ефремов Р.Г.:

Да, действительно, близко к рекорду. Спасибо, Владимир Александрович. Так, коллеги, значит работа вызывает живой интерес. Анна Сергеевна, ответьте, пожалуйста, на замечания.

Алексеева А.С.:

Спасибо большое, я искренне благодарю всех, кто написал отзывы, это позволило мне, конечно, по-другому взглянуть на работу.

Отзыв Аллы Борисовны Салминой с замечанием о нехватке положений выносимых на защиту в автореферате и недостатке схемы, интегрирующей общие закономерности. Я, безусловно, согласна, этого не хватает. Мы постараемся, когда дополним наше представление, какую-нибудь такую схему иметь.

Следующий отзыв с замечаниями — это отзыв Михаила Валентиновича Малахова. Первое замечание по поводу заниженности спектрофлуориметрических данных о накоплении 15000 SiaLe^x липосом. Они, да, действительно, могут быть заниженными. В чем тут дело, в этом эксперименте мы, во первых, пытались максимально воспроизвести условия эксперимента *in vivo*, который уже был проведен, поэтому использовали всего 2% SiaLe^x липосом. Тут я позволю себе вернуться к слайду. То есть был режим для липосом с 2% и тут даже по данным цитометрии, где мы имеем возможность выделять целевые популяции клеток и как-то не интегрально относиться к данным, все равно накопление было не столь выраженным — это раз. Два, по данным конфокальной микроскопии, тоже не столь яркая картина, но тем не менее отличающаяся. Замечание по поводу этого эксперимента, тут, да, данные могут быть заниженным. В случае лизатов клеток мы имеем дело со всей популяцией в эксперименте, без возможности что-то выделить — это раз. Два, экспериментальный подход, подразумевает какие-то потери и так далее. Но тем не менее, к решению вопроса о количественной оценке для накопления наносистем в клетках — это вопрос, к которому подступаются не многие и решают его тоже не многие. В частности из-за того, что это, во первых, экспериментально сложно, во вторых, результаты получаются не всегда удовлетворительные. Тем не менее, в литературе мы нашли данные о сравнении накопления липосом с белковой молекулой, то

есть немножко другой природы, и там говорится о всего 3000 липосом на 1 клетку, поэтому наши данные не столь низкие и, да, для себя мы полагаем, что они могут быть немного заниженными.

И еще одно замечание у Михаила Валентиновича по поводу приведения точки 20 минут вместо 40 минут для эксперимента. Я позволю себе дополнительный слайд. Мы использовали много временных точек для того чтобы отследить распределение и раскрытие SiaLe^x липосом в активированных клетках и, да, наверное, точка 20 минут была бы более интересна, чем точка 40 минут. Но тут есть некоторые экспериментальные тонкости, которые не позволят напрямую сравнить их с данными цитометрии, о которых упомянул Михаил Валентинович, поэтому просто это был не самый лучший выбор для нас. Эти точки, тем не менее, у нас были, спасибо за замечание.

Вот, пожалуй, все. Остальные отзывы замечаний не содержали.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Уважаемые коллеги, мы переходим к научной дискуссии и сначала заслушаем отзывы официальных оппонентов. Слово предоставляется Ярославову Александру Анатольевичу д.х.н., проф., член-корр. РАН, заведующему кафедрой высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ.

Ярославов А.А.:

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается)

Добрый день, уважаемые коллеги. Сегодня мы обсуждаем очень интересную работу, с моей точки зрения. Работу, которая представляет собой новый интересный шаг на пути создания подходов к созданию лекарственных средств, которые могли бы целевым образом атаковать нужные области организма. Надо сказать, что работа Анны Сергеевны и сама Анна Сергеевна сильно облегчила мне задачу, написав хорошую работу, сделав прекрасный доклад, умело отвечая на вопросы, которые были заданы, из чего следует, что она прекрасно представляет ту область, в которой она работает. Кроме того, из ответов также следовало, что она отлично представляет себе, как эта работа может развиваться, какие следующие шаги можно было бы делать в том направлении научном, которое она выбрала. Это позволяет мне не говорить слишком много о формальных частях этой работы, а сразу сосредоточиться на сути того, о чем мы уже много говорили. Если говорить об актуальности работы — она совершенно очевидна: создание новых подходов, любых новых подходов, и исследование механизма того, как функционируют те или иные конструкции, призванные целевым образом доставлять лекарственное вещество в нужные отделы клетки — это, конечно, задача удивительно интересная и главное, что практически полезная. В этом направлении можно

добиться больших результатов. Вот, собственно говоря, это определяет интерес с практической точки зрения к той работе, которая сегодня обсуждается.

В качестве лекарственных средств, в качестве того материала, который доставляется, выбраны реальные лекарственные вещества — это мелфалан и метотрексат. Конечно в работе использованы и модели, но эти модели занимают соответствующее место в работе. Главными действующими лицами являются вот эти два лекарственных вещества. Вот уже этого было бы достаточно для того, чтобы сделать неплохую работу и показать, как же функционируют, куда идут, какого эффекта можно добиться, используя эти соединения, конструкции, которые в работе представлены. Но автор идет дальше. И, на мой взгляд, следующий шаг, который она делает, представляет самый большой интерес в этой работе. Она попыталась оценить механизм того, что происходит после того, как лекарственные вещества, вот эти конструкции, попадают в биологическую среду. Вообще говоря, задача эта совершенно нетривиальная, потому что в большинстве работ, которые мы знаем, авторы как правило ограничиваются описанием эффекта: больше-меньше, быстрее-дальше. А попытка описать различные стадии и указать временные интервалы, в пределах которых эти стадии развиваются, — это, конечно, чрезвычайно интересно, хотя бы потому, что это указывает нам — вот та самая мертвая временная зона, в пределах которой лекарственный эффект просто не может наблюдаться. Вот этих процессов три, все они получили отражение в работе — это связывание лекарственного вещества, в данном случае липосомальной формы, с клеточной поверхностью, проникновение внутрь и разгрузка (высвобождение того самого лекарственного вещества). Вот это делает работу удивительно интересной и выделяет ее на фоне тех исследований, которые сейчас ведутся в области доставки лекарственных веществ. Работа вполне традиционна с точки зрения структуры, об этом сегодня уже говорили, поэтому повторять нет смысла. Литературный обзор представляет собой особый интерес. На мой взгляд, он не очень большой, но сделан он удивительно профессионально. Там отмечены те детали, те элементы, которые потом автор активно использует для создания вот тех конструкций, которые ей нужны. Описывает, как развивалась идея транспорта лекарственных веществ вначале от пассивного, потом к активному и, наконец, активная разгрузка уже вот этой лекарственной формы, попавшей внутрь клетки. Экспериментальная часть тоже очень интересная, ее украшает такой специальный раздел, который автором вынесен (и справедливо) в раздел «Результаты и обсуждение» — это синтез нового флуоресцентного аналога одного из лекарственных веществ, который дает возможность за теми процессами, которые автора интересуют — это транспорт такого рода соединений уже внутри клетки.

Вот теперь о сути работы. Основные результаты, с моей точки зрения, заключаются в следующем. 1) Попытка, очень удачная, иногда в большей степени, иногда есть выводы и соображения, которые более критикуемые, но от этого они не менее интересны, рассуждения относительно того, как происходит транспорт лекарственного вещества в реальной биологической среде, в присутствии клеток. Ну первое что сделал автор, он показал что встраивание тех лекарственных веществ, которые его интересуют, не наносят урона липосоме. А в данном случае липосома является этим самым транспортером, она не меняет ни размер липосом, ни ее живучесть. Вот это первый вывод, который был сделан. А дальше, автор, собственно, переходит к анализу той самой кинетики механизма процесса. Рассматривая, как мы видели сегодня (на докладе это тоже прозвучало), два параллельных процесса: 1) это все события, которые развиваются с участием соединения на основе мелфалана; 2) это на основе метотрексата. Показано, что в обоих случаях вначале происходит взаимодействие с поверхностью, на это требуется некоторое время. Затем происходит транспорт всей этой конструкции через клеточную мембрану, дальше разгрузка. Вот самое интересное - это оценка времен, с моей точки зрения, по крайней мере. Вот применительно к метотрексату, это только один из этих примеров, показано, что подход к клеточной мембране и адсорбция — это время порядка 1,5-2 часов, затем транспорт лекарства через мембрану и разгрузка на протяжении до 20 часов. Вот эти времена, они, на мой взгляд, представляют очень большой интерес для того, чтобы по крайней мере понять, в течение какого времени можно ожидать, либо не ожидать развития лекарственного эффекта. Отдельным достижением работы является синтез флуоресцентно-меченного вещества, аналога лекарственного вещества, которое дает возможность исследовать связанные с транспортом таких конструкций внутри клетки, разгрузку, распределение внутри клетки, взаимодействием с различными компартментами и так далее. Вот эта работа, вообще-то говоря, просто вдумайтесь в цифру: это 7-8 стадийный синтез и с точки зрения органической химии он представляет уже самостоятельное достижение, а в этой работе он просто является ее частью. Можно представить, каков объем этой работы — он, действительно, производит впечатление. То есть все части этой работы хорошо сбалансированы друг с другом и там есть всё: там есть и биохимическая часть (об этом будут подробнее говорить мои коллеги); серьезная физико-химия, которая позволила оценить вот эти временные рамки и скорости; есть синтетическая часть. То есть работа производит очень сильное впечатление.

Но в любой работе есть замечания. Вот в данном случае, замечания, конечно, пришлось поискать, но они носят такой, я бы сказал, скорее формально-технический характер, характер неких рекомендаций. Первое - то, что касается такого технического недостатка, так можно

аккуратно сказать, — это способ построения текста. То есть сначала автор в «Литературном обзоре» дает очень предметное описание той области, в которой он выполнил работу, и те направления, которые он будет развивать, а потом эта же идея повторяется перед второй, перед третьей частью работы. То есть автор как бы боится, что читатель прочитал «Литературный обзор» и все забыл, поэтому основные идеи надо снова повторить, перед тем как будут обсуждаться «Результаты и обсуждение». Но работа не очень большая, всего-то 100 страниц, забыть что написано, вообще говоря, трудно, особенно, когда читаешь этот текст целиком. Кроме того, написана она так хорошо, что оторваться от нее довольно трудно, честно говоря. Поэтому такие повторы, в данном случае, наверное, излишни. Но это, такое, техническое замечание.

Вот теперь, что касается уже самих систем, о которых идет речь. В работе описаны липосомальные формы лекарств, и единственное, что интересует автора это то, сколько материала включено в эту липосому, при этом нигде не упоминается о том, как эта липосома устроена. Вообще-то липосома должно быть устроена симметрично, то есть лекарство, о судьбе которого печётся автор, оно должно быть распределено с внешней стороны и с внутренней стороны мембраны. Вот можно было бы, наверное, попытаться как-то оценить такое распределение, для того чтобы лучше представлять, что же все-таки в конце концов попадет в клетку. И второй вопрос, об это сегодня говорили в ходе дискуссии, он связан с судьбой вот этого лекарства, расположенного на внешней и внутренней стороне мембраны. Наверное то, что расположено на внешней стороне мембраны, оно более атакуемо, скажем ферментами, которые находятся в любой биологически активной среде. Вот эти кусочки лекарства, самое лекарство, может отъедаться и поступать уже собственно в среду, в которой эти клетки находятся. Оно может оказаться вовне клетки, а может и проникнуть в эту клетку. Можно было бы сделать такую оценку, чтобы понять, можно ли рассчитывать на эту часть лекарства или нет. Ну такие работы, как мы слышали из ответов автора, они запланированы в ближайшем будущем, так что все равно работа не остановится и принесет новые любопытные результаты.

Вот теперь о выводах. Поскольку цифры, которые нужно произнести, довольно часто меняются, я просто прочту. Диссертационная работа Алексеевой Анны Сергеевны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор достойна присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - Биоорганическая химия.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Александр Анатольевич. Анна Сергеевна, у Вас есть возможность ответить на вопросы и замечания.

Алексеева А.С.:

Спасибо большое, Александр Анатольевич. По поводу замечания о повторах - я, безусловно, соглашусь. Я, наверное, недооценила таких компетентных читателей моей диссертации. По поводу производных и их распределения относительно монослоев в липосоме во внешнюю, во внутреннюю сторону. Мы предполагаем, что они распределены статистически равнозначно. Мы не характеризовали с этой точки зрения наши липосомы, наверное это наше упущение, да, мы запланируем такую характеристику. Пока мы предполагаем, что равномерно они распределены. Исключительно, что внутренний монослой, как более напряженный, может включать чуть-чуть меньше. Просто потому, что он сам меньше и напряженней. Мы пытались исследовать топологию поверхности липосом с помощью атомно-силовой микроскопии, мы пытались делать молекулярное моделирование липосом. В общем, в этом направлении мы, да, движемся, и я думаю, что такая характеристика тоже будет получена.

Стабильность производных мелфалана и метотрексата в биологическом окружении я уже, да, отмечала, в дискуссии этот вопрос возник. Есть эти данные относительно пролекарства метотрексата, что в плазме крови человека он сохраняет свою стабильность до 24 часов, есть данные фармакокинетики, но там получились немного другие результаты: $t_{1/2}$ для метотрексата около 4 минут, то есть высвобождение в какой-то момент идет. Но тут есть разница в активности ферментов, в специфичности эстераз человека и грызунов. В общем, здесь еще четкой картины у нас не сложилось, мы будем продолжать этим заниматься.

Ну в принципе, это основные моменты, которые я хотела бы отметить в ответах. Спасибо Вам большое.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Александр Анатольевич, Вы удовлетворены ответами соискателя?

Ярославов А.А.:

Да.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Так, следующий официальный оппонент, Сурин Александр Михайлович, которого мы все хорошо знаем, д.б.н., г.н.с. лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли НИИ общей патологии и патофизиологии.

Сурин А.М.:

Не могу не удержаться, вступив на эту трибуну, от некоторой доли воспоминаний, особенно при таком председательствующем. В 84 году мне и Татьяне Волковой эта трибуна была предоставлена впервые, и это была первая кандидатская защита в этом здании. Поэтому мне особенно приятно выступать уже в роли оппонента, особенно потому, что продолжение этой линии оказалось таким замечательным.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо.

Сурин А.М.:

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).

Когда я посмотрел название и бросил первый взгляд на работу, мне стало немножко страшновато, поскольку [диссертация на соискание степени] кандидата химических наук, а я хоть и сам кандидат химических наук, но химией уже давно не занимался, но обнаружив что первый оппонент — это доктор наук по химии именно и все остальные регалии соответствуют химии, мне даже стало немного потом, простите уж, жалко моего первого коллегу, потому что работа-то на самом деле в не меньшей мере заслуживает звания и биологических наук, поскольку это доминирующее направление. И я, опять таки, не могу не воздержаться от воспоминаний, когда я на этой трибуне защищал свою кандидатскую, была всего лишь одна конституционная, то есть образованная в самом начале создания Института лаборатория, занимавшаяся белками — лаборатория Владимира Константиновича Антонова. И дальше, эволюционно, по инициативе и интуиции Юрия Анатольевича стали проявляться группы — это прежде всего [группа] Евгения Васильевича Гришина, Виктора Ионовича Цетлина, потом остальных уже, которые стали заниматься белками. Сначала маленькими токсинами, затем уже рецепторами. И вот теперь это развилось до того, что, наверное, трудно представить себе лабораторию в этом Институте, которая не занималась бы клетками. В преамбуле этого выступления вообще-то говорилось о том, что клеточные исследования в данной диссертации были подвигнуты сначала исследованиями вообще на животных. И я думаю следующий спиральный, эволюционный виток данной работы, очевидно, это снова возврат к животным, но уже на более высоком уровне. То есть данная работа вообще-то показывает то, как замечательно готовят в нашем традиционном Институте тонкой химической технологии, но и то, как развивается и химия, тонкая химическая, и биоорганическая, и вообще биология, что все уже переплетается. В фундаменте остается высокопрофессиональная химия, а дальше ее приложения, самое интересное - это те структуры, которые связаны с непосредственно уже с живой материей.

Переходя, собственно, к диссертации. Фактически я как бы изложил введение, зачем все это нужно — зачем нужна химия, чтобы она была полезна нам в нашей жизни, в биологии, в ее расшифровке методами биофизики, биохимии и с тем, что это сопровождает. Среди порядка 20 диссертаций, которые мне пришлось оппонировать, вот эта диссертация мне показалась, наоборот, не совсем традиционно построенной. А именно, методы отнесены в финальную часть, то есть переход от «Литературного обзора» к «Результатами...» не разделен методами, а как бы, наоборот, она краткосамкнутая. В этом есть свои преимущества. И сначала, поскольку не было такого перехода, когда я стал читать результаты мне тоже показалось, как и уважаемому предшествующему оппоненту, что, наверное, не стоило повторяться. Но чтение, действительно, было очень интересным, очень хорошим, грамотным гладким языком написано. И когда я заглянул в литературную статистику, то обнаружил, что на самом-то деле повторений нет, потому что большинство цитируемых источников, представленных в конкретных главах «Результатов...» они не те же самые, которые в «Литературном обзоре», это другие, дополнительные, уточняющие. То есть, скажем, литобзор заканчивается на 106 ссылке, а все остальные продолжают уже после этого. То есть, мне кажется, что, наоборот, есть определенные достоинства именно в таком построении, когда сначала показывается, что было достигнуто, а затем - что нужно было тщательно проанализировать, чтобы выполнить данную, конкретную работу, описанную в данной, конкретной статье. Единственный, на мой взгляд, недостаток, который был упущен, но объем работы позволял это сделать — это можно было бы поподробней написать о методе флуоресцентной микроскопии, проточной цитофлуориметрии — преимущества и ограничения этого метода. К сожалению, автор сэкономил на этом, мне кажется работа была бы еще более выигрышной. Но это мое замечание относится к разделу пожеланий, которые учтет Анна Сергеевна в своих будущих работах. Что я хотел бы еще сказать в завершение о «Литературном обзоре», у меня сложилась привычка посмотреть, а какая же доля свежих цитат — свежими я считаю те цитаты, которые были опубликованы за период, пока делалась сама кандидатская диссертация. Ведь по идее, нельзя объять необъятного по литературе, но то что выходит в основном за тот период, пока ты делаешь свою работу, ты должен знать. И вот в этом отношении Анна Сергеевна в числе наиболее продвинутых из того списка, что мне пришлось оппонировать, у нее примерно четверть всех цитируемых работ относится к тому периоду, когда она сама активно включилась в работу. Это один из самых высоких показателей, это очень приятно. Я думаю, что ее ответы на вопросы это очень хорошо проиллюстрировали. Теперь относительно основных результатов, которым была посвящена эта работа. Меня подкупила самая сквозная идея этого исследования, что авторы постарались максимально

полно использовать идеологию этого исследования. То есть сначала был выполнен целевой синтез лекарств, которые они выбрали. Ну тема противоопухолевых лекарств, не нужно ее особенно рекламировать, понятно, на втором месте традиционно стоит онкология среди наиболее опасных заболеваний и еще, к сожалению, я думаю эта тема еще долго будет оставаться актуальной. Далее авторы разработали форму включения этих пролекарств в липосомы. Далее подобрали очень грамотно объект. Ну, скажем, для мелфалана, который в форме диацилглицерольного производного был включен в мембрану липосомальных наночастиц, подобрали объект, который мог селективно воспринимать эти самые наночастицы. То есть авторы нашли одно из решений для той самой «магической пули», о которой мечтал Пауль Эрлих. Они взяли эндотелиальные клетки, активировали их фактором некроза опухоли и тем самым сделали этот объект, эти клетки, селективно воспринимающими ту конструкцию, которую они создавали. Далее они применили весь максимально продвинутый арсенал методов, который они могли обнаружить в стенах этого Института в комплексе с другими лабораториями. Был выбран, естественно, метод флуоресценции, как наиболее чувствительный, позволяющий, с одной стороны, изучать взаимодействие малых количеств с клетками. А с другой стороны, этот метод был традиционный еще со времен Льва Давыдовича Бергельсона. И поэтому в этой лаборатории метод сначала флуоресцентной спектроскопии, а затем уже микроскопии используется как один из наиболее компетентно используемых методов, один из наиболее продвинутых методов, и возможность допущения ошибок здесь минимальна. Вот я довольно давно занимаюсь этим методом и для меня было новостью узнать, что, например, что кальцеин, несмотря на четыре заряженные группы, тем не менее способен агрегировать до состояния самотушения, и затем использовать этот феномен растушивания самозатушенных молекул для того, чтобы судить о том, сохранилась ли целостность липосом внутри клеток или эти липосомы становятся пермеабилезованными, по крайней мере для молекул с молекулярной массой порядка 0,5 кДа. В сочетании водорастворимого, замкнутого внутри люмена везикул флуоресцентного вещества и флуоресцирующих производных лекарства или аналогов и одновременное мультипараметрическое измерение флуоресценции и того и другого на живых клетках, позволило проследить за динамикой этого процесса, что в действительности ведь очень тонкие моменты. И они еще тонкие, я позволю себе повторить высказывание Елены Львовны, о том, что для того, чтобы такие измерения были надежными, необходимо иметь какую-то внутреннюю интуицию, чувство выращивать клетки довольно стандартно. Как человек, который занимается культурами клеток примерно последние 20 лет, знаю, насколько это процесс на грани очень аккуратной техники, интуиции и в какой-то момент может быть

даже искусства. Потому что можно стоять рядом с двумя людьми, которые работают в соседних ламинарных шкафах, у одного получается культура, а у другого нет. Анна Сергеевна пример того исследователя, у которого получается, в этом смысле она, конечно, сама по себе драгоценность в стенах этого Института. Чтобы она ни делала, как человек, который может получать длительно воспроизводимые культуры — это вообще надо уметь ценить.

Поскольку все основные достоинства этой работы уже были озвучены уважаемым предыдущим оппонентом, я позволю себе тогда просто зачитать свои основные замечания. Отчасти они будут повторены Анной Сергеевной, поэтому я буду их зачитывать немного короче, чем они написаны. Небольшие поправки в оформлении: Rhod-меченый фосфатидилхолин было написано на 39 странице, а изображен фосфатидилэтаноламин. Основной, с моей точки зрения, недостаток работы с клеточными культурами, о которых я уже косвенно сказал, поэтому когда представляют данные, которые сравнивают какие-то две величины, ну, например, эффект разных концентраций лекарства, или разной концентрации суспензии, или разное время инкубации, обязательно нужно показать не только величину ошибки, но и достоверность отличий. К сожалению, я не увидел это в диссертации, и на слайдах это тоже не было учтено. Это мое второе замечание, и я надеюсь, Анна Сергеевна пояснит в чем тут дело. На Рис. 16., на графиках панели А были показаны (4-8)-кратные различия между накоплением клетками липосом, содержащих метотрексатное производное, и «пустых» липосом, тогда как те же характеристики на панели Б того же самого рисунка имеют гораздо меньшие отличия (не более 1,5-кратных). При анализе причин эффективного ингибирования хлорпромазином накопления клетками липосом с метотрексатным производным рассматривается влияние этого ингибитора только на клатрин-опосредованный эндоцитоз, но известно, что хлорпромазин давным-давно используется как нейротропный препарат, в случае психических заболеваний особенно часто, и спектр его действия чрезвычайно широкий, включающих целый ряд метаботропных рецепторов и допаминовых, и серотониновых, и ацетилхолиновых. К сожалению, ни в литературной части, ни в обсуждении результатов она не коснулась этого вопроса хотя бы вкратце.

Изложенные выше замечания, как я уже сказал, имеют рекомендательный характер и не являются указанием на принципиальные ошибки, а скорее относятся к не всегда удачному изложению и не подвергают сомнению адекватность использованных методов и надежность полученных результатов. Работа представляется новой, интересной, проведенной на высоком теоретическом и методическом уровне, опирающейся на очень солидную методическую базу. Я позволю себе не зачитывать дважды стандартное заключение, я только позволю себе

зачитать общее впечатление о диссертации и на этом закончу. Итого, примененные Анной Сергеевной методы органического синтеза, приготовления клеточных культур, молекулярно-биологические и биофизические методы адекватно подходят для решения поставленных задач. Работа выполнена с использованием большого объема экспериментальных материалов и привлечением современных методов ведения разных типов культур клеток, анализа рецепторного репертуара клеток. Представленные результаты выглядят убедительно, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными. Полученные Алексеевой результаты важны как для понимания фундаментальных принципов связывания липосом с поверхностными рецепторами клетки, в частности, с селектинами, так и для расшифровки внутриклеточных процессов, приводящих к высвобождению лекарственного вещества или его предшествующей форме в цитозоле клеток-мишеней.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Александр Михайлович. Не могу удержаться, хочу лишь добавить, что когда Александр Михайлович говорил о том, что наш Институт, действительно, имеет славные традиции разработки и использования методов флуоресцентной спектроскопии, он и сам в свое время внес существенный вклад в развитие этих методов в нашем Институте. Спасибо еще раз. Анна Сергеевна, пожалуйста, ответьте на вопросы.

Алексеева А.С.:

Спасибо большое, Александр Михайлович — это прекрасное представление моей работы и такой отзыв, очень лестный мне. По поводу замечаний. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин с родаминильной меткой они, действительно, да, некорректно названы, я согласна. Следующее замечание, по поводу достоверностей, да, я вернусь к презентации. Это, действительно, наше упущение, что мы не привели их в основном тексте, на слайдах, в тех случаях, когда мы проводили какое-то сравнение относительных изменений параметров, я привела вероятности. Я оставлю этот слайд (тут и тут тоже есть достоверности), поскольку он будет иметь отношение к ответу на следующее замечание по поводу различий в накоплении. В диссертации этот рисунок соседствует с рисунком, здесь мы видим разницу в 4-8 раз, а здесь разницы не видим. Причины кроются в том, что тут, наверное, была не слишком понятная, исчерпывающая подпись к рисунку. Приведены данные, отнормированные на 100% к контролю, для каждого типа липосом к своему. То есть изначально, различия в накоплении были подобными, в несколько раз, но потом, относительно каждого контроля они были приведены к 100%. И тут уже приведены относительные снижения. Достоверности, также, приведены относительно контроля. Я прошу прощения за это упущение.

Следующее замечание по поводу хлорпромазина. Это вещество, действительно, имеет широчайший спектр действия. При системном введении он оказывается антипсихотическим препаратом и седативным и так далее. В таком случае, основной его мишенью выступают допаминовые рецепторы D2. И связывание с альфа, точнее с бета, с альфа я не нашла, адренорецептором, серотониновыми рецепторами у него, действительно, есть и, наверное, это действие на клетки следовало изучить. Но, в свою очередь, как ингибитор эндоцитоза хлорпромазин используется уже около 20 лет и стал таким очень классическим подходом и механизм его действия связан с блокировкой сборки клатриновой везикулы за счет блокировки адапторного белка AP2. Безусловно, дальше, когда мы будем изучать причины повышенного накопления метотрексатных липосом, эти мишени будут для нас очень интересны, и я искренне благодарю Вас за это замечание, оно дает нам такое направление для дальнейшего поиска.

Еще здесь есть пару дополнений. Вот относительно нехватки обсуждений методов конфокальной микроскопии и цитофлуориметрии в «Литературном обзоре» и в целом в диссертации, я, безусловно, соглашусь. Мне следовало бы уделить этому побольше внимания. И еще одно замечание, которое Александр Михайлович не озвучил, но я для протокола его все-таки озвучу, это рекомендация даже, а не замечание, по поводу того, что среди арсенала наших метчиков внутриклеточных органелл не хватает митохондрий. Я, безусловно, согласна, митохондрий, действительно, не хватает. Это объяснялось исключительно тем, что у нас в доступе не было этого метчика на тот момент. Мы будем и этому тоже уделять внимание. Более того, в лаборатории в 12-м году была опубликована работа, я еще тогда не участвовала в этом, о распределении липосом с пролекарством доксорубицина, который сам обладает флуоресценцией и поэтому является очень удобным в этом смысле объектом. И там была проведена оценка распределения по органеллам, и митохондрии там были и колокализация была достаточно высокой — около 40%.

Также из отзыва Александр Михайлович не стал озвучивать, я все же отвечу. Есть рекомендация приводить количественно рассчитанные колокализации, совпадения сигналов в микроскопии. Я тоже с этим согласна, но мы сознательно этого не делали, потому что методы расчета они всегда грешат какими-то допущениями. А в случае сравнения сигналов от разного типа окрашивания, то есть диффузного и дискретного, разной и интенсивности, они дают очень неточные результаты. Поэтому мы ограничились представлением микроскопии в виде распределения по каналам, по каждому каналу отдельно, что позволяет визуально оценить колокализации, в какой-то степени вышли из положения так. Но я согласна, что это тоже бы улучшило бы диссертацию.

Пожалуй, это все замечания, если Александр Михайлович Вы удовлетворены?

Ефремов Р.Г.:

Александр Михайлович, Вы удовлетворены ответами соискателя?

Сурин А.М.:

Да.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Уважаемые коллеги открываем публичную дискуссию. Кто хотел бы высказаться по рассматриваемой работе? Пожалуйста, Владимир Виленович.

Безуглов В.В.:

Дорогие коллеги, я представлял эту работу на Диссертационном совете как готовую к защите и с удовольствием могу констатировать, что сегодня мы заслушали прекрасный доклад и, действительно, это очень важная работа. Я хочу отметить один момент. Сейчас требования к лекарственному препарату особенно ужесточаются в плане доказательства мишеней и механизма действия. Для липосомальных препаратов это в общем-то большой вопрос, потому что не понятно в значительном количестве случаев, как все-таки распределяются эти липосомы и насколько адекватны будут результаты, полученные в опытах *in vitro* при перенесении уже на уровень организма. И с удовлетворением хочу сказать, что работа которую выполнила Анна Сергеевна вместе с Еленой Львовной, они поставили перед собой очень серьезную задачу, которую в общем не по зубам большинству ведущих лабораторий в этой области за рубежом. И я считаю, что на данном этапе они достигли очень принципиальных, важных результатов, которые позволят во-первых, спланировать дальнейшее продвижение этих веществ, как лекарственных препаратов, может быть с какими-то изменениями. И, несомненно, с точки зрения квалификации Анна Сергеевна заслуживает присуждения ей степени, и я призываю членов Диссертационного совета отдать свой голос за эту кандидатуру.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Владимир Виленович. Еще есть желающие? Николай Владимирович, пожалуйста.

Бовин Н.В.:

Я хочу вынести на защиту Анны Сергеевны три пункта. Пункт первый: то, что работа мне очень понравилась, и я призываю, также как и я сам, всех остальных членов Диссертационного совета присоединиться и голосовать положительно. Пункт второй. Я хотел бы обратить ваше внимание на направленную доставку липосом, на вектор Льюис Х. Практически все, что мы можем найти в литературе по направленной доставке липосом, это основано на моноклональных антителах, попытки так сделать. И здесь, на мой взгляд,

кроется если не ошибка, то по крайней мере ложное направление, потому что доставка к опухоли, когда она делается слишком специфическими методами, она оказывается ложной. Опухоль слишком гетерогенна, она слишком изменчива во времени, и доставка нужна умеренно, разумно специфичной. Вот как раз здесь, в этой диссертации, мы видим пример такой умеренной специфичности, которая работает и для многих опухолей, потому что это [нацеливание] на сайт воспаления, как механизм этой направленной доставки, и селектины есть на любой стадии развития опухолевого процесса. Важность этого пункта, она несомненно очевидна, потому что убить клетку, в том числе опухолевую не представляет большого труда, а вот доставить, действительно, проблема. И третий пункт, который я хочу вынести на эту защиту — это пожелать Анне Сергеевне набраться мужества и терпения, чтобы довести эту работу до клинических испытаний.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Николай Владимирович. Так, Виталий Павлович, пожалуйста.

Зубов В.П.:

Поскольку тут уже были очень убедительные выступления, я буду очень краток. Ну сначала общее впечатление - очень положительное, мне кажется здесь сочетаются и химические, и биологические, и клеточные, и биофизические подходы, связанные с изучением флуоресценции, и все гармонично сочетается. Но мне хотелось бы в немного грубом, таком, аспекте сказать несколько слов. В последнее время становится очень популярной и модной наука наномедицина, где используются различные наноразмерные носители для адресной доставки. И вот здесь как бы такое негласное соревнование липосомальных форм и мицелярных, наногелевых, наночастичных и т.д. Надо сказать, что большинство публикаций в основном связано с частицами, наполненными, без дырочки. Эта работа дала возможность снова вырваться липосомальным формам вперед и в этом ее большая заслуга. Я поздравляю авторов. А в качестве пожелания, могу сказать следующее: замечательно, что на клеточных экспериментах удается избирательно проникать в клетки, разгружаться и все прочее, но *in vivo*, там возникает сложнейшая проблема, чтобы из кровеносных сосудов пройти их стенки и попасть дальше в ткань. Пожелание, чтобы в дальнейшем и в направлении решения этой проблемы тоже работа развивалась. И здесь на липосомы тоже есть надежда, потому что они все-таки как-то ближе к природе, чем частицы, полученные в виде наногелевых форм, мицелл более синтетического типа. Могу только пожелать дальнейших успехов диссертанту и поздравления руководителю.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Так, есть еще желающие выступить. Да, пожалуйста, конечно.

Алимов Андрей Анатольевич, Медико-генетический научный центр:

Нам, посторонним читателям этой диссертации, она понравилась как книжка. Мы ее скачали, спасибо автору!

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Так, уже, наверное, все сказано. Теперь заключительное слово предоставляется соискателю. Анна Сергеевна, если Вы желаете сказать что-нибудь, то, пожалуйста.

Алексеева А.С.:

Конечно! Спасибо большое, Роман Гербертович, я конечно хочу сказать, я понимаю, что все, может быть немножко устали, но благодарности нельзя упустить. Я в первую очередь благодарю Елену Львовну Водовозу за ее чуткость, отзывчивость, щедрость и вообще такого руководителя больше нигде не найти. Я хочу поблагодарить всех сотрудников лаборатории за поддержку и помощь на всех этапах. Я благодарю своих оппонентов, ведущую организацию, которые, действительно, помогли мне взглянуть по-другому на свою работу, за то, что они так глубоко в нее проникли, и дискуссии с оппонентами были для меня очень ценными. Я благодарю всех, кто написал отзывы на автореферат, это было мне очень приятно, такое количество и качество их просто мне льстит. Я хочу, конечно же, поблагодарить Елену Викторовну Свирцевскую, за ее обучение меня методам, в частности, культивирования клеток и конфокальная микроскопия и цитометрия. Все это было возможным благодаря лаборатории межклеточных взаимодействий и Елене Викторовне Свирцевской. Я благодарю Марину Капкаеву за то, что она обеспечила меня материалом для половины мой диссертации — эндотелиальными клетками. Я благодарю своего мужа за поддержку. Я благодарю свою маму, почетную бабушку, без ее помощи диссертация не была бы написана, а я не смогла бы здесь присутствовать. И я благодарю всех за внимание, всех кто пришел, за поддержку. Спасибо большое!

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Уважаемые члены Диссертационного совета, предлагаю избрать счетную комиссию в составе: Бовин Николай Владимирович, Зубов Виталий Павлович и Олейников Владимир Александрович.

(Проходит тайное голосование по диссертации)

Ефремов Р.Г.:

Коллеги, заслушаем результаты голосования.

Олейников В.А.:

Работала счетная комиссия в составе Олейников, Бовин, Зубов. Подсчет голосов при тайном голосовании по диссертации Алексеевой Анны Сергеевны. Присутствовало на заседании 21

член Диссертационного совета, роздано бюллетеней 21, «за» — 21, «против» — нет, «недействительных» — нет.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Владимир Александрович. Необходимо утвердить результаты подсчета голосов. Кто за? Против? Воздержался? Единогласно. Поздравляем соискателя с успешной защитой!

(Проходит голосование по проекту заключения. Заключение принято единогласно)

Ефремов Р.Г.:

На этом наше заседание объявляется закрытым.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

