

На правах рукописи

Борсакова Дарья Валериевна

**РАЗРАБОТКА БИОРЕАКТОРА НА ОСНОВЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ
УДАЛЕНИЯ АММОНИЯ ИЗ КРОВОТОКА**

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской
академии наук

Научный руководитель

Синауридзе Елена Ивановна,
доктор биологических наук

Официальные оппоненты

Миндукшев Игорь Викторович,
доктор биологических наук, главный
научный сотрудник лаборатории
сравнительной физиологии дыхания
ФГБУН «Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М.
Сеченова» Российской академии наук

Миль Елена Михайловна,
доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
физико-химических основ регуляции
биологических систем ФГБУН Институт
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования Курский государственный
медицинский университет Министерства
Здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2019 года в __ часов __ минут на заседании
Диссертационного совета Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской
академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Косыгина, д.4.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им.
Н.Н. Семенова Российской академии наук и на сайте

Автореферат разослан «__» _____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
Д 002.039.01, кандидат химических наук

Л.И. Мазалецкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Использование эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов обеспечивает в ряде случаев существенные фармакологические преимущества. Введение препаратов в организм внутри эритроцитов позволяет снизить кардиотоксичность антрациклиновых антибиотиков, иммунный ответ на L-аспарагиназу, увеличить время циркуляции и обеспечить биотрансформацию пролекарств для дальнейшего получения в клетке и постепенного освобождения в кровотоке дексаметазона и азидотимидина. Эритроцит-носитель может работать как контейнер, постепенно высвобождающий препарат в кровь, или как биореактор, который содержит в себе ферменты, удаляющие нежелательные вещества из кровотока. Серьезные преимущества такая лекарственная форма имеет, в первую очередь, при введении ферментов, которые эритроцит может защищать от инактивации под действием антител и протеаз плазмы, увеличивая время циркуляции препарата в кровотоке. При этом снижаются иммунные и аллергические реакции организма на введенный препарат и токсические воздействия на него высоких доз свободного лекарства.

Одним из перспективных применений эритроцитов-биореакторов (ЭБР) может быть удаление аммония из крови больных в состоянии гипераммониемии, которое возникает при острых и хронических заболеваниях печени, а также при болезнях, связанных с нарушением цикла выведения мочевины, сопровождающихся повышенным содержанием аммония в крови. В силу токсичности аммония для центральной нервной системы, у пациентов с гипераммониемией развивается печеночная энцефалопатия, наблюдаются тремор, судороги, возникает угроза комы и летального исхода. Такое состояние требует обязательной и быстрой коррекции, однако, к сожалению, существующие лекарства снижают уровень аммония в крови только опосредованно и достаточно медленно. Использование эритроцитов, перерабатывающих аммоний (аммоцитов), может быть перспективным для быстрого снижения концентрации аммония в крови у пациентов, для которых существующие методы лечения гипераммониемии недостаточно эффективны.

Цель работы. Поиск и разработка новых подходов для создания эффективных ЭБР для удаления аммония из крови.

Задачи исследования:

1. Создание методом обратимого гипоосмотического диализа биореактора для удаления из крови аммония на основе совместного включения в эритроциты двух ферментов: глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ).
2. Проверка эффективности работы такого биореактора в системах *in vitro* и *in vivo*.
3. Исследование хранения ЭБР, полученных методом обратимого гипоосмотического диализа, содержащих ГДГ и АЛТ.

4. Сравнение эффективности включения в эритроциты крупной молекулы ГДГ с помощью различных гипоосмотических методов. Выбор оптимального метода для создания ЭБР, содержащих этот фермент.
5. Исследование ГДГ из *Proteus sp.* в качестве кандидата для увеличения активности ГДГ в эритроцитах.

Научная новизна

1. Впервые был создан биореактор для удаления аммония из кровотока на основе совместного включения в эритроцит двух ферментов (ГДГ+АЛТ). Показана эффективность таких биореакторов *in vitro* и *in vivo*.
2. Проведено систематическое сравнение различных гипоосмотических методов включения ГДГ из печени быка в эритроциты и показано, что наиболее оптимальным (по эффективности включения фермента и качеству полученных ЭБР) является метод проточного диализа.
3. Для повышения активности ГДГ внутри эритроцитов, в клетки впервые вместо ГДГ из печени быка была включена бактериальная ГДГ из *Proteus sp.*, которая обладает большей удельной активностью. Впервые показано, что она не агрегирует при повышении концентрации ферментного белка в растворе, что является важным преимуществом данного препарата ГДГ, позволяя получать большую активность фермента внутри эритроцита.

Научно-практическое значение:

Разработанный на основе включения в эритроциты двух ферментов (ГДГ и АЛТ) новый вид ЭБР для удаления аммония из кровотока способен работать в организме более длительное время, чем любые ранее известные варианты аммоцитов. Это обеспечивается независимостью его работы от скорости транспорта через мембрану эритроцита таких плохо проникающих метаболитов как α -кетоглутарат и глутаминовая кислота. Правильный выбор оптимального метода включения ГДГ (метода проточного диализа) и использование для включения бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* позволяют сильно повысить активность ГДГ в эритроците. Все это открывает возможности для получения ЭБР, содержащих эффективные дозы ферментов, убирающих аммоний из кровотока, для применения данных ЭБР в клинике.

Методология и методы исследования. Методология работы была подчинена основной цели исследования и решению всех поставленных задач. Сначала принципиально новые ЭБР, содержащие два фермента (ГДГ и АЛТ), были получены с помощью традиционного метода гипоосмотического диализа в мешках. Было показано, что такие ЭБР способны убирать аммоний как из среды *in vitro*, так и из крови мышей *in vivo*. Следующей задачей было повысить активность ГДГ, включенной в эритроциты, т.к. именно этот фермент является в выбранном тандеме ферментов основным аммоний-утилизирующим, однако эффективность его включения очень низка. Решение этой задачи шло по двум направлениям: 1) выбор наиболее оптимального метода включения препарата в эритроциты (путем систематического сравнения трех различных гипоосмотических методов) и 2) использование для включения в эритроциты ГДГ из

другого источника (бактериальной ГДГ из *Proteus sp.*), обладающей более высокой удельной активностью.

Получение ЭБР в работе проводили различными гипоосмотическими методами, основанными на обратимом образовании пор в мембране эритроцита при нахождении клеток в гипоосмотической среде. Активности ферментов измеряли биохимическими методами (спектрофотометрически, при $\lambda=340$ нм). Качество получаемых ЭБР (как свежеприготовленных, так и в ходе недельного хранения при $+4^{\circ}\text{C}$) было оценено по уровню гемолиза в суспензии ЭБР, кривой их осмотической резистентности и стандартным эритроцитарным индексам. Уровни свободного гемоглобина и процент нелизированных эритроцитов при измерении кривой осмотической резистентности, также измеряли спектрофотометрически (при $\lambda=540$ нм и 620 нм, соответственно). Стандартные эритроцитарные индексы были измерены на клиническом гематологическом анализаторе. Форму эритроцитов оценивали методом конфокальной микроскопии. Кинетику убыли аммония в среде *in vitro* измеряли с помощью ион-селективного аммониевого электрода, а при работе с малыми образцами крови мышей (*in vivo*) – микрофлюориметрическим методом. Все полученные результаты были статистически обработаны.

Положения, выносимые на защиту:

1. ГДГ и АЛТ могут быть включены в эритроциты совместно с помощью метода гипоосмотического диализа. Полученные ЭБР удаляют аммоний как из среды *in vitro*, так и *in vivo* в модели гипераммониемии на мышах. Низкая эффективность включения ГДГ может ограничивать эффективность биореактора.
2. ЭБР с ГДГ+АЛТ, полученные методом гипоосмотического диализа, сохраняют хорошее функциональное состояние при хранении в течение, по крайней мере, 1 недели при 4°C .
3. Систематическое сравнение различных гипоосмотических методов включения больших по размеру молекул ГДГ из печени быка в эритроциты показывает, что оптимальным методом их включения является метод проточного диализа.
4. Использование для включения в эритроциты вместо ГДГ из печени быка фермента из *Proteus sp.* позволяет увеличить эффективность инкапсуляции ГДГ и ее удельную активность в клетках за счет более высокой удельной активности исходного фермента и отсутствия его агрегации при повышении концентрации белка в растворе.

Личный вклад автора. Все работы по получению эритроцитов-биореакторов, измерению активности ферментов, исследованию функциональной активности ЭБР *in vitro*, исследованию характеристик полученных эритроцитов, систематическое сравнение методов получения эритроцитов-биореакторов, а также написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились либо лично автором, либо при его непосредственном участии. Опыты *in vivo* по исследованию эффективности разработанных ЭБР в модели индуцированной гипераммониемии на мышах были проведены в Институте теоретической и экспериментальной биофизики

РАН, г. Пущино д.б.н. Еленой Александровной Косенко и статистически обработаны автором.

Достоверность и обоснованность результатов. Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как спектрофотометрия в УФ и видимой области, ионметрия, конфокальная микроскопия, статистическая обработка результатов с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Использование аттестованных средств измерения позволяло получать результаты с удовлетворительным уровнем точности. Достоверность полученных результатов подтверждалась также их согласованностью с литературными данными и внутренней согласованностью данных, полученных разными методами.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на IX Симпозиуме «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» в рамках II Международного симпозиума «Трансляционная и регенеративная медицина» (Москва, Россия, 6-8 февраля, 2015 г.); II Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 3-5 декабря, 2015 г.); 10-ом Конгрессе азиатского подразделения международного общества детской онкологии (10th SIOP Asia Congress) (Москва, Россия 25-28 мая, 2016); International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy (November 16-18, 2017, Barcelona, Spain); Международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина» (15-17 декабря, 2017, Орел, Россия); 35th International Congress of the ISBT (Toronto, Canada 2-6 June, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе, статей в рецензируемых журналах - 7; публикаций в трудах конференций и съездов - 6.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста и включает содержание, введение, литературный обзор (глава 1), постановку задачи (глава 2); описание материалов и методов (глава 3), результаты и обсуждение (глава 4), заключение, выводы, список цитированной литературы (207 библиографических источников), список сокращений и обозначений и благодарности. Работа содержит 27 рисунков и 7 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность исследуемой темы, сформулированы цели и задачи исследования и дана общая характеристика работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Приведены основные сведения о строении и физиологии эритроцитов, описаны процессы, происходящие с эритроцитом во время гипоосмотического стресса. Описаны также основные методы, которые используются для включения в эритроциты различных биологически активных веществ. Изложены сведения о метаболизме аммония в организме, гипераммониемии и методах ее лечения, а также о предыдущих попытках создания эритроцитов-биореакторов, способных

удалять аммоний из крови. Приведены сведения о ферментах, используемых для включения в эритроциты в данной работе.

Глава 2 посвящена постановке задачи настоящего исследования. В ней проанализированы причины, мешающие эффективному использованию ранее созданных аммоцитов, изложены основные предпосылки для создания биореактора на основе двух ферментов (ГДГ и АЛТ) и сформулированы задачи, которые необходимо решить для создания таких ЭБР и повышения эффективности их работы.

В **главе 3** описаны материалы и методы, использованные в работе. Помимо трех основных гипоосмотических методов включения ферментов в эритроциты, изложенных ниже, описаны использованные реактивы, методы выделения из крови эритроцитов, измерения их осмотической резистентности, эритроцитарных индексов, гемолиза, осмоляльности растворов, активности включаемых ферментов, метод конфокальной микроскопии. Описаны также процесс изготовления малых диализаторов, методы флуориметрического и ионометрического определения концентрации аммония, модель индуцированной гипераммониемии на мышах и процедура статистической обработки результатов.

Включение ГДГ из печени быка в эритроциты методом обратимого гипоосмотического лизиса. К 100 мкл суспензии эритроцитов с гематокритом $83 \pm 2\%$ добавляли 10,5 мкл раствора ГДГ из печени быка (50 МЕ/мл) до конечной концентрации фермента 4-5 МЕ/мл_{сусп.}. К 110,5 мкл суспензии эритроцитов с ГДГ добавляли по 400 мкл гипоосмотического раствора, содержащего 5 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), 1,5 мМ АТФ, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ глюкозы. Разная осмоляльность растворов достигалась добавлением различных концентраций NaCl. Смесь инкубировали при 4°C в течение 3 мин. Конечная расчётная осмоляльность полученных суспензий была 75, 100 и 120 мОсм/кг. После этого добавляли запечатывающий раствор (1 М NaCl, 50 мМ калий-фосфатного буфера, 5 мМ АТФ, 50 мМ глюкозы, 50 мМ пирувата натрия, 2170 мОсм/кг, рН 7,4) в объеме 50 мкл и инкубировали суспензию 30 мин при 37°C. Полученные аммоциты отмывали в растворе PBS три раза путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин.

Включение ферментов (ГДГ или ГДГ+АЛТ) в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа. Процедуру включения тандема ферментов ГДГ и АЛТ в эритроциты проводили в двух вариантах. В первом варианте к 625 мкл дистиллированной H₂O добавляли 20 мкл исходной суспензии ГДГ и 10 мкл исходной суспензии АЛТ. Полученную смесь ферментов добавляли к 1 мл суспензии исходных эритроцитов, гематокрит (Ht) которой предварительно доводили до 70%, добавляя PBS. Финальный Ht полученной суспензии составлял ~ 42%, активности ферментов в ней были равны 10 МЕ/мл_{сусп.} и 5 МЕ/мл_{сусп.} для ГДГ и АЛТ, соответственно. Во втором варианте диализа предварительно диализированные растворы ферментов (для удаления избыточных солей) добавляли к 4 мл суспензии отмытых эритроцитов с Ht 83% (до финальной активности каждого фермента 50 МЕ/мл_{сусп.}). Объемы финальных смесей суспензии и ферментов несколько варьировали, и Ht в них в среднем составлял $58 \pm 12\%$ (среднее \pm SD). При включении ГДГ без АЛТ (n=7) к 630 мкл дистиллированной воды

добавляли 20 мкл исходной ГДГ из печени быка. Полученную смесь добавляли к 1 мл суспензии отмытых эритроцитов с Нт 70%. Конечный Нт полученной суспензии составлял 42%, активность ГДГ в этой суспензии была равна примерно 10 МЕ/мл_{сусп.}

Полученные смеси диализировали в мешках в течение 1 часа при 4°C против гипоосмотического раствора (2 мМ натрий фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мМ КСl, 27 мМ NaCl, осмоляльность 60-65 мОсм/кг). Во втором варианте включения ГДГ+АЛТ буфер был дополнен 20 мМ глюкозы, осмоляльность составляла 70-75 мОсм/кг. Растворы с большей осмоляльностью получали путём добавления в исходный гипотонический раствор NaCl в соответствующих концентрациях. Соотношение объемов суспензии и диализирующего буфера составляло 1:100. После диализа суспензию извлекали из диализного мешка, помещали в пробирку и при включении тандема ферментов дополнительно добавляли к ней NADH и пиридоксаль-5'-фосфат до конечных концентраций 0,3 мМ и 0,2 мМ, соответственно. После перемешивания полученной суспензии к ней добавляли гиперосмотический раствор (с осмоляльностью 1020 мОсм/кг) в количестве 1/3 от объема диализированной суспензии, содержащий 30 мМ Na₂HPO₄, 30 мМ инозина, 1,5 мМ аденина, 8,4 мМ глюкозы, 1,5 мМ пирувата, 3 мМ MgCl₂, 55 мМ NaCl и 458 мМ KCl (рН 7,4). Инкубировали суспензию при 37°C 30 мин и отмывали полученные ЭБР в растворе PBS три раза путем центрифугирования в течение 8 мин при 1000 g.

Проведение процедуры проточного диализа в диализаторе малого объема. ГДГ из печени быка (очищенную от солей) или ГДГ из *Proteus sp.* добавляли к 2 мл суспензии отмытых эритроцитов с Нт 70% (до конечной активности 10 МЕ/мл_{сусп.} при сравнении включения двух ферментов и в различных концентрациях при исследовании зависимости эффективности включения от концентрации фермента в суспензии). Полученные смеси пропускали через специально сконструированный в работе диализатор малого объема на минимальной скорости насоса - 0,2 мл/мин. Диализатор был погружен в перемешиваемый гипоосмотический раствор (5 мМ KN₂PO₄/K₂HPO₄, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ глюкозы, рН 7,4). Соотношение объемов суспензия : раствор составляло 1 к 100. Полное время прохождения смеси через диализатор составляло около 10 мин. В полученный диализат добавляли запечатывающий раствор (1 М NaCl, 50 мМ KN₂PO₄/K₂HPO₄, 5 мМ АТР, 50 мМ глюкозы, 50 мМ пирувата натрия, рН 7,4, 2170 мОсм/кг) таким образом, чтобы конечная осмоляльность суспензии составляла 350-400 мОсм/кг. После этого суспензию инкубировали 30 мин при 37°C и полученные аммоциты отмывали в растворе PBS три раза путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин.

Для всех использованных методов включения ферментов эффективность процедуры характеризовали двумя параметрами: процентом инкапсуляции (т.е. процентом фермента, включенного в клетки в ходе процедуры) и выходом клеток (т.е. процентом клеток, выживших после процедуры). Эти показатели были рассчитаны по формулам (1, 2):

$$\text{Выход клеток (С, \%)} = V_{\text{конеч}} \times \text{Нт}_{\text{конеч}} \times 100 / (V_{\text{исх}} \times \text{Нт}_{\text{исх}}) \quad (1),$$

$$\text{Инкапсуляция (Е, \%)} = A_{\text{конеч}} \times V_{\text{конеч}} \times 100 / (A_{\text{исх}} \times V_{\text{исх}}) \quad (2),$$

где $A_{исх}$ и $A_{конеч}$ – активности фермента в исходной суспензии эритроцитов до процедуры и конечной суспензии фармакоцитов с включенным ферментом, соответственно, $V_{исх}$ и $V_{конеч}$ – объемы, а $Ht_{исх}$ и $Ht_{конеч}$ — гематокриты этих суспензий, соответственно.

Глава 4 посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

Совместное включение ГДГ и АЛТ в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа

В настоящей работе аммоциты, содержащие ГДГ и АЛТ, были получены впервые, методом обратимого гипоосмотического диализа. Результаты представлены на рисунке 1. Процент инкапсуляции для обоих ферментов был достоверно выше в первом варианте метода (см. Материалы и методы). В обоих вариантах инкапсуляция АЛТ была достоверно выше, чем для ГДГ (ANOVA, $p < 0,05$).

Низкая эффективность включения ГДГ из печени быка в эритроциты данным методом хорошо согласуется с ранее опубликованными работами, и объясняется тем, что молекулы ГДГ имеют большую молекулярную массу (332 кДа) и могут агрегировать с образованием молекулярных агрегатов еще большего размера при увеличении концентрации белка ГДГ выше 0,1-0,3 мг/мл. Выходы клеток для двух вариантов метода включения достоверно не различались (ANOVA, $p < 0,05$). Для АЛТ (М.в. 115-125 кДа) проблемы, связанные с агрегацией белка, не описаны.

Достоверные различия между процентами включения каждого из ферментов в двух вариантах метода связаны, по-видимому, с тем, что в первом варианте условия диализа были несколько жестче (осмоляльность буфера в первом варианте составляла 60-65 мОсм/кг против 70-75 мОсм/кг во втором варианте). Кроме того, во втором варианте, концентрация ГДГ в исходной суспензии эритроцитов была в 5 раз выше, чем в первом. Это могло привести к агрегации фермента и препятствовать включению не только ГДГ, но и АЛТ в эритроцит.

Скорость утилизации аммония с помощью ЭБР, содержащих ГДГ+АЛТ, в системе in vitro

При добавлении в буфер с аммонием ЭБР, содержащих ГДГ из печени быка и АЛТ (конечный Ht 8-10%), скорость убыли аммония составляла после пересчета на 100% гематокрит 1,5 ммоль/ч \times л_{ЭБР} (n=3) (рисунок 2, кривая 2). Для смеси ферментов (без клеток), добавленной непосредственно в тот же буферный раствор, полученная скорость убыли аммония составляла 0,39 мм/ч (n=4) (рисунок 2, кривая 3). Убыль аммония связана с работой ферментов, включенных в ЭБР, т.к. сами эритроциты не способны убирать аммоний из среды с заметной скоростью (рисунок 2, кривая 1).

Скорость убыли аммония in vivo в модели гипераммониемии на мышах

Функциональная эффективность ЭБР, содержащих ГДГ и АЛТ, была исследована также *in vivo* на мышах с индуцированной гипераммониемией. Исследование было проведено совместно с д.б.н. Еленой Александровной Косенко (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино).

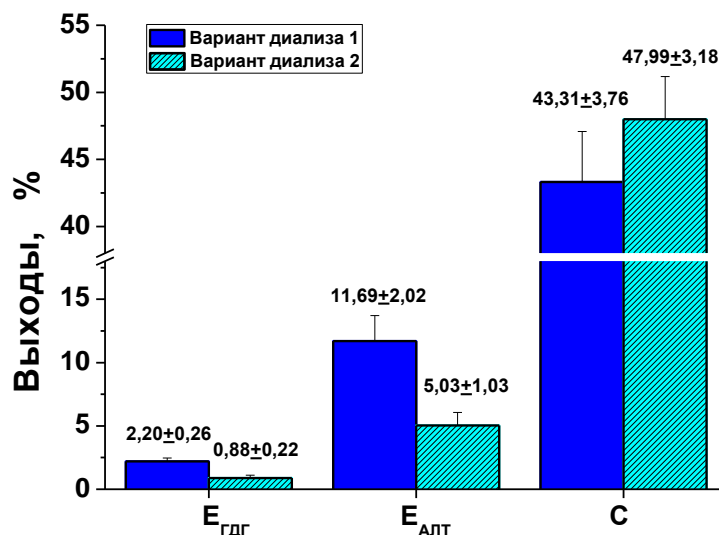


Рисунок 1. Эффективность включения ГДГ (из печени быка) и АЛТ в эритроциты с помощью двух вариантов обратимого гипосмотического диализа в мешках. Представлены проценты инкапсуляция (E) для ГДГ и АЛТ, а также выход клеток (С). Активности ГДГ и АЛТ в исходной суспензии при загрузке составляли для первого варианта метода 10 МЕ/мл_{сусп} и 5 МЕ/мл_{сусп}, соответственно. Для второго варианта концентрации каждого из ферментов в исходной суспензии составляли 50 МЕ/мл_{сусп}. Представлены средние значения ± SEM для каждого из показателей (n=9 и 10 для первого и второго варианта метода, соответственно).

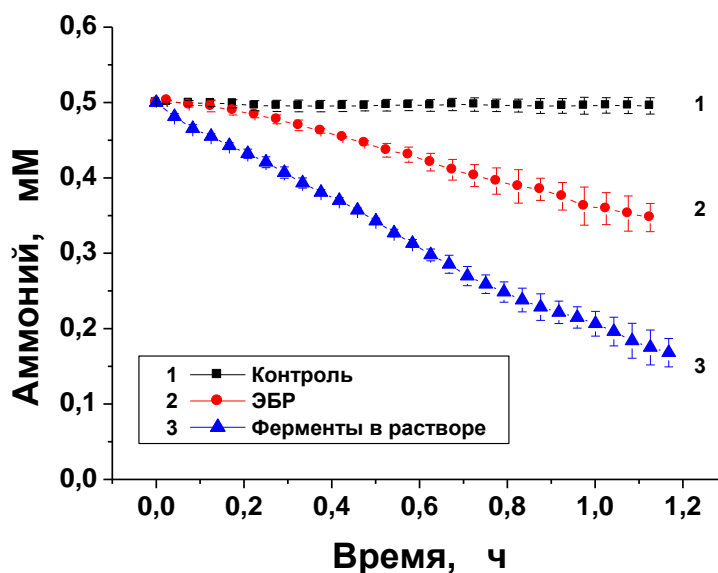


Рисунок 2. Измеренная *in vitro* скорость утилизации аммония ферментной системой ГДГ (из печени быка)+АЛТ. Кривая 1 – контроль. В буферный раствор, содержащий 0,5 мМ аммония, добавлены нативные эритроциты (без включенных ферментов) (n=4). Кривая 2 - в тот же буферный раствор добавлены ЭБР, содержащие ГДГ и АЛТ, финальные активности которых составляли 0,10 и 0,28 МЕ/мл_{образца}, соответственно (Ht суспензии в среднем составлял 9.3%) (n=3). Кривая 3 - раствор смеси ферментов ГДГ и АЛТ был прямо добавлен в буфер, содержащий 0,5 мМ аммония (n=4). Финальные активности в смеси составляли 0,3 МЕ/мл и 1,5 МЕ/мл, для ГДГ и АЛТ соответственно.

Аммоциты из эритроцитов мышей были получены стандартным методом гипоосмотического диализа. Средние активности ГДГ и АЛТ в аммоцитах были равны, соответственно, $1,31 \pm 0,11$ и $1,61 \pm 0,20$ МЕ/мл_{ЭБР} (среднее \pm SEM). Эти аммоциты были введены мышам (по 0,135 мл ЭБР на мышь), после чего животным был введен ацетат аммония в дозе 2,5 ммоль/кг. Полученные результаты представлены на рисунке 3. В качестве контроля использовали животных, которые вместо аммоцитов получали эритроциты, полностью прошедшие все стадии процедуры получения ЭБР, но без включения ферментов (n=12). Так как в опытах были использованы здоровые мыши, введенный ацетат аммония быстро перерабатывался их здоровой печенью даже в отсутствие аммоцитов (рисунок 3, черная кривая (контроль)).

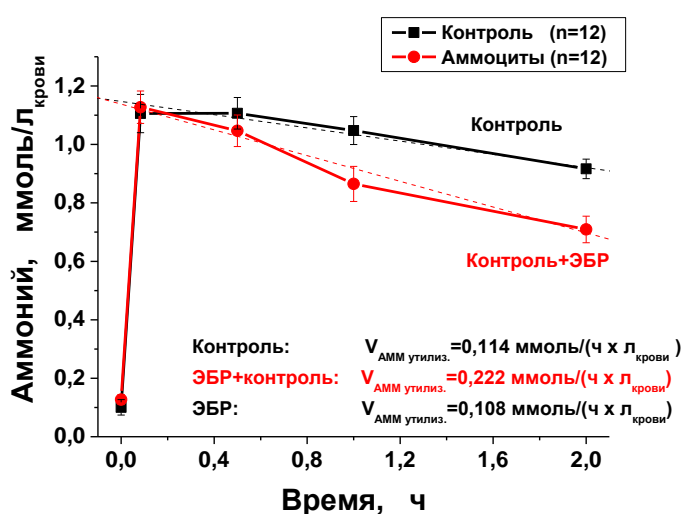


Рисунок 3. Модель индуцированной гипераммониемии на мышах. Изменение концентрации аммония в крови мышей (самцы линии Swiss весом 30 г) с гипераммониемией, которая была индуцирована введением в хвостовую вену ацетата аммония в дозе 2,5 ммоль/кг. Каждое животное (n=12) получило 135 мкл эритроцитов-биореакторов, содержащих ГДГ и АЛТ ($1,31 \pm 0,11$ и $1,61 \pm 0,20$ МЕ/мл_{ЭБР} для ГДГ и АЛТ, соответственно) в физиологическом растворе (общий объем 0,4 мл (красная кривая)). Конечный гематокрит эритроцитов-биореакторов в крови составил примерно 5,4%. В качестве контроля использовали мышей, которые получали эритроциты, прошедшие все этапы процедуры инкапсуляции, но без включения ферментов (n=12) (черная кривая). Для нулевых точек (до введения ацетата аммония) n=4. Приведены средние величины \pm SEM.

При введении аммоцитов (рисунок 3, красная кривая) скорость утилизации аммония ($V_{\text{амм утилиз.}}$) складывается из скорости, которую обеспечивают введенные ЭБР, а также из скорости удаления аммония здоровой печенью этих животных. В результате, сами ЭБР удаляют аммоний из крови мышей со скоростью $0,108$ ммоль/ч \times л_{крови}, или при пересчете на 100% гематокрит, 2 ммоль/ч \times л_{ЭБР}. Эксперименты показали, что ЭБР продолжали работать на протяжении всего периода наблюдения (т.е. в течение двух часов после введения), что отличало их от ЭБР с одним включенным ферментом (глутаминсинтетазой или глутаматдегидрогеназой), описанных ранее в литературе.

Изменение качества ЭБР в процессе хранения

Чтобы оценить насколько сильно клетки повреждаются в процессе гипотонического диализа и последующих манипуляций, были измерены стандартные эритроцитарные индексы исходных эритроцитов и ЭБР, а также кривые их осмотической резистентности. Эти показатели оценивали сразу после получения аммоцитов и в процессе хранения суспензии ЭБР (и исходных эритроцитов) в течение 6-7 дней в специальном растворе при 4°C. Измеряли также активности включенных в ЭБР ферментов и уровень гемолиза в суспензиях исходных и контрольных (прошедших полную процедуру диализа, но в отсутствие ферментов) эритроцитов при хранении.

Полученные результаты показали, что активность загруженных ферментов внутри клеток довольно быстро падала в течение первых двух дней хранения, после чего ее быстрое падение приостанавливалось. За 6 дней хранения активность АЛТ и ГДГ в ЭБР упала в среднем примерно на 24% и 50%, соответственно (рисунок 4а). Средний клеточный объем и средняя концентрация гемоглобина в ЭБР и контрольных эритроцитах были ниже, чем в исходных клетках примерно на 30%. Особенно сильно (~на 45%) снижалось в ЭБР и контрольных эритроцитах среднее содержание гемоглобина в клетках (рисунки 4б, 4г и 4в, соответственно). На величины эритроцитарных индексов не влияли включенные в клетки ферменты. Несмотря на то, что сразу после процедуры эритроцитарные индексы были достаточно сильно снижены, никакого дальнейшего падения этих показателей в процессе хранения ЭБР и контрольных эритроцитов практически не происходило (рисунки 4б-4г).

Вид кривой осмотической резистентности для ЭБР в день их получения достаточно сильно отличался от вида кривой для исходных нативных эритроцитов (рисунок 5а), при этом ЭБР обладали даже несколько большей устойчивостью к низким осмоляльностям, чем суспензия исходных эритроцитов (рисунок 5б). Это согласуется с результатами, полученными в ранее опубликованных работах. После 6 дней хранения обе кривые почти не отличались на уровне 50% гемолиза (рисунок 5).

Чтобы исследовать, насколько процедура включения ферментов в эритроциты может снизить устойчивость клеток и повысить уровень их гемолиза в процессе хранения, был измерен гемолиз в исходных нативных, а также контрольных эритроцитах (прошедших все процедуры диализа, запечатывания и отмывания, но без включения ферментов) на разных сроках хранения и рассчитаны скорости лизиса клеток в каждой из суспензий (рисунок 6). Хотя абсолютные средние значения гемолиза контрольных эритроцитов были несколько выше, чем гемолиз нативных эритроцитов, достоверных отличий между этими значениями не было ни в один из дней хранения, кроме дня 2 (ANOVA, $p < 0,05$). Средняя скорость гемолиза составила 0,12% в день для нативных эритроцитов и 0,19% в день для контрольных диализированных клеток. Это подтверждает, что процесс гипоосмотического диализа хотя и ухудшил несколько состояние клеток, но не привел к их критическим изменениям.

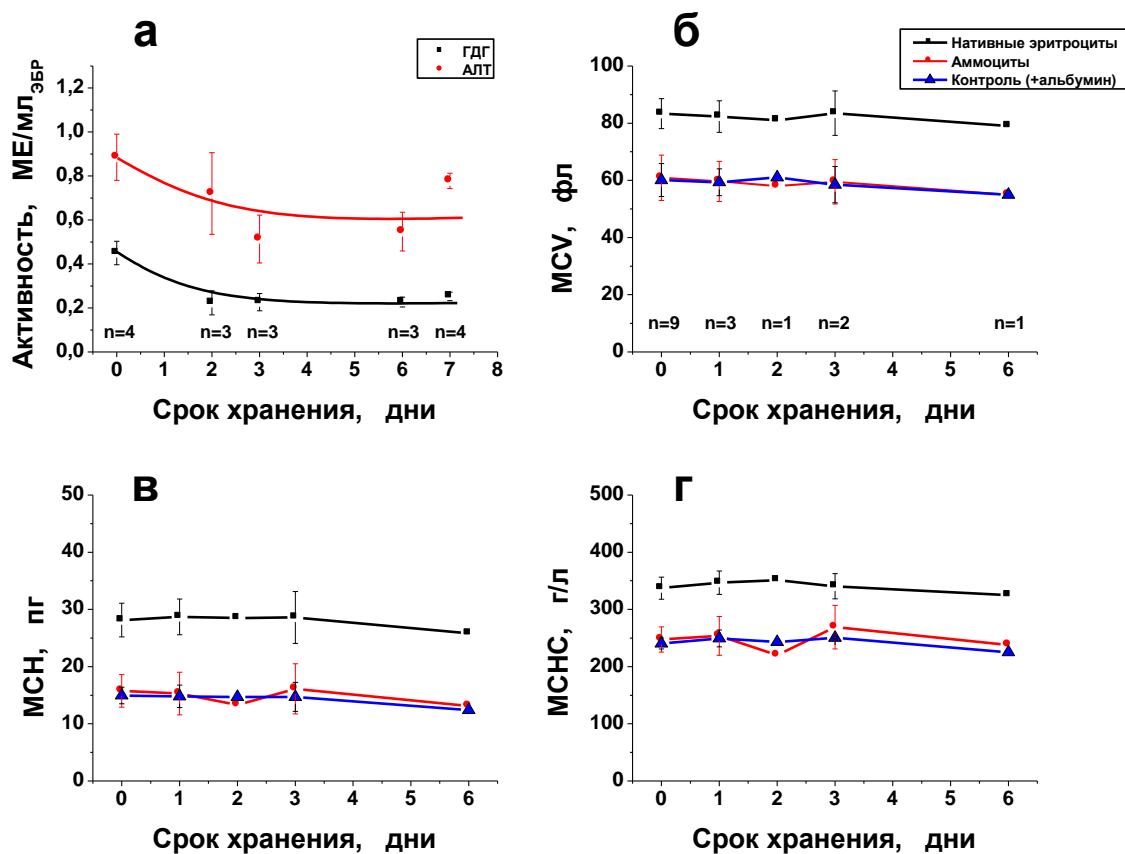


Рисунок 4. Изменение параметров исходных эритроцитов, ЭБР и контрольных эритроцитов в ходе их хранения в суспензии с гематокритом 10% при 4°C. Кроме стандартных компонентов, раствор для хранения содержал аденин (0,28 мМ), глюкозу (10 мМ) и антибиотик ампициллин (0,02 мг/мл). Контрольные эритроциты прошли процедуру гипоосмотического диализа и изоосмотического запечатывания аналогично ЭБР, но в присутствии в среде для диализа 1,1 мМ альбумина вместо ГДГ и АЛТ. (а) – Изменение активности ГДГ и АЛТ в эритроцитах в ходе хранения ЭБР. Представлены средние величины \pm SEM. (б, в и г) – Изменения величин эритроцитарных индексов (среднего объема клетки (MCV, в фл), среднего содержания гемоглобина в клетке (MCH в пг) и средней концентрации гемоглобина в клетке (MCHC, в г/л), соответственно) в ходе хранения суспензий исходных и контрольных эритроцитов, а также ЭБР. Представлены средние величины \pm SD. Величины n указаны на рисунках.

Сравнение эффективности включения ГДГ в эритроциты различными гипоосмотическими методами

Наиболее эффективный метод включения в эритроциты крупных по размеру молекул ГДГ, был выбран при сравнении трех гипоосмотических методов загрузки: обратимого гипоосмотического лизиса (далее – лизис), гипоосмотического диализа в диализных мешках (диализ) и гипоосмотического проточного диализа (далее - проточный диализ). Каждый из методов был исследован при различных осмоляльностях гипоосмотического буфера (рисунок 7).

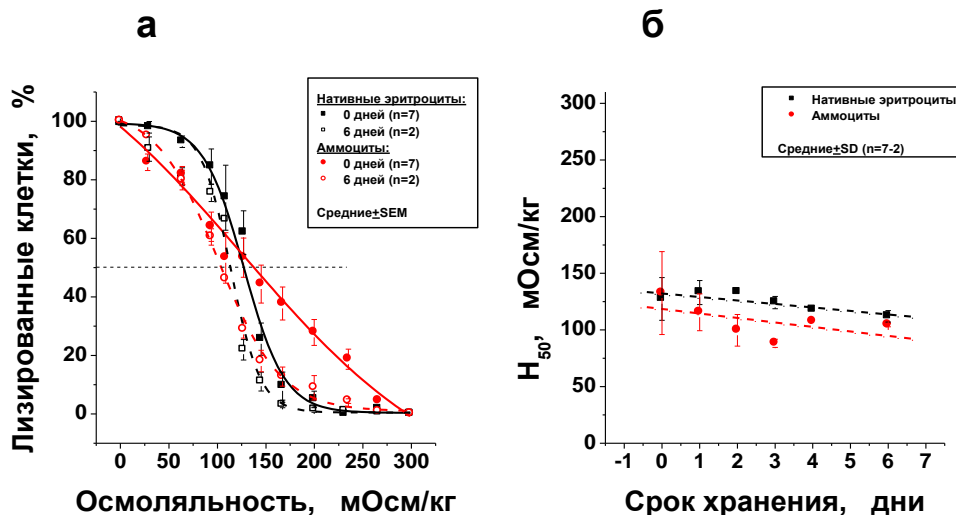


Рисунок 5. Изменение осмотической резистентности нативных эритроцитов и эритроцитов-биореакторов, полученных методом гипоосмотического диализа, в ходе хранения. (а) - Кривые осмотической резистентности нативных эритроцитов, а также ЭБР, содержащих ГДГ и АЛТ, в день проведения процедуры (0 день), а также через 6 дней хранения в суспензии с гематокритом 10% при 4°C. Представлены средние величины ± SEM. (б) - Изменение величин осмоляльности, вызывающей 50% гемолиз (H₅₀) нативных эритроцитов и ЭБР, в ходе хранения (средние величины ± SD). Величины n указаны на рисунке.

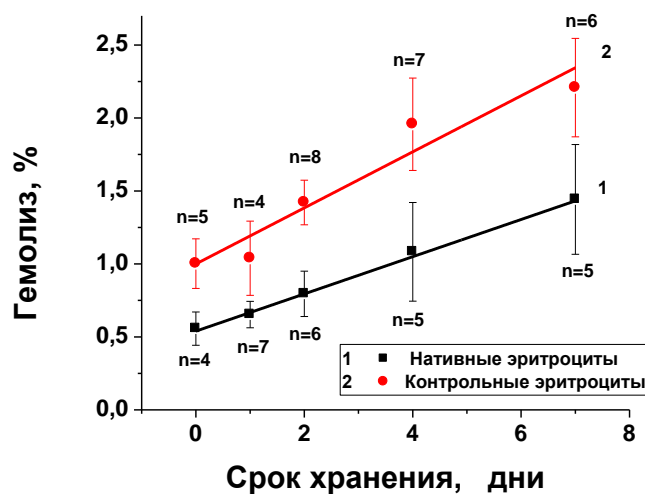


Рисунок 6. Гемолиз нативных эритроцитов (кривая 1) и контрольных эритроцитов, прошедших процедуру гипоосмотического диализа в мешках (вариант диализа 1) (кривая 2), на различных сроках хранения суспензий (Ht 10%, температура 4°C). Представлены средние значения ± SEM. Количество экспериментов указано на графике.

Наибольший процент инкапсуляции ГДГ из печени быка (рисунок 7а), равный $4,70 \pm 0,47$ % (среднее ± SEM, n=9), был достигнут в методе проточного диализа при осмоляльности 100 мОсм/кг. При этом выход клеток (рисунок 7б) при этой осмоляльности также был максимальным и составлял $66,1 \pm 4,0$ % (среднее ± SEM, n=9).

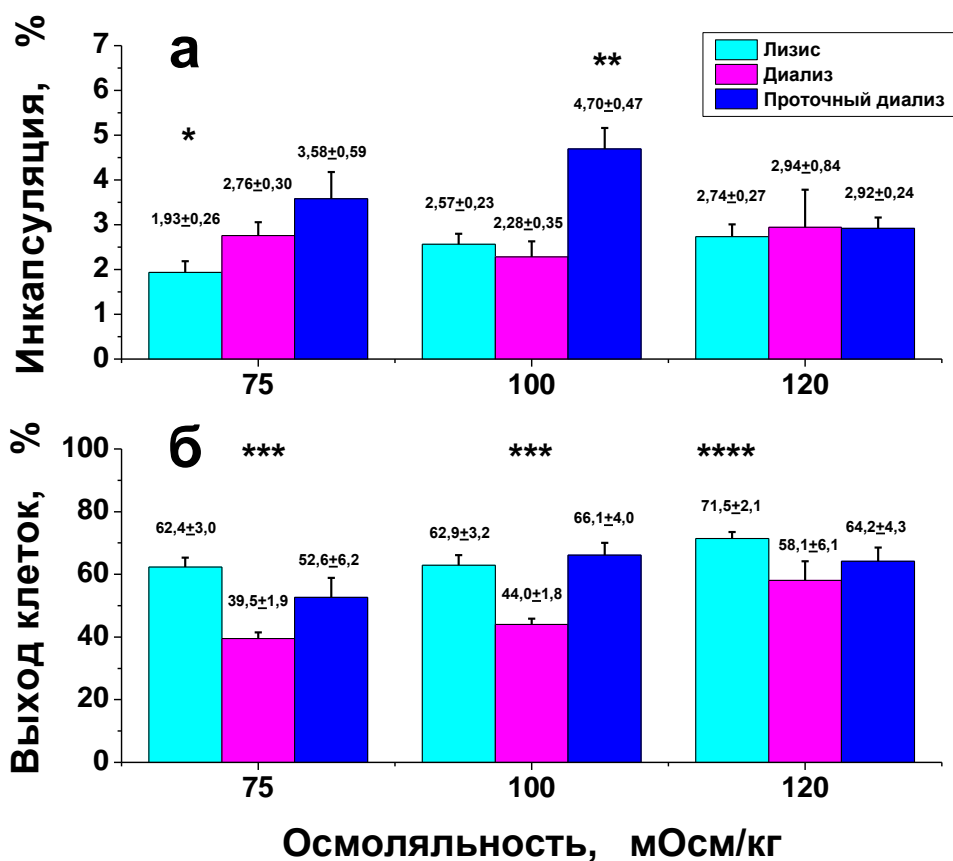


Рисунок 7. Зависимость эффективности инкапсуляции ГДГ из печени быка (а) и выхода эритроцитов (б) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении фермента в эритроциты тремя различными гипоосмотическими методами (лизис, диализ в мешке, проточный диализ). Число экспериментов $n=10$ и $n=7$ для всех осмоляльностей в случае лизиса или диализа, соответственно. Для проточного диализа $n=8$ (при 75 мОсм/кг), $n=9$ (при 100 мОсм/кг) и $n=5$ (при 120 мОсм/кг). Представлены средние значения \pm SEM. * - Процент инкапсуляции достоверно отличался от полученных для метода лизиса при 120 мОсм/кг и для метода проточного диализа при 75 и 100 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$). ** - Значение инкапсуляции достоверно отличалось от всех остальных, кроме полученного для проточного диализа при 75 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$). *** - Выход клеток достоверно отличался от выходов клеток, полученных другими методами при тех же осмоляльностях, и от полученного методом диализа при 120 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$). **** - Выход клеток достоверно отличался от выходов клеток, полученных методом диализа при любых осмоляльностях, методом лизиса при осмоляльностях 75 и 100 мОсм/кг и методом проточного диализа при 75 мОсм/кг (ANOVA, $p<0,05$).

Характеристики ЭБР, полученных разными методами

В качестве параметров, характеризующих свойства ЭБР, полученных разными методами, были выбраны стандартные эритроцитарные индексы (средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в клетке (MCH) и средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)), а также осмотическая резистентность исходных эритроцитов и полученных аммоцитов (рисунки 8 и 9).

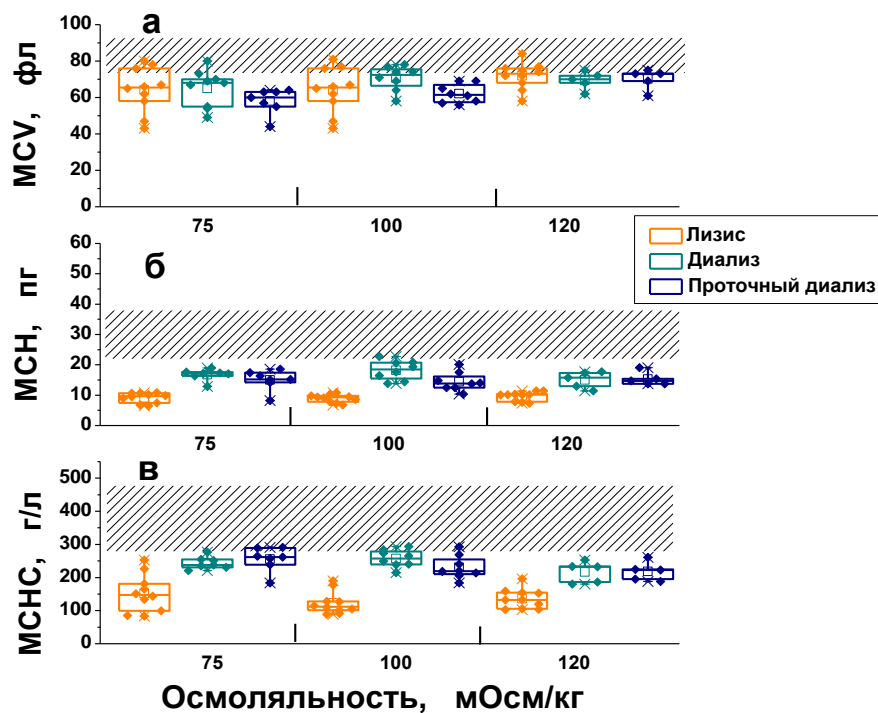


Рисунок 8. Зависимость среднего объема эритроцитов (MCV, фл) (а), среднего содержания гемоглобина (MCH, пг) (б) и средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л) (в) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении ГДГ из печени быка в клетки различными методами. Заштрихованные области соответствуют диапазонам значений для исходных эритроцитов до начала процедуры. Размеры боксов соответствуют области значений, включающей от 25 до 75 перцентилей всех измеренных величин. Для каждого бокса представлены также среднее арифметическое значение (отмечено квадратом), медиана (горизонтальная линия) и разброс между минимальным и максимальным значениями (вертикальные линии).

После диализа и проточного диализа клетки теряли примерно от 30 до 50% своего гемоглобина. И, в отличие от лизиса, в результате диализа и проточного диализа содержание гемоглобина внутри эритроцитов снижалось пропорционально уменьшению объема эритроцитов, поэтому концентрация гемоглобина в эритроцитах при проточном диализе изменялась слабо (не более чем на 15-30%) (рисунок 8). После лизиса было получено незначительное изменение объема эритроцитов и одновременно самое сильное снижение в них содержания гемоглобина по сравнению с аммоцитами, полученными другими методами. Это может говорить о том, что эти эритроциты, хотя и потеряли большую часть своего осмотического материала (гемоглобина), но в ходе процедуры набухли.

Такое поведение может быть связано с неспособностью клеток регулировать свой объем после жестких условий лизиса. Если это так, то отношение площади поверхности к объему у этих эритроцитов должно быть уменьшено, что должно прямо отразиться на них осмотической резистентности. Действительно, у эритроцитов, полученных методом лизиса, осмотическая резистентность оказалась самой низкой (рисунок 9).

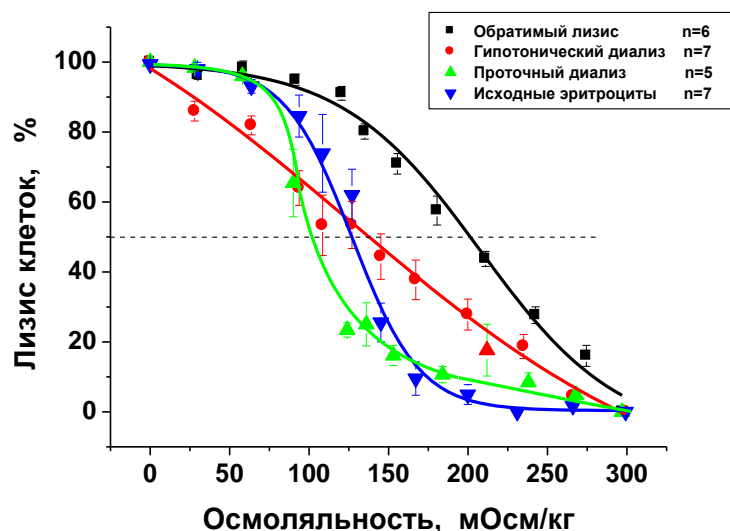


Рисунок 9. Кривые осмотической резистентности исходных эритроцитов и ЭБР, полученных тремя различными методами. Представлены средние значения \pm SEM; n – количество экспериментов.

Кривая их осмотической резистентности сильно сдвинута вправо относительно аналогичной кривой для нативных клеток. Это подтверждает и параметр H_{50} , который численно характеризует осмоляльность буфера, при которой лизирует 50% клеток (таблица 1), у этих аммоцитов он был самый высокий. Половина этих клеток разрушалась при осмоляльности около 200 мОсм/кг, когда нативные эритроциты еще практически не лизировали (рисунок 9). После гипоосмотического диализа аммоциты по параметру H_{50} были близки к исходным клеткам, но становились очень разнородными: кривая осмотической резистентности этих ЭБР стала гораздо более полой (рисунок 9), а ширина распределения аммоцитов по осмотической резистентности (W) после диализа была максимальна среди всех исследованных методов (таблица 1).

Таблица 1. Параметры осмотической резистентности аммоцитов, полученных разными методами¹⁾.

Параметр	Исходные эритроциты	Лизис	Диализ	Проточный диализ
H_{50} ¹⁾	128,4 \pm 13,4 (n=7)	198,2 \pm 4,0 (n=6)	132,5 \pm 13,8 (n=7)	100,6 \pm 6,0 (n=5)
W	35,0 \pm 2,7 (n=7)	171,3 \pm 7,6 (n=6)	183,5 \pm 5,9 (n=7)	101,6 \pm 11,2 (n=5)

¹⁾ H_{50} – осмоляльность буфера, при которой лизирует половина клеток; W – ширина распределения эритроцитов по осмотической резистентности, равная разности осмоляльностей буферов, при которых лизирует 10 и 90% эритроцитов. Представлены средние значения \pm стандартная ошибка среднего. В скобках представлено количество экспериментов (n).

Аммоциты после проточного диализа по параметру H_{50} были даже более осмотически устойчивы, чем исходные клетки (половина клеток была лизирована при снижении осмоляльности буфера на две трети от физиологической (рисунок 9)). Эти клетки имели также минимальную величину W среди всех полученных ЭБР (таблица 1). Таким образом, результаты измерения осмотической резистентности дают косвенное представление о деформируемости полученных ЭБР, и позволяют предполагать, что эритроциты, полученные методом проточного диализа могут быть наиболее деформируемы, в то время как аммоциты, полученные методом лизиса, будут деформироваться хуже, и будут быстро выводиться из кровотока селезенкой.

Микрофотографии исходных нативных и контрольных (прошедших все процедуры, но в присутствии альбумина) эритроцитов, полученные с помощью конфокальной микроскопии, показывают, что для всех использованных методов инкапсуляции ферментов, после гипоосмотического воздействия на эритроциты, гиперосмотического «запечатывания» и последующей отмывки, основная часть клеток возвращает свою исходную двояковогнутую форму (рисунок 10). Эритроциты

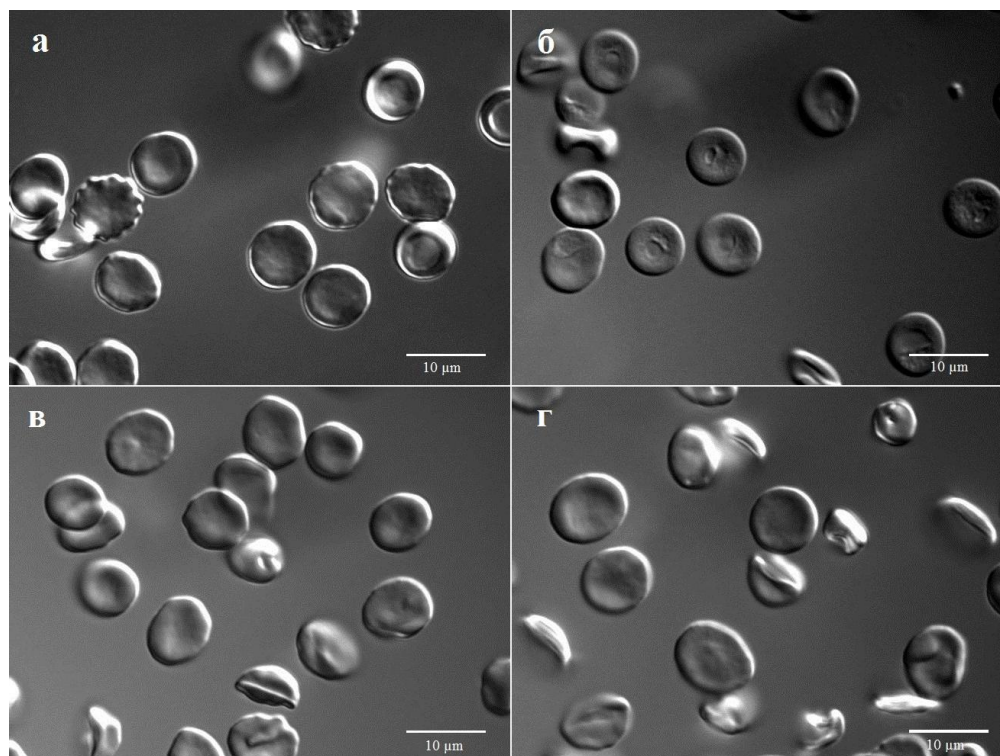


Рисунок 10. Микрофотографии эритроцитов, полученные с помощью конфокальной микроскопии. а – Исходные эритроциты, б – эритроциты после лизиса, в – эритроциты после диализа, г – эритроциты после проточного диализа. Клетки были фиксированы в 2,5% глутаровом альдегиде в PBS (рН 7,4) не менее часа. Фотографии получены с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss, Йена, Германия), иммерсионный объектив 100x, 1,3 NA, камера QuantEm 512sc.

после лизиса имеют на поверхности следы локальных повреждений мембраны (рисунок 10б). Во всех суспензиях присутствует небольшая доля клеток с измененным объёмом и формой.

Сравнение ГДГ из печени быка и *Proteus sp.*

До настоящего времени во всех работах для включения в ЭБР был использован только коммерчески доступный препарат ГДГ из печени быка. Как уже было сказано выше, этот препарат имеет низкую удельную активность (~ 40 МЕ/мг белка) и не может быть использован в суспензии в высокой концентрации, так как агрегирует при концентрациях выше 0,1-0,3 мг/мл. Бактериальная ГДГ из *Proteus sp.* появилась как коммерчески доступный препарат недавно, она обладает высокой удельной активностью (~ 400 МЕ/мг) и по литературным данным, предположительно, не склонна к агрегации. Чтобы исследовать перспективность ГДГ из *Proteus sp.* для создания аммоцитов, было проведено сравнение эффективности включения в клетки этой ГДГ и обычно используемой ГДГ из печени быка (рисунок 11).

Для метода проточного диализа процент инкапсуляции ГДГ из *Proteus sp.* был в 2,6-3,7 раза выше процента инкапсуляции бычьего фермента при осмоляльности буфера в диапазоне 75-120 мОсм/кг (рисунок 11а), в то время как выход клеток в том же диапазоне осмоляльностей достоверно не различался (рисунок 11б).

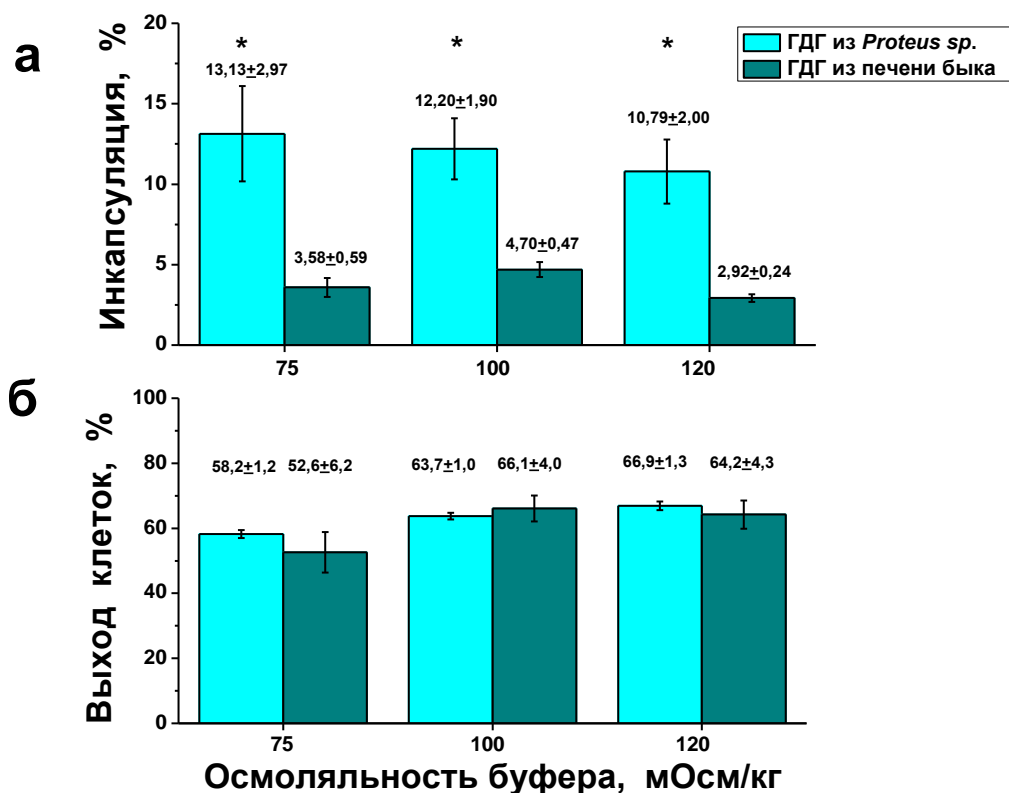


Рисунок 11. Зависимость процента инкапсуляции (а) и выхода клеток (б) от осмоляльности буфера при включении в эритроциты методом проточного диализа ГДГ из *Proteus sp.* (число экспериментов (n) равно 7, 5 и 6 при осмоляльностях буфера 75, 100 и 120 мОсм/кг, соответственно) и из печени быка (n равно 8, 9 и 5 при осмоляльностях буфера 75, 100 и 120 мОсм/кг, соответственно). Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. * - Достоверное отличие между ферментами при одинаковой осмоляльности буфера (ANOVA, $p < 0,05$).

Для обоих ферментов были также исследованы зависимости удельной активности

ГДГ внутри аммоцитов, и процента инкапсуляции фермента от концентрации фермента в исходной суспензии эритроцитов (рисунок 12). Результаты показали, что для ГДГ из печени быка было характерно снижение процента инкапсуляции с ростом концентрации фермента в суспензии, обусловленное, по-видимому, его агрегацией в области концентраций выше 0,1 мг/мл (рисунок 12б), тогда как для ГДГ из *Proteus sp.* процент инкапсуляции с ростом концентрации белка не снижался, а оставался практически неизменным (несмотря на большой экспериментальный разброс результатов) (рисунок 12б).

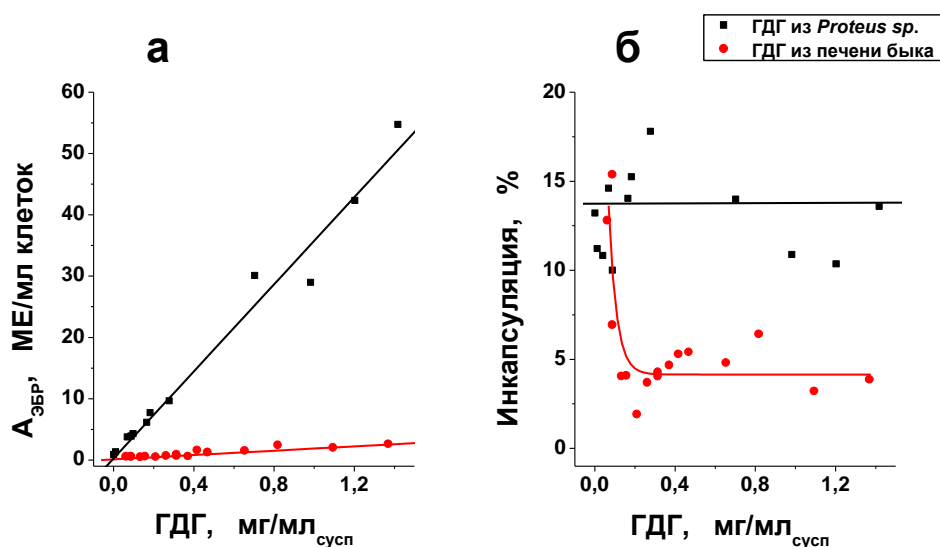


Рисунок 12. Зависимость активности фермента в эритроцитах-биореакторах ($A_{ЭБР}$), измеренной при рН 7,4 (а), и процента инкапсуляции фермента (б) от концентрации фермента в исходной суспензии при включении в эритроциты ГДГ из печени быка ($n=16$) или из *Proteus sp.* ($n=12$).

Таким образом, для ГДГ из печени быка в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,4 мг/мл_{сусп} рост удельной активности фермента в аммоцитах практически не наблюдался. При дальнейшем увеличении концентрации происходил незначительный рост этой активности при сохранении процента инкапсуляции (рисунок 12а). Процент инкапсуляции ГДГ из *Proteus sp.* сохранялся постоянным при увеличении концентрации фермента в исходной суспензии клеток, а удельная активность фермента в аммоцитах увеличивалась прямо пропорционально увеличению этой концентрации (рисунок 12б). Это подтверждает предположение о том, что для этого фермента не характерна агрегация при повышении концентрации, либо она очень слабо выражена. Максимальная полученная активность ГДГ из *Proteus sp.* в эритроцитах при исходной концентрации фермента в суспензии 1,4 мг/мл_{сусп} составила 54,5 МЕ/мл_{ЭБР} (тогда как активность бычьей ГДГ при этой концентрации составляла лишь 2,4 МЕ/мл_{ЭБР}).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе аммоциты, включающие ГДГ и АЛТ, были впервые получены экспериментально. Было показано, что данные ЭБР способны убирать аммоний как из буферной среды *in vitro*, так и из крови мышей с индуцированной гипераммониемией *in vivo*.

Исследование свойств полученных аммоцитов показало, что они не уступают по свойствам ранее описанным ЭБР. Однако основным потребляющим аммоний ферментом в новых аммоцитах, по-прежнему, является ГДГ, для которой ранее не удавалось получать высокие проценты включения. Это связано с тем, что ранее для создания аммоцитов использовали только ГДГ из печени быка, а этот фермент имеет низкую удельную активность и агрегирует при концентрациях выше 0,1-0,3 мг/мл.

Для увеличения активности ГДГ в эритроцитах было проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения ГДГ из печени быка в эритроциты, и выбран достаточно мягкий, но эффективный способ инкапсуляции – метод проточного диализа с использованием диализного патрона. Хотя использование этого метода и позволило увеличить процент инкапсуляции ГДГ в эритроциты, однако это увеличение было небольшим (примерно в 2 раза). Поэтому далее мы попытались повысить активность включенной в эритроцит ГДГ за счет использования фермента из другого источника. В качестве такого фермента была выбрана бактериальная ГДГ из *Proteus sp.* Специфическая активность фермента в этом препарате примерно в 10 раз выше, чем для ГДГ из печени быка. При включении в эритроциты методом проточного диализа фермент давал примерно в 2,6-3,7 раза более высокий процент инкапсуляции по сравнению с ГДГ из печени быка. Основным преимуществом ГДГ из *Proteus sp.* оказалось то, что фермент не агрегировал при повышении концентрации в растворе. Это согласовывалось с общими тенденциями, описанными в литературе для бактериальных ГДГ, но для данного фермента было показано экспериментально впервые. Используя для включения метод проточного диализа, и заменив ГДГ из печени быка на ГДГ из *Proteus sp.*, мы смогли получить в эритроцитах активность ГДГ, более чем в 20 раз превосходящую активность фермента из печени быка, включенного в тех же условиях, что дает возможность в дальнейшем включать в эритроциты терапевтические дозы ГДГ, необходимые в клинике.

ВЫВОДЫ

1. ГДГ и АЛТ могут быть включены в эритроциты методом гипоосмотического диализа. Полученные ЭБР удаляют аммоний как из среды *in vitro*, так и *in vivo* в модели гипераммониемии на мышах. Низкая эффективность включения ГДГ из печени быка в ЭБР (не более $2,20 \pm 0,26\%$) может ограничивать эффективность биореактора.
2. Эритроциты-биореакторы, содержащие ГДГ и АЛТ, полученные методом гипоосмотического диализа, сохраняют хорошее функциональное состояние

- (активность ферментов, загруженных в эритроцит, эритроцитарные индексы и осмотическую резистентность клеток) при хранении в течение, по крайней мере, 1 недели при 4°C. Гемолиз в суспензии клеток при хранении достаточно быстро растет, поэтому, хранившиеся более суток ЭБР подлежат обязательному дополнительному отмыванию перед введением.
3. Систематическое сравнение различных гипоосмотических методов включения ГДГ из печени быка в эритроциты (обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа в диализных мешках и проточного диализа) показало, что оптимальным методом включения больших по размеру молекул ГДГ в эритроциты является метод проточного диализа. Гематологические характеристики эритроцитов и их осмотическая резистентность после проточного диализа меняются меньше, чем после других методов включения.
 4. Использование для включения в эритроциты вместо ГДГ из печени быка бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* увеличивает эффективность инкапсуляции фермента методом проточного диализа от 2,6 до 3,7 раза (для разных осмоляльностей гипоосмотического буфера). При этом удельная активность ГДГ, включенная в клетки, прямо пропорциональна активности фермента в исходной суспензии клеток в широком диапазоне активностей, что указывает на отсутствие агрегации этого белка при повышении концентрации. Эта активность может возрастать более чем в 20 раз по сравнению с активностью бычьей ГДГ при одинаковой исходной концентрации белка 1,4 мг/мл, достигая более 50 МЕ/мл_{ЭБР}, что позволяет надеяться на получение ЭБР с эффективностью, достаточной для клинического применения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Атауллаханов, Ф.И. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? / Ф.И. Атауллаханов, Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, Е.И. Синауридзе, А.М. Зейналов. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – Т. 17. - № 1. – С. 108-116.
2. Кумукова, И.Б. Сравнение лабораторных показателей рентген облученных эритроцитных взвесей и взвесей, полученных из цельной крови, предварительно обработанной ультрафиолетом в присутствии рибофлавина. / И.Б. Кумукова, П.Е. Трахтман, Н.Н. Старостин, Д.В. Борсакова, А.А. Игнатова, А.Ю. Федотов, М.Е. Плахотник, Ф.И. Атауллаханов. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – Т. 17. - № 1. - С. 64-74.
3. Борсакова, Д.В. Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты. / Д.В. Борсакова, М.Е. Плахотник, Л.Д. Колева, Е.А. Бовт, Ю.Г. Александрович, Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе. // Онкогематология. – 2018. – Т. 13. – № 3. – С. 91-101.

4. Борсакова, Д.В. L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств. / Д.В. Борсакова, Е.И. Синауридзе // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. - Т. 17. - № 4. – С. 80-97.
5. Protasov, E.S. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood. / E.S. Protasov, D.V. Borsakova, Y.G. Alexandrovich, A.V. Korotkov, E.A. Kosenko, A.A. Butylin, F.I. Ataullakhanov, E.I. Sinauridze. // Scientific Reports. – 2019. – Т. 9. – № 1455. – P. 1-16.
6. Trakhtman, P.V. The pathogen-reduced red blood cell suspension: single center study of clinical safety and efficacy in children with oncological and hematological diseases. / P. Trakhtman, I. Kumukova, N. Starostin, D. Borsakova, D. Balashov, A. Ignatova, L. Kadaeva, G. Novichkova, A. Rumiantsev. Vox Sanguinis. – 2019. – V. 114. - № 3. – P. 223-231.
7. Борсакова, Д.В. Способы повышения активности глутаматдегидрогеназы в эритроцитах-биореакторах для удаления аммония. / Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, С.В. Назаренко, Ю.Г. Александрович, А.А. Бутылин, Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе. // Биологические мембраны. – 2019. – Т. 36. - № 3. – С. 192–206.

Публикации в трудах конференций и съездов:

1. Борсакова, Д.В. Использование эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов. / Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, Ю.Г. Александрович, Т.А. Вуймо, Е.И. Синауридзе, Ф.И. Атауллаханов. // Сборник тезисов II национального конгресса по регенеративной медицине, 3-5 декабря 2015, Москва, М.: МЕДИ Экспо, – С. 28.
2. Borsakova, D.V. The development of a medical device for L-asparaginase loading into red blood cells. / D.V. Borsakova, E.I. Sinauridze, E.S. Protasov, F.I. Ataullakhanov. // The Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 10th SIOP Asia Congress, 25-28 May 2016, Moscow. Abstracts – P. 26.
3. Borsakova, D.V. Erythrocytes as bioreactors for blood ammonia removal. / D.V. Borsakova, E.S. Protasov, Y.G. Alexandrovich, A.A. Butylin, F.I. Ataullakhanov, E.I. Sinauridze. // Book of Abstracts of International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy, 16-18 November 2017, Barcelona, Spain. – P. 31.
4. Protasov, E.S. Analysis of different erythrocytes-bioreactors for decreasing of an excess ammonia concentration in patient blood. / E.S. Protasov, D.V. Borsakova, A.A. Butylin, F. I. Ataullakhanov, E.I. Sinauridze. // Book of Abstracts of International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy, 16-18 November 2017, Barcelona, Spain. – P. 30.
5. Борсакова, Д.В. Эритроцит как лекарственная форма: возможности клинического применения. / Д.В. Борсакова. // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина» 15-17 декабря 2017, Орёл. – С. 15-18.
6. Kumukova, I. Comparison of laboratory parameters of pathogen reduced and irradiated RBC suspension. / I. Kumukova, P. Trakhtman, N. Starostin, D. Borsakova, A. Ignatova, M. Cardoso. // Abstract of the 35th International Congress of the ISBT (Post. 296), 2-6 June 2018, Toronto, Canada. Vox Sanguinis. 2018. – V. 113. (Suppl. 1). - P. 173-174.