



**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской
академии наук
(ЦТП ФХФ РАН)**

**«19» марта 2019 г. Москва, 119991, ул. Косыгина 4, т. 938-25-33
исх. № 1903/3**



УТВЕРЖДАЮ

**ВРИО Директора ЦТП ФХФ РАН,
д.ф.-м.н., проф. РАН М.А.Пантелеев**

**«19» марта 2019 г.
М.П.**

**ВЫПИСКА
ИЗ ПРОТОКОЛА ЗАСЕДАНИЯ
УЧЕНОГО СОВЕТА ЦТП ФХФ РАН**

От "19" марта 2019 г. № 4

**Председатель: д.ф.-м.н. Пантелеев Михаил Александрович
Ученый секретарь совета: к.б.н. Кольцова Екатерина Михайловна**

ПОВЕСТКА ДНЯ

Обсуждение диссертационной работы Борсаковой Дарьи Валерьевны «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ПРИСУТСТВОВАЛИ:

Члены Ученого совета Центра в количестве 18 человек из 20, входящих в состав Ученого совета (более 2/3 членов Ученого совета):

СЛУШАЛИ:

Доклад по диссертационной работе Борсаковой Дарьи Валериевны «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Вопросы, заданные докладчику:

К.б.н. Подоплелова Надежда: Вы рассказываете о снижении гематологических показателей биореакторов по сравнению с нативными эритроцитами, а что означает это снижение? ...

Д.В.Борсакова: Снижение гематологических показателей может влиять на срок циркуляции эритроцитов в крови. В ходе процедуры диализа клетки теряют гемоглобин и уменьшаются в объеме. Такое снижение неизбежно в процессе диализа и полученные показатели согласуются с другими работами, в которых получали эритроциты-биореакторы.

К.б.н. Кольцова Екатерина: На слайде №12 гемолиз суспензии эритроцитов-биореакторов в процессе хранения растёт? Не продолжится ли гемолиз после переливания таких эритроцитов пациенту?

Д.В.Борсакова: Да, на слайде №12 представлен рост гемолиза в суспензии в процессе хранения *in vitro* в специальном буферном растворе. Результаты исследования гемолиза помогают оценить срок возможного хранения суспензии перед переливанием, но некорректно оценивать поведение эритроцитов в среде *in vivo* по этим результатам. Как известно из литературы, эритроциты со схожими гематологическими показателями, циркулировали в кровотоке до 3х недель без признаков значительного гемолиза.

Д.ф.-м.н М.А.Пантелеев: пожелания по докладу и презентации: у вас в презентации фигурируют такие показатели, как процент лизированных клеток, процент гемолиза и процент выживших клеток. Необходимо более подробно объяснить, чем они отличаются друг от друга.

Д.В.Борсакова: Спасибо за замечания, так и сделаю.

ВЫСТУПИЛИ:

Рецензент к.ф.-м.н. Кузнецова С.А. сообщила, что работа является завершённым научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на достаточно высоком научном и методическом уровне. Полученные результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы.

Работа базируется на достаточном числе исходных данных и экспериментальных материалах, написана доходчивым и, вместе с тем, профессиональным языком.

Рецензент к.б.н. Липец Е.Н. отметила, что диссертационная работа является законченным научным трудом и может быть представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «биофизика».

Д.б.н. Синауридзе Е.И. сообщила, что молодой специалист Борсакова Дарья Валерьевна участвовал в международных и отечественных конференциях, имеет публикации в рецензируемых журналах и является перспективным молодым ученым. Борсакова Д.В. полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к соискателям ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Открытым голосованием единогласно принято решение рекомендовать кандидатуру Борсаковой Д.В. на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

ПОСТАНОВИЛИ:

1. Утвердить Заключение ЦТП ФХФ РАН по диссертационной работе Д.В. Борсаковой (прилагается).
2. Рекомендовать работу Борсаковой Дарьи Валерьевны к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика на диссертационном совете Д 002.039.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук.

Председатель Ученого Совета,
д.ф.-м.н., профессор РАН

Пантелеев М.А.

Ученый секретарь
Центра теоретических проблем
физико-химической фармакологии РАН,
кандидат биологических наук, к.б.н.




Кольцова Е.М.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии
наук
(ЦТП ФХФ РАН)

«19» марта 2019 г. Москва, 119991, ул. Косыгина 4, т. 938-25-33
исх. № 1903/1

УТВЕРЖДАЮ
ВРИО Директора ЦТП ФХФ РАН,
М.А. Пантелеев
2019 г.
М.П.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской
академии наук

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 –
биофизика.

Диссертация «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» выполнена Борсаковой Дарьей Валериевной в лаборатории физиологии и биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН). В период подготовки диссертации соискатель Борсакова Дарья Валериевна проходила обучение в очной аспирантуре Российской академии наук с 01.06.2013 по 31.05.2017.

В 2013 г. окончила Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева по специальности «Химическая технология синтетических биологически активных веществ».

Удостоверение № 1 о сдаче кандидатских экзаменов «история и философия науки», «иностранный язык (английский)» и «биофизика» выдано 7.03.2016 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Научный руководитель: Синауридзе Елена Ивановна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией физиологии и биофизики клетки ЦТП ФХФ РАН. Научный руководитель утвержден приказом № 107А ЦТП ФХФ РАН «09» октября 2017г. Тема диссертационной работы утверждена решением Ученого совета ЦТП ФХФ РАН от 10.11.2013 г., Протокол № 7.

По результатам рассмотрения диссертации “Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока” принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы

Диссертация Борсаковой Д.В. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов исследований разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для биофизики и медицины. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Актуальность темы

Использование эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов показывает значительные фармакологические преимущества: позволяет снизить кардиотоксичность антрациклиновых антибиотиков, иммунный ответ на L-аспарагиназу, увеличить время циркуляции препаратов. 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, 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.

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.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Все работы по получению эритроцитов-биореакторов, измерению активности ферментов, исследованию функциональной активности ЭБР *in vitro*, исследованию характеристик полученных эритроцитов, систематическое сравнение методов получения эритроцитов, 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 гипергаммониемии на мышах были проведены в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино д.б.н. Еленой Александровной Косенко и статистически обработаны автором.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

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

Практическая значимость работы

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.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Работа соответствует специальности 03.01.02 – биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах Борсаковой Д.В., из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и тезисы 6 докладов на российских и международных конференциях.

Диссертационная работа Борсаковой Д.В. удовлетворяет требованиям, установленным п. 14 (об отсутствии заимствований без ссылок на источник и авторов) "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в ред. Постановления Правительства РФ от 01.10.2018 г. № 1168).

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях и съездах:

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).

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. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze. // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – № 1455. – P. 1-16.
6. Trakhtman, P.B. 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. - Early view. DOI: 10.1111/vox.12757.
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. 1–14.

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. Ataulakhanov. // The Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 10th SIOP Asia Congress, 25-28 May 2016, Moscow. Abstracts – С. 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. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze. // Book of abstracts of International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy, 16-18 November 2017, Barcelona, Spain. – С. 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. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze. // Book of abstracts of International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy, 16-18 November 2017, Barcelona, Spain. – С. 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, 2-6 June 2018, Toronto, Canada. Vox Sanguinis. 2018. – V. 113. (Suppl. 1). - P. 173-174.

Диссертация «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» Борсаковой Дарьи Валериевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Заключение принято на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН. На заседании присутствовали члены Ученого совета Центра в количестве 18 человек из 20, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра. Заключение принято единогласно, протокол № 4 от 19 марта 2019 г.

Ученый секретарь
Центра теоретических проблем
физико-химической фармакологии РАН,
к.б.н.



Копьцова Е.М.