

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.039.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ.
Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 06.11.2019 г., протокол №9

О присуждении Борсаковой Дарье Валериевне, гражданину Российской Федерации, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» по специальности 03.01.02 – биофизика принята к защите 05 июня 2019 года, протокол №6, диссертационным советом Д 002.039.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук по адресу: 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4; приказ Министерства образования и науки 105/нк от 11 апреля 2012 года.

Соискатель – Борсакова Дарья Валериевна, 1990 года рождения, в 2013 году окончила Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева по направлению «Химическая технология синтетических биологически активных веществ». С 01 июня 2013 г. по 31 мая 2017 г. обучалась очно в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук по специальности 03.01.02 – биофизика. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Диссертация выполнена в лаборатории физиологии и биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук **Синауридзе Елена Ивановна**, заведующий лабораторией биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Официальные оппоненты:

Миндукшев Игорь Викторович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии дыхания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института 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 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своём положительном заключении, подписанном заведующей кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, доктором биологических наук Сипливой Любовью Евгеньевной и утвержденном ректором Университета, доктором медицинских наук Лазаренко Виктором Анатольевичем, указала, что диссертация Борсаковой Д.В. обладает научной новизной, а тема диссертации является актуальной. Ведущая

организация отмечает, что автор провёл качественную и объёмную исследовательскую работу, результаты которой могут найти применение в медицинской практике, поэтому научно-практическая значимость работы не вызывает сомнений. Отмечается, что интерпретация данных исследований и построение выводов подчиняется логике и не противоречит современным представлениям о закономерностях биофизических процессов. В отзыве отмечено, что диссертация Борсаковой Д.В. полностью удовлетворяет требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018 г. №1168, а её автор, Борсакова Дарья Валериевна, заслуживает присвоения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, все по теме диссертации, из них 7 статей, опубликованных в рецензируемых российских и международных научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и тезисы 6 докладов на российских и международных конференциях.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. 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. – Т. 9. – № 1455. – P. 1-16.
2. **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.
3. 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. Rumiantcev. Vox Sanguinis. – 2019. – V. 114. - № 3. – P. 223-231.

На автореферат поступило 4 положительных отзыва: **1)** в отзыве к.ф.-м.н. Дынника Владимира Владимировича, ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук отмечено, что в качестве пожелания можно было бы назвать включение в автореферат более подробного рассмотрения вопроса о выборе ферментной системы для включения в эритроциты; **2)** отзыв д.фарм.н. Тринеевой Ольги Валерьевны, доцента кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» без замечаний; **3)** в отзыве д.х.н. Ходонова Андрея Александровича, старшего научного сотрудника лаборатории кинетики и механизмов ферментативных и каталитических реакций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук в качестве замечания отмечено, что в выводах автореферата следовало бы показать, какие исследования сделаны впервые, а какие представляют собой новую модификацию уже известных методов; **4)** отзыв к.б.н. Захаровой Натальи Владимировны, старшего научного сотрудника лаборатории масс-спектропии биомакромолекул Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук без замечаний.

В отзывах отмечено, что актуальность темы диссертации не вызывает сомнений, полученные результаты имеют важное научное и практическое значение для развития исследований в области биофизики, молекулярной биологии и медицины, результаты работы свидетельствуют о перспективности разработанных биореакторов для удаления аммония из кровотока. Результаты и выводы работы соответствуют поставленным задачам, достоверны и не вызывают сомнений. В качестве достоинств работы отмечается, что разработки автора могут найти практическое применение в медицине.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован их специализацией по проблематике настоящей диссертационной работы и достижениями в области разработки и исследования эритроцитов-носителей лекарственных препаратов, морфологии эритроцитов, транспорта аммония и других соединений через мембрану эритроцита, а также наличием публикаций в соответствующей сфере исследования и способностью оценить научную и практическую значимость диссертации. Оппонент д.б.н., профессор Миндукшев И.В. является ведущим специалистом в области внутриклеточной и межклеточной сигнализации клеток крови (эритроциты и тромбоциты). Он является разработчиком новой технологии клеточного анализа в кинетических исследованиях, основанной на использовании малоуглового светорассеяния. Оппонент д.б.н. Миль Е.М. является ведущим специалистом в области исследования эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии, действия различных биологически активных веществ на эритроциты и белки эритроцитных мембран. Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации является одной из ведущих научно-исследовательских организаций России в области разработки эритроцитов-носителей лекарственных препаратов и исследования клеточных (эритроцитных) форм антибиотиков, в том числе исследований *in vivo* на животных с моделями различных заболеваний.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая экспериментальная методика создания эритроцитов-биореакторов, предназначенных для удаления аммония из крови, основанная на включении в эритроцит двух ферментов – глутаматдегидрогеназы из печени быка и аланинаминотрансферазы из свиного сердца, которая позволяет заметно повысить эффективность эритроцитов-биореакторов, удаляющих аммоний, по сравнению с реакторами, ранее описанными в литературе;

предложены: а) наиболее эффективный и щадящий эритроциты метод проточного диализа для включения ферментов внутрь клеток, б) использование в эритроцитах-биореакторах глутаматдегидрогеназы из другого источника – *Proteus sp.*, позволяющее повысить внутриклеточную активность фермента;

доказана перспективность нового биореактора на основе двух ферментов – глутаматдегидрогеназы из *Proteus sp.* и аланинаминотрансферазы из свиного сердца для применения в клинической практике при лечении гипераммонемии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны преимущества использования разработанного нового эритроцит-биореактора, включающего 2 фермента – глутаматдегидрогеназу и аланинаминотрансферазу, которые заключаются в более высокой эффективности нового реактора и способности работать в 2 раза дольше по сравнению с известным биореактором, содержащим только глутаматдегидрогеназу;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных методов исследования свойств эритроцитов, таких как спектрофотометрия в УФ и видимой области, конфокальная микроскопия, биохимические методы анализа активности ферментов, а также комплекс гипоосмотических методов включения ферментов в эритроциты;

изложены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что ферменты глутаматдегидрогеназа и аланинаминотрансфераза могут быть включены в эритроцит методом гипоосмотического диализа; показано, что разработанные биореакторы способны удалять аммоний из раствора (в среде *in vitro*), а также из кровотока мышей с индуцированной гипераммонемией (в модели *in vivo*);

раскрыты закономерности включения в эритроциты фермента глутаматдегидрогеназы из печени быка и из *Proteus sp.* в зависимости от исходной концентрации этих ферментов, а именно, снижение процента включения глутаматдегидрогеназы из печени быка в эритроциты с увеличением исходной концентрации фермента в суспензии эритроцитов связано с его

агрегацией, в то время как увеличение исходной концентрации в суспензии глутаматдегидрогеназы из *Proteus sp.* приводит к прямо пропорциональному увеличению удельной активности фермента в эритроцитах, что свидетельствует об отсутствии агрегации фермента из *Proteus sp.*;

изучены изменения ключевых свойств эритроцитов после включения в них ферментов различными гипоосмотическими методами по сравнению со свойствами нативных эритроцитов: осмотическая хрупкость клеток, средние показатели объема эритроцита и концентрации в нем гемоглобина, форма эритроцитов; изменение эритроцитных показателей, степени гемолиза и активности, включенных в эритроциты ферментов в процессе хранения эритроцитов (7 дней при 4°C) даёт представление о возможности и сроках хранения таких эритроцитов-биореакторов;

проведена модернизация метода проточного–диализа, позволившая создать диализатор малого объема, что приводит к заметному сокращению расходов дорогостоящих реактивов при проведении исследований;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны биореакторы на основе эритроцитов, способные более эффективно удалять аммоний из кровотока;

определены оптимальные условия получения разработанных биореакторов, в наименьшей степени повреждающие клетки и позволяющие эффективно включать наибольшее количество фермента глутаматдегидрогеназы внутрь эритроцита;

представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности включать в эритроциты ферменты для удаления аммония, в количествах, достаточных для дальнейшего клинического применения этих эритроцитов-биореакторов.

Оценка достоверности результатов выявила:

научные положения, выводы и результаты, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы экспериментальными данными, достоверны и получили

признание в научной литературе и на различных конференциях; использовано высокотехнологичное оборудование с применением стандартизированных методик и всех необходимых калибровок; надёжность результатов исследований обусловлена многократным повторением ряда независимых испытаний и статистической обработкой полученных результатов; показана воспроизводимость результатов исследования при различных постановках эксперимента;

теория опирается на известные литературные данные о биофизических процессах, протекающих в эритроците во время включения в него ферментов гипоосмотическими методами и согласуется с ранее опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе работы полученных ранее биореакторов для удаления аммония на основе эритроцитов и обобщении передового опыта в области создания эритроцитов-биореакторов;

использованы авторские результаты, которые были сравнены с ранее опубликованными в научной литературе данными по рассматриваемой тематике;

установлено, что полученные автором результаты хорошо согласуются с представленными в независимых источниках данными по теме разработки эритроцитов-биореакторов, направленных на удаление аммония из кровотока;

использованы современные методики сбора и статистической обработки научных данных с обоснованием выбора объектов и методов исследования.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах работы, в том числе, в анализе литературных данных, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, формулировании положений и выводов, а также подготовке статей к опубликованию и представлении результатов на научных конференциях.

Диссертация Борсаковой Д.В. «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» представляет собой

Теперь нам предстоит проголосовать и утвердить протокол счетной комиссии. Кто за то, чтобы утвердить результаты? Кто против? Нет. Воздержавшиеся? Нет. Принято единогласно.

Нам предстоит принять заключение по диссертации. Есть ли какие-то замечания по проекту заключения?

Д.х.н., проф. И.Н. Курочкин:

На пятой странице написано “предложены оригинальные научные суждения”. Мне кажется, уместнее было бы указать “предложена и обоснована гипотеза”. Мне кажется – это более корректно.

Д.х.н. А.В. Трофимов:

Я, абсолютно, согласен. Еще есть замечания, предложения? Если нет, то предлагаю принять с той поправкой, которую предложил Илья Николаевич. Кто «за»? Кто «против»? Нет! Кто воздержался? Нет! Принято единогласно. На этом наше заседание окончено, можно поздравить соискателя, спасибо!

Зам. председателя
диссертационного совета,
доктор химических наук

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук




А.В. Трофимов


Л.И. Мазалецкая