



УТВЕРЖДАЮ

Ректор Федерального государственного

федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования

бюджетного образовательного учреждения

**«КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

высшего образования «Курский государственный

Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России)

медицинский университет» Министерства

здравоохранения Российской Федерации, д.м.н.,

проф.  Лазаренко Виктор Анатольевич

ул. К. Маркса, 3, г. Курск, 305041,  
тел./факс: (4712) 58-81-37

<https://kurskmed.com> e-mail: [kurskmed@mail.ru](mailto:kurskmed@mail.ru)



№ \_\_\_\_\_

На № \_\_\_\_\_

от \_\_\_\_\_

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Борсаковой Дарьи Валериевны «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.02 – биофизика

Эритроциты в качестве контейнеров для лекарственных препаратов нашли широкое применение в разных областях медицины. При сравнении с липосомами, полимерными частицами и другими видами искусственных носителей, собственные клетки организма являются наиболее выгодными с точки зрения биологической совместимости. Клеточная форма препаратов на основе эритроцитов активно исследуется как система доставки антибиотиков различных классов и назначений, которая снижает токсичность антибиотиков, может направленно создавать высокие концентрации препарата в зоне, охваченной патологическим процессом, при этом снижаются побочные реакции и кратность введения препарата. Использование эритроцитов, нагруженных ферментами, работающих как клетки-биореакторы, также находит своё применение в медицине, где есть запрос на неиммуногенную ферментотерапию. Работа Дарьи Валериевны Борсаковой посвящена разработке эритроцитов-биореакторов для удаления из кровотока пациентов избыточного аммония. Тема работы несомненно является актуальной, так как избыток аммония вызывает сильную нейротоксичность.

Предварительные теоретические исследования показали, что наиболее перспективной системой для создания эритроцитов-биореакторов, способных убирать из среды аммиак, является система из двух ферментов - глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы. Целью представленной работы было экспериментальное получение таких биореакторов и анализ факторов, которые влияют на эффективность их работы. Для достижения поставленной цели в работе было решено несколько задач. Во-первых, эритроциты-

биореакторы, содержащие одновременно глутаматдегидрогеназу (из печени быка) и аланинаминотрансферазу были получены экспериментально методом обратимого гипоосмотического диализа. Было показано, что такие биореакторы способны удалять аммоний как из среды *in vitro*, так и *in vivo* на модели мышей с гипераммонемией. Параллельно было изучено, как характеристики полученных эритроцитов-биореакторов изменялись в процессе их хранения. Таким образом, созданные биореакторы способны были выполнять поставленную перед ними задачу. Тем не менее, эффективность этих биореакторов оставалась достаточно низкой, так как степень включения одного из использованных ферментов – глутаматдегидрогеназы была очень небольшой. Второй блок задач, которые были поставлены в данной диссертации, был посвящен исследованию того, как можно увеличить активность включенной в эритроциты глутаматдегидрогеназы и повысить в результате эффективность созданных биореакторов. Были проведены исследования для выбора наиболее оптимальных условий и метода включения ферментов в эритроциты, а также исследовано включение в эритроциты глутаматдегидрогеназы из другого источника – бактериальной глутаматдегидрогеназы из *Proteus species*. Результатом проведенных исследований было увеличение удельной активности включенной в эритроциты глутаматдегидрогеназы более, чем в 20 раз.

Диссертация состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 207 источников, а также содержит список сокращений и обозначений.

Первая глава посвящена литературному обзору темы исследования. Обзор получился достаточно объемным. В нём очень подробно исследованы такие вопросы, как физиология эритроцита, процессы, происходящие во время гипоосмотического стресса эритроцита, описаны различные методы включения веществ в эритроциты, а также уделено внимание проблеме гипераммонемии, на решение которой направлено исследование. Приведены сведения о ферментах, которые использовались в данной работе для включения в эритроциты.

Вторая глава посвящена постановке задачи. В этой главе описаны предпосылки для создания эритроцитов-биореакторов на основе двух выбранных ферментов. Приведены основные выводы из теоретического анализа, сделанного коллективом авторов ранее, в которых обосновывается выбор для включения тандема ферментов глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы. Обосновываются пути решения поставленной задачи увеличения эффективности предложенных биореакторов.

Третья глава посвящена материалам и методам исследования. В ней представлен список использованных в работе реагентов, описаны методики измерения активности

ферментов, приведен перечень приборов, на которых производились измерения и описаны методики определения различных эритроцитных показателей, таких как эритроцитарные индексы, осмотическая резистентность, доля свободного гемоглобина т.д. Приведено описание индукции гипераммонемии у мышей и исследования функциональной активности эритроцитов-биореакторов *in vivo*.

В четвертой главе представлены результаты исследования и их обсуждение. Все полученные в работе данные хорошо проиллюстрированы (графиками и таблицами). Проведен их подробный анализ. В конце каждого раздела этой главы приведены промежуточные выводы. Общее заключение выделено в отдельный раздел, где автор обобщает результаты и говорит о применимости полученных эритроцитов-биореакторов в дальнейшей медицинской практике. В заключении приведены также результаты математического расчёта возможной скорости переработки аммония полученными биореакторами в кровотоке человека.

Работа Дарьи Валериевны безусловно обладает научной новизной. Предложенный биореактор на основе двух ферментов был получен впервые. Автором впервые прямо показано, что бактериальная глутаматдегидрогеназа, в отличие от фермента из печени быка, не агрегирует при повышении ее концентрации и включается в эритроциты прямо пропорционально концентрации белка в растворе. Научно-практическая значимость этой работы также не вызывает сомнений. Вся она посвящена тому, чтобы приблизиться к применению таких эритроцитов-биореакторов в клинической практике, и по представленным результатам видно, что автором сделаны важные шаги в сторону клинического применения.

Представленные результаты достоверны, так как подтверждены исследованиями с помощью различных современных методов и статистической обработкой. Интерпретация данных и построение выводов на их основе подчиняются логике и не противоречат современным представлениям о закономерностях биофизических процессов.

Таким образом, можно сказать, что автор провёл качественную, объемную исследовательскую работу по актуальной на сегодняшний день теме, результаты которой могут найти применение в медицинской практике. Тем не менее, стоит отметить и ряд недостатков и замечаний. В качестве замечаний можно отметить следующие:

1. В первом разделе литературного обзора на стр. 12 говорится о том, что 1 г гемоглобина может связать примерно 1,34 мл кислорода, однако соответствующая ссылка на литературный источник отсутствует.
2. На стр. 15 автор пишет "... вода из внешней среды начинает поступать внутрь, чтобы скомпенсировать разность осмотического давления внутри и снаружи мембраны, возникающую из-за того, что внутри клетки присутствует в высокой

концентрации (~ 5 мМ) белок гемоглобин". Это утверждение, строго говоря, не совсем верно, так как разность осмотического давления создается не только за счет избытка концентрации белков внутри эритроцита, но и за счет разности концентраций ионов внутри и снаружи эритроцита. В гипоосмотическом растворе такая разность исходно существует, хотя необходимо отметить, что она быстро выравнивается за счет работы мембранных насосов и прямой диффузии ионов через мембрану.

3. На рисунке 26а представлен процент инкапсуляции глутаматдегидрогеназы из печени быка в сравнении с глутаматдегидрогеназой из *Proteus sp.*, однако не указано, при какой концентрации каждого из белков в растворе были сделаны эти эксперименты. Это важно, так как ранее в работе сообщалось, что для глутаматдегидрогеназы из печени быка имеет место агрегация, степень которой зависит от концентрации фермента в растворе.
4. На стр. 48. автор приводит следующее утверждение: «Глутаматдегидрогеназа катализирует реакцию превращения  $\alpha$ -кетоглутарата в L-глутамат. Кофакторами в этой реакции служат NADH или NADPH». Здесь следует отметить, что NADH и NADPH выступают в качестве субстратов, расходуясь в реакции, поэтому называть их кофакторами не совсем корректно.
5. Вызывает сомнение целесообразность цитирования литературных источников 50-60-х г.г. Недостаточно полно отражены достижения отечественных учёных.
6. На наш взгляд некорректно называть биореактор лекарственной формой, так как лекарственная форма - придаваемое лекарственному средству удобное для применения состояние при котором наблюдается необходимый лечебный эффект.

Отмеченные выше недостатки не снижают общего впечатления о работе как о квалифицированном научном труде высокого уровня. Содержание автореферата отражает основные идеи и выводы диссертации, а сама диссертация соответствует специальности 03.01.02 – биофизика.

Представленная диссертация полностью удовлетворяет требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 01.10.2018 № 1168.

Материалы диссертации прошли апробацию на международных конференциях. По ним опубликованы 7 статей в журналах, входящих в перечень ВАК. Результаты работы Борсаковой Дарьи Валериевны следует рекомендовать для использования в организациях, занимающихся исследованиями эритроцитов как носителей лекарственных препаратов, а

также в медицинских организациях, разрабатывающих новые терапевтические подходы для лечения патологических состояний крови, например, НМИЦ Гематологии Минздрава России или НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва.

Все вышесказанное позволяет заключить, что Борсакова Дарья Валериевна несомненно достойна присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Отзыв рассмотрен и одобрен на заседании кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета Министерства Здравоохранения Российской Федерации (протокол № 5 от 16 октября 2019 г.).

Отзыв составил:

Заведующий кафедрой фармацевтической,  
токсикологической и аналитической химии  
КГМУ, доктор биологических наук,  
профессор

Сипливая Любовь Евгеньевна

Подпись Сипливой Любви Евгеньевны заверяю.

Начальник управления персоналом и  
кадровой работы ФГБОУ ВО КГМУ

Н.Н. Сорокина

16 октября 2019 г.

Сипливая Любовь Евгеньевна



Доктор биологических наук, специальность 14.00.36. – аллергология и иммунология, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет Министерства Здравоохранения Российской Федерации». 305041, Курская область, г. Курск, ул. Карла Маркса, д.3. [kurskmed@mail.ru](mailto:kurskmed@mail.ru), тел. +7 (4712) 588 -137.