

## ОТЗЫВ

### официального оппонента

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

#### **Актуальность темы**

Работа Борсаковой Дарьи Валериевны посвящена разработке биореакторов на основе эритроцитов человека, способных удалять из кровотока аммоний. Актуальность исследования не вызывает сомнений. Известно, что аммиак и ионы аммония токсичны для человека. В первую очередь от высоких концентраций аммония страдает мозг. Существует обширный ряд заболеваний, в результате которых концентрация свободного аммиака в крови повышается. В результате наступает расстройство нервной системы и возникают угрожающие жизни состояния. Такие заболевания требуют быстрого и эффективного лечения, однако существующие медикаментозные средства работают настолько медленно, что для снижения концентрации аммония в крови иногда требуется несколько дней. Использование эритроцитов в качестве биореакторов, прямо удаляющих из кровотока токсичные соединения, может стать изящным решением проблемы токсичности высоких концентраций аммиака.

#### **Научная новизна работы**

В научной работе Дарьи Валериевны Борсаковой впервые были экспериментально получены эритроциты-биореакторы, которые включают одновременно два фермента, глутаматдегидрогеназу и аланинаминотрансферазу. В результате их совместной работы аммоний превращается в нетоксичный аланин, который достаточно хорошо переносится через клеточную мембрану. В результате сравнения различных гипоосмотических методов включения ферментов в эритроциты был выбран наиболее эффективный метод включения в клетки большого по размеру молекул фермента глутаматдегидрогеназы, который при этом не повреждал эритроциты значительно. Была также подобрана оптимальная осмоляльность буфера для гипоосмотической процедуры включения. Для увеличения удельной активности глутаматдегидрогеназы, в работе впервые был использован новый фермент – бактериальная глутаматдегидрогеназа из *Proteus sp.* В работе впервые выявлено полезное свойство этого нового фермента: не агрегировать при увеличении собственной концентрации в суспензии и одинаково эффективно включаться в эритроциты при любой начальной концентрации.

#### **Практическая значимость**

В данной работе экспериментально была продемонстрирована состоятельность нового биореактора на основе двух ферментов, которая ранее была предсказана только теоретически. Был также преодолен ряд технологических ограничений, не позволявших ранее получать высокоэффективные биореакторы для удаления аммония, обусловленных как низкой эффективностью обычного метода включения, так и природой самого фермента

глутаматдегидрогеназы из печени быка, а именно его низкой удельной активностью и способностью агрегировать при повышении концентрации фермента в растворе. Проведенное исследование позволило сильно увеличить удельную активность глутаматдегидрогеназы в клетках и впервые получить эритроциты-биореакторы для удаления аммония, которые могут быть использованы в клинической практике, что определяет очевидную практическую ценность данной работы для медицины.

### **Общая характеристика и содержание работы**

Диссертационная работа Дарьи Валериевны написана по традиционному плану. Она хорошо структурирована и содержит все необходимые разделы: введение, обзор литературы, постановку задачи, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, а также список сокращений и обозначений и благодарности.

Во введении автор обосновывает актуальность темы, говорит о проблеме гипераммонемии и приводит примеры применения эритроцитов-носителей для лечения различных заболеваний, сопровождая примеры ссылками. Закономерно в качестве цели автор формулирует разработку эффективных биореакторов для удаления аммония. Он чётко формулирует задачи работы, необходимые для достижения цели - создание новых биореакторов на основе ферментов глутаматдегидрогеназы из печени быка и аланинаминотрансферазы методом обратимого гипоосмотического диализа, проверка эффективности этих биореакторов в системах *in vitro* и *in vivo*, исследование хранения биореакторов, содержащих эти ферменты, выбор оптимального метода включения и исследование глутаматдегидрогеназы из *Proteus sp.* (фермента из другого источника) в качестве кандидата для увеличения активности этого фермента в эритроцитах. Все поставленные задачи были сформулированы в виде положений, вынесенных на защиту.

В литературном обзоре (глава 1) Дарья Валериевна лаконично, подробно и систематизировано раскрывает все теоретические аспекты, касающиеся данного исследования. В начале обзора автор уделяет внимание эритроциту как ключевому предмету исследования, описывая физиологию клетки и поведение эритроцита в гипотонических условиях. Далее автор описывает различные методы, которые когда-либо использовались для включения веществ в эритроциты, анализируя достоинства и недостатки каждого из методов. Автор также уделяет значительную часть обзора проблеме, на решение которой направлено исследование - гипераммонемии, анализирует возможные механизмы токсического действия аммиака, описывает основные методы лечения гипераммонемии и сравнивает эти методы между собой по способности снижать концентрацию аммония в крови. Завершая подраздел гипераммонемии, Дарья Валериевна подробно разбирает результаты предыдущих попыток создания эритроцитов-биореакторов для удаления аммония. В конце обзора автор предусмотрительно собрал все необходимые сведения о ферментах, с которыми ему предстояло работать.

Вторая глава (постановка задачи) является, на мой взгляд, одной из ключевых для понимания задач данного исследования. В ней показаны возможные ограничения эффективной работы разработанных ранее биореакторов для удаления аммония из кровотока

на основе глутаминсинтетазы или глутаматдегидрогеназы (а именно, слабая проницаемость мембраны эритроцита для субстратов этих реакций, глутамата и  $\alpha$ -кетоглутарата, соответственно), а также показано, как новый биореактор с двумя ферментами сможет преодолеть эти ограничения. Для иллюстрации работы нового биореактора представлена подробная схема реакций, катализируемых двумя включаемыми ферментами в сопряжении с собственным метаболизмом эритроцита.

Дарья Валериевна также указала на то, что авторы предыдущих работ столкнулись с низкой эффективностью включения глутаматдегидрогеназы в эритроциты, поэтому повышение активности этого фермента в эритроцитах является также одной из задач данной исследовательской работы.

В третьей главе представлены материалы и методы, применяемые в данной работе диссертантом. Методы описаны очень подробно, что дает возможность воспроизвести процедуры в другой лаборатории. Из данного раздела следует, что работа выполнена на высоком методическом уровне с применением современного оборудования и использованием статистической обработки полученных данных. Всё это обеспечивает достоверность полученных результатов и сделанных на их основе выводов.

В четвертой главе представлены результаты работы и их обсуждение, которое дополняется промежуточными выводами после каждого из основных разделов главы. Результаты качественно проиллюстрированы рисунками с подробными пояснениями. Все поставленные в работе задачи были решены. Хочется отметить, как всесторонне были исследованы эритроциты после различных гипоосмотических процедур. Автор исследовал такие свойства, как средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина, осмотическая хрупкость, а также исследовал форму эритроцитов на конфокальном микроскопе. Все полученные результаты внутренне согласованы, что также доказывает их достоверность.

В разделе «Заключение» Дарья Валериевна просуммировала основные результаты работы и порассуждала об их возможном применении в дальнейшей медицинской практике.

Выводы, представленные в работе, логичным образом вытекают из представленных результатов и научно обоснованы.

Диссертация и автореферат написаны хорошим литературным языком. Автореферат соответствует содержанию диссертации. По ее материалам опубликовано 7 статей в российский и зарубежных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК, а также 6 публикаций по результатам, представленным на российских и международных конференциях. Такая апробация свидетельствует о высоком уровне научной работы диссертанта.

#### **Замечания к работе**

В качестве замечаний к данной работе можно отметить следующие:

- в таблице 2 (стр. 22) ширина распределения клеток выражена лишь в мОсм/кг, тогда как остальные показатели таблицы дублируются еще и в концентрациях раствора NaCl, вызывающих лизис (в г/л);

- на стр. 28 литературного обзора написано, что потеря 60-70% цитоплазматических веществ сократит срок циркуляции эритроцитов *in vivo*. Хотелось бы несколько подробнее узнать, насколько сокращается время жизни эритроцитов после различных гипоосмотических воздействий;

- представленные микрофотографии эритроцитов на рисунке 25 выглядят довольно тёмными. Думаю, что для более подробного исследования формы и поверхности обработанных эритроцитов было бы интересно воспользоваться методом атомно-силовой микроскопии.

Указанные замечания не являются принципиальными и ни в коей мере не снижают высокую оценку диссертационной работы.

### Заключение

Считаю, что диссертация Борсаковой Дарьи Валериевны «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока» является законченным научно-квалификационным трудом и соответствует специальности 03.01.02 – биофизика. Она полностью отвечает требованиям ВАК и пунктам 9-14 «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. Сам диссертант заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Официальный оппонент

ведущий научный сотрудник лаборатории

физико-химических основ регуляции биологических систем

Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской академии наук,

доктор биологических наук

Миль Елена Михайловна

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Телефон: 8(495) 939-74-81

E-mail: [Elenamil2004@mail.ru](mailto:Elenamil2004@mail.ru)

Подпись в.н.с., д.б.н. Елены Михайловны Миль заверяю

