

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертационную работу Борсаковой Дарьи Валериевны на тему «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика**

### **Актуальность темы**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Д.В. Борсаковой посвящена актуальной медицинской проблеме удаления аммония из крови больных в состоянии гипераммониемии. Гипераммониемия возникает при хронических и острых заболеваниях печени и почек (циррозе, гепатэктомии, повреждении печени гепатотоксинами или вирусами), а также при ряде генетических заболеваний связанных с недостаточностью ферментов цикла мочевины или с нарушением деградации аминокислот и транспорта некоторых метаболитов. Существующие терапевтические способы купирования гипераммониемического состояния (аммонул, карбаглу) при тяжелых формах недостаточно эффективны, и приходится проводить процедуру гемодиализа. Использование эритроцитов, как биореакторов, трансформирующих аммоний, является очень интересным и перспективным способом лечения гипераммониемии. Уже на начальном этапе развития этой технологии при использовании аммоцитов в модели индуцированной гипераммониемии в работах Косенко Е.А. и соавторов достигнуты обнадеживающие результаты. Но эти работы показали, что эти трансформированные эритроциты очень ограничено по времени работают как биореакторы, и, поэтому, необходимо решить ряд проблем, связанных как с устойчивостью этих клеток, так и с их эффективностью. Именно эти проблемы решаются в представленной работе.

### **Структура диссертации и автореферата**

Диссертация Борсаковой Д.В. построена почти по традиционному плану и состоит из содержания, введения, обзора литературы, постановки задачи, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, списка сокращений и обозначений. Список цитируемой литературы, насчитывает 207 источников. Работа представлена на 131 странице и содержит 27 рисунков, 7 таблиц. Автореферат соответствует основным идеям и выводам диссертации. В автореферате изложены все основные положения диссертации, он написан доступным языком, хорошо иллюстрирован.

Во **Введении** обоснована актуальность применения эритроцитов-биореакторов (ЭБР) для удаления аммония из крови больных в состоянии гипераммониемии. Формулируются цель и задачи работы. Охарактеризованы научная новизна, практическая значимость работы, методология исследования. Представлена информация об апробации диссертации.

В **Обзоре литературы** изложены современные представления о структуре, метаболизме, регуляции объема эритроцитов; транспорте аммиака/аммония через мембрану клетки. Подробно освещены вопросы связанные с методами включения препаратов в эритроциты. Большое внимание уделено физиологическим аспектам обмена аммиака в организме и проблеме гипераммониемии. Очень полезны сведения о ферментах, использованных в данной работе. В целом литературный обзор в полном объеме отражает все задачи поставленные в работе.

Следующий раздел «**Постановка задачи**» нетрадиционен для диссертаций, но очень уместен, т.к. выделяет все важнейшие положения диссертации. Здесь аналитически четко выделены задачи и представлены способы решения их. Прежде всего, эритроциты, в которых включен только один фермент (глутаматдегидрогеназа - ГДГ) ограничены по времени работы из-за лимитирования транспорта  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата. На основании анализа метаболизма, ранее было обосновано включение еще одного фермента – аланинаминотрансферазы (АЛТ), и предложен новый тип эритроцитов-биореакторов (ЭБР), в которых включены оба фермента (ГДГ и АЛТ). Задачей работы было получить такие ЭБР экспериментально. Другой задачей представленной работы является повышение в эритроцитах активности включенных ферментов. Поскольку наиболее оптимальными методами включения ферментов в эритроциты являются гипоосмотические методы, обоснована задача сравнения различных гипоосмотических методов и выбора наиболее эффективного. На основании данных о возможной агрегации используемого ГДГ, обоснован поиск другого фермента, имеющего более высокую удельную активность.

Раздел **Материалы и методы исследования** в полной мере отражает весь инструментарий, используемый в работе. Наибольшее внимание уделено гипоосмотическим методам включения ферментов в эритроциты. Для применения метода проточного диализа практически представлена новая разработка диализатора малого объема. Очень интересен метод определения осмотической резистентности клеток, в котором обосновано использование количественных параметров характеризующих статус клеток.

**Результаты и обсуждение** представлены в четырех взаимосвязанных разделах главы 4. Главный результат состоит в том, эритроциты-биореакторы, содержащие ГДГ и АЛТ,



полученные методом проточного диализа, очень эффективны для утилизации аммония, и на протяжении длительного времени сохраняют хорошее функциональное состояние. Этот результат достигается логичной последовательностью экспериментальных разделов работы. В первом экспериментальном разделе совместное включение ГДГ и АЛТ в эритроциты было проведено методом обратимого гипоосмотического диализа. Далее, проверяется эффективность включения этих ферментов в клетку, и в условиях *in vitro*, и *in vivo* (модель индуцированной гипераммониемии), определяется скорость утилизации аммония с помощью ЭБР. Большое внимание уделено оценке качества ЭБР с использованием различных подходов: активность ферментов внутри клетки, стандартные эритроцитарные индексы, осмотическая резистентность, уровень гемолиза. В следующих двух разделах проводится сравнение эффективности включения ферментов в эритроциты различными гипоосмотическими методами. Проведенные исследования убедительно показывают, что метод проточного диализа наиболее эффективен для этой процедуры, т.к. включение фермента сравнимо с другими способами, а трансформированные клетки повреждены в меньшей степени и ближе по статусу к контрольным эритроцитам. К тому же метод проточного диализа в перспективе наиболее технологичен для полноценного клинического применения. В последнем четвертом разделе проводится сравнение ГДГ из печени быка и *Proteus sp.* Эта часть работы связана с тем, что ГДГ из печени быка обладает низкой удельную активностью и способна агрегировать при высокой концентрации в растворе. Проведенные исследования показали, что использование для включения в эритроциты вместо ГДГ из печени быка бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* увеличивает эффективность инкапсуляции фермента методом проточного диализа в несколько раз.

В **Заключении** автор описывает перспективы научного и практического применения результатов диссертационной работы.

Представленные **Выводы** полностью обоснованы и не вызывают сомнения.

Оценивая диссертацию Дарьи Валериевны, как очень грамотное и цельное исследование хотелось бы, в порядке обсуждения, получить разъяснения по следующим вопросам:

1. В модели индуцированной гипераммониемии на мышах использовался ацетат аммония. Чем обусловлен выбор соли ацетат аммония, где не только аммоний, но и ацетат оказывает системное воздействие? Не логичнее ли использование хлорида аммония для создания гипераммониемии?

2. При измерении скорости утилизации аммония с помощью эритроцитов-биореакторов (ЭБР) в системе *in vitro* использовался ионселективный аммониевый электрод «Элит». Электроды этой серии с ПВХ-мембраной достаточно чувствительны к ионами калия, а исследования проводятся в диапазоне  $< 0.5 \text{ мМ NH}_4^+$ , при том что в среде  $2.7 \text{ мМ K}^+$ . Какова селективность используемого электрода к ионам аммония по сравнению с ионами калия, и насколько это учитывалось в экспериментах?
3. Дополнительное инкорпорирование аланинаминотрансферазы - очень эффективное решение, т.к. снимает проблему накопления плохо проникающего глутамата и остановки реакции связывания аммония. Но при этом конечным продуктом становится аланин. Есть ли понимание, как выводится аланин из эритроцитов, и насколько его накопление не будет тормозить процесс утилизации аммония?
4. В работе для глутаматдегидрогеназы из бактерий (ГДГ из *Proteus inconstans*) указаны разные  $K_m$  по аммонiu:  $0.37 \text{ мМ}$  на стр.49, и  $1.1 \text{ мМ}$  на стр.98 (диссертация). Чем вызвано это разночтение данных?
5. При характеристике аммоцитов, полученных разными методами (лизис, диализ, проточный диализ), наибольшее различие выявляется по  $W$  - ширине распределения клеток по осмотической резистентности. Можно ли рекомендовать данный параметр для характеристики гетерогенности популяции эритроцитов, в т.ч. в клинической практике?

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не умаляют достоинств данной работы и не ставят под сомнение обоснованность основных положений и выводов.

Диссертационная работа обладает **научной новизной**, а именно: создан новый клеточный биореактор для удаления аммония из кровотока на основе совместного включения в эритроцит двух ферментов (ГДГ+АЛТ). Эффективность ЭБР проверена в условиях *in vitro* и *in vivo*. Проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения ферментов в эритроциты и показано, что наиболее оптимальным является метод проточного диализа. Обоснована и экспериментально подтверждена замена ГДГ из печени быка на ГДГ из *Proteus sp.*

**Практическая значимость** результатов работы определяется клинической важностью проблемы гипераммониемии. Представленная работа практически является законченной разработкой для внедрения в клиническую практику для лечения гипераммониемии различной этиологии, что очень ценно и редко встречается в диссертационных работах.

Положения, выносимые на защиту, отражают главное содержание работы. Автореферат полностью раскрывает содержание диссертации. Основные результаты диссертации



опубликованы в 13 научных работах, включая 7 статей в рецензируемых журналах, что отвечает формальным требованиям ВАК.

Заключение. Диссертационная работа **Д.В. Борсаковой «Разработка биореактора на основе эритроцитов человека для удаления аммония из кровотока»** представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биологии и медицины. Рецензируемая диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Борсакова Дарья Валериевна заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 - биофизика.

Официальный оппонент,

Главный научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук

доктор биологических наук



Игорь Викторович Миндукшев

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр.Тореза, д.44

м.т. +7 9219794793, раб. 8 (812) 5528554

e-mail: iv\_mindukshev@mail.ru

Подпись г.н.с., д.б.н И.В. Миндукшева заверяю:

Ученый секретарь ИЭФБ РАН.



Гальперина Е.И.

11.10.2019г.

