

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.038.01,  
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА  
БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.М. ЭМАНУЭЛЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ  
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 07.06.2023 г., № 2

О присуждении Колевой Ларисе, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» по специальности 1.5.2. Биофизика принята к защите 23 ноября 2022 года (протокол заседания № 12) диссертационным советом 24.1.038.01, созданным 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** Колева Лариса, «07» ноября 1993 года рождения, в 2017 году окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» по специальности «Химия». С 2017 года по 2021 год проходила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН) по специальности 03.01.02 – биофизика (1.5.2. Биофизика).

В период подготовки диссертации с 2018 года работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории биофизики и, по совместительству, в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук в лаборатории физиологии и биофизики клетки, в настоящее время в должности младшего научного сотрудника.

**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**, заведующая лабораторией биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, и по совместительству – заведующая лабораторией физиологии и биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

**Официальные оппоненты:**

**Миндукшев Игорь Викторович**, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией клеточные механизмы гомеостаза крови Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им И.М. Сеченова Российской академии наук;

**Тринеева Ольга Валерьевна**, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

**дали положительные отзывы на диссертацию.**

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук в своём **положительном отзыве**, подписанном Маевским Евгением Ильичом, доктором медицинских наук, заведующим лабораторией энергетики биологических систем ИТЭБ РАН и утвержденным и.о. директора Института, кандидатом физико-математических наук Селезневой Ириной Ивановной, указала, что актуальность работы обусловлена острой необходимостью повышения эффективности современной терапии, во-первых, острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) путем пролонгирования функциональной активности вводимой в кровотоки аспарагиназы, и, во-вторых, в надобности надежной ликвидации избытка аммония, токсического метаболита, накоплением которого сопровождаются токсические и вирусные поражения печени и уремия. Для этого автор диссертационной работы разрабатывает и использует новый тип ферментативных контейнеров – эритроциты как биореакторы (ЭБР), способные удалять из плазмы низкомолекулярные метаболиты. ЭБР, удаляющие из плазмы аспарагин, содержат длительно функционирующий фермент аспарагиназу, а ЭБР, элиминирующие из кровотока избыток аммония (аммоциты), имеют два дополнительных сопряженно функционирующих фермента глутаматдегидрогеназу (ГДГ) и аланинаминотрансферазу (АЛТ). Эти два фермента формируют новый метаболический путь, решающий проблему воспроизведения  $\alpha$ -кетоглутарата и глутамата. В необходимости уборки указанных метаболитов и заключается актуальность и высокая ценность по сути прорывного наукоемкого технологического подхода к модификации современной терапии в области онкологии и гепатологии.

В заключении отмечено, что диссертационная работа Колевой Л. на тему «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (ред. от 18.03.2023 г. №415), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения

искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, в том числе 14 – по теме диссертации, из них 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus; 6 публикаций в российских и международных сборниках трудов и материалов научных конференций и 1 патент.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Борсакова Д.В. Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты / Борсакова Д.В., Плахотник М.Е., **Колева Л.Д.**, Бовт Е.А., Александрович Ю.Г., Синауридзе Е.И., Атауллаханов Ф.И. // Онкогематология. – 2018. – V. 13, № 3. – P. 91–101. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2018-13-3-91-101>.
2. **Koleva L.** Erythrocytes as carriers: from drug delivery to biosensors / Koleva L., Bovt E., Ataulakhanov F., Sinauridze E. // *Pharmaceutics*. – 2020. – V. 12, № 3. – P. 276. DOI: [10.3390/pharmaceutics12030276](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030276).
3. Borsakova D.V. Ammonium removal by erythrocyte-bioreactors based on glutamate dehydrogenase from *Proteus* sp. jointly with porcine heart alanine aminotransferase / Borsakova D.V., **Koleva L.D.**, Protasov E.S., Ataulakhamov F.I., Sinauridze E.I. // *Sci Reports*. – 2022. – V. 12, № 1. – P. 5437. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09435-y>.

На автореферат поступило 3 положительных отзыва: **1)** отзыв к.ф.-м.н. Бутылина Андрея Александровича, доцента кафедры медицинской физики физического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» без замечаний; **2)** в отзыве к.б.н. Сергиной Елены Александровны, научного сотрудника лаборатории клинического гемостаза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии онкологии и иммунологии имени Дмитрия

Рогачёва» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в качестве замечания к одной из частей работы отмечается, что утилизация аммония *in vitro* с помощью эритроцитов-биореакторов показана на примере эритроцитов, взятых только от 2-х доноров (рисунок 9А автореферата), однако, выше из таблицы 2 видно, что число опытов по получению аммоцитов составляет 31, что вполне достаточно для получения статистически значимых результатов; 3) отзыв д.б.н. Золотова Николая Николаевича, главного научного сотрудника лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова» содержит ряд вопросов и пожеланий: 1. с чем, по мнению автора, связан более низкий процент включения ферментов с использованием метода диализа в мешках по сравнению с проточным диализом, а также с чем связано резкое падение активности аспарагиназы в течение первых 24 часов после введения эритроцитов-биореакторов пациентам; 2. почему с использованием разработанного автоматического устройства были получены только эритроциты с аспарагиназой, но не с глутаматдегидрогеназой и аланинаминотрансферазой; 3. хотелось бы оценить максимально возможную скорость утилизации аммония аммоцитами, хотя бы *in vitro*.

В отзывах отмечено, что тема диссертации является актуальной и обладает практической значимостью. Разработан метод стерильного включения и установка для автоматического включения лекарственных средств в эритроциты, показана работоспособность получаемых эритроцитов-биореакторов и исследованы их характеристики. В пилотных исследованиях показана безопасность применения ЭБР с аспарагиназой в клинической практике у двух пациентов с острым лимфобластным лейкозом. Проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения ферментов в эритроциты и показано, что наиболее оптимальным является метод проточного диализа. Впервые получены аммоциты, содержащие совместно включенные ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи.

Все сделанные выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам, имеющим важное как фундаментальное, так и прикладное

значение, а работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика.

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации** обосновывается их специализацией по проблеме настоящей диссертационной работы и достижениями в области биофизики, физиологии и фармакологии, а также наличием публикаций в соответствующей сфере исследования, что позволяет им оценить научную и практическую ценность диссертации. Оппонент д.б.н. Миндукшев И.В. является ведущим специалистом в области молекулярных механизмов трансформации и апоптоза безъядерных клеток крови (тромбоцитов и эритроцитов). Оппонент д.фарм.н. Тринеева О. В. является специалистом в области фармакологии, стандартизации и оценки качества лекарственных средств. Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук является одним из лидеров в области биофизики клетки, биотехнологии, нейробиологии, включая исследования состояний гипераммониемии.

**Диссертационный совет** отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

**разработана** новая экспериментальная методика стерильного включения лекарственных соединений в эритроциты и автоматическая установка для такого включения;

**предложены** новые способы снижения высоких концентраций аммония в кровотоке, способы повышения эффективности инкапсуляции глутаматдегидрогеназы в эритроциты, а также новый метод оценки качества получаемых фармакоцитов путем измерения их фильтруемости *in vitro* через поры искусственного фильтра диаметром 3-5 мкм;

**доказана** способность эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой истощать аспарагин при остром лимфобластном лейкозе и работоспособность эритроцитов-биореакторов с глутаматдегидрогеназой и аланинаминотрансферазой *in vitro*, что указывает на перспективность клинического использования таких эритроцитов-биореакторов.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что**

**доказано**, что благодаря включению двух ферментов (глутаматдегидрогеназы из *Proteus sp.* и аланинаминотрансферазы) в эритроциты могут быть получены эффективные фармакоциты, удаляющие из кровотока аммоний и обладающие длительным временем работы в кровотоке, что отличает их от ранее предложенных аммоцитов;

**применительно к проблематике диссертации результативно использован** теоретико-экспериментальный подход для включения лекарственных соединений в эритроциты, а также комплекс существующих методов исследования свойств эритроцитов, таких как спектрофотометрия, флуориметрия, импедансный метод и другие;

**изложены** идеи повышения эффективности аммоцитов, снижающих концентрацию аммония в крови, благодаря использованию метода проточного диализа и бактериальной ГДГ из *Proteus sp.*, для их получения;

**изучены** факторы, влияющие на эффективность инкапсуляции ферментов в эритроциты и факторы, определяющие эффективное истощение аспарагина;

**проведена модернизация** существующих методов получения фармакоцитов с аспарагиназой и фармакоцитов, выводящих из крови аммоний.

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

**разработаны и внедрены** в лабораторную практику автоматическая установка для включения лекарств в эритроциты, экспериментальная методика, которая может быть использована для получения эритроцитов-биореакторов в клинике, а также методика оценки качества полученных фармакоцитов методом фильтрации через искусственные фильтры;

**определены** перспективы использования эритроцитов-биореакторов в клинической практике; параметры работы автоматической установки для получения наиболее эффективного включения лекарств;

**создана** и запатентована автоматическая установка для включения лекарств в эритроциты, позволяющая увеличить выход включения по сравнению с другими существующими установками;

**представлены** экспериментальные данные пилотных испытаний *in vivo*,

показывающие, что эритроциты-биореакторы с аспарагиназой удаляют аспарагин из кровотока с эффективностью, пропорциональной величине включенной в эритроциты активности аспарагиназы, а ферменты в эритроцитах-биореакторах с глутаматдегидрогеназой и аланинаминотрансферазой работают согласовано и способны утилизировать аммоний *in vitro*.

**Оценка достоверности** результатов исследования выявила следующее:  
**для экспериментальных работ** результаты получены на сертифицированном оборудовании с применением современных экспериментальных методов исследований в области биофизики клетки, а также стандартных методик обработки результатов; показана воспроизводимость результатов для всех используемых методов получения эритроцитов-биореакторов;  
**теория** создания эритроцитов-носителей лекарственных средств построена на известных экспериментальных данных и согласуется с многочисленными опубликованными данными по теме диссертации;  
**идея** базируется на анализе и обобщении литературных данных по получению эритроцитов-биореакторов с различными лекарственными соединениями;  
**использованы** авторские данные, которые сравниваются с результатами, полученными и опубликованными другими исследователями, по рассматриваемой тематике;  
**установлено** качественное и количественное соответствие авторских результатов с данными, представленными в независимых источниках, по безопасности применения эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой у пациентов с острым лимфобластным лейкозом, фармакокинетике и фармакодинамике аспарагиназы, включенной в эритроциты;  
**использованы** современные методы исследования и статистической обработки данных экспериментальных измерений. Научные положения, результаты и выводы, полученные в диссертации, достоверны, внутренне согласованы и полностью подтверждаются экспериментальными данными, а также получили признание в виде научных публикаций и апробации на научных конференциях.

**Личный вклад соискателя** состоит в непосредственном участии на всех этапах работы: анализе научной литературы, разработке стерильного метода получения эритроцитов-биореакторов, участии в разработке автоматического устройства, планировании и проведении всех экспериментов по включению лекарственных соединений в эритроциты разными методами, анализе характеристик полученных эритроцитов-биореакторов, планировании клинических испытаний и получении эритроцитов-биореакторов для этих испытаний, а также в написании статей по результатам данной работы и апробации результатов исследования на тематических конференциях.

В ходе защиты диссертации было высказано следующее критическое замечание:

Ввиду того, что в клинических испытаниях приняло участие только два пациента, преждевременно утверждать о безопасности исследуемых эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой.

Соискатель Колева Л. ответила на замечание и привела собственную аргументацию:

Безусловно, выборка пациентов очень мала для получения окончательных выводов, и в наши цели входит дальнейшее включение пациентов в исследование. На данный момент в диссертации описаны результаты пилотных исследований, которые еще продолжаются, и указано, что для тех пациентов, которые уже приняли участие в исследовании, данные эритроциты с аспарагиназой были безопасны.

Диссертация Колевой Ларисы «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» представляет собой законченную научно-квалификационную работу и отвечает требованиям в пунктах 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Минобрнауки России (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, в ред. Постановления Правительства РФ от 18.03.2023), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

На заседании 07 июня 2023 года диссертационный совет принял решение за диссертационную работу, посвященную вопросу создания

эритроцитов-биореакторов для утилизации аммония и аспарагина из кровотока, а также созданию автоматической установки для включения лекарств в эритроциты, присудить Колевой Ларисе ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.2. Биофизика, участвовавших в заседании, из 25 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель

диссертационного совета, д.х.н.



Трофимов А.В.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.х.н.

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the scientific secretary, is written below the stamp.

Мазалецкая Л.И.

07.06.2023