

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о соответствии диссертационной работы «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» Колевой Ларисы профилю Диссертационного совета 24.1.038.01 и требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Комиссия в составе — д.б.н., проф. Пальминой Надежды Павловны, д.х.н., проф., Шишкиной Людмилы Николаевны, д.б.н., проф. Розенфельда Марка Александровича — констатирует, что диссертационная работа «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» по теме, постановке задач, методам исследования и полученным результатам соответствует специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки).

Комиссия отмечает следующие **основные научные результаты** диссертационной работы и её **новизну**:

Колевой Л. проведена экспериментальная и теоретическая работа по разработке эритроцитов-биореакторов для утилизации аспарагина и аммония из кровотока.

Проведено систематическое сравнение различных гипоосмотических методов получения эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой. Показано, что наиболее эффективным и оптимальным является метод проточного гипоосмотического диализа.

Впервые разработана и запатентована автоматическая установка для стерильного получения эритроцитов с аспарагиназой или другими лекарственными препаратами. Показано, что хранение таких биореакторов в течение 14 дней при 4°C существенно не изменяет активность фермента в эритроцитах и такие свойства этих эритроцитов как эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность.

Продемонстрирована безопасность применения полученных эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой в клинической практике у 2-х пациентов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), показана фармакокинетика аспарагиназы, включенной в эритроциты, а также способность таких эритроцитов истощать аспарагин *in vivo*.

В работе также были получены эритроциты-биореакторы для утилизации аммония (аммоциты), содержащие совместно включенные ферменты — глутаматдегидрогеназу (ГДГ) из *Proteus* sp. и аланинаминотрансферазу (АЛТ) из сердца свиньи. Показано, что такие эритроциты-биореакторы способны утилизировать аммоний *in vitro*. Установлено, что данные ферменты в аммоцитах работают в тандеме, т.к. в процессе потребления аммония происходит

пропорциональное увеличение концентрации аланина.

На примере аммоцитов показана возможность измерения фильтруемости эритроцитов для оценки качества полученных эритроцитов-биореакторов.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как спектрофотометрия, флуориметрия, статистическая обработка результатов. Достоверность полученных результатов также подтверждается их внутренней согласованностью и с ранее опубликованными литературными данными.

Практическая и научная значимость результатов диссертационной работы.

Полученные в диссертации результаты способствуют применению эритроцитов-биореакторов в клинической практике: впервые создан отечественный препарат аспарагиназы, инкапсулированной в эритроциты в стерильных условиях, показана возможность и безопасность применения таких эритроцитов у пациентов с острым лимфобластным лейкозом.

Кроме того, разработана автоматическая установка для включения в эритроциты различных биологически активных веществ. Данная установка превосходит по эффективности включения аспарагиназы все другие устройства для получения фармакоцитов, запатентованные в мире.

Увеличение эффективности включения глутаматдегидрогеназы в эритроциты и продемонстрированная возможность совместного включения двух ферментов (бактериальной глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы) оптимальным для клинического применения методом открывают новые возможности применения аммоцитов в терапии гипераммониемии.

Список основных печатных работ:

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. –Р. 91-101.

2. Бовт Е.А. Дефицит пируваткиназы и несфероцитарная гемолитическая анемия/ Бовт Е.А., Колева Л.Д., Черняк Е.А., Сметанина Н.С., Атауллаханов Ф.И., Синауридзе Е.И. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2020. –V. 19, № 3. – Р. 121-130.

3. Колева Л. Д. Эритроцит как идеальный носитель для внутрисосудистой доставки лекарств. /Колева Л.Д., Атауллаханов Ф.И., Синауридзе Е.И. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. -2020.-V. 19, № 4. – Р. 234-242.

4. 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.

5. Protasov E. Theoretical analysis of the built-in metabolic pathway effect on the metabolism of erythrocyte-bioreactors that neutralize ammonium / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Ataulakhanov F., Sinauridze E. // *Metabolites*. – 2021. – V. 11, №1. - P. 36.

6. 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.

7. Koleva L. Erythrocytes for targeted drug delivery. / Koleva L. // *Encyclopedia*. -2022. [Электронный ресурс]: <https://encyclopedia.pub/entry/20899>.

8. Атауллаханов Ф.И., Борсакова Д.В., Бовт Е.А., Даниелян А.Д., Зейналов А.М., Колева Л.Д., Кушнир Н.С., Протасов Е.С., Синауридзе Е.И., Суворова А.С. Устройство для включения биологически активных компонентов в эритроциты способом проточного диализа. Патент РФ № 2 772 209 (заявка № 2021125401 от 27.08.2021), патентообладатель ООО «РБК-Фармэко» Москва, РФ (2022). Дата публикации 18.05.2022 Бюлл. №14.

Публикации основных научных результатов диссертации соответствуют требованиям пунктов 11 и 13 «Положения о порядке присуждения ученых степеней (Утверждено постановлением Правительства России от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановления Правительства России от 21.04.2016 г. №335 в редакции Постановления Правительства России от 20.03.2021 г. №426).

Диссертация не содержит заимствованных материалов и результатов без ссылок на авторов и источники заимствования. В диссертации даны ссылки на результаты работ, выполненные Колевой Л. в соавторстве с Атауллахановым Ф.И., Синауридзе Е.И., Борсаковой Д.В. и др.

Диссертация Колевой Л. «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» отвечает требованиям, установленными пунктами 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Утверждено Постановлением Правительства России №842 от 24.09.2013 г. с изменениями Постановления Правительства России от 21.04.16 г. №335 в редакции Постановления Правительства России от 20.03.2021 г. №426), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук.

На основании вышеизложенного, комиссия рекомендует принять к защите диссертационную работу Колевой Л. «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 Биофизика.

Комиссия рекомендует утвердить в качестве **официальных оппонентов:**

доктора биологических наук (специальности 03.01.02 – биофизика и 03.03.01 – физиология) **Миндукшева Игоря Викторовича**, главного научного сотрудника, заведующего лабораторией клеточные механизмы гомеостаза крови ФГБУ науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии Наук;

доктора фармацевтических наук (специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия и 03.03.01 – физиология) **Тринееву Ольгу Валерьевну**, профессора кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ высшего образования «Воронежский государственный университет»;

в качестве ведущей организации предлагается Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук.

Председатель комиссии

Члены комиссии