



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук
(ЦТП ФХФ РАН)

«09» сентября 2022 г., 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30, тел. 8
(495) 678-31-16
исх. № 7/2-22(УС)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ЦТП ФХФ РАН,
М.А. Пантелеев М.А. Пантелеев
«09» сентября 2022 г.
М.П.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской
академии наук

Диссертация «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» выполнена в лаборатории физиологии и биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

В период подготовки диссертации Колева Лариса работала в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории биофизики на должности младшего научного сотрудника и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН) в лаборатории

физиологии и биофизики клетки на должности стажера-исследователя по совместительству.

В 2017 г. окончила Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов" по специальности «Химия», с 01.10.2017 по 30.09.2021 проходила обучение в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН) по специальности биофизика (справка №2/21).

Удостоверение № 0104/19 о сдаче кандидатских экзаменов выдано 15.05.2019 г. Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Центром теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Научный руководитель: Синауридзе Елена Ивановна, доктор биологических наук, 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.

Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены решением Ученого совета ЦТП ФХФ РАН №12 от 12.12.2017 г., приказ №12-УС от 19.12.2017.

По результатам рассмотрения диссертации «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» принято следующее заключение:

Оценка выполненной работы

Диссертация Колевой Л. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов исследований разработаны положения, имеющие актуальное научное и практическое значение для биофизики и медицины. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Актуальность темы

Настоящая работа посвящена разработке эритроцитов биореакторов (ЭБР), способных удалять из плазмы такие низкомолекулярные метаболиты как аспарагин или аммоний. Эритроциты-биореакторы, содержащие фермент аспарагиназу, способны утилизировать аспарагин из плазмы, а ЭБР, в составе которых ферменты глутаматдегидрогеназа (ГДГ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ) (аммоциты), способны снижать концентрацию аммония в кровотоке.

Аспарагиназа является неотъемлемой частью курса терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у взрослых и детей. Несмотря на эффективность аспарагиназы как противоопухолевого препарата, ее применение осложнено многими побочными эффектами. Препараты аспарагиназы, как правило, получены из бактерий (*Escherichia coli* или *Erwinia chrysanthemii*) и представляют собой чужеродный для организма человека

белок, поэтому введение этих ферментов часто вызывает аллергические реакции, в том числе реакции гиперчувствительности, которые препятствуют применению препарата. Вырабатываемые антитела осложняют каждое следующее введение лекарства и делают терапию менее эффективной. В такой ситуации использование эритроцитов как носителей аспарагиназы способно сильно улучшить ее фармакологические свойства, т.к. может увеличить срок жизни препарата в кровотоке и снизить аллергические реакции на него за счет того, что аспарагиназа спрятана в собственных клетках пациента и недоступна для его иммунной системы.

Состояние гипераммониемии (повышение концентрации аммония в крови) является опасным осложнением многих патологических состояний, связанных с дефицитами ферментов цикла мочевины, хроническими и острыми патологиями печени. Повышение уровня аммония характеризуется сильной нейротоксичностью. Таким образом, необходимо его быстрое выведение из кровотока. Однако, современные медикаментозные средства не очень эффективны, т.к. все они действуют на уровень аммония опосредовано (через активности ряда ферментов, участвующих в цикле мочевины, выводящем из организма азот). С этой точки зрения перспективным может быть создание ЭБР с ферментами, перерабатывающими аммоний. Разработка ЭБР, способных удалять их кровотока аспарагин или аммоний, которые можно было бы применять в клинике, является актуальной задачей.

Личное участие автора в получении результатов

Автор проводил анализ научной литературы, планировал и проводил все эксперименты, описанные в диссертации, а также занимался подготовкой иллюстраций, написанием научных статей и тезисов по материалам работы. Материалы диссертации доложены автором в устных докладах на международных конференциях.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов

Достоверность результатов и справедливость сделанных на их основании выводов обеспечены использованием общепринятых современных методов анализа (спектрофотометрия, флуориметрия, статистические методы обработки результатов) и подтверждаются внутренней согласованностью всех полученных материалов и их согласованностью с ранее опубликованными в литературе результатами.

Научная новизна

1. Впервые проведено систематическое сравнение различных гипоосмотических методов получения эритроцитов с включенной аспарагиназой. Показано, что наиболее эффективным является метод проточного гипоосмотического диализа.
2. Впервые разработана и запатентована полностью автоматическая установка для стерильного получения эритроцитов с аспарагиназой или другими лекарственными препаратами.
3. Исследованы свойства полученных с помощью метода проточного диализа эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой в процессе их хранения. Показано, что хранение в течение 14 дней при 4°C не изменяет существенно активность фермента в

эритроцитах и такие свойства этих эритроцитов как эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность.

4. Показана безопасность применения отечественных эритроцитов-биореакторов с аспарагиназой в клинической практике у 2-х пациентов с ОЛЛ.

5. Измерена фармакокинетика аспарагиназы, включенной в эритроциты, и способность этих эритроцитов истощать аспарагин *in vivo*.

6. Впервые получены аммоциты, содержащие совместно включенные ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи. Показано, что они способны утилизировать аммоний *in vitro*.

7. Установлено, что использование ГДГ из *Proteus* sp. и метода проточного диализа для ее включения в эритроциты, приводит к увеличению активности ГДГ внутри эритроцитов более чем в 5 раз по сравнению с аммоцитами, ранее полученными методом диализа в мешках, содержащими ГДГ из бычьей печени.

8. Впервые для оценки качества полученных эритроцитов-биореакторов был использован метод измерения фильтруемости эритроцитов, характеризующий их способность деформироваться.

9. Установлено, что ферменты в аммоцитах работают согласованно (в тандеме), т.к. в процессе потребления аммония происходит пропорциональное увеличение концентрации аланина.

Практическая значимость работы

В работе впервые создан отечественный препарат аспарагиназы, включенной в эритроциты в стерильных условиях, который может быть использован в клинике. Кроме того, разработана автоматическая установка для включения в эритроциты различных биологически активных компонентов. Данная установка превосходит по эффективности включения аспарагиназы все другие устройства для получения фармакоцитов, запатентованные в мире.

Увеличение эффективности включения ГДГ и продемонстрированная возможность совместного включения АЛТ и бактериальной ГДГ методом проточного диализа позволяют надеяться на возможность получения аммоцитов, которые можно будет использовать в клинической практике для терапии гипераммониемии. Все полученные результаты способствуют применению в клинике такой новой лекарственной формы, как эритроциты-биореакторы.

Ценность научных работ соискателя, соответствие содержания диссертации специальности, полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах Колевой Л., из них 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 6 тезисов докладов на российских и международных конференциях и 1 патент.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, Moscow, December 7-9, 2020 (Москва, Россия) (2 доклада); на Hybrid International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataulakhanov, Moscow, August 25-27, 2021 (Москва, Россия) (2 доклада); 4th International virtual Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems, April 5, 2021, London, UK; Российском конгрессе «Детская онкология, гематология и иммунология XXI века: от науки к практике», 27-29 мая, 2021 (Москва, Россия).

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

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. - Р. 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. - Р. 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.- Р. 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 в трудах конференций и съездов:

1. Protasov, E. Erythrocytes-bioreactors and limitations of their efficiency. / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Ataulakhanov F., Sinauridze E. // Тезисы докладов конференции “International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks”, Москва, 7-9 декабря, 2020, с. 8.

2. Koleva, L. Erythrocytes-bioreactors for removing ammonium from the blood. / Koleva L., Borsakova D., Protasov E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. Тезисы докладов конференции "International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks", Москва, 7-9 декабря, 2020, с. 41.
3. Protasov, E. Mathematical modeling of the RBC-bioreactors. / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Sinauridze E., Ataullakhanov F. // Тезисы докладов конференции "International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, the meeting is dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataullakhanov", Москва, 25-27 августа, 2021, с. 15.
4. Protasov, E. Erythrocytes-bioreactors that neutralize ammonium. / Protasov E., Koleva L., Bovt E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. // Тезисы докладов конференции "4th International virtual Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems held during", London, 5 апреля, 2021, с. 21.
5. Koleva, L. Development of an automatic device for creating drug-loaded erythrocytes. / Koleva L., Kushnir N., Bovt E., Borsakova D., Suvorova A., Sinauridze E., Danielyan A., Ataullakhanov F. // Тезисы докладов конференции "Hybrid International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, the meeting is dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataullakhanov", Москва, 25-27 августа, 2021, р. 15.
6. Колева, Л.Д. Старт пилотного исследования безопасности и фармакокинетики отечественного препарата L-аспарагиназы в эритроцитах (АСПЭР) в терапии острого лимфобластного лейкоза. / Колева Л.Д., Бовт Е.А., Макагонова А.С., Кушнир Н.С. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2021. – V. 20, № S2. Приложение 1, 102. (Материалы Российского конгресса "Детская онкология, гематология и иммунология XXI века: от науки к практике", 2021, Москва).

Диссертационная работа Колевой Ларисы «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в ред. Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 №1539) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН. На заседании присутствовали члены Ученого совета Центра в количестве 13 человек из 15, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра. Заключение принято единогласно, протокол № 7 от 9 сентября 2022 г.

Ученый секретарь
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Центра теоретических проблем
физико-химической фармакологии РАН,
к.б.н.

Кольцова Е.М.