

Отзыв

на автореферат диссертационной работы
Колевой Ларисы

«Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика

Диссертационное исследование Колевой Л. посвящено созданию эритроцитов-биореакторов, направленных на терапию некоторых онкологических заболеваний крови, а также на терапию состояний гипераммониемии. Механизм терапевтического действия данных эритроцитов-биореакторов основан на утилизации из кровотока таких низкомолекулярных метаболитов, как аспарагин и аммоний, соответственно. Эритроциты — долгоживущие клетки, присутствующие в большом количестве в кровотоке, ключевой задачей которых является перенос кислорода. Однако, уникальные свойства этих клеток позволяют их использовать в качестве биосовместимой и биodeградируемой системы доставки терапевтических агентов. В данном случае в роли терапевтических агентов выступают ферменты — аспарагиназа, способная расщеплять аспарагин, и глутаматдегидрогеназа и аланинаминотрансфераза, ферменты, перерабатывающие аммоний.

Аспарагиназа в настоящее время является одним из основных и обязательных компонентов химиотерапии большого количества онкологических заболеваний крови. Истощение аспарагина в кровотоке лишает опухолевые клетки крови нужной аминокислоты (строительного материала), что опосредует их апоптоз. Однако, применение аспарагиназы сопряжено с рядом трудностей. Поскольку это иммуногенный чужеродный белок, терапия аспарагиназой часто сопровождается иммунными, аллергическими реакциями и инактивацией фермента иммунной системой. Фермент быстро выводится из кровотока при прямом внутривенном введении. Таким образом, поиск решений, направленных на снижение иммуногенности этого фермента и пролонгации его нахождения в крови является крайне актуальной задачей.

Повышение концентрации аммония в крови сопровождается ряд патологий, в том числе приобретенные патологии печени, вирусные инфекции, а также наследственные гипераммониемии. Повышение аммония в крови ведет не только к проявлениям токсического отравления организма, но и к дальнейшим грозным последствиям, нарушениям в центральной нервной системе, циррозу печени и другим осложнениям. Существующие лекарства для снижения в крови концентрации аммония являются недостаточно эффективными. Для того, чтобы снизить его концентрацию до нормы обычно требуется несколько дней. Это связано с тем, что данные препараты косвенно влияют на его концентрацию, через ряд

соответствующих реакций. Именно поэтому разработка эритроцитов-носителей ферментов, способных прямо перерабатывать аммоний, является перспективной. Несколько вариантов таких эритроцитов-биореакторов было разработано ранее, однако их эффективность также оказалась очень низкой, ввиду ограничений по необходимым субстратам реакций. В работах последних лет было показано, что наиболее перспективным для удаления аммония из крови может быть совместное включение двух ферментов: глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы. Такие эритроциты в качестве терапии гипераммониемии пока не применяются, но являются перспективной научной разработкой для внедрения в клиническую практику.

Данная диссертационная работа предлагает одно из решений вопроса иммуногенности и пролонгированного действия ферментных препаратов. В работе Л. Колевой показана возможность создания эритроцитов-носителей с указанными выше ферментами, разработан оптимальный метод их включения в эритроциты и исследовано качество полученных эритроцитов-биореакторов. Разработанный автором стерильный метод получения эритроцитов с аспарагиназой позволил перейти к пилотным клиническим испытаниям данных носителей, в ходе которых продемонстрировано применение полученных эритроцитов-биореакторов в терапии двух пациентов. На этой, хоть и небольшой выборке, была показана безопасность полученных биореакторов и эффективность расщепления аспарагина (продолжительность истощения аспарагина достигала 55 дней для одного из пациентов). Также обнадеживающим результатом является фармакокинетика аспарагиназы, период полувыведения которой составил около 15 дней, что сильно отличается от периода полувыведения аспарагиназы, применяемой в настоящее время (около 1,3 дня). Данные результаты демонстрируют несомненную практическую значимость диссертационной работы. Более того, с участием автора разработано автоматическое устройство, позволяющее включать различные лекарственные препараты в эритроциты, что может служить хорошей отправной точкой при переходе в клиническую практику. К незначительным недостаткам данной части работы можно отнести очень небольшую выборку пациентов, участвующих в клинических испытаниях, учитывая большой разброс полученной дозы аспарагиназы, в результате чего пока сложно делать окончательные выводы о фармакокинетике и фармакодинамике препарата. Однако, число пациентов, которые участвовали в клинических испытаниях, от желания автора не зависело.

Что касается утилизации аммония, то автором впервые получены аммоциты содержащие совместно включенные ГДГ из *Proteus* sp. и АЛТ из сердца свиньи и установлено, что ферменты в аммоцитах работают согласованно, т.к. в процессе потребления аммония происходит пропорциональное увеличение концентрации аланина. Показано, что такие аммоциты способны утилизировать аммоний *in vitro*. Впервые для оценки качества полученных эритроцитов-биореакторов был использован метод

измерения фильтруемости эритроцитов, характеризующий их способность деформироваться. В качестве несущественного замечания к этой части работы с аммоцитами хотелось бы отметить, 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. Принципиальных замечаний по автореферату не имею. Автореферат отражает все разделы диссертации. Полученные результаты и сформулированные на их основе выводы актуальны, обладают научной новизной и практической значимостью.

Основные результаты работы опубликованы в 7 статьях в высокорейтинговых журналах, рекомендованных ВАК, и доложены на нескольких международных конференциях.

По совокупности материалов автореферата можно заключить, что данное исследование отвечает требованиям пп. 9 и 14 положения «О порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ N 842 от 24.09.2013 г.; в редакции Постановления Правительства РФ от 18.03.2023 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Л. Колева заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Кандидат биологических наук,
Научный сотрудник лаборатории
клинического гемостаза
ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России

19.05.2023

Серёгина Елена Александровна

Подпись Серёгиной Елены Александровны удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России

Доктор медицинских наук, профессор


Е. А. Спиридонова

Федеральное государственное бюджетное
учреждение «Национальный медицинский
исследовательский детский гематологический
онкологии имени Дмитрия Рогачева»
Министерства здравоохранения Российской
Федерации

17997, г. Москва, ул. Саморы Машела д. 1

Тел: +7-(495) 937-50-24

E-mail: info@fnkc.ru

