ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Колевой Ларисы на тему: «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 биофизика

Актуальность диссертационной работы

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Ларисы Колевой посвящена развитию очень перспективной медицинской технологии, связанной с использованием эритроцитов как биореакторов, позволяющих направленно удалять низкомолекулярные метаболиты, такие как аспарагин и аммоний. Утилизация аспарагина является обязательным компонентом в терапии острого лимфобластного лейкоза и некоторых других онкологических заболеваний. В клинической практике для этого используется частое интервальное введение L-аспарагиназы, что крайне сложно и часто приводит к иммунным осложнениям. Применение эритроцитов-биореакторов для утилизации аспарагина позволяет значительно уменьшить число сеансов химиотерапии и избежать таких иммунных осложнений. Существующие терапевтические способы купирования гипераммониемических состояний, возникающих при хронических и острых заболеваниях печени и почек недостаточно эффективны. Поэтому использование эритроцитов-биореакторов, для утилизации аммония, является очень перспективным способом лечения гипераммониемии.

Структура диссертации и автореферата.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из содержания, введения, литературного обзора (глава 1), описания материалов и методов (глава 2), результатов и обсуждения (глава 3), заключения, выводов, списка цитированной литературы и списка сокращений. Список цитируемой литературы, насчитывает 193 источников. Работа представлена на 148 странице и содержит 27 рисунков, 5 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 в медицине эритроцитов-биореакторов (ЭБР), содержащие определенные ферменты и катализирующие реакции с удаляемым из плазмы субстратом непосредственно внутри эритроцитов. Соответственно, для удаления из плазмы аспарагина предлагается включение в клетку аспарагиназы, а для утилизации аммония обосновывается включение глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Формулируются цель (создание эффективных эритроцитов-биореакторов для удаления из кровотока низкомолекулярных метаболитов) и

задачи работы. Охарактеризованы научная новизна, практическая значимость работы, методология исследования. Представлена информация об апробации диссертации.

В **«Обзоре литературы»** изложены современные представления о физиологии, метаболизме и регуляции объема эритроцитов. Представлены осмотические методы включения лекарственных веществ в эритроциты и влияния этой технологии на физиологию и жизнеспособность эритроцитов. Большое внимание уделено применению эритроцитов в терапии, как носителям с постепенным высвобождением лекарственного средства, как системе направленной доставки лекарственного препарата, как биореакторам, включающих ферменты не свойственные этим клеткам.

Раздел «**Материалы и методы»** очень подробный и в полной мере отражает все методические аспекты работы. По существу представлена полная технология приготовления и применения фармакоцитов (эритроцитов–биореакторов) от выделения клеток, методов инкапсуляции ферментов в эритроциты до оценки качества фармакоцитов, включающая апирогенность и оценку эффективности полученных эритроцитов–биореакторов.

Глава 3. Результаты и обсуждение представлены в семи взаимосвязанных разделах. Наибольшее внимание было уделено комплексным исследованиям применения эритроцитов–биореакторов для удаления аспарагина у больных с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Сделаны сравнительные эксперименты по включению L-аспарагиназы в эритроциты различными методами и показано, что наиболее эффективным способом является метод проточного гипоосмотического диализа. Отработаны стерильные условия получения эритроцитов с аспарагиназой методом проточного диализа. Основываясь на исследованиях фармакокинетики и фармакодинамики аспарагиназы у пациентов с ОЛЛ при внутримышечном введении раствора фермента, проведены клинические испытания фармакоцитов с аспарагиназой и показано, что предложенный способ утилизации аспарагина является более эффективным по сравнению с традиционным введением в кровь аспарагиназы. Разработано автоматическое устройство для включения биологически активных компонентов в эритроциты. На основании этих разработок были получены и исследованы аммоциты, эритроциты, содержащие глутаматдегидрогеназу (ГДГ) и аланинаминотрансферазу (АЛТ), позволяющие эффективно утилизировать аммоний в плазме крови.

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

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

Оценивая диссертацию Ларисы Колевой, как грамотное и цельное исследование, хотелось бы, в порядке обсуждения, получить разъяснения по следующим **вопросам**:

1. В растворах, используемых в процедурах инкапсуляции ферментов, не используются хелаторы кальция, например ЕГТА (только цитрат при взятии крови). По крайне мере это нигде в диссертации не описывается. Насколько критично высокое содержание ионов кальция в этих средах для функциональных характеристик получаемых фармакоцитов?
2. Почему наблюдается повышенный объем эритроцитов (даже после процедуры запечатывания в изотоническом растворе), полученных методом обратимого гипоосмотического лизиса при осмоляльности именно 90 мОсм/кг (Рисунок 7)? Чем обусловлено уменьшение объема клеток при инкапсуляции ферментов методами диализа?
3. Чем можно объяснить, что эритроциты, полученные после проточного диализа являются более осмотически устойчивыми, чем эритроциты, полученные методами лизиса и обратного осмоса? Почему различается осмотическая резистентность фармакоцитов с аспарагиназой и аммоцитов, хотя эти клетки получены одним методом проточного диализа?
4. Какую долю в общем содержании эритроцитов составляют эритроциты-биореакторы при терапии ОЛЛ и гипераммонемии? Насколько сохраняются транспортные характеристики эритроцитов-биореакторов, и как в терапевтической практике оперативно оценивать эти характеристики фармакоцитов?
5. При сравнении двух пациентов при терапии ОЛЛ фармакоцитами, видно, что если исходная активность аспарагиназы (инкапсулированная в эритроциты) низкая (меньше 1000 МЕ/л), то через неделю наблюдается увеличение концентрации аспарагина (Рисунок 16). Можно ли на основании этих наблюдений сделать рекомендации по применению в терапии фармакоцитов с оцениваемой исходной высокой активностью фермента?

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

Практическая значимость результатов, их достоверность и новизна.

Практическая значимость работы определяется клинической важностью проблемы терапии ОЛЛ и гипераммониемии. Представленная работа является законченной разработкой для внедрения в клиническую практику для лечения острого лимфобластного лейкоза, что очень ценно и не часто встречается в диссертационных работах. Представлена разработанная установка для автоматического включения лекарств в эритроциты.

Подобраны оптимальные условия работы этого устройства на каждом из этапов процесса, для получения высокоэффективного и воспроизводимого включения лекарственного препарата в эритроциты. Эти разработки, безусловно, обладают научной новизной. Проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения ферментов в эритроциты и показано, что наиболее оптимальным является метод проточного диализа. Положения, выносимые на защиту, отражают главное содержание работы. Автореферат полностью раскрывает содержание диссертации. Основные результаты диссертации достоверны и не вызывают сомнения.

Публикации по теме диссертации

Результаты работы опубликованы в 14 научных работах, в том числе в рецензируемых научных журналах (7 работ), удовлетворяющих формальные требования ВАК, а также представлены в трудах конференций (6 тезисов докладов), получен 1 патент.

Заключение

Диссертационная работа «Эритроциты-биореакторы для утилизации из кровотока низкомолекулярных метаболитов» полностью отвечает требованиям, предъявляемым к научным диссертациям согласно положению «Положение о присуждении ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 в действующей редакции от 18 марта 2023 г., а ее автор, Колева Лариса, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Официальный оппонент,

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 имени И. М. Сеченова Российской академии наук

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д.44
Контактный телефон: +7 (812) 5527901
Электронный адрес: iv_mindukshev@mail.ru

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

Ученый секретарь ИЭФБ РАН, к.б.н. _____ Гальперина Е.И.

12.05.2023г.