

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии
Российской академии наук

На правах рукописи

Протасов Евгений Сергеевич

**Системно-биологический анализ эффективности
эритроцитов-биореакторов**

Специальность 1.5.2 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических
наук

Научный руководитель:
академик РАН, доктор биологических
наук Ф. И. Атауллаханов

Москва – 2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Сегодня метаболическая инженерия – область биотехнологии, занимающаяся искусственными модификациями метаболизма, демонстрирует большие успехи, решая задачи в различных прикладных областях от науки и медицины до сельского хозяйства и промышленности. Ее бурному развитию в последние десятилетия способствовали три обстоятельства. Во-первых, были разработаны и нашли широкое применение технологии массового «сканирования» клетки – протеомика, геномика, метаболомика и т. д. Применение этих технологий позволило кардинально сократить трудозатраты на получение информации о клеточном метаболизме. Это позволило за десятилетия собрать огромный объем данных о структуре и функционировании метаболических сетей различных клеток. Во-вторых, к концу XX – началу XXI века мощная вычислительная техника стала общедоступным инструментом, что привело к широкому применению численных и прочих компьютерных методов во всех областях, включая биологию. Это позволило разрабатывать и применять для анализа метаболических систем сложные математические модели. В-третьих, методы экспериментальной молекулярной биологии (в частности, генетическая инженерия), разработанные еще в последней четверти XX века, в веке XXI были доведены до высокой степени совершенства, что позволило наладить их широкое применение для решения практических задач.

Вышеперечисленная триада – «омики», методы системной биологии и методы практической молекулярной биологии, создала базу для успешного вмешательства человека в метаболизм клеток и организмов с целью встраивания в него метаболических путей, несвойственных этим организмам изначально, но полезных человеку. Поскольку метаболизм даже наиболее просто устроенных клеток представляет собой сложную систему из многих химических реакций, взаимодействующих друг с другом как прямо (через общие метаболиты), так и косвенно (через аллостерические регуляции, ферментативные каскады и т. д.), предсказание последствий вмешательства в эту систему становится сложной задачей и требует предварительных расчетов. Методы системной биологии в течение более полувека использования показали высокую эффективность в решении таких задач. Анализ математических моделей метаболических систем позволяет подобрать оптимальную модификацию клеточного метаболизма для решения конкретной практической задачи, что даже в простейших случаях практически невозможно сделать на основе интуитивного понимания метаболической системы. В настоящее время системно-биологические исследования стали неотъемлемой частью конструирования метаболических систем.

Одним из вариантов клеток с искусственно модифицированным метаболизмом являются так называемые эритроциты-биореакторы (ЭБР) – эритроциты, в которые

помещены ферменты, катализирующие реакции, отсутствующие в нормальном эритроците. Такие эритроциты потенциально могут быть использованы в медицинских целях, в случае если необходимо производить или утилизировать какие-либо вещества в кровотоке пациента. Очевидной и давно известной в медицине альтернативой ЭБР является прямое введение в кровоток пациента ферментов, катализирующих нужные реакции. Однако, в кровотоке белки подвергаются воздействию иммунной системы и протеаз плазмы крови. Это влечет за собой два нежелательных следствия. Во-первых, быстрое разрушение ферментов резко сокращает срок их функционирования. Во-вторых, в качестве побочного эффекта у пациентов могут наблюдаться сильные аллергические реакции. Внутри эритроцитов ферменты изолированы от иммунной системы и протеаз плазмы, поэтому использование ЭБР позволяет избежать нежелательных эффектов, описанных выше.

К настоящему времени различными научными группами по всему миру было создано и экспериментально исследовано большое количество вариантов ЭБР различного назначения. Некоторые из них применяются в медицинской практике (например, ЭБР с аспарагиназой). Несмотря на то, что практически все опубликованные экспериментальные исследования *in vitro* и *in vivo* оказались успешны в том смысле, что полученные ЭБР были способны потреблять или производить целевые вещества, подавляющая часть из них продемонстрировала низкую эффективность, причины которой проанализированы не были. Такое положение дел демонстрирует, с одной стороны, потенциальную перспективность технологии ЭБР для медицинских целей; с другой же стороны, становится понятной необходимость применения системно-биологического подхода в разработке новых ЭБР. Системно-биологические методы, успешно применяемые в других задачах метаболической инженерии, могли бы помочь не только установить причины низкой эффективности существующих ЭБР, но и выработать меры по ее увеличению, а также общие подходы к метаболическому конструированию эффективных ЭБР. До настоящего момента подобных теоретических исследований практически не проводилось.

Разработанность темы исследования

ЭБР различного назначения разрабатывались с начала 1980-х годов разными научными группами по всему миру. Некоторые из разработанных ЭБР (например ЭБР для утилизации аспарагина) успешно применяются в клинической практике. К моменту написания настоящей работы в литературе было описано два типа ЭБР для утилизации аммония – ЭБР на основе глутаматдегидрогеназы и ЭБР на основе глутаминсинтетазы. Несмотря на то, что была продемонстрирована работоспособность описанных ЭБР *in vitro* и *in vivo*, оба варианта ЭБР продемонстрировали низкую эффективность. Анализ причин наблюдаемой низкой эффективности в опубликованных работах не проводился.

Также в литературе были описаны различные варианты ЭБР для утилизации этанола. Все эти варианты сводились к использованию двух ферментов – алкогольдегидрогеназы (ADH) и альдегиддегидрогеназы (ALDH). Были предложены ЭБР, основанные на работе каждого из этих ферментов по отдельности, а также на совместной работе двух ферментов. ЭБР на основе совместной работы ADH и ALDH продемонстрировали достаточно высокую эффективность *in vitro*. Также в 2017 году была предпринята попытка теоретического анализа факторов, ограничивающих эффективность работы таких ЭБР. Анализ упрощенной математической модели метаболической системы рассматриваемых ЭБР показал, что скорость окисления этанола ограничена скоростью притока пирувата в систему из внешней среды. Экспериментальная проверка результатов этого анализа подтвердила, что увеличение концентрации пирувата во внешней среде приводит к увеличению скорости окисления этанола. Эта попытка оставалась единственной попыткой теоретического анализа эффективности ЭБР. Несмотря на успешность проведенного анализа, полученные результаты не были полными, так как использованная математическая модель не включала в себя описания гликолиза, с которым встроенная метаболическая система взаимодействует через общие метаболиты, и, следовательно, не позволяла проанализировать ограничения эффективности ЭБР, связанные со взаимодействием реакций встроенного метаболического пути с собственным метаболизмом эритроцита.

Цель работы

Целью настоящей работы является системно-биологический анализ факторов, ограничивающих эффективность работы описанных в литературе биореакторов и использование результатов этого анализа для конструирования эффективных биореакторов на примере ЭБР, утилизирующих аммоний и ЭБР, утилизирующих этанол.

Задачи исследования

1. Создание математических моделей ЭБР, утилизирующих аммоний, с *gjlvtom*. различных метаболических путей.
2. Выявление с помощью анализа построенных моделей причин низкой эффективности ранее предложенных ЭБР и конструирование на основе полученных выводов метаболического пути для создания более эффективных ЭБР, утилизирующих аммоний.
3. Построение математической модели, описывающей метаболизм новых предложенных ЭБР для утилизации аммония, ее анализ с целью оценки возможной эффективности этих ЭБР и выявления факторов, ограничивающих эту эффективность.
4. Экспериментальная проверка *in vitro* некоторых предсказаний модели новых ЭБР для удаления аммония.

5. Создание математической модели метаболической системы ЭБР, утилизирующих этанол на основе реакций, катализируемых алкогольдегидрогеназой (ADH) и альдегиддегидрогеназой (ALDH).

6. Анализ полученной математической модели ЭБР для утилизации этанола с целью оценки возможной эффективности таких ЭБР, а также выявления факторов, ограничивающих эту эффективность.

Научная новизна

1. Впервые построены математические модели метаболических систем ЭБР для удаления аммония из кровотока на основе глутаминсинтетазы (GS), глутаматдегидрогеназы (GDH), аланиндегидрогеназы (AlaDH).

2. В результате анализа этих математических моделей выявлены причины низкой эффективности удаления аммония ранее предложенными в литературе ЭБР, содержащими GDH или GS – низкая проницаемость мембраны для α -кетоглутарата и глутамата, а также выявлена причина неэффективности ЭБР на основе AlaDH – протекание реакции в сторону производства аммония в условиях, близких к физиологическим.

3. Результаты системно-биологического анализа метаболической системы ЭБР впервые использованы для конструирования нового ЭБР для удаления аммония.

Предложен вариант такого ЭБР, содержащий одновременно ГДГ и аланиаминотрансферазу (ААТ). Использование такого метаболического пути позволяет избежать проблем с транспортом субстратов и продуктов встроенных реакций сквозь мембрану, так как при совместной работе обоих ферментов эти субстраты (глутамат и α -кетоглутарат) потребляются и производятся внутри эритроцита циклически, а образующийся в качестве нового продукта аланин достаточно легко проходит через эритроцитарную мембрану.

4. Проанализированы возможные последствия взаимодействия встроенного метаболического пути с метаболизмом эритроцита для ЭБР на основе GDH и ААТ. Показано, что при увеличении активности ферментов встраиваемой системы происходит дополнительное окисление NADPH в реакции GDH, что приводит к снижению концентрации NADPH, активации пентозофосфатного пути и, в конечном итоге, к потере стационарного состояния в гликолизе.

5. Впервые построена полная математическая модель метаболической системы ЭБР, потребляющего этанол, на основе совместной работы двух ферментов алкогольдегидрогеназы (ADH) и альдегиддегидрогеназы (ALDH).

6. Выявлено два возможных ограничения для эффективности ЭБР потребляющих этанол: скорость поступления пирувата в клетку из внешней среды, и потеря

стационарного состояния в гликолизе при увеличении активности ферментов встраиваемой системы в результате конкуренции за окисленный никотинамидадениндинуклеотид (NAD) между гликолизом и реакциями встраиваемого пути. Обнаружено, что при переходе от устойчивого стационарного состояния гликолиза к нестационарному с накоплением ряда метаболитов, в гликолизе возникает колебательный режим.

Научно-практическое значение

В работе впервые проведен системно-биологический анализ функционирования эритроцитов-биореакторов. Анализ математических моделей ЭБР, утилизирующих аммоний и этанол, выявил две главные группы факторов, ограничивающих возможную эффективность ЭБР: низкая скорость транспорта субстратов или продуктов целевых реакций сквозь мембрану эритроцита и нарушения работы метаболизма эритроцита из-за взаимодействия с реакциями встраиваемого метаболического пути. Примененные методы анализа, а также выводы, полученные в результате этого анализа, могут быть использованы для конструирования новых эффективных ЭБР разного назначения.

Методология и методы исследования

Системно-биологический анализ метаболических систем ЭБР проводился с помощью математического моделирования. Математические модели представляют собой системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) первого порядка, описывающих зависимости концентраций веществ в клетке от времени. Различные модели включают в себя ОДУ, описывающие работу различных частей метаболизма эритроцита (гликолиз, пентозофосфатный путь окисления глюкозы, окислительно-восстановительный метаболизм) и реакций встроенных метаболических путей. Правые части ОДУ представляют собой разности скоростей потребления и производства соответствующего метаболита. Скорости ферментативных реакций описаны согласно представлениям ферментативной кинетики, данные о кинетических константах и механизмах ферментов взяты из литературы. Для метаболитов, способных проходить сквозь мембрану эритроцита учтены также скорости трансмембранного транспорта.

Численные решения систем ОДУ получены методами Рунге-Кутты переменного порядка и шага, использующими формулы численного дифференцирования порядка 1-5 в MATLAB 2009.b.

В анализе математических моделей метаболических систем использованы также методы теории динамических систем и качественной теории дифференциальных уравнений.

ЭБР, утилизирующие аммоний, были получены из эритроцитов здоровых доноров методом обратимого гипотонического диализа. Активности глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы в лизате ЭБР измерены

энзиматическими методами, скорость реакций определялась фотометрическим методом по изменению концентрации восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH). Изменение концентрации аммония в суспензии ЭБР *in vitro* определено с помощью ион-селективного электрода.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны математические модели эритроцитов-биореакторов, убирающих из кровотока аммоний или этанол, включающие подробное описание реакций гликолиза и встроенных в эритроцит ферментов.
2. Выявлены факторы, ограничивающие эффективность ранее предложенных ЭБР для утилизации аммония.
3. ЭБР на основе AlaDH не способен потреблять аммоний в физиологических условиях.
4. ЭБР для удаления аммония на основе совместной работы GDH и ААТ способен удалять аммоний с высокой скоростью в течение длительного времени.
5. Теоретические предсказания моделей, описывающих работу ферментной системы GDH и ААТ, находящейся в растворе или внутри ЭБР, хорошо согласуются с результатами экспериментов, проведенных *in vitro*.
6. При увеличении активности GDH и ААТ в ЭБР, утилизирующих аммоний, происходит исчезновение стационарного состояния в гликолизе и монотонное накопление ряда метаболитов гликолиза, которое приводит к гибели клетки.
7. Эффективность ЭБР, утилизирующего этанол, ограничена двумя факторами: скоростью поступления пирувата из внешней среды и взаимодействием встроенного метаболического пути с гликолизом через общие метаболиты – NAD и NADH.
8. Превышение пороговых значений активностей ADH и ALDH, встраиваемых в, утилизирующие этанол ЭБР, приводит к потере стационарного состояния в гликолизе и гибели клетки из-за накопления метаболитов. Стадии накопления метаболитов предшествует состояние, в котором наблюдаются колебания концентраций всех метаболитов гликолиза.

Личный вклад автора

Все работы по построению и анализу математических моделей ЭБР, получению ЭБР, утилизирующих аммоний, проведению экспериментов *in vitro*, обработке

результатов, написанию статей и тезисов конференций по материалам диссертации проведены либо лично автором, либо при его непосредственном участии.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность результатов гарантируется использованием современных данных о кинетических параметрах всех включенных в модели реакций и концентрациях метаболитов, наблюдаемых в физиологических условиях, совершенством программ для решения дифференциальных уравнений моделей, согласованностью результатов теоретического расчета с результатами, полученными при исследовании данных ЭБР в экспериментах *in vitro*, а также внутренней согласованностью всех полученных результатов.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на II Национальном Конгресса по Регенеративной Медицине (3-5 декабря 2015, Москва), 10th Asia Continental Branch Congress of International Society of Pediatric Oncology (10th SIOP Asia), 25-28 May 2016, Moscow, Russia; International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy (16-18 ноября 2017, Барселона, Испания); 4 International Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems (5 April, 2021, London, Great Britain); первая международная виртуальная конференция «Системная Биология и Системная Физиология: Регуляция Сложных Биологических Систем» (7-9 декабря 2020, Москва, Россия); вторая международная гибридная конференция «Системная Биология и Системная Физиология: Регуляция Сложных Биологических Систем» (25-27 августа 2021, Москва, Россия); 5 Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems (13 October, 2021, London, Great Britain).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, 1 патент и 7 публикаций в материалах конференций и съездов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор (глава 1), постановку задачи (глава 2), описание материалов и методов (глава 3), результаты (глава 4), обсуждение результатов (глава 5), выводы, список сокращений и обозначений, список цитированной литературы (129 ссылок), а также благодарности. Работа содержит 35 рисунков и 17 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** приведено краткое описание текущего состояния области исследования и возможных путей ее дальнейшего развития. На основе этого описания сформулирована цель и задачи работы. Также приведено краткое описание методологии и методов исследования.

Глава 1 посвящена обзору литературы. В ней приведены общие сведения, существенные для проведения дальнейшего исследования. Первые три подраздела (1.1-1.3) посвящены общей характеристике эритроцита: его физиологии, структуре и регуляции его метаболической системы, а также механизмам транспорта низкомолекулярных соединений сквозь его мембрану. Далее (раздел 1.4) приводится краткое описание методов и задач метаболической инженерии и некоторые примеры ее успешного применения в различных прикладных областях. Следующий раздел (1.5) содержит краткий исторический обзор развития математических моделей метаболической системы эритроцита. В разделе 1.6 приведено описание ранее созданных ЭБР для утилизации аммония и этанола. Оставшаяся часть первой главы посвящена характеристике ферментов, катализирующих реакции встраиваемых в анализируемые ЭБР метаболических путей (раздел 1.7) и математической модели гликолиза в эритроците человека, которая используется в качестве основы для построения математических моделей метаболических систем в настоящей работе (раздел 1.8).

В **Главе 2** описаны цели и постановка задач настоящего исследования.

Глава 3 содержит описание теоретических и экспериментальных методов, применяемых в данной работе. Дана характеристика исследуемых математических моделей, приведены системы дифференциальных уравнений, уравнения скоростей биохимических процессов и значения кинетических констант ферментов.

Математические модели метаболических систем ЭБР представляют собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) первого порядка, возможно, дополненную алгебраическими уравнениями. При этом одно ОДУ описывает изменение концентрации одного метаболита в клетке. Скорость изменения концентрации вещества (производная концентрации этого вещества по времени) приравнивается к алгебраической сумме скоростей процессов, в которых рассматриваемое вещество потребляется или производится. Таким образом ОДУ для некоторого вещества X имеет вид

$$\frac{dX}{dt} = \sum_i V_i^{Xpr} - \sum_j V_j^{Xc}$$

где V^{Xpr} – скорости процессов производства вещества X , V^{Xc} – скорости процессов его потребления. Указанные процессы обычно представляют собой либо ферментативные реакции с участием указанного вещества, либо процессы его транспорта сквозь клеточную мембрану. Скорости процессов представляют собой функции (чаще всего нелинейные) концентраций метаболитов (в общем случае не только субстратов и продуктов реакции). Уравнения скоростей процессов были взяты из литературы в готовом виде, либо, при необходимости, получены или дополнены методом Кинга-Альтмана на основе литературных данных о механизме ферментативной реакции. Значения кинетических констант ферментативных реакций взяты из литературы.

Математические модели метаболических систем различных ЭБР помимо описания реакций встраиваемого метаболического пути включали в себя описание гликолиза, а также, при необходимости, других частей метаболизма эритроцита (пентозофосфатный путь, окислительно-восстановительный метаболизм, транспорт метаболитов сквозь мембрану эритроцита).

Были проанализированы математические модели четырех вариантов ЭБР для утилизации аммония – на основе включения отдельных ферментов (глутаматдегидрогеназы, глутаминсинтетазы или аланиндегидрогеназы) и на основе работы совместно включенных в эритроцит глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы. Также был исследован ЭБР, утилизирующий этанол на основе совместной работы алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы.

Полученные модели анализировали с применением численных методов. Временные зависимости концентраций метаболитов были рассчитаны методами Рунге-Кутты переменного порядка и шага на основе формул численного дифференцирования порядка от 1 до 5. Стационарные концентрации получали как численные решения систем алгебраических уравнений, полученных из систем ОДУ приравниванием правых частей уравнений к 0.

При построении и анализе математических моделей сделаны следующие допущения:

1. Скорость гексокиназной реакции считали независимой от концентрации глюкозы, так как константа Михаэлиса гексокиназы для глюкозы примерно в 10 раз ниже физиологических концентраций глюкозы.
2. Мембрану эритроцита считали непроницаемой для всех веществ, кроме пирувата, лактата, аланина, α -кетоглутарата, аммония, глутамина, этанола и ацетальдегида.
3. Влияние трансмембранных потенциалов на транспорт веществ не учитывали.
4. Концентрации всех веществ, способных проходить сквозь мембрану, в плазме крови считали постоянными.
5. Предполагалось, что внеклеточные и внутриклеточные концентрации аммония, ацетальдегида и ацетата находятся в равновесии, так как проницаемость мембраны для этих веществ чрезвычайно велика.
6. Суммы концентраций аденилатов (ATP, ADP и AMP) и переносчиков электронов (NAD и NADH; NADP и NADPH) считали постоянными.
7. Скорость окисления NADPH глутатионредуктазой считали постоянной.
8. Скорость восстановления NADP в пентозофосфатном пути окисления глюкозы считали равной скорости глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции, так как именно эта реакция в пентозофосфатном пути является лимитирующей.
9. Объем эритроцитов считали постоянным.

Глава 4 посвящена описанию полученных результатов. Анализ математических моделей, ранее созданных ЭБР для удаления аммония, показал, что низкая эффективность ЭБР на основе глутаматдегидрогеназы (GDH) или глутаминсинтетазы (GS) обусловлена низкой проницаемостью мембраны эритроцита для субстратов этих реакций – α -кетоглутарата или глутамата, соответственно (Рис. 1А-В). Стационарная скорость потребления аммония ЭБР, содержащими GDH, равна в стационарном состоянии скорости притока α -кетоглутарата из внешней среды и не превышает 2 мкМ/ч (на 1 литр клеток). В случае GS, главным ограничением для эффективности ЭБР является неспособность глутамата проходить сквозь клеточную мембрану. В результате этого ЭБР на основе GS способен потреблять аммоний только до исчерпания глутамата внутри клетки (в эритроцитах содержится не более 0.5 мМ глутамата) (Рис. 1Б, В).

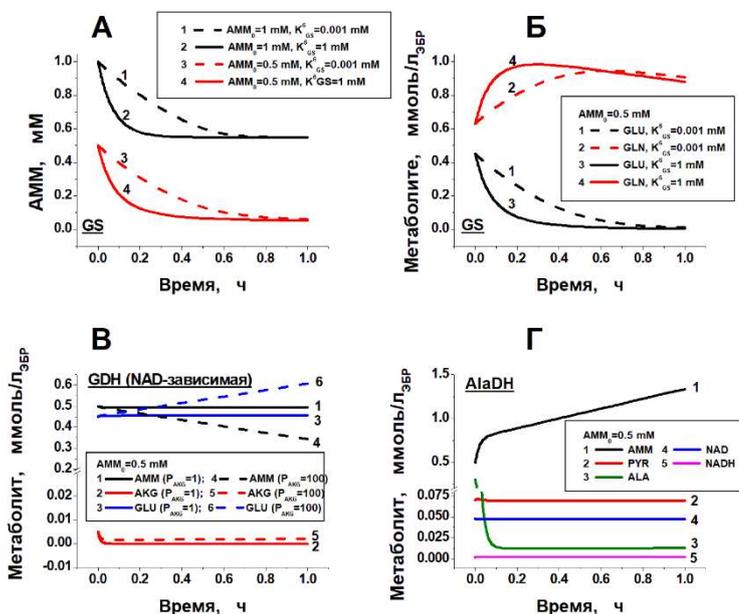


Рис. 1. Кинетика аммония (АММ) и других метаболитов в ЭБР, загруженных различными индивидуальными ферментами. Гематокрит суспензии равен 100%. Исходная концентрация АММ равна 1 или 0.5 мМ. А. – Снижение АММ в присутствии ЭБР с GS (1 МЕ/млЭБР) при различных величинах константы K_{GS}^6 , которую не нашли в литературе. Б. – Кинетика глутамата (GLU) и глутамина (GLN) в ЭБР с GS. В. – Кинетика АММ,

α -кетоглутарата (АКГ) и GLU в ЭБР с NADP-зависимой GDH (10 МЕ/млЭБР) при разных проницаемостях мембраны для АКГ. Г. – Кинетика АММ, пирувата (PYR), аланина (ALA), NAD и NADH в присутствии ЭБР с AlaDH.

На основе результатов проведенного анализа была выдвинута идея использования пирувата в роли субстрата для связывания аммония в реакции, катализируемой аланиндегидрогеназой (AlaDH). Пируват в этом качестве обладает двумя важными преимуществами. Во-первых, он легко проходит сквозь мембрану эритроцита, что позволяет рассчитывать на достаточно высокую скорость связывания аммония. Во-вторых, продуктом аминирования пирувата является аланин, проницаемость мембраны для которого также достаточно велика, что позволяет избежать накопления его в клетке в процессе работы ЭБР. Кроме того, аланин безвреден для

организма и может быть использован другими клетками для своих нужд. Вариант ЭБР на основе включенной AlaDH казался перспективным, однако расчет показал, что отношение действующих масс субстратов и продуктов этой реакции в физиологических условиях превышает константу равновесия реакции. Таким образом, в физиологических условиях данный ЭБР будет производить аммоний и не может быть использован для его потребления (Рис. 1Г).

Так как сохранение пары пируват - аланин в качестве начального субстрата и конечного продукта метаболического пути утилизации аммония по-прежнему выглядело привлекательным, было решено использовать метаболический путь из двух последовательных реакций, первая из которых катализируется GDH, а вторая – аланинаминотрансферазой (AAT) (Рис. 2). В этой последовательности реакций

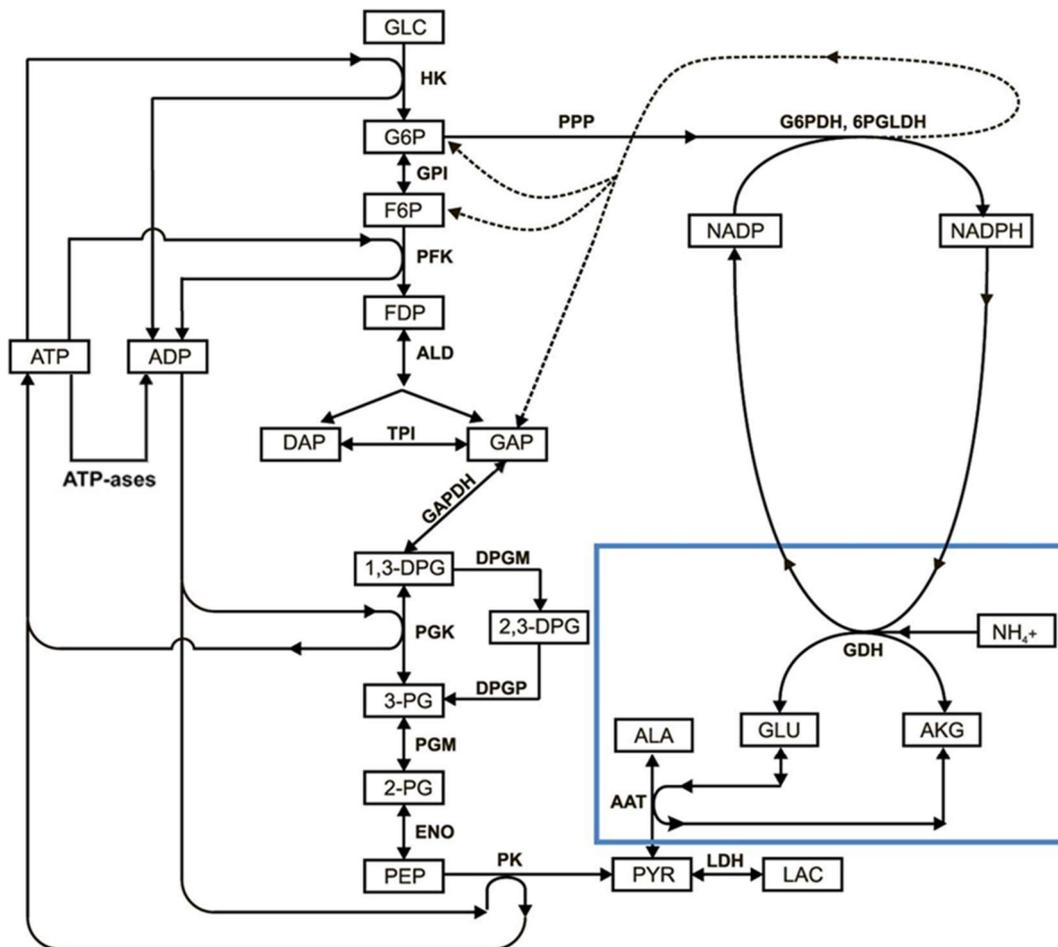


Рис. 2. Схема метаболической системы ЭБР с ГДГ и ААТ. Метаболический путь утилизации аммония выделен синей рамкой. Использованные сокращения: GLC – глюкоза; G6P – глюкозо-6-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FDP – фруктозо-1,6-дифосфат; DAP - дигидроксиацетонфосфат; GAP – глицеральдегид-3-фосфат; 1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат; 2,3-DPG – 2,3-дифосфоглицерат; 3-PG – 3-фосфоглицерат; 2-PG – 2-фосфоглицерат; PEP - фосфоенолпируват; PYR - пируват; LAC - лактат; NADP и NADPH – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата, соответственно; ATP - аденозинтрифосфат; ADP - аденозиндифосфат; НК - гексокиназа; GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза; PFK - фосфофруктокиназа; ALD - альдолаза; TPI -

триозофосфатизомераза; GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; PGK – фосфоглицераткиназа; PGM – фосфоглицератмутаза; ENO – енолаза; PK – пируваткиназа; LDH – лактатдегидрогеназа; PPP – пентозофосфатный путь окисления глюкозы; GDH – глутаматдегидрогеназа; AAT – аланинаминотрансфераза; ALA – аланин; AKG – α -кетоглутарат; GLU – глутамат; NH_4^+ – ион аммония. На схеме не представлены реакции с участием NAD/NADH.

α -кетоглутарат и глутамат потребляются и производятся внутри эритроцита циклически, что позволяет системе работать независимо от их транспорта извне.

Анализ математической модели метаболической системы нового ЭБР показал, что такие ЭБР могут утилизировать аммоний в физиологических условиях в течение длительного времени. Для создания такого ЭБР следует использовать NADP-специфические или универсальные (работающие с NAD и NADP) GDH.

Метаболический путь на основе NAD-специфической GDH производит аммоний вместо его потребления (Рис. 3А). Смещение равновесия реакции происходит из-за низкого (менее 0.05) значения отношения, $[\text{NADH}]/[\text{NAD}]$, которое поддерживается в клетке за счет окисления NADH лактатдегидрогеназой (LDH). Действительно, снижение активности LDH в 100 раз приводит к увеличению этого отношения и смещению равновесия GDH реакции в сторону потребления аммония (Рис. 3А, кривая 2). Отношение $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}]$, напротив поддерживается в клетке очень высоким (около 166, что соответствует доле NADPH в пуле ($[\text{NADPH}]+[\text{NADP}]$) более 0.99) за счет восстановления NADP в пентозофосфатном пути, что и обеспечивает стабильную работу в нужном направлении метаболического пути на основе NADP-специфической или универсальной GDH (рис. 3Б).

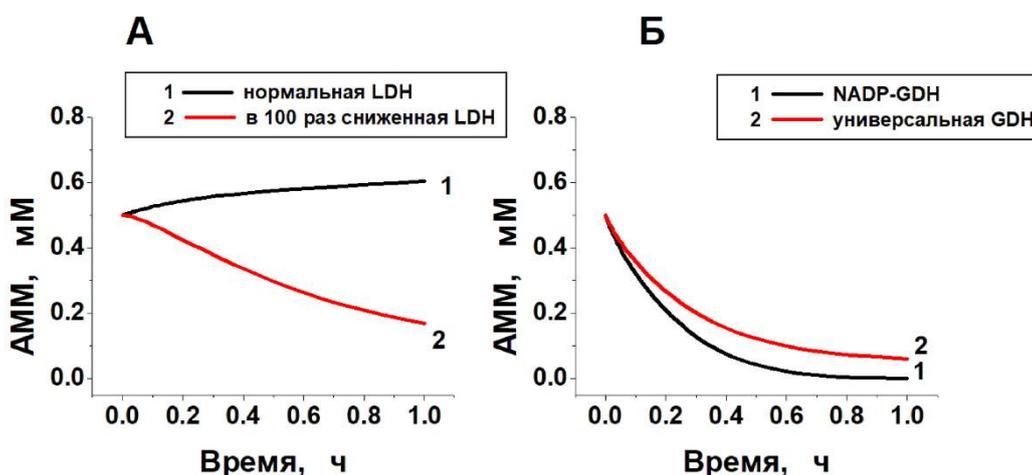


Рис. 3. Изменение концентрации аммония в среде с ЭБР на основе AAT (50 ME/млЭБР) и GDH (10 ME/млЭБР) различной специфичности: NAD-зависимой (А) при нормальной (кривая 1) или в 100 раз сниженной (кривая 2) активности лактатдегидрогеназы, и NADP-зависимой или универсальной (Б).

Эффективность работы предложенных ЭБР ограничена двумя факторами. Первый из них связан с транспортом пирувата из внешней среды. Максимально возможная скорость потребления аммония в стационарном состоянии равна скорости притока пирувата из внешней среды. В физиологическом состоянии (при концентрации пирувата в плазме 0.05-0.1 мМ) эта скорость составляет 3-5 мМ/ч. Второе ограничение связано с взаимодействием метаболического пути утилизации аммония с собственным метаболизмом эритроцита. При увеличении скорости потребления аммония до примерно 12 мМ/ч наблюдается исчезновение стационарного состояния в гликолизе, что ведет к монотонному возрастанию концентраций метаболитов гликолиза (Рис. 4).

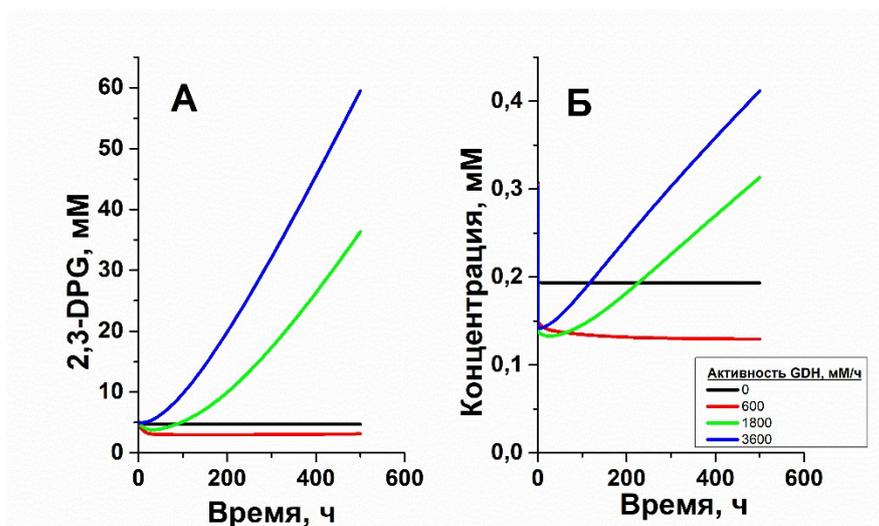


Рис. 4. Динамика концентрации 2,3-DPG (А) и суммарной концентрации всех остальных метаболитов гликолиза, кроме 2,3-DPG и аденилатов (Б) при докритических (0, 600 мМ/ч) и сверхкритических (1800, 3600 мМ/ч) активностях GDH. Активность ААТ всегда в 5 раз выше активности GDH.

Активности рассчитаны на 1 л клеток. Концентрация аммония постоянная и равна 0.5 мМ, концентрация пирувата во внешней среде 0.5 мМ.

Механизм исчезновения стационарного состояния в гликолизе связан с тем, что в реакции GDH происходит окисление NADPH. Падение концентрации NADPH приводит к активации пентозофосфатного пути и, следовательно, оттоку в PPP глюкозо-6-фосфата, который ингибирует гексокиназную реакцию. Этот отток приводит к потере стационарного состояния в гликолизе. Непосредственной причиной этого служит возрастание концентрации АТР (более 99% пула аденилатов находится в форме АТР), из-за чего снижается концентрация АДФ и уменьшается скорость пируваткиназной реакции. Поскольку скорость производства метаболитов гликолиза определяется в первую очередь, гексокиназной и фосфофруктокиназной реакциями, скорость их производства начинает превышать максимально возможную скорость, с которой фосфоенолпируват может потребляться в пируваткиназной реакции. В результате этого начинается накопление в клетке всех метаболитов гликолиза до фосфоенолпирувата включительно.

Экспериментальная верификация математической модели, описывающей потребление аммония в системе, содержащей смесь ферментов GDH и ААТ,

добавленных в буфер либо непосредственно, либо внутри ЭБР, в обоих случаях хорошо описывает результаты экспериментов (Рис. 5А и В). Зависимость квазистационарной скорости потребления аммония от соотношения активностей GDH и ААТ, добавленных непосредственно в буфер, также находится в хорошем согласии с экспериментальными данными (Рис. 5Б).

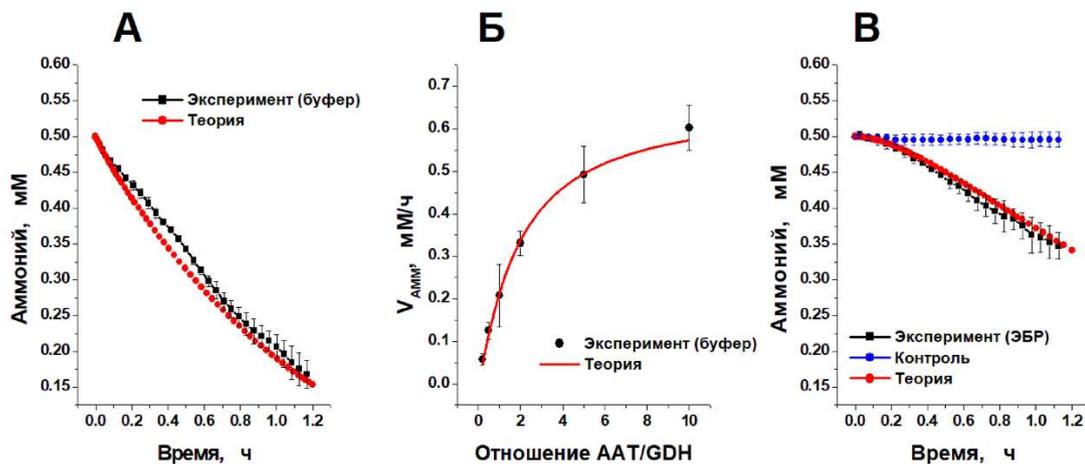


Рис. 5. Сравнение теоретических расчетов модели и данных эксперимента. А. - Снижение концентрации аммония во времени для смеси ферментов GDH (0.3 МЕ/мл буфера) и ААТ (1.5 МЕ/мл буфера), добавленных непосредственно в буфер. Б. – Зависимость квазистационарной скорости потребления аммония от отношения активностей ААТ и GDH ($A_{ААТ}/A_{ГДГ}$), добавленных непосредственно в буферный раствор *in vitro*. В. - Снижение концентрации аммония в суспензии ЭБР, содержащих GDH (0.1 МЕ/мл_{сусп. ЭБР}) и ААТ (0.28 МЕ/мл_{сусп. ЭБР}). Гематокрит суспензии ЭБР равен 9.3%. В качестве контроля представлена кинетика снижения концентрации аммония нативными эритроцитами. Стационарная скорость потребления аммония на панелях А и В была определена как тангенс угла наклона кривых потребления аммония во времени, начиная с 0.3-0.4 ч.

Кроме моделей ЭБР, утилизирующих аммоний, в работе была построена и исследована математическая модель метаболической системы ЭБР для утилизации этанола на основе алкогольдегидрогеназы (ADH) и альдегиддегидрогеназы (ALDH). В этом метаболическом пути этанол последовательно окисляется до ацетальдегида, а затем до ацетата (Рис. 6). В обеих стадиях в качестве окислителя выступает NAD. В таком варианте ЭБР отсутствуют субстраты (помимо этанола), которые должны поступать в клетку из внешней среды, а конечным продуктом является ацетат, проницаемость мембраны клетки для которого очень велика. Следовательно, для данного ЭБР отсутствуют ограничения, связанные с транспортом субстратов и продуктов встраиваемого метаболического пути.

Расчеты показали, что ЭБР, содержащий только ADH не способен долго потреблять этанол в физиологических условиях. Это связано с тем, что отношение действующих масс (ОДМ) для этой реакции в физиологических условиях очень близко к константе равновесия реакции ($K_{равн.}$), которое достигается как только будет переработано 40

мкМ ацетальдегида из 10 мМ добавленного этанола) (при рН 7.0 $ОДМ_{ADH} = [CH_3CHO] \times [NADH] \times [H^+] / ([C_2H_5OH] \times [NAD]) = 25.6 \times 10^{-12}$ М, тогда как $K_{равн.} = 22 \times 10^{-12}$ М) (Рис 7А, зеленая кривая). Результаты расчетов находятся в удовлетворительном согласии с экспериментальными данными, опубликованными в литературе [Magnani, 1990] (Рис. 7Б).

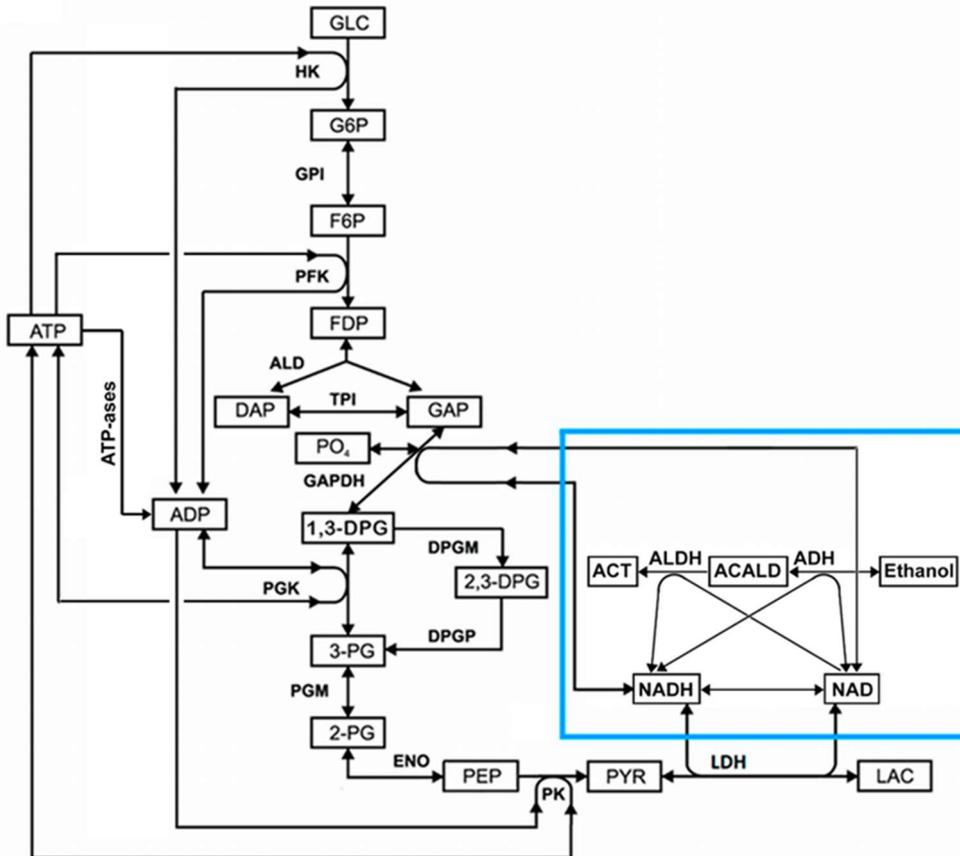
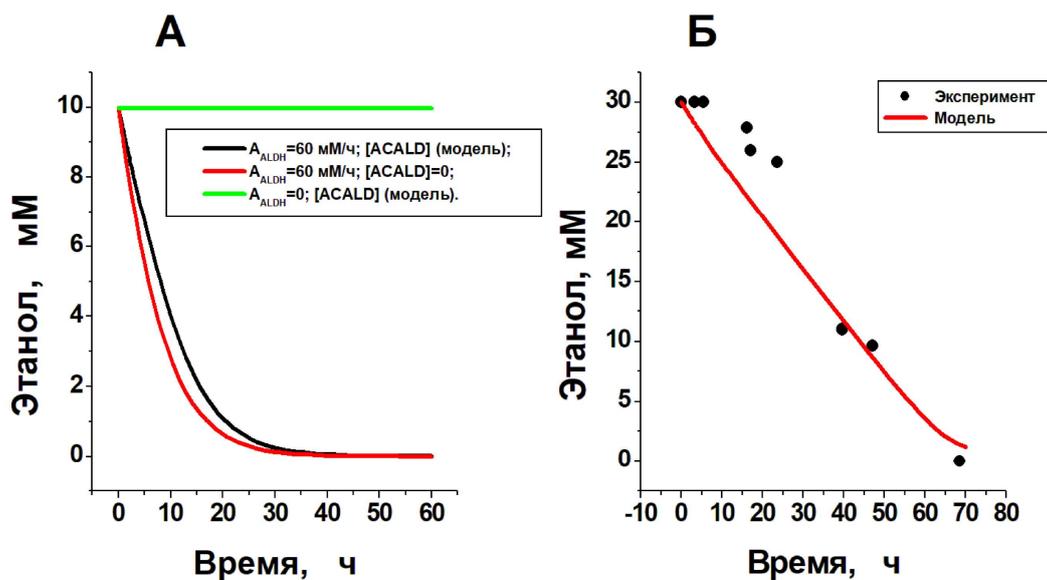


Рис. 6. Схема метаболической системы ЭБР, потребляющего этанол, содержащего ADH и ALDH. Реакции встраиваемой системы выделены синей рамкой. Использованы сокращения, приведенные на Рис. 2, а также: ACALD - ацетальдегид; АСТ - ацетат; ADH - алкогольдегидрогеназа; ALDH – альдегиддегидрогеназа; NAD и NADH – окисленная и восстановленная форма никотинамиадениндинуклеотида, соответственно.

Так же, как и для ЭБР, потребляющего аммоний, для ЭБР, потребляющего этанол существует два фактора, ограничивающих максимально возможную скорость его работы. Первый из них связан с транспортом пирувата из внешней среды. NAD восстанавливается до NADH в ADH и ALDH реакциях. Образовавшийся NADH затем окисляется в реакции, катализируемой лактатдегидрогеназой, субстратом которой является пируват. В результате скорость окисления этанола оказывается связанной со скоростью поступления пирувата в систему. Стехиометрический анализ показывает, что в стационарном состоянии скорость окисления этанола равна половине скорости притока пирувата извне. Таким образом, максимальная скорость работы встроенного метаболического пути может быть ограничена не только скоростью притока субстрата, но и скоростью притока некоторого стороннего



вещества, не участвующего в целевых реакциях прямо. Зависимость поведения метаболической системы от скорости окисления этанола показана на Рис. 8.

Рис. 7. А. - Зависимость концентрации этанола от времени в суспензии ЭБР с гематокритом 0.5 при активности АДН на всех кривых 60 мМ/ч. Активность АЛДН равна 60 мМ/ч (черная и красная кривые) или 0 (зеленая кривая). Концентрация ацетальдегида рассчитана из уравнений модели (черная и зеленая кривые) или равна 0 (красная кривая). Б. – Экспериментальная (точки) и теоретически рассчитанная (красная кривая) зависимость концентрации этанола от времени в суспензии ЭБР с гематокритом 0.25 при активности АДН 78 мМ/ч, АЛДН 18 мМ/ч и начальной концентрации этанола 30 мМ

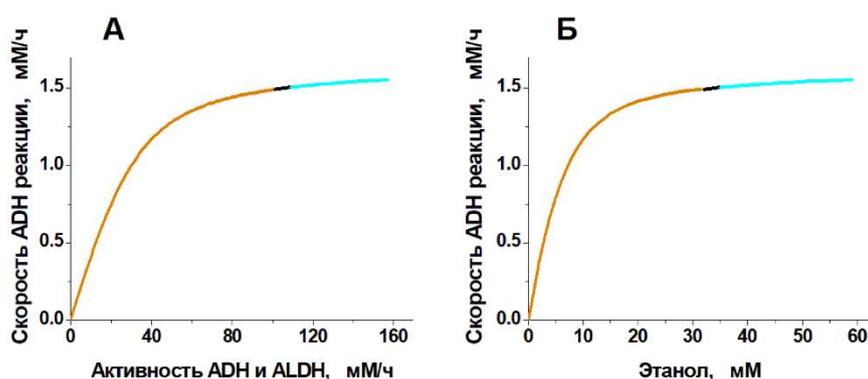


Рис. 8. Зависимость стационарной скорости окисления этанола от активности АДН и АЛДН (А) или от концентрации этанола в среде (Б). Оранжевый, черный и бирюзовый цвета линии соответствуют устойчивому стационарному состоянию, неустойчивому стационарному состоянию с колебательным режимом и неустойчивому стационарному состоянию с монотонным накоплением метаболитов, соответственно. А. – Концентрация этанола равна 10 мМ, активность АДН равна активности АЛДН. Б. – Активности АДН и АЛДН равны 40 мМ/ч.

Увеличение этой скорости может быть достигнуто двумя способами: увеличением активности ADH и ALDH при одной и той же концентрации этанола в среде или увеличением концентрации этанола в среде при одних и тех же активностях ADH и ALDH. Из-за увеличения скорости восстановления NAD, его концентрация в клетке уменьшается. Так как NAD – субстрат глицеральдегидфосфатдегидрогеназной реакции, это приводит к снижению ее скорости. С этим связана потеря устойчивости стационарного состояния в гликолизе, что приводит сначала к переходу системы в режим, при котором наблюдаются колебания концентраций всех гликолитических метаболитов (Рис. 9А), а затем, при дальнейшем увеличении скорости окисления этанола, колебательный режим сменяется монотонным накоплением метаболитов верхней части гликолиза (FDP, DAP и GAP) (Рис. 9Б).

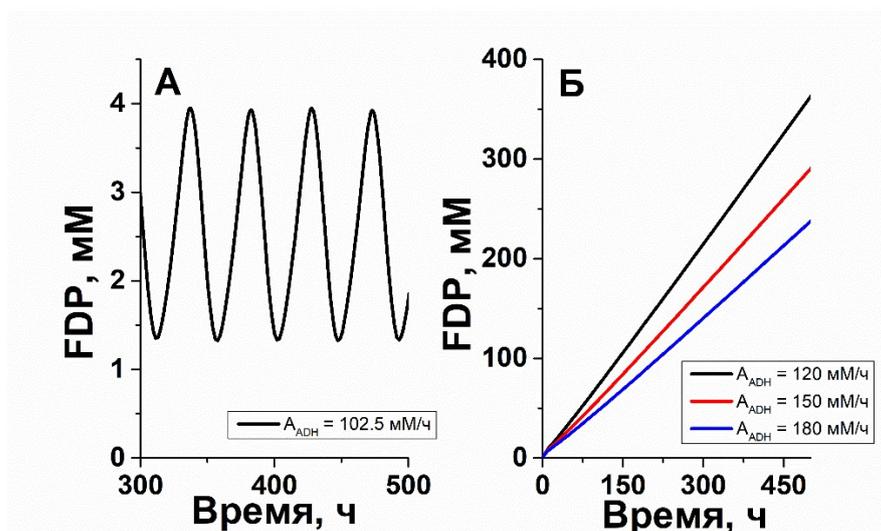


Рис. 9. Иллюстрация колебаний (А) и монотонного возрастания концентраций FDP при различных активностях ADH и ALDH (Б). Активности ADH и ALDH равны друг другу. Для панели А активность ADH составляет 102.5 mM/ч, что соответствует устойчивому режиму колебаний.

Очевидно, что описанные ЭБР потенциально пригодны для медицинского применения только в случае, если активности ADH и ALDH внутри клеток соответствуют режиму с устойчивым стационарным состоянием.

Колебательные режимы в гликолизе были неоднократно теоретически предсказаны и экспериментально наблюдались ранее, однако возможность такого режима в эритроците показана впервые.

Глава 5 посвящена обсуждению полученных результатов. Два параметра можно считать определяющими меру медицинской эффективности ЭБР – скорость потребления или производства целевого вещества и время жизни клеток-биореакторов в кровотоке. Из приведенного выше анализа можно заключить, что существует два класса факторов, ограничивающих эту эффективность – факторы, связанные с транспортом субстратов и продуктов целевого метаболического пути сквозь мембрану эритроцита и факторы, обусловленные взаимодействием встраиваемых реакций с собственным метаболизмом эритроцита. При этом факторы любого из двух типов могут проявляться как в снижении скорости производства или потребления целевых веществ, так и в снижении времени жизни клеток.

Низкая скорость притока субстратов из внешней среды приводит к снижению скорости целевых реакций (вплоть до нуля, если какой-либо из субстратов не способен проходить сквозь мембрану клетки). Этой причиной обусловлена неэффективность ЭБР для утилизации аммония на основе GDH (медленный приток α -кетоглутарата) и ЭБР на основе GS (отсутствие притока глутамата). Низкая скорость оттока продуктов во внешнюю среду приводит к накоплению продуктов внутри клетки и, как следствие, сначала ухудшению деформируемости эритроцита, а затем и его гибели от осмотического лизиса. Даже при медленном накоплении вещества внутри клетки ухудшение деформируемости эритроцита все равно приводит к его преждевременной гибели, так как он теряет способность проходить сквозь тонкие капилляры, из-за чего уничтожается макрофагами селезенки. Проблема накопления продукта наблюдается в ЭБР на основе GDH из-за неспособности глутамата (продукта GDH реакции) проходить сквозь мембрану эритроцита. Таким образом, при конструировании метаболического пути для создания нового ЭБР необходимо выбирать в качестве начальных субстратов и конечных продуктов вещества, относительно легко проходящие через мембрану эритроцита (для ответа на вопрос, какую проницаемость можно считать достаточной, в каждом конкретном случае необходимо производить расчеты для конкретной задачи). Даже в случае, когда проницаемость мембраны для субстрата велика, скорость целевой реакции, по-прежнему, может оставаться связанной со скоростью его притока в клетку. Так, скорость потребления аммония ЭБР на основе GDH и ААТ в стационарном состоянии равна скорости транспорта пирувата из внешней среды.

Возможны также ситуации, когда скорость реакции опосредовано ограничена притоком некоторого стороннего вещества (не являющегося субстратом целевой реакции). Например, скорость окисления этанола ЭБР на основе ADH и ALDH в стационарном состоянии равна половине скорости притока пирувата извне. Это обусловлено тем обстоятельством, что пируват служит окислителем для NADH, который в свою очередь, является продуктом окисления этанола. Выявление ограничений такого типа неочевидно, и требует стехиометрического анализа системы.

Простейшее ограничение, обусловленное взаимодействием встраиваемых реакций и реакций собственного метаболизма эритроцита, связано с равновесием целевых реакций. Поскольку в физиологическом состоянии концентрации всех веществ внутри клетки стационарны или квазистационарны, а их значения определяются скоростями внутриклеточных метаболических реакций, может возникнуть ситуация, когда отношение действующих масс реагентов целевой реакции близко к константе равновесия или превышает ее. Это может приводить к остановке целевой реакции через короткий промежуток времени. Так ЭБР для утилизации этанола на основе только ADH в физиологических условиях при начальной концентрации этанола 10 мМ способен окислить десятки мкМ этанола, после чего достигается равновесие и

потребление этанола ЭБР прекращается. Возможен также вариант развития событий, когда отношение действующих масс превышает константу равновесия реакции. В таком случае целевая реакция идет в обратную сторону. Так ЭБР для утилизации аммония на основе AlaDH в физиологических условиях будет не потреблять, а производить аммоний именно по причинам, связанным с равновесием. Таким образом, при подборе метаболического пути для утилизации или производства целевого вещества следует убедиться, что в физиологических условиях реакция будет протекать в нужном направлении.

И, наконец, наиболее сложными с точки зрения механизма действия, являются факторы, обусловленные влиянием встроенного метаболического пути на собственный метаболизм эритроцита. Поскольку практически всегда реакции встроенного метаболического пути используют вещества, вовлеченные также в метаболизм эритроцита, увеличение скоростей целевых реакций может приводить к изменению режима функционирования метаболической системы клетки. Так увеличение скорости реакций потребления аммония в ЭБР на основе GDH и AAT приводит к активации пентозофосфатного пути за счет снижения концентрации NADPH (NADPH служит восстановителем в GDH реакции, после чего полученный NADP восстанавливается в пентозофосфатном пути). Активация пентозофосфатного пути приводит, в свою очередь, к оттоку G6P, следствием чего является исчезновение стационарного состояния в гликолизе. Из-за этого при превышении критического значения скорости целевой реакции внутри клетки происходит монотонное накопление некоторых метаболитов (в случае рассмотренного ЭБР наблюдается накопление всех метаболитов гликолиза, не способных проходить сквозь мембрану клетки), что приводит к ее гибели из-за осмотического лизиса. До определенной степени сходные явления наблюдаются при увеличении скорости окисления этанола в ЭБР на основе ADH и ALDH. Общим для встраиваемого метаболического пути и гликолиза метаболитом в этом случае является NAD, который служит окислителем в реакциях окисления этанола и ацетальдегида. Восстановление NAD также происходит в реакции GAPDH, а полученный в результате NADH окисляется в реакции LDH (окислителем служит пируват). Увеличение скорости окисления этанола приводит к снижению концентрации NAD, что, в свою очередь является причиной снижения скорости реакции GAPDH. Результатом описанных событий является потеря устойчивости стационарного состояния гликолиза. Это последовательно приводит сначала к состоянию, в котором наблюдаются незатухающие колебания концентраций ряда метаболитов гликолиза. Затем, при дальнейшем увеличении скорости окисления этанола, колебательный режим сменяется монотонным накоплением метаболитов верхней части гликолиза (FDP, DAP и GAP). Как высокоамплитудные (с амплитудой больше, чем единицы мМ) колебания, так и монотонное накопление метаболитов неприемлемы с физиологической точки зрения, так как приводят к ухудшению деформируемости клетки или ее гибели от осмотического лизиса.

ВЫВОДЫ

1. Впервые построены математические модели различных вариантов метаболических систем ЭБР для утилизации аммония на основе одного фермента – GDH, GS и AlaDH, ЭБР для утилизации аммония на основе двух ферментов – GDH и ААТ, а также ЭБР, для утилизации этанола на основе двух ферментов – АДН и ALDH, включающие реакции собственного метаболизма эритроцита (гликолиз, пентозофосфатный путь) и соответствующие встроенные реакции.
2. Главный фактор, ограничивающий эффективность ранее предложенных ЭБР для утилизации аммония – низкая проницаемость для субстратов и продуктов встраиваемых реакций – α -кетоглутарата (ЭБР на основе GDH) и глутамата (ЭБР на основе GS и ЭБР на основе GDH).
3. ЭБР для утилизации аммония на основе AlaDH не способен потреблять аммоний из-за того, что в физиологических условиях реакция AlaDH идет в сторону производства аммония из-за высокого (более 20) значения отношения концентраций $[NAD]/[NADH]$.
4. ЭБР для утилизации аммония на основе совместной работы GDH и ААТ способен потреблять аммоний в физиологических условиях в течение длительного времени. Транспорт α -кетоглутарата и глутамата не накладывает ограничений на скорость потребления аммония за счет их циклического производства и потребления во встроенном метаболическом пути.
5. Правильность разработанной модели потребления аммония для системы ферментов GDH + ААТ подтверждается экспериментом. Теоретически рассчитанные кинетики убыли аммония в буферном растворе, содержащем добавленные ферменты GDH и ААТ (без эритроцитов), или содержащем ЭБР с GDH и ААТ, хорошо согласуются с аналогичными зависимостями, измеренными экспериментально. Также согласуется с расчетной экспериментально измеренная зависимость скорости потребления аммония добавленными в раствор GDH и ААТ при различных соотношениях активностей этих ферментов.
6. Увеличение активностей GDH и ААТ внутри клетки приводит к исчезновению стационарного состояния в гликолизе и монотонному накоплению ряда метаболитов гликолиза, следствием которого является гибель клетки от осмотического лизиса. Ключевым параметром, определяющим момент исчезновения стационарного состояния является величина доли восстановленного NADPH ($[NADPH]/([NADP]+[NADPH])$). При снижении этой доли из-за окисления NADPH в GDH реакции происходит активация пентозофосфатного пути, приводящая к оттоку G6P из

гликолиза, который и является непосредственной причиной потери стационарного состояния в метаболической системе ЭБР.

7. Эффективность ЭБР для утилизации этанола ограничена двумя факторами. Первый из них – скорость притока пирувата из внешней среды. Механизм этого ограничения связан с тем, что хотя пируват не является субстратом реакций окисления этанола, он является окислителем для NADH, восстанавливаемого при окислении этанола и ацетальдегида. В стационарном состоянии максимальная скорость окисления этанола равна половине скорости притока пирувата из внешней среды.

8. Второй ограничивающий фактор обусловлен взаимодействием метаболического пути окисления этанола с гликолизом через общие метаболиты NAD и NADH. Восстановление NAD в реакциях окисления этанола и ацетальдегида приводит к снижению концентрации NAD, из-за чего снижается максимальная скорость GAPDH реакции, которая при активностях ADH и ALDH, превышающих пороговые значения, становится неспособной потреблять весь GAP, производимый предшествующими реакциями гликолиза. Эта последовательность событий приводит к исчезновению стационарного состояния в гликолизе и накоплению ряда метаболитов (FDP, DAP, GAP). Переходу от устойчивого стационарного состояния к неустойчивому с монотонным накоплением метаболитов предшествует неустойчивое состояние, в котором наблюдаются незатухающие колебания всех метаболитов гликолиза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и патент

1. Атауллаханов, Ф. И.; Борсакова, Д. В.; Протасов, Е. С.; Синауридзе, Е. И.; Зейналов, А. М. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* **2018**, 17 (1), 9-15.
2. Protasov, E. S.; Borsakova, D. V.; Alexandrovich, Y. G.; Korotkov, A. V.; Kosenko, E. A.; Butylin, A. A.; Ataulakhanov, F. I.; Sinauridze, E. I. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood. *Scientific Reports* **2019**, 9:1445.
3. Protasov, E.; Koleva, L.; Bovt, E.; Ataulakhanov, F. I.; Sinauridze, E. Theoretical analysis of the built-in metabolic pathway effect on the metabolism of erythrocyte-bioreactors that neutralize ammonium. *Metabolites* **2021**, 11(1), 36.
4. Borsakova, D. V.; Protasov, E. S.; Nazarenko, S. V.; Alexandrovich, Y. G.; Butylin, A. A.; Ataulakhanov, F. I.; Sinauridze, E. I. Ways to increase the activity of glutamate dehydrogenase in erythrocyte-bioreactors for the ammonium removal. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology* **2019**, 13, 212-224.

5. Borsakova, D. V.; Koleva, L. D.; Protasov, E. S.; Ataulakhanov, F. I.; Sinauridze, E. I. Ammonium removal by erythrocyte-bioreactors based on glutamate dehydrogenase from *Proteus* sp. jointly with porcine heart alanine aminotransferase. *Scientific Reports* **2022**, *12(1)*, 5437.

6. Protasov, E.; Martinov, M.; Sinauridze, E.; Vitvitsky, V.; Ataulakhanov, F. Prediction of Oscillations in Glycolysis in Ethanol-Consuming Erythrocyte-Bioreactors. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24(12)*, 10124.

7. 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:

8. Борсакова, Д.В. Использование эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов. / Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, Ю.Г. Александрович, Т.А. Вуймо, Е.И. Синауридзе, Ф.И. Атауллаханов. // Сборник тезисов II национального конгресса по регенеративной медицине, 3-5 декабря 2015, Москва, М.: МЕДИ Экспо, С. 28.

9. Borsakova, D.V. The development of a medical device for L-asparaginase loading into red blood cells. / D.V. Borsakova, E.I. Sinauridze, E.S. Protasov, F.I. Ataulakhanov. // The Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology. 10th SIOP Asia Congress, 25-28 May 2016, Moscow. Abstracts – P. 26.

10. Borsakova, D.V. Erythrocytes as bioreactors for blood ammonia removal. / D.V. Borsakova, E.S. Protasov, Y.G. Alexandrovich, A.A. Butylin, F.I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze. // Book of Abstracts of International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy, 16-18 November 2017, Barcelona, Spain. – P. 31.

11. Protasov, E.S. Analysis of different erythrocytes-bioreactors for decreasing of an excess ammonia concentration in patient blood. / E.S. Protasov, D.V. Borsakova, A.A. Butylin, F. I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze. // Book of Abstracts of International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy, 16-18 November 2017, Barcelona, Spain. – P. 30.

12. Protasov E. Erythrocytes-bioreactors and limitations of their efficiency. / 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. 8-9.

13. Koleva L. Erythrocytes-bioreactors for removing ammonia from the blood. / Borsakova D., Protasov 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. 41-42.

14. Protasov E. Erythrocytes-bioreactors that neutralize ammonia. / Koleva L., Bovt E., Ataulakhanov F., Sinauridze E. // Тезисы докладов конференции “4th International virtual Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems», 5 апреля, 2021, London, Great Britain.

15. Protasov E. Mathematical modeling of the RBC-bioreactors. / Koleva L., Bovt E., Sinauridze E., Ataulakhanov 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 Ataulakhanov”, Москва, 25-27 августа, 2021, с. 15.