

На правах рукописи

Протасов Евгений Сергеевич

**Теоретический анализ эффективности
эритроцитов-биореакторов**

Специальность 1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук

Научный руководитель: академик РАН, д.б.н., профессор
Атауллаханов Фазоил Иноятович,
научный руководитель ЦТП ФХФ РАН

Официальные оппоненты: д.ф.-м.н., проф. **Тихонов Александр Николаевич,**
профессор кафедры биофизики физического
факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (г. Москва)

д.х.н., проф. **Федотова Марина Витальевна,**
главный научный сотрудник Института химии
растворов им. Г.А. Крестова РАН (г. Иваново)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки **Институт иммунологии и
физиологии** Уральского отделения Российской
академии наук (г. Екатеринбург)

Защита состоится «18» марта 2025 г. в 13-30 на заседании Совета 24.1.127.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Л.Г. Бобылёва

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В последние десятилетия быстрый прогресс в накоплении данных о внутриклеточных процессах и развитие геномики, протеомики, метаболомики и т. д. привели к быстрому возрастанию объема наших знаний о том, что происходит в клетке. Сегодня доступно огромное количество данных о внутриклеточных процессах. Наступает этап активного осмысления накопленного массива информации – извлечения знаний из данных. Это осмысление имеет шанс в ближайшее время сильно продвинуть представления человечества об устройстве метаболических систем, а, следовательно, открыть новые возможности для направленного вмешательства в их работу. Математические и компьютерные методы более чем за полвека своего развития показали свою высокую эффективность в решении такого рода задач. Поэтому в ближайшем будущем стоит ожидать все более широкого применения такого рода методов в биологических науках.

Метаболические системы живых клеток представляют собой сложные последовательности ферментативных реакций, взаимодействующих друг с другом как через общие метаболиты, так и непрямыми методами (аллостерическая регуляция, ковалентная модификация ферментов и т. д.). Такая сложная структура позволяет клетке не только производить необходимые для поддержания жизнедеятельности вещества и энергию, но и, путем введения сложных, но чрезвычайно эффективных инструментов регуляции метаболизма, обеспечить высокую устойчивость метаболической системы к внешним воздействиям различной природы (гомеостаз). Многие метаболические системы могут продолжать функционировать в очень широких диапазонах значений ключевых параметров (таких как концентрации метаболитов, активности ферментов, проницаемость мембран для тех или иных веществ, скорость каких-либо химических реакций и т. п.) – изменение этих параметров в разы, а иногда и в десятки раз все еще не приводит к выходу метаболической системы из строя. Современные биотехнологические методы позволяют активно вмешиваться в метаболизм клеток, с целью изменения их функционирования или даже приобретения ими новых функций, желательных человеку в медицинских, промышленных, научных и т. п. целях. Высокая стабильность функционирования метаболических систем клетки, с одной стороны, позволяет рассчитывать на то, что такое вмешательство человека в метаболизм не сильно повлияет на состояние клетки, с другой стороны, трудно предвидеть последствия такого вмешательства в силу сложности метаболических систем. Наличие огромного количества взаимосвязанных химических превращений (для примера, в эритроците – простейшей клетке млекопитающих, одновременно протекает более 200 биохимических реакций), сильно затрудняет интуитивное понимание назначения каждого блока биохимической системы, а также его

взаимодействия с другими блоками. Попытки экспериментального анализа сложных метаболических систем *in vitro* помимо вышеперечисленных факторов осложняются еще и тем, что из-за тесной взаимосвязи метаболических путей небольшие части метаболических систем крайне трудно поддаются изоляции для воспроизведения и изучения в лабораторных условиях. Таким образом, предсказание последствий вмешательства человека в метаболизм даже относительно просто устроенных клеток, а, следовательно, и подбор правильного воздействия, а также оценка допустимых пределов такого воздействия становится трудноразрешимой задачей.

Инструменты огромной силы и важности для решения такого рода задач дают теоретические методы исследования биологических систем. Примеры таких инструментов - огромные базы данных по кинетике отдельных ферментов и стадий метаболических систем, математическое моделирование и компьютерные методы исследования сложных систем. Главным достоинством этого подхода по сравнению с экспериментальными методами является возможность выделения и анализа любой части исследуемой системы, а также произвольного изменения любых параметров, что в экспериментах *in vitro* и *in vivo* требует больших трудозатрат, а часто и вовсе невозможно. На основе результатов системного анализа клеточного метаболизма могут быть сформулированы предсказания, которые относительно легко поддаются экспериментальной проверке. Полученное на основе такого анализа понимание устройства метаболической системы открывает возможности для планирования направленных модификаций метаболизма от терапии болезней до конструирования новых метаболических путей. Начиная с середины прошлого века математические модели метаболических систем и другие методы теоретического исследования в биологии все более широко используются научными коллективами по всему миру.

Эритроцит – одна из наиболее просто устроенных и хорошо изученных клеток в организме млекопитающих. Простое физиологическое устройство и относительная немногочисленность биохимических реакций, протекающих в эритроците, делают его удобным объектом для изучения функционирования и регуляции клеточного метаболизма, а также одним из наилучших кандидатов для модификаций.

Один из возможных способов модификации эритроцита заключается во введении в него ферментов, катализирующих реакции, отсутствующие в нормальном эритроците. Эритроциты, модифицированные таким образом, называются эритроцитами-биореакторами (ЭБР). ЭБР могут применяться в медицине, в тех случаях, когда лечение требует производства в кровотоке некоторого целевого вещества, или же наоборот, его удаления из кровотока. В этом случае в эритроцит могут быть помещены ферменты, катализирующие реакции метаболического пути, в котором целевое вещество производится или потребляется. Использование ЭБР обладает двумя главными преимуществами по сравнению с прямой инъекцией ферментов в кровь пациента.

Внутри эритроцита ферменты изолированы от воздействия на них иммунной системы пациента. Первым следствием этого является сильное снижение вероятности аллергической реакции на введение ферментов. Второе, не менее важное следствие, заключается в том, что из-за невозможности деактивации введенных ферментов иммунной системой и протеазами плазмы крови время их функционирования увеличивается с десятков часов до десятков дней. В разное время разными научными группами создавались ЭБР, потребляющие аспарагин, аммоний, этанол и другие вещества. Некоторые из таких биореакторов в настоящее время используются в клинической практике. Большинство предложенных биореакторов, однако, демонстрировали низкую эффективность *in vitro* и *in vivo*. Попытки выяснения причин такого исхода, а также оценки пределов возможной эффективности ЭБР и последствий, к которым может привести взаимодействие встроенного метаболического пути с метаболической системой клетки до настоящего времени практически не предпринимались. Помочь в этом может математическое моделирование работы ЭБР, однако таких моделей до недавнего времени не существовало. Это обстоятельство делает данное исследование актуальным.

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 с взаимодействием реакций встроенного метаболического пути с собственным метаболизмом эритроцита.

Цель работы

Целью настоящей работы является теоретический 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 на основе различных метаболических путей, теоретически способных перерабатывать аммоний и этанол.
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 удаления 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. Построение и анализ математической модели ЭБР для утилизации этанола с целью оценки возможной эффективности таких ЭБР, а также выявления факторов, ограничивающих эту эффективность.

Научная новизна

1. На основе существующих математических моделей метаболизма глюкозы в эритроците человека впервые построены модели метаболических систем ЭБР для удаления аммония из кровотока на основе глутаминсинтетазы (GS), глутаматдегидрогеназы (GDH), аланиндегидрогеназы (AlaDH).
2. Выявлены причины низкой эффективности удаления аммония ранее предложенными в литературе ЭБР, содержащими GDH или GS – низкая проницаемость мембраны для α -кетоглутарата, 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 GDH и аланиаминотрансферазу (ААТ). Использование такого метаболического пути позволяет избежать проблем с транспортом субстратов и продуктов встроенных реакций через мембрану, так как при совместной работе обоих ферментов эти субстраты (глутамат и α -кетоглутарат) потребляются и производятся внутри эритроцита циклически.

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.

Теоретическая и практическая значимость

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

Теоретический 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. Построены 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. Предложен новый вариант ЭБР для удаления аммония из кровотока на основе совместной работы глутаматдегидрогеназы и аланинаминотрансферазы.
4. Выявлены факторы, ограничивающие эффективность вновь предложенных ЭБР для утилизации аммония, а также ЭБР для утилизации этанола на основе совместной работы алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы.
5. Получены оценки максимально допустимых значений скоростей целевых реакций и активностей встраиваемых ферментов, допустимых при практическом использовании ЭБР

б. Описаны механизмы, приводящие к выходу ЭБР из строя из-за потери метаболической системой устойчивого стационарного состояния в случае превышения критических значений активностей встраиваемых ферментов.

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.

Связь с плановыми исследованиями

Работы, положенные в основу диссертации выполнены в рамках госзаданий «Изучение биофизических и молекулярных механизмов регуляции движения хромосом в процессах деления клеток, тромбообразования, разработка новых методов диагностики нарушений свертывания крови, создание нового поколения плазмозамещающих противосвертывающих средств, выявление и изучение неблагоприятных факторов внешней среды, образа жизни и полиморфизма генов, определяющих предрасположенность к возникновению мультифакторных заболеваний, а также разработка методов создания новых лекарственных форм и биореакторов на базе эритроцитов», 122041100273-9, 2022-2024; «Разработка методов создания новых лекарственных форм и биореакторов на базе эритроцитов», АААА-А19-119111690006-9, 2019-2021 и при поддержке грантов РФФИ (16-14-00224), РФФИ (15-29-01228), президиума РАН (грант по программе фундаментальных исследований «Фундаментальные основы технологии физиологических адаптаций»), РФФИ (23-24-00178).

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на II Национальном Конгрессе по Регенеративной Медицины (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); Первой международной виртуальной конференции

«Системная Биология и Системная Физиология: Регуляция Сложных Биологических Систем» (7-9 декабря 2020, Москва, Россия); Второй международной гибридной конференции «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 15 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, 1 патент и 8 публикаций в материалах российских и международных конференций и съездов.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы (глава 1), постановку задачи (глава 2), описание материалов и методов (глава 3), результаты (глава 4), выводы, список сокращений и обозначений, список цитированной литературы (129 ссылок), а также благодарности. Работа содержит 36 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 глутаминсинтетезы (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).

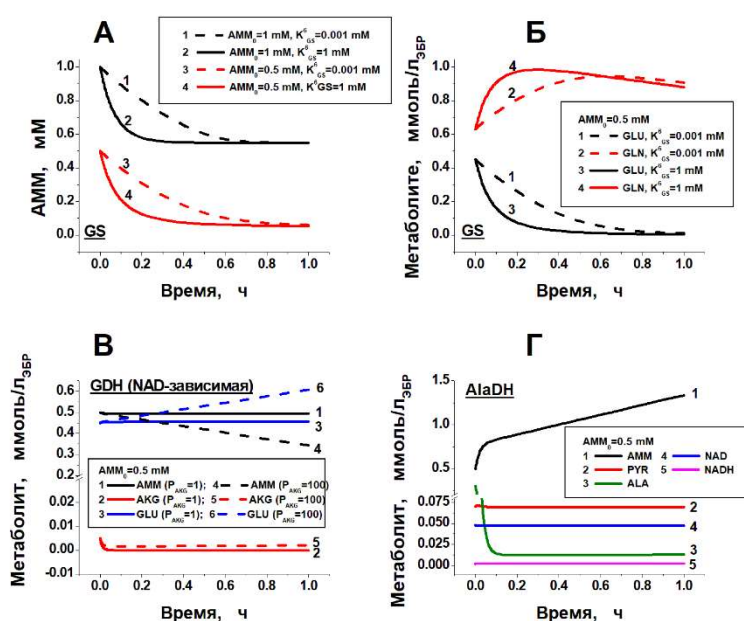


Рис. 1. Кинетика аммония (АММ) и других метаболитов в ЭБР, загруженных различными индивидуальными ферментами. Гематокрит суспензии равен 100%. Исходная концентрация АММ равна 1 или 0.5 мМ. **А.** – Снижение АММ в присутствии ЭБР с GS (1 МЕ/млЭБР) при различных величинах константы K_{GS} ⁶, которую не 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 (ААТ) (Рис. 2). В этой последовательности реакций

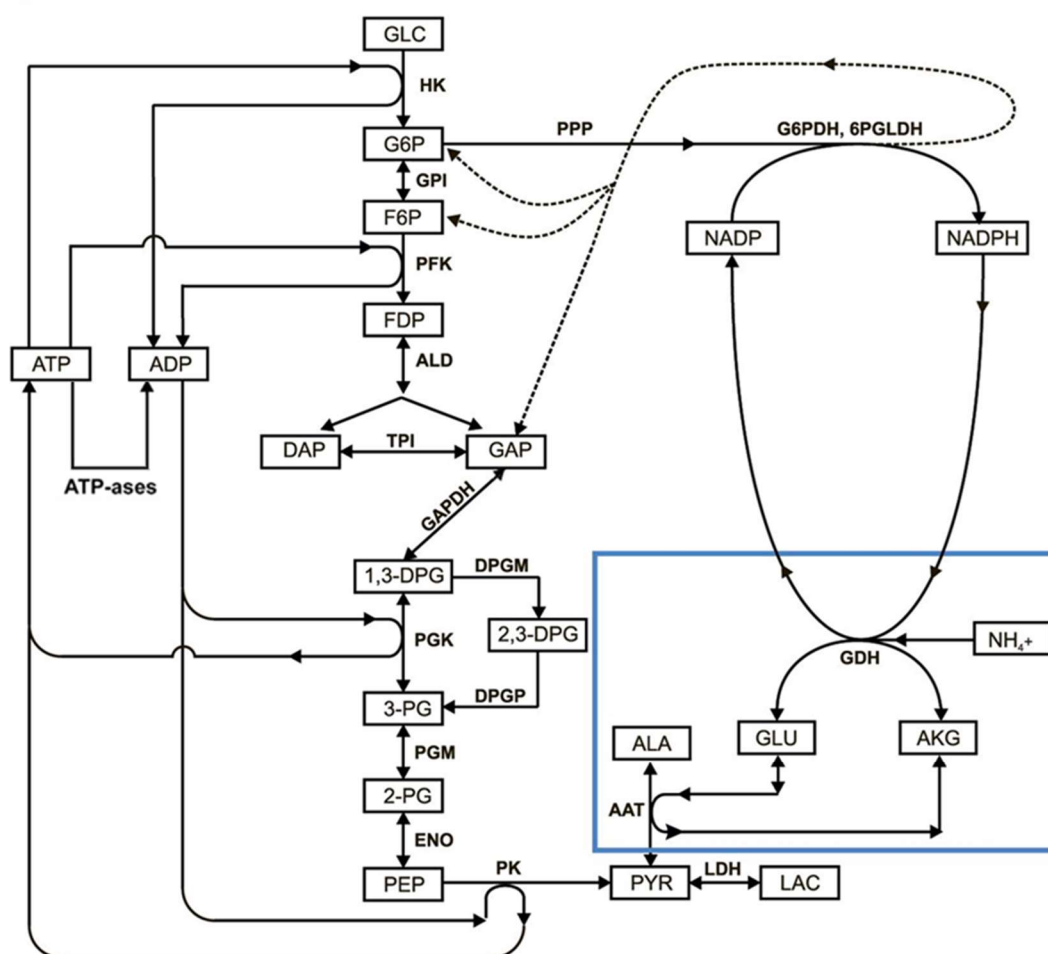


Рис. 2. Схема метаболической системы ЭБР с ГДГ и ААТ. Метаболический путь утилизации аммония выделен синей рамкой. Использованные сокращения: GLC – глюкоза; G6P – глюкозо-6-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FDP – фруктозо-1,6-дифосфат; DAP – дигидроксиацетонфосфат; GAP – глицеральдегид-3-фосфат; 1,3-DPG – 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; HK – гексокиназа; GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза; PFK – фосфотриозокиназа; ALD – альдолаза; TPI – триозофосфатизомераза; GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; PGK – фосфоглицераткиназа; PGM – фосфоглицератмутуза; ENO – енолаза; PK – пируваткиназа; LDH – лактатдегидрогеназа; PPP – пентозофосфатный путь окисления глюкозы; GDH – глутаматдегидрогеназа; AAT – аланинаминотрансфераза; ALA – аланин; AKG – α -кетоглутарат; GLU – глутамат; NH₄⁺ – 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, $[NADH]/[NAD]$, 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 $[NADPH]/[NADP]$, напротив поддерживается в клетке очень высоким (около 166, что соответствует доле NADPH в пуле $([NADPH]+[NADP])$ 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).

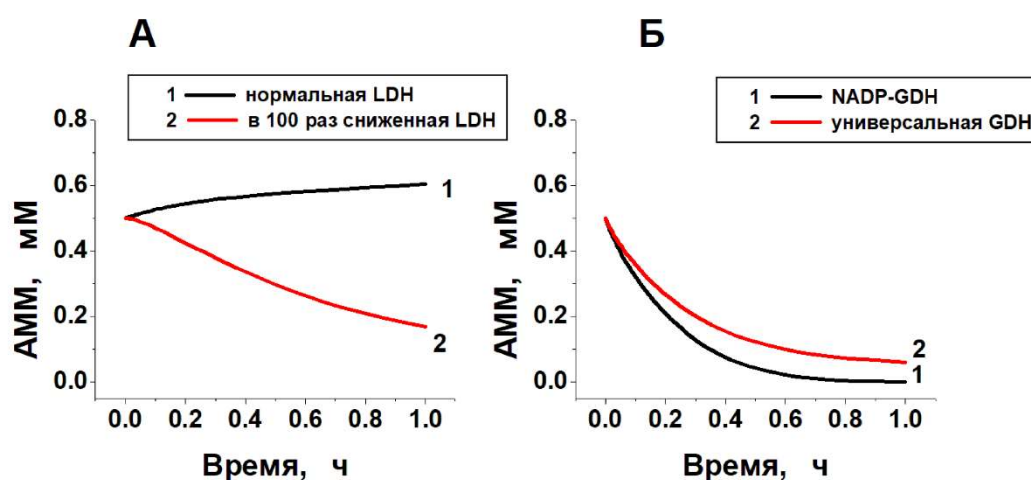


Рис. 3. Изменение концентрации аммония в среде с ЭБР на основе ААТ (50 МЕ/млЭБР) и GDH (10 МЕ/млЭБР) различной специфичности: NAD-зависимой (А) при нормальной (кривая 1) или в 100 раз сниженной (кривая 2) активности лактатдегидрогеназы, и NADP-зависимой или универсальной (Б).

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 примерно до 12 мМ/ч наблюдается исчезновение стационарного состояния в гликолизе, что ведет к монотонному возрастанию концентраций метаболитов гликолиза (Рис. 4).

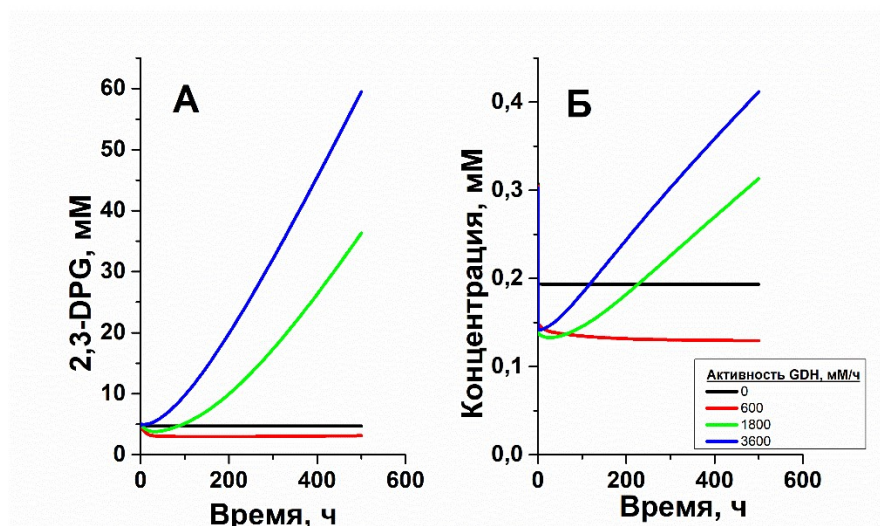


Рис. 4. Динамика концентрации 2,3-DPG (А) и суммарной концентрации всех остальных метаболитов гликолиза, кроме 2,3-DPG и аденилатов (Б) при докритических (0, 600 мМ/ч) и сверхкритических (1800, 3600 мМ/ч) активностях GDH. Активность ААТ всегда в 5 раз выше активности GDH.

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 АТФ (более 99% пула аденилатов находится в форме АТФ), 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).

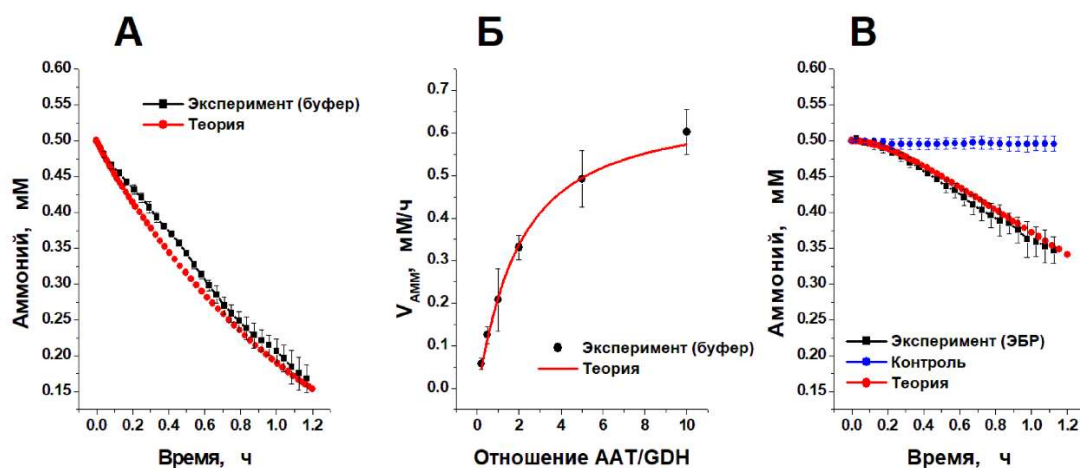


Рис. 5. Сравнение теоретических расчетов модели и данных эксперимента. **А.** - Снижение концентрации аммония во времени для смеси ферментов GDN (0.3 МЕ/мл буфера) и ААТ (1.5 МЕ/мл буфера), добавленных непосредственно в буфер. **Б.** - Зависимость квазистационарной скорости потребления аммония от отношения активностей ААТ и GDN ($A_{ААТ}/A_{ГДГ}$), добавленных непосредственно в буферный раствор *in vitro*. **В.** - Снижение концентрации аммония в суспензии ЭБР, содержащих GDN (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 pH 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).

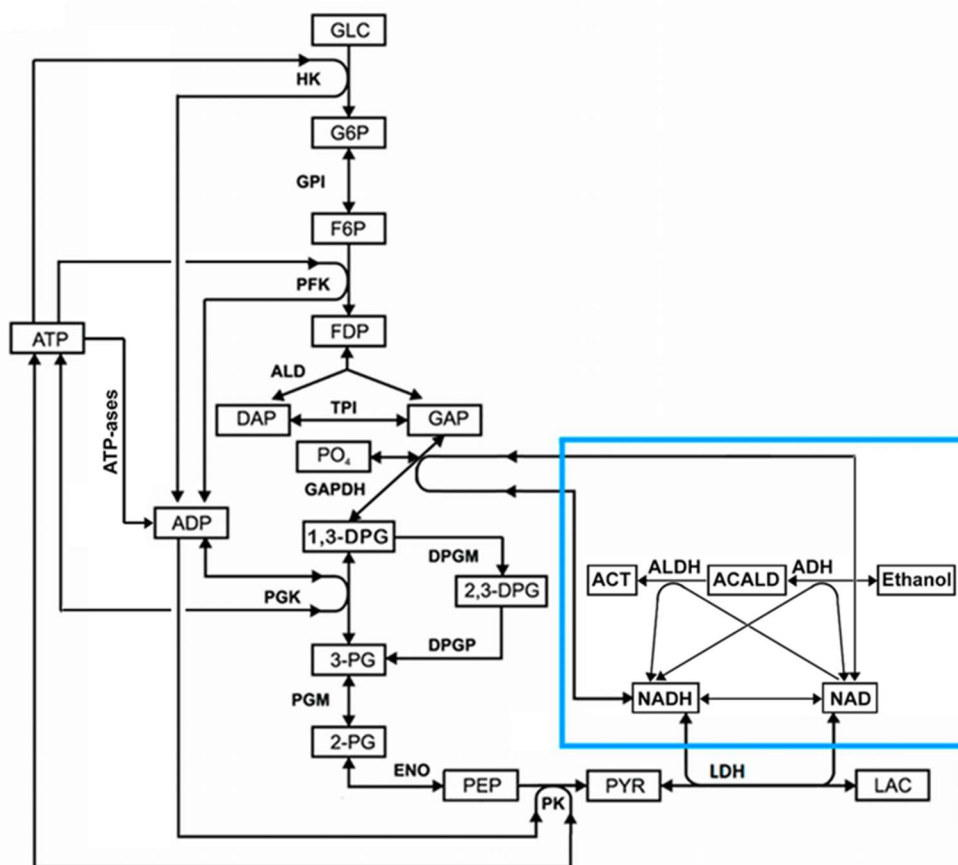


Рис. 6. Схема метаболической системы ЭБР, потребляющего этанол, содержащего АДН и АЛДН. Реакции встраиваемой системы выделены синей рамкой. Используются сокращения, приведенные на Рис. 2, а также: АСАЛД - ацетальдегид; АСТ - ацетат; АДН - алкогольдегидрогеназа; АЛДН – альдегиддегидрогеназа; NAD и NADH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

Для ЭБР, потребляющего этанол, как и для ЭБР, потребляющего аммоний, существует два фактора, ограничивающих максимально возможную скорость его работы. Первый из них связан с транспортом пирувата из внешней среды. NAD восстанавливается до NADH в АДН и АЛДН 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.

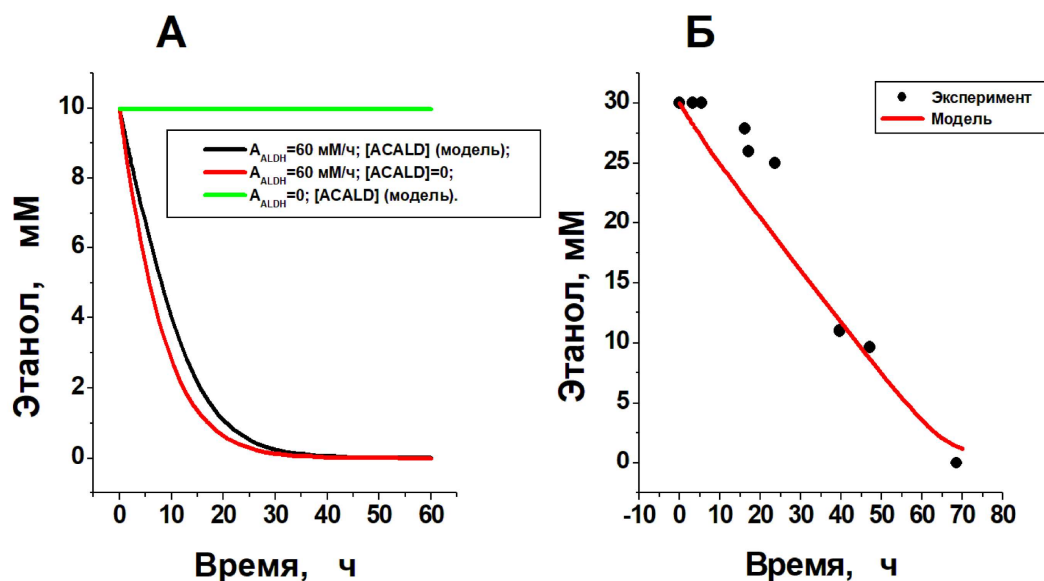


Рис. 7. А - Зависимость концентрации этанола от времени в суспензии ЭБР с гематокритом 0.5 при активности ADH на всех кривых 60 мМ/ч. Активность ALDH равна 60 мМ/ч (черная и красная кривые) или 0 (зеленая кривая). Концентрация ацетальдегида рассчитана из уравнений модели (черная и зеленая кривые) или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

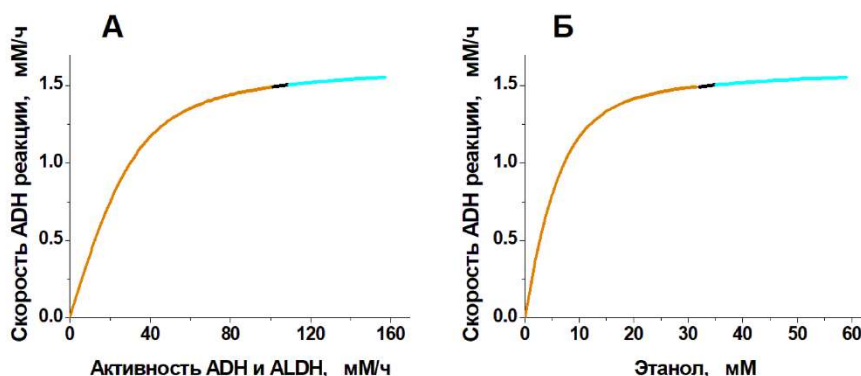


Рис. 8. Зависимость стационарной скорости окисления этанола от активности ADH и ALDH (А) или от концентрации этанола в среде (Б). Оранжевый, черный и бирюзовый цвета линии соответствуют устойчивому стационарному состоянию, неустойчивому стационарному состоянию с колебательным режимом и неустойчивому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

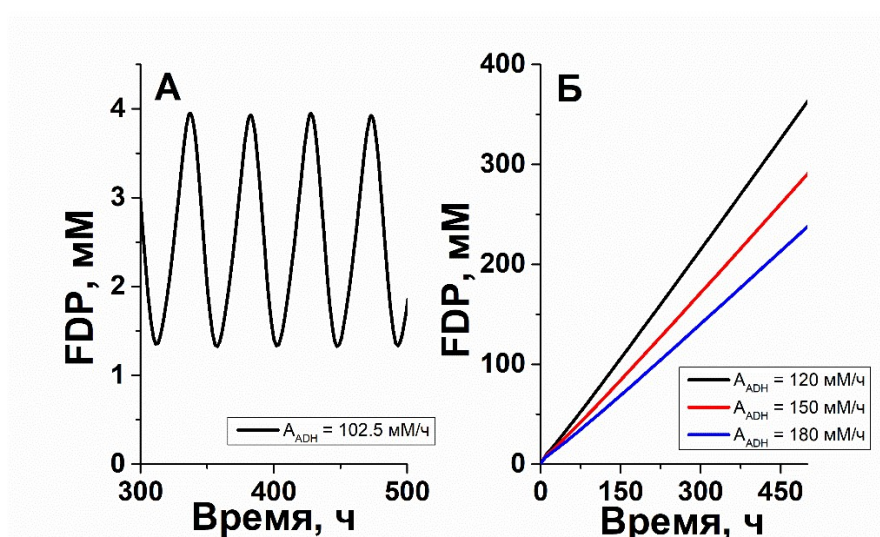


Рис. 9. Иллюстрация колебаний (А) и монотонного возрастания концентраций FDP при различных активностях АДН и АЛДН (Б). Активности АДН и АЛДН равны друг другу. Для панели А активность АДН составляет 102.5 мМ/ч, что соответствует устойчивому режиму колебаний.

Очевидно, что описанные ЭБР потенциально пригодны для медицинского применения только в случае, если активности АДН и АЛДН 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.

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 AAT 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 ААТ 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.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Полученные в настоящей работе результаты могут быть положены в основу дальнейших исследований в трех главных направлениях.

Во-первых, на основе результатов проведенного анализа аналогичными методами могут быть сконструированы эффективные ЭБР для утилизации или производства

других веществ (например, перспективным направлением кажется разработка ЭБР для утилизации метанола, так как эффективных методов лечения отравления метанолом на данный момент не существует).

Во-вторых, проанализированные ЭБР для удаления аммония на основе совместной работы GDH и AAT и ЭБР для удаления этанола на основе совместной работы ADH и AIDH могут быть использованы в медицинской практике. Для этого необходимы дополнительные исследования с целью определения необходимой для терапевтического эффекта скорости утилизации аммония и этанола в организме и выработки клинических методов достижения этой эффективности, а также клинические исследования ЭБР. Однако успешное медицинское применение ЭБР с аспарагиназой позволяет предположить, что исследованные в работе ЭБР могут стать эффективным клиническим средством.

Третьим направлением является дальнейшее обобщение теоретических результатов работы. Выявленные механизмы потери стационарного состояния в метаболических системах ЭБР позволяют предположить, что существует ограниченное число таких механизмов, и что тип механизма и связанные с ним ограничения являются одинаковыми для большого числа различных метаболических систем. Выявление, исследование и классификация таких механизмов могли бы существенно облегчить исследование и проектирование модификаций новых метаболических систем.

ВЫВОДЫ

1. Анализ построенных математических моделей ЭБР позволил выявить три класса факторов, ограничивающих их эффективность: направление протекания целевых реакций в физиологических условиях, транспорт субстратов и продуктов сквозь мембрану эритроцита, взаимодействие целевых реакций с собственным метаболизмом эритроцита через общие метаболиты.
2. Неэффективность утилизации аммония в ЭБР на основе GDH и ЭБР на основе GS обусловлена низкой проницаемостью мембраны эритроцитов для α -кетоглутарата и глутамата, а неэффективность ЭБР на основе AlaDH (утилизация аммония) и ЭБР на основе ADH (утилизация этанола) определяется обратным направлением целевых реакций в эритроцитах.
3. Стационарная скорость потребления целевого вещества эффективно работающими ЭБР остается ограниченной притоком извне субстрата (пируват для ЭБР утилизирующего аммоний на основе совместной работы GDH и AAT), либо вещества, не являющегося субстратом или продуктом целевых реакций (пируват для ЭБР утилизирующего этанол на основе совместной работы ADH и AIDH).

4. Взаимодействие химических реакций, катализируемых введенными в ЭБР ферментами, с собственным метаболизмом эритроцита (гликолиз, пентозофосфатный путь и т. д.) ограничивает максимальное количество ферментов, которое может быть помещено в эритроцит. Из-за конкуренции за общие метаболиты (например, NAD^+ или NADP^+) целевой метаболический путь создает дополнительную нагрузку на метаболизм клетки, из-за чего при активностях встраиваемых ферментов, превышающих критические значения происходит потеря устойчивого стационарного состояния в метаболической системе ЭБР, приводящая к накоплению метаболитов внутри клетки и ее гибели от осмотического лизиса.

5. Теоретические расчеты динамики снижения концентрации аммония в среде с ЭБР на основе GDN и ААТ, а также снижения концентрации этанола в среде с ЭБР на основе АДН и АИДН *in vitro* находятся в согласии с экспериментальными данными.

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. Т. 17, № 1. С. 108-116. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2018-17-1-108-116>
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. V. 9. Art.No. 1455. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37828-5>
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. V. 11, iss. 1. Art.No. 36. <https://doi.org/10.3390/metabo11010036>
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. V. 13. P. 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. V. 12, iss. 1. Art.No. 5437. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09435-y>

6. Protasov, E.; Martinov, M.; Sinauridze, E.; Vitvitsky, V.; Ataullakhanov, F. Prediction of Oscillations in Glycolysis in Ethanol-Consuming Erythrocyte-Bioreactors. // International Journal of Molecular Sciences. 2023. V. 24, iss. 12. Art.No. 10124. <https://doi.org/10.3390/ijms241210124>

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. Ataullakhanov. // 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. Ataullakhanov, 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. Ataullakhanov, 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., Ataullakhanov F., Sinauridze E. // Book of Abstracts of International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks. Moscow, 7-9 December, 2020. P. 8-9.

13. Koleva L. Erythrocytes-bioreactors for removing ammonium from the blood. / Borsakova D., Protasov E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. // Book of Abstracts of International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks. Moscow, 7-9 December, 2020. P. 41-42.

14. Protasov E. Erythrocytes-bioreactors that neutralize ammonium. / Koleva L, Bovt E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. // Book of Abstracts of the 4th International virtual

Conference on Pharmaceutics and Advanced Drug Delivery Systems. 5 April, 2021. London, Great Britain.

15. Protasov E. Mathematical modeling of the RBC-bioreactors. / Koleva L., Bovt E., Sinauridze E., Ataulakhanov F. // Book of Abstracts of International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, the meeting is dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataulakhanov. Moscow, 25-27 August, 2021. P. 15.