



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

«20» декабря 2023 г., 109029, г. Москва, ул. Средняя Калитниковская, д. 30, тел. 8 (495) 678-31-16

исх № 12/2-23(УС)

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ЦТП ФХФ РАН,  
*Пантелеев* М.А. Пантелеев  
«20» декабря 2023 г.  
М.П.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Диссертация «Теоретический анализ эффективности эритроцитов-биореакторов» выполнена в лаборатории физиологии и биофизики клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центра теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН).

В период подготовки диссертации Протасов Евгений Сергеевич работал в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН) по совместительству. В настоящее время работает в должности лаборанта-исследователя в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в должности младшего научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Центре теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук (ЦТП ФХФ РАН) по совместительству.

В 2014 г. окончил физический факультет Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова по специальности «Биохимическая физика», с 01.10.2015 по 20.02.2019

проходил обучение в очной аспирантуре физического факультета Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова по специальности 06.06.01 – биологические науки (диплом № АА 001614).

**Научный руководитель:** Атауллаханов Фазоил Иноятович, доктор биологических наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук.

Тема диссертационной работы и научный руководитель утверждены решением Ученого совета ЦТП ФХФ РАН №4 от 23.03.2021 г., приказ №12/2-УС от 25.03.2021.

По результатам рассмотрения диссертации «Теоретический анализ эффективности эритроцитов-биореакторов» принято следующее заключение:

### **Оценка выполненной работы**

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

### **Актуальность темы**

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 непрямые методы (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. д.) – 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. д. 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.

### **Личное участие автора в получении результатов**

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. Материалы диссертации доложены автором в устных докладах на международных конференциях.

### **Степень обоснованности и достоверности полученных 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.

### **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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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.

### **Практическая значимость работы**

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.

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

Работа соответствует специальности 1.5.2. Биофизика на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук. Материалы и основные результаты диссертации достаточно полно изложены в опубликованных работах Протасова Е. С., из них 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, тезисы 7 докладов на российских и международных конференциях и 1 патент.

### **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 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); 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).

## Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

### 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. 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. // 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 ammonium from the blood. / Borsakova D., Protasov E., Ataullakhanov F., Sinauridze E. Тезисы докладов конференции “International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks”, Москва, 7-9 декабря, 2020, с. 41-42.
14. Protasov E. Erythrocytes-bioreactors that neutralize ammonium. / Koleva L, Bovt E., Ataullakhanov 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., Ataullakhanov F. // Тезисы докладов конференции “International Conference of Systems Biology and Systems Physiology: Regulation of Biological Networks, the meeting is dedicated to 75th anniversary of Fazly Ataullakhanov”, Москва, 25-27 августа, 2021, с. 15.

Диссертационная работа Протасова Е. С. «Системно-биологическое исследование эффективности эритроцитов-биореакторов» удовлетворяет требованиям, установленным пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в ред. Постановления Правительства РФ от 11.09.2021 №1539) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Заключение принято на заседании Ученого совета ЦТП ФХФ РАН. На заседании присутствовали члены Ученого совета Центра в количестве 17 человек из 19, входящих в состав Ученого совета, а также научные сотрудники Центра. Заключение принято единогласно, протокол № 12 от 20 декабря 2023 г.

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

Кольцова Е.М.