

НАРУШЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА В ЭРИТРОЦИТАХ КРЫС ПРИ АММОНИЙ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ: РОЛЬ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ

© 2023 Е.А. Косенко*, Г.А. Алилова, Л.А. Тихонова

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: eakos@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 10.08.2023

Принята к публикации 11.08.2023

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) как медицинский термин нервно-психического расстройства, развивающегося у пациентов с тяжелым нарушением функции печени, известна уже более века, однако патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при заболеваниях печени до сих пор полностью не выяснены. Концептуально, основной причиной ГЭ является накопление аммиака в головном мозге вследствие нарушения детоксикационной функции печени или возникновения портосистемного шунта. Доказано, что токсическое действие аммиака опосредовано гиперактивацией глутаматных NMDA-рецепторов (NMDA-R) и распространяется на многие процессы аэробного метаболизма, обеспечивающего энергией мириады специфических функций и жизнедеятельность нервных клеток. Недавнее открытие функциональных NMDA-R в эритроцитах и отклонения от нормы многих гематологических параметров, свидетельствующих о нарушении гемодинамики и снижении кислородтранспортной функции эритроцитов у большинства пациентов с ГЭ, указывали на наличие взаимосвязи между повреждением эритроцитов и дисфункцией мозга. Чтобы понять, как в условиях гипераммониемии (ГА) прогрессирование аэробного энергетического кризиса мозга приводит к энцефалопатии, необходимо определить вклад в эту патологию аммоний-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах, приводящего к нарушению их кислородтранспортной функции. Для обнаружения вышеуказанного недостающего звена активность антиокислительных ферментов и концентрация GSH, GSSG и H_2O_2 были измерены в эритроцитах животных с ГА в присутствии неконкурентного антагониста NMDA-R, МК-801. Было выявлено, что аммиак, содержащийся в крови гипераммониемированных животных, накапливается в значительном количестве в эритроцитах крыс и делает эти клетки, лишенные аммиак-обезвреживающих ферментов, наиболее восприимчивыми к его прооксидантному действию, проявляющемуся по развитию окислительного стресса, показатели которого полностью или частично восстанавливаются МК-801. Полученные данные обеспечивают основу для выявления дополнительных факторов риска в развитии когнитивных нарушений и неблагоприятного прогноза, связанного с гипоперфузией у пациентов с повышенной концентрацией аммиака в крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипераммониемия, гепатоэнцефалопатия, эритроциты, NMDA-рецепторы, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523090191, **EDN:** YADLJQ

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) – это нервно-психическое расстройство, развивающееся у пациентов с тяжелым нарушением функции печени. Клинические симптомы патологии варьируют от легких поведенческих нарушений до полного угнетения сознания, пере-

ходящего в кому, которая часто заканчивается смертью [1]. Хотя «гепатоэнцефалопатия» как медицинский термин заболевания известна уже более века [2] и концептуально отражает взаимосвязь между повреждением печени и патологией головного мозга, патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при заболеваниях печени до сих пор полностью

Принятые сокращения: ГА – гипераммониемия; ГП – глутатионпероксидаза; ГР – глутатионредуктаза; ГТ – глутатионтрансфераза; ГЭ – гепатоэнцефалопатия; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; СОД – супероксиддисмутаза; NMDA-R – глутаматные NMDA-рецепторы.

* Адресат для корреспонденции.

не выяснены. Общеизвестно, однако, что повышенный уровень аммиака в крови, вызванный нарушением детоксикационной функции печени или портокавальным шунтированием, позволяющим аммиаку, образуемому в желудочно-кишечном тракте (не обезвреживаясь в печени или минуя печень), беспрепятственно проникать в мозг, является основным фактором, способствующим накоплению аммиака в ЦНС, токсический эффект которого отвечает как за церебральную дисфункцию, так и за клинические симптомы ГЭ [3, 4].

Механизмы нейротоксичности аммиака до конца не ясны, но, согласно литературным данным, его токсическое действие распространяется на многие метаболические процессы, обеспечивающие специфические энергозависимые функции нервной ткани. Так, нами было показано, что аммиак нарушает энергетический обмен в клетках мозга животных, тормозит поток электронов в дыхательной цепи митохондрий, приводя к нарушению окислительного фосфорилирования, производства АТФ [5] и нарушению гомеостаза Ca^{2+} [6], значительному усилению образования активных форм кислорода и азота [7], подавлению активности антиоксидантных ферментов и активности глутаминсинтетазы, что является причинами возникновения окислительного стресса [8], уменьшения скорости детоксикации аммиака в мозге и быстрой гибели животных [9]. Наши исследования показали также, что глобальные нарушения жизненно важных биохимических процессов в головном мозге и гибель животных с острой гипераммониемией (ГА) почти полностью предотвращались различными антагонистами глутаматных NMDA-рецепторов (NMDA-R), действующими на разные центры рецепторов, и в частности, МК-801 — неконкурентным антагонистом рецепторов [10]. Эти данные убедительно подтвердили ключевую роль нейромедиатора глутамата как основного эффектора, вызывающего аммоний-индуцированный каскад патологических реакций, опосредованный гиперактивацией NMDA-R, приводящий к гибели нервных клеток и организма в целом.

Недавнее открытие функциональных NMDA-R вне ЦНС в различных периферических тканях, включая печень, сердце, поджелудочную железу, а также эритроциты [11], позволило предположить, что полиорганная недостаточность может быть неотъемлемой частью ГЭ [12], а токсические эффекты аммиака при ГЭ, опосредованные NMDA-R, могут быть более разрушительными и опасными, чем считалось ранее. Однако, несмотря на

то что концепция о ведущей роли аммиака в развитии полиорганной патологии далеко не нова [13], в настоящее время не известна ни степень накопления аммиака в периферических тканях (за исключением ранних единичных статей), ни роль NMDA-R в механизме его токсического действия, и сделать однозначный вывод о том, насколько не нейрональные периферические ткани восприимчивы к токсическому действию аммиака, также не представляется возможным.

Тем не менее отклонения от нормы многих гематологических параметров [14], наличие анемии у большинства пациентов [15], сопровождающейся появлением эритроцитов с атипичной морфологией [16], с измененным поверхностным зарядом [17] и другими аномалиями [18], приводящими к нарушению гемодинамики, снижению кислородтранспортной функции крови [19], дают возможность предположить, что ГЭ является системной патологией, при которой мультиорганная гипоксия и, в частности, гипоксия мозга может быть неотъемлемой частью заболевания и может играть важную роль в патогенезе ГЭ.

Эритроциты — единственные клетки в интегрированной системе транспорта кислорода (помимо сердечно-сосудистой и дыхательной систем), способные переносить кислород и поддерживать аэробное окисление глюкозы в тканях и жизнедеятельность организма в целом. Для мозга, в отличие от других органов, необходим достаточно высокий уровень окислительного метаболизма. При этом, как это ни парадоксально, мозг имеет ограниченные запасы кислорода [20] и поэтому нуждается в постоянном снабжении насыщенной кислородом кровью. Поэтому неудивительно, что нерегулярная подача кислорода даже на короткий период вызывает повреждение головного мозга [21], приводящее к потере сознания, а хроническая кислородная недостаточность (независимо от этиологии заболевания) может привести к гипоперфузии и необратимому повреждению клеток головного мозга и энцефалопатии [22, 23], что указывает на некоторую общую биохимическую основу неврологических симптомов при различных заболеваниях. Отсюда очевидно, что в условиях ГЭ, сопровождающейся ГА, помимо известной взаимосвязи «заболевания печени ↔ дисфункция мозга» [24], прослеживается дополнительная промежуточная причинно-следственная взаимосвязь «заболевания печени ↔ повреждение эритроцитов ↔ дисфункция мозга». Из чего следует, что для понимания того, как нарушения энергетиче-

ского обмена в мозге, имеющем ограниченные запасы кислорода и нуждающемся в постоянном снабжении насыщенной кислородом кровью, в условиях ГА приводят к энцефалопатии, крайне важно определить вклад в эту патологию аммоний-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах, приводящего к повреждению их кислородтранспортной функции.

В свою очередь, кислородтранспортная функция эритроцитов регулируется их внутриклеточным метаболизмом в первую очередь за счет энергетического обмена и системы антиоксидантной защиты [25], метаболиты и ферменты которых контролируют сродство гемоглобина к кислороду [26], которое для связывания максимально возможного количества кислорода в легких должно быть высоким и низким — для беспрепятственного высвобождения необходимого количества кислорода в ткани. К сожалению, взаимосвязь между нарушением внутриклеточных биохимических процессов и кислородтранспортной функцией эритроцитов не вызывает особого интереса среди исследователей, а нормативная инерция замедляет включение имеющихся данных в повседневную клиническую практику, что, естественно, занижает и ценность исследований, направленных на выявление ранних маркеров, которые могут предшествовать гипоксическому повреждению мозга, наблюдаемому при ГЭ.

Поэтому в настоящее время все еще неизвестно, может ли токсический эффект аммиака, накопившегося в крови, распространяться на эритроциты и объяснять изменения, обнаруженные в гликолитической и антиоксидантной системах и лежащие в основе нарушения транспортной функции этих клеток и, как следствие этого, быть причиной гипоперфузии и энцефалопатии у пациентов с заболеваниями печени.

Для выявления вышеуказанного недостающего звена, принимая во внимание наличие глутаматных NMDA-R (характерных для ЦНС) в эритроцитах, мы провели специальные исследования. Учитывая то, что одним из ведущих звеньев патологического каскада, запускаемого гиперактивацией NMDA-R в головном мозге ГА-животных и пациентов с ГЭ [27], является окислительный стресс, активность антиокислительных ферментов, концентрация GSH и GSSG, а также концентрация H_2O_2 были измерены в эритроцитах ГА-животных в присутствии неконкурентного антагониста NMDA-R, МК-801.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы следующие реактивы: МК-801, ацетат аммония, NAD^+ , $NADH$, $NADP^+$, $NADPH$, Tris, ТЭА, АТР, ADP, фосфоенолпируват, фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат, глюкоза, пируват натрия, карбонат натрия, GSH, GSSG, ксантин, п-нитротетразолиевый синий, пируваткиназа, лактатдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глутаматдегидрогеназа, каталаза, ксантиноксидаза, глутатионредуктаза, ЭГТА, ЭДТА, 1-хлор-2,4-динитробензол, 2-винилпиридин — фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Все остальные реагенты были отечественного производства квалификации «особо чистые».

Животные. В экспериментах использовались крысы линии Wistar массой 210–230 г, содержащиеся в виварии при комнатной температуре, естественном режиме освещения и свободном доступе к корму и воде. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Животным группы 1 («ацетат аммония») вводили ацетат аммония в виде однократной внутрибрюшинной инъекции (в/б) в сублетальной дозе 7 ммоль/кг, декапитацию производили, как и в ранее выполненных исследованиях, через 15 мин после инъекции, обычно после прохождения двух судорожных эпизодов [9]. Животным группы 2 («контроль») вводили в/б 0,9% (w/v) NaCl в том же объеме, что и ацетат аммония. Декапитацию животных производили через 15 мин после инъекции. Физиологический раствор в качестве контрольного раствора был выбран на основании наших предыдущих исследований, показавших, что введение ацетата натрия, так же, как и введение физиологического раствора, не оказывает влияния на измеряемые показатели. Животным группы 3 («группа МК-801») вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг, необходимой для полной блокировки рецепторов; декапитацию животных проводили через 30 мин после инъекции [8]. Животным группы 4 («МК-801 + ацетат аммония») вначале вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — раствор ацетата аммония в дозе 7 ммоль/кг. Декапитацию производили через 15 мин после введения ацетата аммония.

Получение плазмы крови и очищенных эритроцитов. Для получения плазмы и суспензии очищенных эритроцитов собранную при декапитации кровь (в качестве антикоагулянта использовали 130 мМ 3Na-цитрат, pH 7,4), делили на 2 части. Для получения плазмы крови форменные элементы удаляли

центрифугированием в течение 10 мин при 1000 g (+4 °C). Одна часть плазмы использовалась для определения активности ферментов, другая была депротеинизирована охлажденной смесью 6% HClO_4 /40% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ при -20 °C и нейтрализована 30% (w/w) KOH (-20 °C) до pH 6; после осаждения кристаллов KClO_4 (1000 g, 10 мин, +4 °C) полученный супернатант немедленно использовали для измерения концентрации аммиака.

Для очищения эритроцитов от лейкоцитов и тромбоцитов вторую часть крови пропускали через колонку, заполненную α -целлюлозой и гемикристаллинцеллюлозой тип 50 в соотношении 1 : 1 и уравновешенную 0,9% (w/v) NaCl [28]. Кровь элюировали (1 : 5) при комнатной температуре раствором, содержащим 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4) и 150 мМ NaCl . Эритроциты осаждали центрифугированием при +4 °C в течение 10 мин при 1000 g и дважды промывали раствором, содержащим 10 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4), 140 мМ NaCl , 5 мМ KCl , 2,8 мМ глюкозы, 0,5 мМ K-ЭДТА (10 мин, +4 °C, 1500 g, 2000 g) и суспендировали в этом же растворе в соотношении 1 : 5.

Получение лизатов эритроцитов для определения активности ферментов. Очищенные от тромбоцитов и лейкоцитов эритроциты (1 мл) лизировали 2 мл гипосмотического буфера (50 мМ ТЭА, pH 7,4/0,15 мМ K-ЭГТА , 3 мМ β -меркаптоэтанол), содержащего 0,2% сапонины.

Получение экстрактов эритроцитов для определения концентрации аммиака. Очищенные эритроциты смешивали с холодной смесью (-20 °C) 6% HClO_4 /40% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в соотношении 1 : 10. Центрифугировали 5 мин при температуре +4 °C при 10 000 g. Осадок удаляли, pH супернатанта доводили до значения 5–6, используя 30% (w/w) KOH и сухой KHCO_3 . Осадок перхлората калия удаляли центрифугированием при тех же режимах. Прозрачный супернатант немедленно использовали для определения концентрации аммиака (ммоль/литр) с помощью микрофлуориметрического метода, как описано Kosenko et al. [29]. Концентрация аммиака в плазме крови была измерена аналогичным способом и выражалась в ммоль/литр.

Определение пероксида водорода в эритроцитах. Концентрацию H_2O_2 в эритроцитах определяли спектрофотометрическим методом [30] в глутатионредуктазной (ГР) реакции по окислению NADPH при 340 нм в присутствии GSSG , образуемого из GSH под действием глутатионпероксидазы (ГП). Поскольку ГП является неспецифическим ферментом и взаимодействует как с перокси-

дом водорода, так и с гидропероксидами, в экстрактах первоначально измерялось суммарное содержание пероксида водорода и гидропероксида, а после добавления в реакционную среду каталазы отдельно измерялось содержание гидропероксида. Свободная концентрация пероксида водорода рассчитывалась вычитанием концентрации гидропероксидов из суммарного содержания пероксида водорода + гидропероксидов и выражалась в мкмоль/литр. Реакционная смесь (1 мл) состояла из 100 мМ Tris-HCl (pH 7,6); 0,2 мМ Na-ЭДТА ; 5 мМ GSH ; 25 мкл экстракта эритроцитов; 250 мкМ NADPH ; 0,3 ед. ГП; $\pm$ 28 ед. каталазы и 0,5 ед. ГР.

Определение восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах. Для стабилизации GSH и GSSG кровь (20 мкл) быстро смешивали со 100 мкл 10 мМ HCl . После осаждения белков сульфосалициловой кислотой (конечная концентрация – 1%) пробы центрифугировали 5 мин, 10 000 g, +4 °C. Прозрачный супернатант использовали для определения суммарного глутатиона ($\text{GSH} + \text{GSSG}$) спектрофотометрическим методом, основанным на системе рециркуляции GSH , который в присутствии ГР образует комплекс с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой, регистрируемый при 412 нм [31]. Расчет концентрации суммарного глутатиона проводили с использованием калибровочной кривой. Определение концентрации GSSG проводили в присутствии 2-винилпиридина, ингибитора, препятствующего окислению GSH в GSSG . Получение проб и измерение концентрации GSSG проводили вышеуказанным способом. Концентрацию выражали в мкмоль/литр. Концентрацию GSH рассчитывали путем вычитания GSSG из суммы $\text{GSH} + \text{GSSG}$.

Определение активности ферментов в эритроцитах. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли спектрофотометрически по снижению скорости восстановления красителя п-нитротетразолиевого синего (NTB) в ксантин-ксантиноксидазной системе при 550 нм и 25 °C [32]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало 50%-ное торможение реакции восстановления NTB. Активность глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9) определяли спектрофотометрически по снижению светопоглощения при 340 нм и 25 °C при окислении NADPH окисленным глутатионом [33]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток. Активность глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) определяли по скорости окисления NADPH при 340 нм под действием

окисленного глутатиона [34]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по снижению величины поглощения при 240 нм в реакции с пероксидом водорода [35]. Активность фермента выражали в величинах константы скорости реакции первого порядка (с^{-1} на 1 мл клеток). Активность глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) определяли по скорости связывания GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом при 340 нм [36]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) определяли спектрофотометрически по увеличению светопоглощения при восстановлении NADP^+ при 340 нм, 37 °C [37]. Активность фермента выражали в мкмоль/мин на 1 мл клеток.

Все показатели плазмы крови и эритроцитов были измерены на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) и спектрофлуориметре Cary Eclipse («Varian», Австралия) с использованием стандартных методов, разработанных международным комитетом по стандартизации в гематологии [28], и при помощи методов, описанных в Methods of enzymatic analysis под ред. Bergmeyer [38].

Статистический анализ выполняли с помощью компьютерной программы Prism 5.00 («GraphPad Software», США). Результаты выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения переменных подтвердили с помощью

критерия Колмогорова—Смирнова. Различия между группами анализировали с использованием *t*-теста Стьюдента, а при множественных сравнениях — метода ANOVA с поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние МК-801 на концентрацию аммиака в плазме и эритроцитах крыс с острой гипераммониемией. Мы показали ранее, что МК-801 в значительной степени снижал уровень аммиака в мозге крыс с аммиачной интоксикацией [39]. Для выявления аналогичной роли NMDA-R в циркулирующих эритроцитах мы исследовали влияние МК-801 на уровень аммиака в эритроцитах и в плазме животных всех исследуемых групп (рис. 1).

Как видно из рис. 1, *а*, содержание аммиака в плазме крыс контрольной группы составляло $0,166 \pm 0,021$ ммоль/литр, что входит в допустимый диапазон значений, соответствующих физиологической норме для этих животных [3, 4, 39]. После введения ацетата аммония концентрация аммиака в плазме крыс достоверно повышалась до $2,335 \pm 0,190$ мМ ($p < 0,001$), а у животных, получавших МК-801, — не отличалась от контрольных значений. При совместном введении МК-801 с ацетатом аммония концентрация аммиака уменьшалась до $1,875 \pm 0,019$ мМ ($p < 0,001$), то есть частично и всего лишь на 20% по сравнению

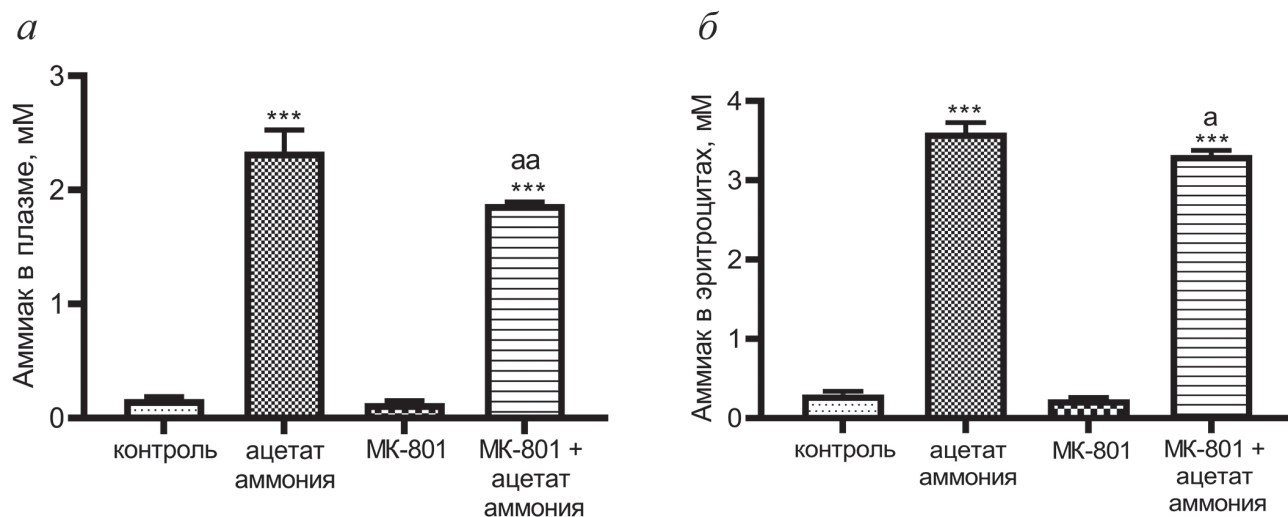


Рис. 1. Концентрация аммиака в плазме (*а*) и эритроцитах (*б*) животных из разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг, животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения концентрации аммиака указаны в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее ± SEM». *** $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы; а — $p < 0,05$, aa — $p < 0,01$ — по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

с концентрацией, обнаруженной у ГА-животных (рис. 1, *а*). Из рис. 1, *б* видно, что концентрация аммиака в эритроцитах животных всех исследуемых групп выше, чем в плазме. В эритроцитах контрольных крыс содержание аммиака составляло $0,300 \pm 0,038$ ммоль/литр. После введения ацетата аммония уровень аммиака в эритроцитах возрос до $3,602 \pm 0,126$ мМ ($p < 0,001$), тогда как в эритроцитах животных, получавших МК-801, этот показатель не отличался от нормы ($0,237 \pm 0,023$ мМ), а после введения МК-801 в сочетании с ацетатом аммония концентрация аммиака незначительно, но достоверно ($p < 0,05$) снизилась до $3,320 \pm 0,06$ мМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация NMDA-R в эритроцитах или, точнее, активация путей передачи сигнала NMDA-R в незначительной степени влияет на накопление аммиака в эритроцитах. Это частично согласуется с литературными данными, указывающими на то, что внутриэритроцитарная концентрация аммиака зависит от многих факторов, в частности, от скорости его пассивной диффузии (NH_3 , незаряженная форма) [40], пропорциональной его концентрации в крови, активности специфических транспортеров аммиака, локализованных на мембране эритроцитов [41], pH, температуры [42], а также от активности ферментов, катализирующих эндогенные аммиакообразующие реакции [43]. Выявленное нами наличие градиента аммиака между плазмой и эритроцитами (концентрация аммиака в эритроцитах выше, чем в плазме) у контрольных животных (рис. 1) соответствует нормальному распределению аммиака в крови человека и крыс [44]. Сохранение же этого градиента при значительном накоплении аммиака в эритроцитах ГА-животных (рис. 1) свидетельствовало о том, что эритроциты являются временным депо аммиака [45], что может иметь ряд патологических последствий как для самих эритроцитов, так и для всего организма в целом. И в первую очередь из-за того, что эритроциты — это самые многочисленные клетки крови и высвобождение ими накопившегося аммиака, зависящее от многих факторов [43], непредсказуемым образом может увеличивать его концентрацию в крови и, соответственно, приводить к ошибочным выводам относительно степени его накопления в мозге и невозможности оказания своевременной лечебной помощи пациентам. Кроме того, эритроциты крыс и человека не содержат ни глутаминсинтетазу, ни глутаматдегидрогеназу (в отличие от других тканей), которые могли бы снизить аммиачную нагрузку на сами клетки, превра-

щая накопленный аммиак в глутамин и глутамат соответственно. И именно этим может объясняться особенная чувствительность эритроцитов к токсическому действию аммиака, которое проявляется в виде более серьезных функциональных нарушений, включая те, которые влияют на доставку кислорода в ткани, зависящую в первую очередь от энергетического обмена и системы антиоксидантной защиты [25], метаболиты и ферменты которых, как уже было сказано, контролируют сродство гемоглобина к кислороду [26]. Однако не исключено, что быстрое накопление NH_3 в эритроцитах, вызывающее защелачивание внутриклеточной среды [46], дополнительно может приводить к увеличению сродства гемоглобина к кислороду, что тоже будет способствовать ограниченному переходу кислорода в ткани [47].

Влияние аммиака и МК-801 на антиоксидантный статус эритроцитов крыс. Учитывая положительную корреляцию между накопившимся аммиаком в клетках мозга и окислительным стрессом, который полностью подавлялся МК-801 [48], в настоящем исследовании мы оценили, связано ли накопление аммиака в эритроцитах, имеющих NMDA-R на поверхности мембран, с нарушением антиоксидантной защиты клеток. Мы измерили активность антиоксидантных ферментов СОД, каталазы, ГР, ГП, ГТ, Г6ФДГ в эритроцитах крыс всех исследуемых групп. Кроме того, мы измерили содержание GSH и GSSG, а также пероксида водорода в эритроцитах и оценили действие МК-801 на эти показатели. Как показано на рис. 2 (*а–в* и *д*), введение ацетата аммония в разной степени снижало ферментативную активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах животных. Так, активность СОД, каталазы, ГП, ГТ снижалась на 69% ($p < 0,001$), 25% ($p < 0,05$), 29% ($p < 0,05$) и 20% ($p < 0,01$) соответственно, тогда как активность ГР при аммиачной интоксикации не отличалась от контрольных значений (рис. 2, *е*).

Активность всех указанных ферментов, измеренная после введения МК-801, не отличалась от контрольных значений. При совместном введении МК-801 и ацетата аммония только активность СОД повышалась на 144% ($p < 0,001$) (рис. 2, *а*) при сравнении с активностью, обнаруженной в эритроцитах ГА-животных, но при этом не достигала контрольного значения. Полученные результаты свидетельствовали о том, что аммоний-индуцированное торможение указанных антиоксидантных ферментов не связано исключительно с эффектами, опосредованными активацией NMDA-R, хотя очевидно, что активация этих рецепторов

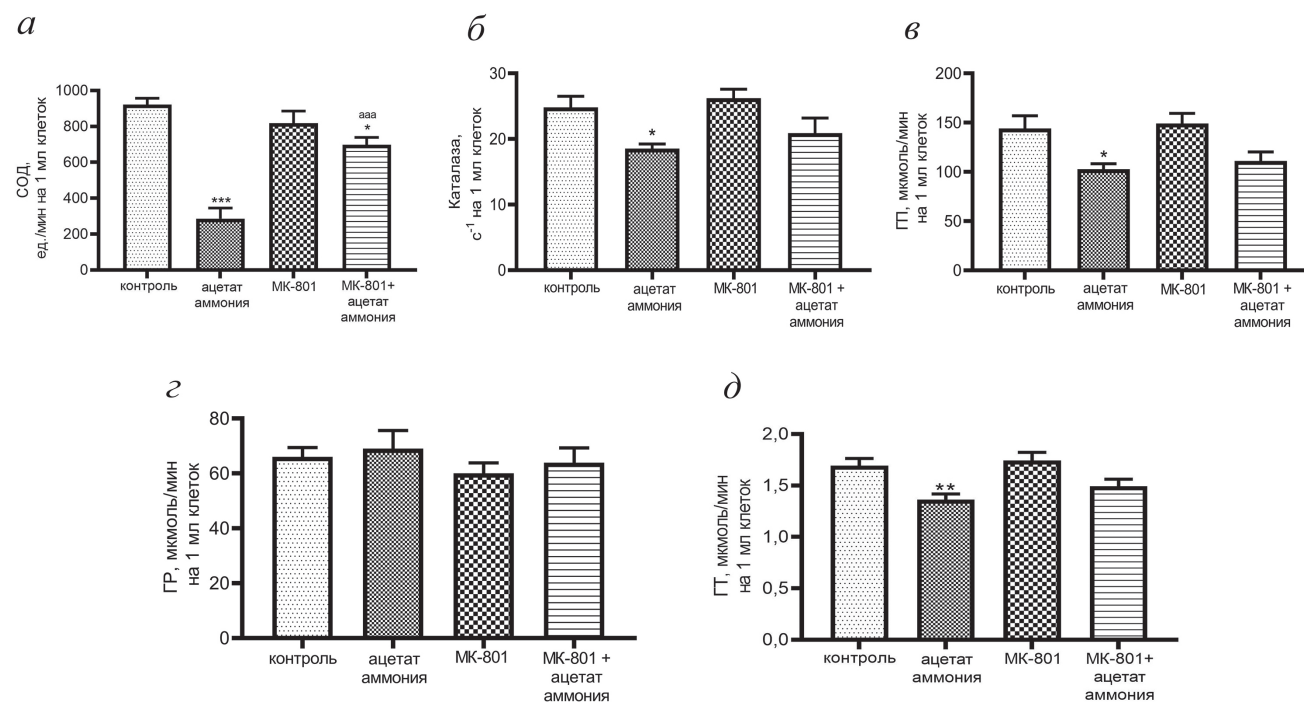


Рис. 2. Активность антиоксидантных ферментов СОД (а), каталазы (б), ГП (в), ГР (г) и ГТ (д) в эритроцитах животных из разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг, животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и методы определения активности антиоксидантных ферментов указаны в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее $\pm$ SEM». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы; aaa — $p < 0,001$ — по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

является важным этапом в развитии аммоний-индуцированного нарушения антиоксидантного статуса эритроцитов, предшествующего развитию окислительного стресса.

Ранее мы показали, что сниженная активность СОД, каталазы, ГП и ГТ в митохондриях, выделенных из неокортекса и печени крыс с ГА, восстанавливалась до контрольных значений ингибитором NO-синтазы, нитро-аргинином, введенным совместно с ацетатом аммония [49]. Эти данные указывали на то, что главным ингибитором антиоксидантных ферментов в мозге и печени в условиях ГА является NO-радикал ($\text{NO}^{\bullet}$), образование которого усиливается в клетках в результате Ca^{2+} -зависимого сигнального каскада, запускаемого гиперактивированными NMDA-R [6]. Следует отметить, что патологическая роль NMDA-R эритроцитов полностью не определена, что частично объясняется наличием в крови множества агонистов и антагонистов, концентрация которых непредсказуемым образом может меняться при каждом конкретном заболевании. Однако если учесть наличие в эритроцитах взаимосвязи между активацией NMDA-R и Ca^{2+} -зависимым образованием $\text{NO}^{\bullet}$ [11], то, согласно нашим данным, только сниженная

активность СОД в эритроцитах ГА-животных (которая восстанавливалась при совместном введении МК-801 и ацетата аммония) может объясняться указанным сигнальным каскадом, запускаемым активированными NMDA-R. Причины аммоний-индуцированного торможения эритроцитарных ГТ, ГП и каталазы (их активность не восстанавливалась сочетанным введением МК-801 и ацетата аммония) в настоящее время неизвестны, хотя не исключено, что их торможение тоже может быть Ca^{2+} /NO-зависимым, как, например, в случае разрушения тетрамерной структуры мембранного спектрина индукторами окислительного стресса, делающими мембрану эритроцитов проницаемой для Ca^{2+} [50]. Кроме того, учитывая потребность ГТ, ГП и каталазы в NADPH и в GSH [51], можно предположить, что именно недостаток этих факторов в эритроцитах ГА-животных (рис. 4, а и 5, б) лежит в основе торможения вышеуказанных ферментов, хотя очевидно, что причины торможения могут быть множественными и для их выявления требуются дополнительные исследования.

Изменение концентрации пероксида водорода в эритроцитах ГА-животных, влияние МК-801. При сниженной нейтрализующей активности

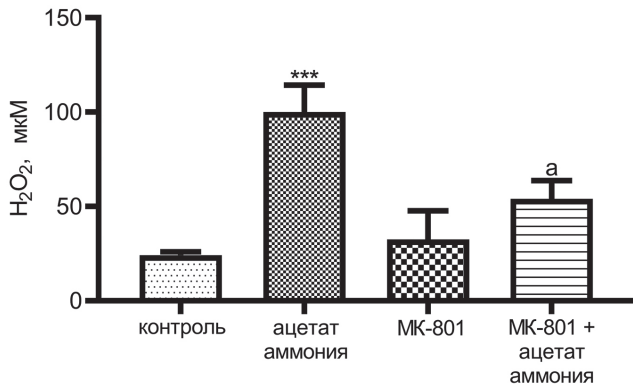


Рис. 3. Концентрация H_2O_2 в эритроцитах животных разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг, животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения концентрации H_2O_2 указаны в разделе «Материалы и методы». *** $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы; a — $p < 0,05$ — по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

внутриклеточных антиоксидантных ферментов пероксид водорода, поступающий в эритроциты из экзогенных источников [52] и образуемый в клетках эндогенно [53], является главным прооксидантом, который инициирует развитие окислительного стресса, приводящего к нарушению кислородтранспортной функции эритроцитов [54]. Обнаруженное нами достоверное уменьшение активности основных антиоксидантных ферментов, разрушающих пероксид водорода, каталазы и ГП (рис. 2, б и в) в эритроцитах крыс с ГА, указывало на возможность избыточного накопле-

ния пероксида водорода в эритроцитах этих животных.

Действительно, концентрация пероксида водорода резко возрастала в эритроцитах крыс с ГА ($100,1 \pm 14,23$ мкМ; $p < 0,001$) при сравнении с концентрацией, обнаруженной в эритроцитах животных контрольной группы ($24,19 \pm 1,801$ мкМ) (рис. 3).

Значения, полученные после введения МК-801, достоверно не отличались от контрольных, а при совместном введении МК-801 и ацетата аммония уровень пероксида водорода в эритроцитах животных снижался в 2 раза ($54,07 \pm 9,59$ мкМ) по сравнению с уровнем, измеренным в эритроцитах животных с аммонийной интоксикацией, но оставался в 2 раза завышенным по сравнению с контрольным значением ($24,19 \pm 1,801$ мкМ). Это указывало на то, что и нарушение гомеостаза пероксида водорода в эритроцитах ГА-животных, как и торможение активности антиоксидантных ферментов (рис. 2), частично зависит от гиперактивации NMDA-R, и подтверждало наличие других многочисленных факторов, регулирующих внутриклеточную концентрацию пероксида водорода в эритроцитах [53, 55].

Изменение концентрации восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах ГА-животных, влияние МК-801. Поскольку одной из важных причин, приводящих к накоплению пероксида водорода в эритроцитах, является значительное истощение GSH и накопление GSSG [56], мы измерили концентрацию обеих форм глутатиона в эритроцитах животных всех исследуемых групп. Как видно из рис. 4, а, концентрация GSH в эритроцитах животных после введения им ацетата аммония

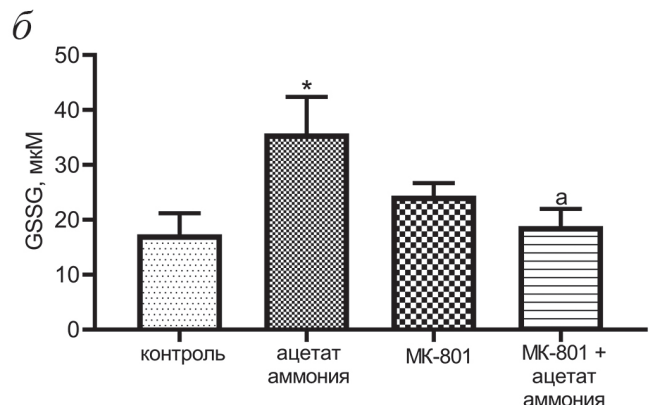
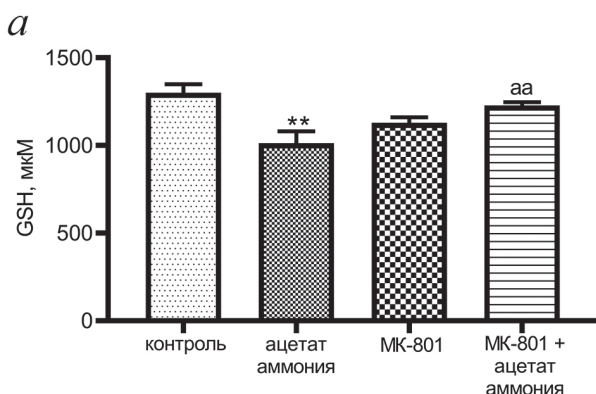


Рис. 4. Концентрация GSH (а) и GSSG (б) в эритроцитах животных разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг; животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения концентрации GSH и GSSG указаны в разделе «Материалы и методы». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ — по сравнению с животными контрольной группы; a — $p < 0,05$, aa — $p < 0,01$ — по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

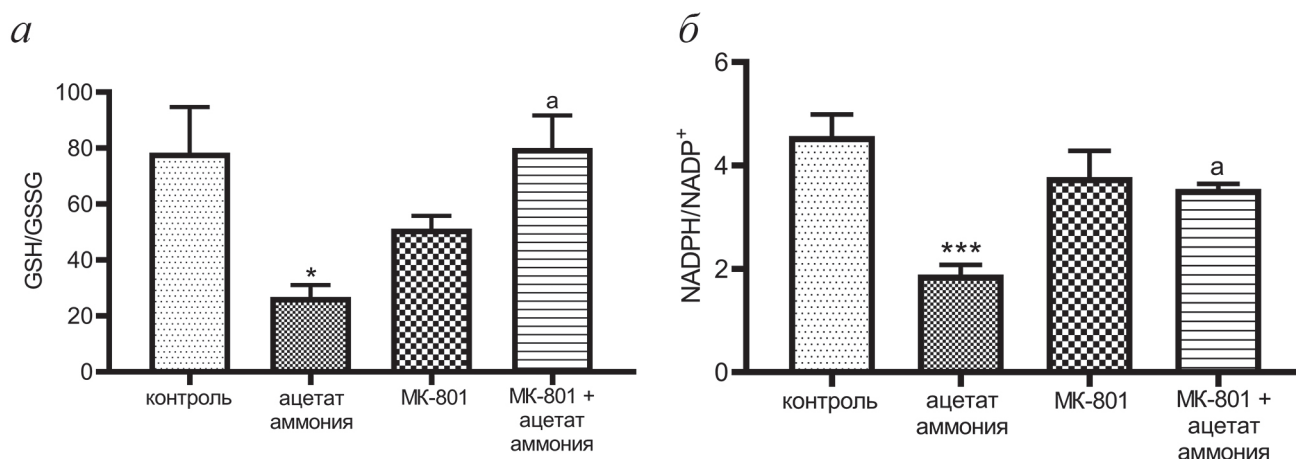


Рис. 5. Отношение GSH/GSSG (а) и отношение NADPH/NADP⁺ (б) в эритроцитах животных разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг; животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин – ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных и получение проб указаны в разделе «Материалы и методы». Отношение [NADPH]/[NADP⁺] рассчитывали по компонентам реакции, катализируемой Г6ФДГ ([NADPH]/[NADP⁺] = [глюкозо-6-фосфат]/[6-фосфоглюконолактон]) [58], константа равновесия которой равна 1,3 [59]. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ – по сравнению с животными контрольной группы; а – $p < 0,05$ – по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

достоверно снижалась на 22% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Показатели, полученные после инъекции МК-801, не отличались от контрольных значений, а при совместном введении МК-801 с ацетатом аммония концентрация GSH увеличивалась на 21% по отношению к значениям, измеренным в эритроцитах ГА-животных, и достоверно не отличалась от контрольного значения (рис. 4, а).

Концентрация GSSG в эритроцитах ГА-животных, напротив, достоверно увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$; рис. 4, б), но после инъекции МК-801 – не отличалась от контрольных значений. Предварительная инъекция МК-801 достоверно снижала содержание GSSG ($18,86 \pm 3,111$ мкМ; $p < 0,05$), увеличенное введением ацетата аммония ($35,74 \pm 6,644$ мкМ) до контрольного значения ($17,37 \pm 3,815$ мкМ). В соответствии с этими показателями изменялось и отношение GSH/GSSG в эритроцитах животных всех исследуемых групп. Из рис. 5, а видно, что введение ацетата аммония животным уменьшало отношение GSH/GSSG почти в 3 раза, тогда как блокада NMDA-R с помощью МК-801 не только полностью и достоверно ($p < 0,05$) предотвращала аммоний-индуцированное снижение отношения, но и восстанавливала его значение до контрольного уровня (рис. 5, а). Из этого следует, что аммоний-индуцированное нарушение окислительно-восстановительного баланса эритроцитов, определяемого отношением GSH/GSSG, опосредованно активацией NMDA-R.

Окислительно-восстановительный статус эритроцитов, в свою очередь, зависит от доступности NADPH, регулирующего рециркуляцию GSH [57], необходимого для разрушения пероксида водорода в глутатионпероксидазной/редуктазной реакциях. Из рис. 5, б видно, что отношение NADPH/NADP⁺ в эритроцитах контрольных животных составляло $4,570 \pm 0,421$, а при введении животным ацетата аммония это отношение достоверно уменьшалось до $1,891 \pm 0,188$ ($p < 0,001$). Отношение, рассчитанное для эритроцитов крыс с инъекцией МК-801, не отличалось от контрольного значения, а при совместном введении МК-801 с ацетатом аммония это отношение повышалось до $3,774 \pm 0,513$ и достоверно не отличалось от отношения, рассчитанного для эритроцитов животных контрольной группы. Это свидетельствовало о том, что сниженное производство NADPH в эритроцитах животных с аммонийной интоксикацией полностью предотвращалось МК-801 и что стационарная концентрация главного кофактора, регулирующего доступность GSH, необходимого для разрушения H₂O₂ в глутатионпероксидазной/редуктазной реакциях, зависит от активации NMDA-R.

Влияние ацетата аммония на активность Г6ФДГ в эритроцитах крыс, роль МК-801. NADPH образуется в эритроцитах исключительно в пентозофосфатном пути, первую реакцию которого катализирует Г6ФДГ. Согласно литературным данным, снижение активности этого фермента в эритроцитах, причем независимо от степени его торможения,

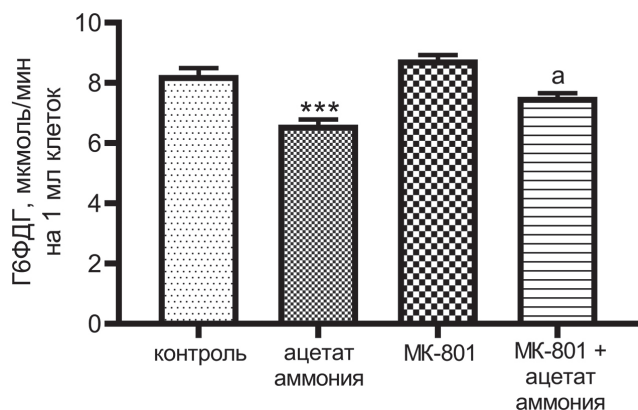


Рис. 6. Активность Г6ФДГ в эритроцитах животных из разных экспериментальных групп. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор. Животным группы «ацетат аммония» вводили ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг; животным группы «МК-801» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг. Животным группы «МК-801 + ацетат аммония» вводили МК-801 в дозе 2,0 мг/кг и через 15 мин — ацетат аммония в дозе 7 ммоль/кг. Все инъекции производили в/б. Декапитация животных, получение проб и метод определения активности Г6ФДГ указаны в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее $\pm$ SEM». *** $p < 0,001$ — по сравнению с животными контрольной группы; а — $p < 0,05$ — по сравнению с животными группы «ацетат аммония»

приводит к развитию окислительного стресса из-за недостатка NADPH [60]. Для выявления подобной взаимосвязи в эритроцитах крыс с острой ГА мы измерили активность Г6ФДГ в эритроцитах животных всех экспериментальных групп (рис. 6).

Было обнаружено, что активность Г6ФДГ в эритроцитах животных с аммонийной интоксикацией достоверно уменьшалась (20%; $p < 0,001$) при сравнении с контрольными показателями (рис. 6). Значения, полученные после введения МК-801, не отличались от контроля, а при совместном введении МК-801 с ацетатом аммония активность фермента на 14% ($p < 0,05$) превысила активность, измеренную в эритроцитах крыс с ГА, и достоверно не отличалась от контрольных значений. Полученные результаты показали, что активность Г6ФДГ, главного фермента эритроцитов, определяющего чувствительность клеток к действию прооксидантов, зависит от функции NMDA-R и подтвердили известную точку зрения о том, что повышенная чувствительность эритроцитов к агентам-прооксидантам и, как в нашем исследовании, к прооксидантному действию аммиака, наблюдаемая даже при незначительном дефиците Г6ФДГ (20%) [61], возникает как прямое следствие снижения концентрации NADPH, которая, как было сказано выше, тоже регулируется активностью NMDA-R эритроцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты впервые показали, что при ГА большая часть аммиака накапливается не в плазме, а в эритроцитах, что делает эти клетки, лишенные аммиак-обезвреживающих ферментов, наиболее восприимчивыми к его прооксидантному действию. Аммиак-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах животных с ГА, выявленный по повышенному содержанию пероксида водорода и сниженной активности антиоксидантных ферментов, частично или полностью предотвращался блокатором NMDA-R, МК-801 (рис. 7).

Полученные результаты дают возможность предположить, что патогенез ГЭ является многофакторным и что аммоний-индуцированный окислительный стресс в эритроцитах, лежащий в основе нарушения кислородтранспортной функции этих клеток [54] и приводящий к гипоксическому повреждению мозга [22, 62], может указывать на существование дополнительной причинно-следственной взаимосвязи: «заболевания печени $\leftrightarrow$ повреждение эритроцитов $\leftrightarrow$ дисфункция мозга».

Следовательно, можно ожидать, что токсические эффекты аммиака при ГЭ могут быть более глобальными, чем это считалось ранее. Мы уверены, что тщательное изучение показателей метаболических/энергетических путей в эритроцитах, модулирующих их кислородтранспортную функцию, помогут выявить дополнительный фактор риска в развитии когнитивных нарушений и неблагоприятного прогноза, связанного с гипоперфузией и энцефалопатией у пациентов с повышенной концентрацией аммиака в крови и особенно у людей старшего поколения, для эритроцитов которых характерны возрастные нарушения многих биохимических процессов, протекающих в мембранах и внутри клеток [23]. Кроме того, во избежание ошибок при постановке диагноза у пациентов с заболеваниями печени, уровень аммиака должен измеряться одновременно и в плазме крови, и в эритроцитах особенно в тех случаях, когда клинические симптомы заболевания не коррелируют с измеренной концентрацией аммиака в плазме [63, 64].

В целом, проведенные исследования расширяют наше понимание роли аммиака в патогенезе энцефалопатии, которая может быть гораздо шире (с вовлечением в патологический процесс эритроцитов, главных компонентов интегрированной системы транспорта кислорода), чем это прогнозируется на основании принятой в научном мире гипотезы, согласно

которой повышение концентрации аммиака в крови из-за неспособности печени выполнять детоксикационную функцию является основной причиной исключительно повреждения мозга.

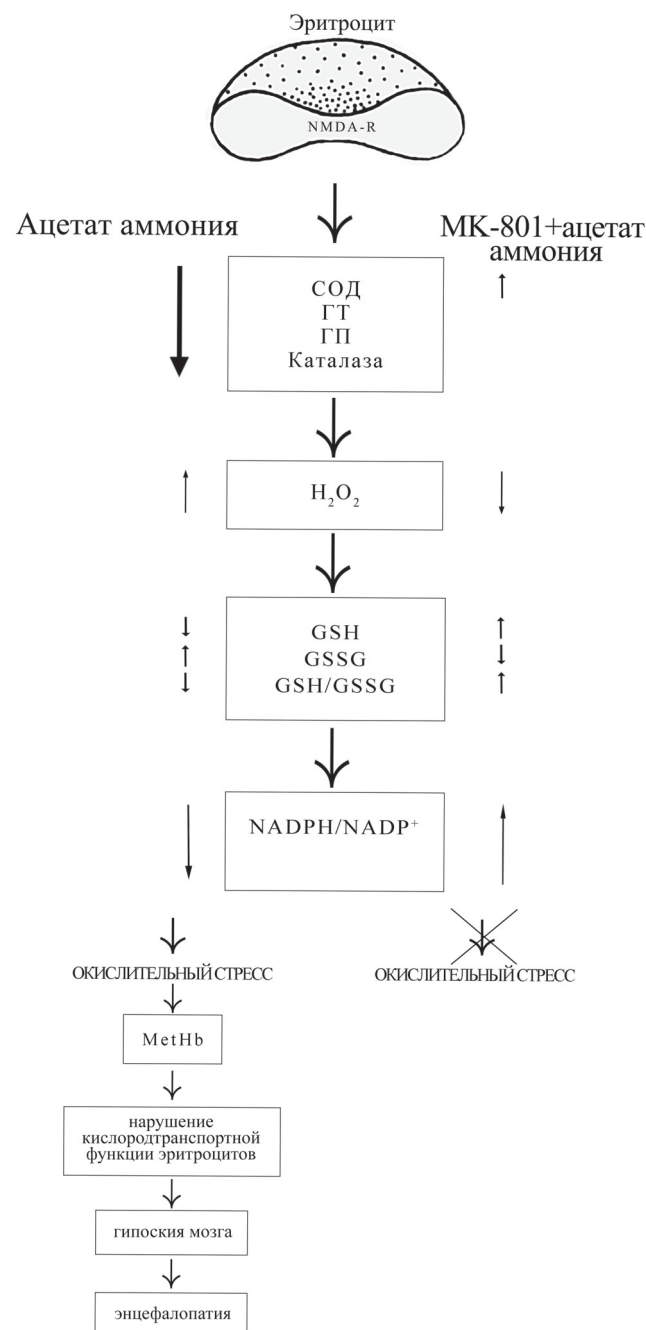


Рис. 7. Гипотетическая схема опосредованного NMDA-рецепторами аммоний-индуцированного нарушения антиоксидантного статуса в эритроцитах. При ГА аммиак накапливается в эритроцитах. Отсутствие аммиак-обезвреживающих ферментов в эритроцитах делает эти клетки наиболее восприимчивыми к прооксидантному действию аммиака, которое выявляется по повышенному содержанию пероксида водорода и сниженной активности антиоксидантных ферментов. Этот эффект частично или полностью предотвращается блокатором NMDA-R, МК-801

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Существует ряд ограничений нашего исследования, которые должны быть упомянуты. Во-первых, мы не провели корреляционный анализ между концентрацией аммиака в эритроцитах крыс с ГА и показателями антиоксидантной системы, что, очевидно, ограничивает получение более полной картины связей между анализируемыми метаболитами и ферментами в эритроцитах и аммиаком, накопившимся в этих клетках. Во-вторых, мы не провели сравнительный анализ Ca^{2+} -зависимого сигнального каскада, запускаемого гиперактивными NMDA-R в мозге и в эритроцитах, в результате чего роль NO-радикала в торможении ферментов антиоксидантной защиты в эритроцитах крыс с ГА осталась только предположительной. Мы полагаем, что исследования, проведенные *in vivo* и *in vitro* в присутствии ингибиторов NO-синтазы и генераторов NO[•], позволят получить более точную картину однотипности или различий между NMDA-R-зависимым каскадом в мозге и в не нейронных тканях и, в частности, в эритроцитах. Очевидно, что для более полного понимания роли аммиака и NMDA-R в повреждении эритроцитов при ГА, приводящей к энцефалопатии, необходимо проведение дальнейших исследований.

Вклад авторов. Е.А. Косенко — концепция и руководство работой, написание текста статьи; Л.А. Тихонова и Г.А. Алилова — проведение экспериментов; Е.А. Косенко, Л.А. Тихонова и Г.А. Алилова — обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00133); <https://rscf.ru/project/23-25-00133/>.

Благодарности. В работе использовали оборудование (спектрофлуориметр Cary Eclipse («Varian», Австралия)) центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Экспериментальные процедуры были выполнены с соблюдением правил гуманного обращения с животными в соответствии с Европейскими правилами по использованию лабораторных животных 1986 г. (пересмотренными в Директиве 2010/63/EU Совета Европы). Все протоколы были одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (протокол № 31/2023 от 15.02.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Butterworth, R. F. (1992) Pathogenesis and treatment of portal-systemic encephalopathy: An update, *Dig. Dis. Sci.*, **37**, 321-327, doi: 10.1007/BF01307722.
2. Von Frerichs, F. T. (1860) *A Clinical Treatise on Diseases of the Liver by Dr Friedrich Theodor Frerichs*, The New Sydenham Society, London, **V1**, pp. 193-246.
3. Butterworth, R. F., Giguère, J. F., Michaud, J., Lavoie, J., and Layrargues, G. P. (1987) Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, *Neurochem. Pathol.*, **6**, 1-12, doi: 10.1007/BF02833598.
4. Cooper, A. J., and Plum, F. (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia, *Physiol. Rev.*, **67**, 440-519, doi: 10.1152/physrev.1987.67.2.440.
5. Kosenko, E., Felipo, V., Montoliu, C., Grisolia, S., and Kaminsky, Y. (1997) Effects of acute hyperammonemia *in vivo* on oxidative metabolism in non-synaptic rat brain mitochondria, *Metab. Brain Dis.*, **12**, 69-82, doi: 10.1007/BF02676355.
6. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Stavroskaya, I. G., and Felipo, V. (2000) Alteration of mitochondrial calcium homeostasis by ammonia-induced activation of NMDA receptors in rat brain *in vivo*, *Brain Res.*, **880**, 139-146, doi: 10.1016/S0006-8993(00)02785-2.
7. Kosenko, E. A., Tikhonova, L. A., Alilova, G. A., Montoliu, C., Barreto, G. E., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2017) Portacaval shunting causes differential mitochondrial superoxide production in brain regions, *Free Radic. Biol. Med.*, **113**, 109-118, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.023.
8. Kosenko, E., Kaminski, Y., Lopata, O., Muravyov, N., and Felipo, V. (1999) Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication, *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1369-1374, doi: 10.1016/S0891-5849(98)00339-6.
9. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Grisolia, S., and Felipo, V. (1995) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism, *Neurochem. Res.*, **20**, 451-456, doi: 10.1007/BF00973101.
10. Monfort, P., Kosenko, E., Erceg, S., Canales, J.-J., and Felipo, V. (2002) Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA receptors, *Neurochem. Int.*, **41**, 95-102, doi: 10.1016/S0197-0186(02)00029-3.
11. Makhro, A., Wang, J., Vogel, J., Boldyrev, A. A., Gassmann, M., Kaestner, L., and Bogdanova, A. (2010) Functional NMDA receptors in rat erythrocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, C1315-C1325, doi: 10.1152/ajpcell.00407.2009.
12. Perazzo, J. C., Tallis, S., Delfante, A., Souto, P. A., Lemberg, A., Eizayaga, F. X., and Romay, S. (2012) Hepatic encephalopathy: An approach to its multiple pathophysiological features, *World J. Hepatol.*, **4**, 50-65, doi: 10.4254/wjh.v4.i3.50.
13. Sener, A., Hutton, J. C., Kawazu, S., Boschero, A. C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., and Malaisse, W. J. (1978) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets, *J. Clin. Invest.*, **62**, 868-878, doi: 10.1172/JCI109199.
14. Gupte, P., and Nagral, A. (2009) Hematological problems and liver disease, *Trop. Gastroenterol.*, **30**, 65-70.
15. Singh, S., Manrai, M., Parvathi, V. S., Kumar, D., Srivastava, S., and Pathak, B. (2020) Association of liver cirrhosis severity with anemia: does it matter? *Ann. Gastroenterol.*, **33**, 272-276, doi: 10.20524/aog.2020.0478.
16. Owen, J. S., Brown, D. J., Harry, D. S., McIntyre, N., Beaven, G. H., Isenberg, H., and Gratzer, W. B. (1985) Erythrocyte echinocytosis in liver disease. Role of abnormal plasma high density lipoproteins, *J. Clin. Invest.*, **76**, 2275-2285, doi: 10.1172/JCI112237.
17. Djiambou, Nganjeu, H. (2017) Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis, *J. Transl. Int. Med.*, **5**, 64-67, doi: 10.1515/jtim-2017-0013.
18. Senzolo, M., and Burroughs, A. K. (2007) Haematological abnormalities in liver disease, In *Textbook of Hepatology* (Rodés, J., Benhaumou, J. P., Blei, A. T., Reichen, J., and Rizzetto, M., eds) Oxford, Blackwell Sci. Pub., pp. 1767-1779, doi: 10.1002/9780470691861.ch21c.
19. Moreau, R., Lee, S. S., Hadengue, A., Ozier, Y., Sicot, C., and Lebrec, D. (1989) Relationship between oxygen transport and oxygen uptake in patients with cirrhosis: effects of vasoactive drugs, *Hepatology*, **9**, 427-432, doi: 10.1002/hep.1840090314.
20. Bailey, D. M., Willie, C. K., Hoiland, R. L., Bain, A. R., MacLeod, D. B., Santoro, M. A., DeMasi, D. K., Andrijanic, A., Mijacka, T., Barak, O. F., Dujic Z., and Ainslie P. N. (2017) Surviving without oxygen: how low can the human brain go? *High Alt. Med. Biol.*, **18**, 73-79, doi: 10.1089/ham.2016.0081.
21. Leithner, C., and Rojl, G. (2014) The oxygen paradox of neurovascular coupling, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 19-29, doi: 10.1038/jcbfm.2013.181.
22. Bosman, G. J. C. G. M. (2018) Disturbed red blood cell structure and function: an exploration of the role of red blood cells in neurodegeneration, *Front. Med. (Lausanne)*, **5**, 198, doi: 10.3389/fmed.2018.00198.
23. Kosenko, E. A., Tikhonova, L. A., Montoliu, C., Barreto, G. E., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2017) Metabolic abnormalities of erythrocytes as a risk factor for Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **11**, 728, doi: 10.3389/fnins.2017.00728.
24. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., and Montoliu, C. (2020) A look into liver mitochondrial

- dysfunction as a hallmark in progression of brain energy crisis and development of neurologic symptoms in hepatic encephalopathy, *J. Clin. Med.*, **9**, 2259, doi: 10.3390/jcm9072259.
25. Brewer, G. J., and Eaton, J. W. (1971) Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport, *Science*, **171**, 1205-1211, doi: 10.1126/science.171.3977.1205.
 26. Van Wijk, R., and van Solinge, W. W. (2005) The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis, *Blood*, **106**, 4034-4042, doi: 10.1182/blood-2005-04-1622.
 27. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., and Montoliu, C. (2022) Is NMDA-receptor-mediated oxidative stress in mitochondria of peripheral tissues the essential factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy? *J. Clin. Med.*, **11**, 827, doi: 10.3390/jcm11030827.
 28. Beutler, E., Blume, K. G., Kaplan, J. C., Löhr, G. W., Ramot, B., and Valentine, W. N. (1977) International committee for standardization in haematology: recommended methods for red-cell enzyme analysis, *Br. J. Haematol.*, **35**, 331-340, doi: 10.1111/j.1365-2141.1977.tb00589.x.
 29. Kosenko, E. A., Venediktova, N. I., Kudryavtsev, A. A., Ataullakhanov, F. I., Kaminsky, Y. G., Felipo, V., and Montoliu, C. (2008) Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification, *Biochem. Cell. Biol.*, **86**, 469-476, doi: 10.1139/O08-134.
 30. Tappel, A. L. (1978) Glutathione peroxidase and hydroperoxides, *Methods Enzymol.*, **52**, 506-513, doi: 10.1016/s0076-6879(78)52055-7.
 31. Anderson, M. E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples, *Methods Enzymol.*, **113**, 548-555, doi: 10.1016/s0076-6879(85)13073-9.
 32. Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287, doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
 33. Lawrence, R. A., and Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952-958, doi: 10.1016/0006-291x(76)90747-6.
 34. Kosenko, E., Venediktova, N., Kaminsky, Y., Montoliu, C., and Felipo, V. (2003) Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication *in vivo*, *Brain Res.*, **981**, 193-200, doi: 10.1016/s0006-8993(03)03035-x.
 35. Aebi, H. E. (1984) Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed) Verlag Chemie, Weinheim, Germany, Vol. 3, pp. 273-286.
 36. Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferases from human liver, *Methods Enzymol.*, **113**, 499-504, doi: 10.1016/s0076-6879(85)13065-x.
 37. Beutler, E. (1971) *Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods*, Grune and Stratton, New York, pp. 62-64.
 38. Bergmeyer, H.-U. (2012) *Methods of Enzymatic Analysis*, Elsevier, ISBN 978-0-323-14177-2.
 39. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Marcaida, G., Grisolia, S., and Felipo, V. (1994) Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and Na⁺,K⁺-ATPase, *J. Neurochem.*, **63**, 2172-2178, doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63062172.x.
 40. Labotka, R. J., Lundberg, P., and Kuchel, P. W. (1995) Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by ¹⁴N and ¹⁵N saturation transfer NMR spectroscopy, *Am. J. Physiol.*, **268**, C686-C699, doi: 10.1152/ajpcell.1995.268.3.C686.
 41. Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D. O., and Foskett, J. K. (2002) Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter, *J. Biol. Chem.*, **277**, 12499-12502, doi: 10.1074/jbc.C200060200.
 42. Reeves, R. B. (1976) Temperature-induced changes in blood acid-base status: Ph and PCO₂ in a binary buffer, *J. Appl. Physiol.*, **40**, 752-761, doi: 10.1152/jap.1976.40.5.752.
 43. Nakamura, K., Yamane, K., Shinohara, K., Doi, K., Inokuchi, R., Hiruma, T., Nakajima, S., Noiri, E., and Yahagi, N. (2013) Hyperammonemia in idiopathic epileptic seizure, *Am. J. Emerg. Med.*, **31**, 1486-1489, doi: 10.1016/j.ajem.2013.08.003.
 44. Huizenga, J. R., Tangerman, A., and Gips, C. H. (1994) Determination of ammonia in biological fluids, *Ann. Clin. Biochem.*, **31** (Pt 6), 529-543, doi: 10.1177/000456329403100602.
 45. Huizenga, J. R., Gips, C. H., and Tangerman, A. (1996) The contribution of various organs to ammonia formation: a review of factors determining the arterial ammonia concentration, *Ann. Clin. Biochem.*, **33** (Pt 1), 23-30, doi: 10.1177/000456329603300103.
 46. Klocke, R. A., Andersson, K. K., Rotman, H. H., and Forster, R. E. (1972) Permeability of human erythrocytes to ammonia and weak acids, *Am. J. Physiol.*, **222**, 1004-1013, doi: 10.1152/ajplegacy.1972.222.4.1004.
 47. Soliani, F., Lusenti, T., Franco, V., Lindner, G., Davoli, V., Parisoli, A., Brini, M., and Borgatti, P. P. (1990) Intradialytic variations in hemoglobin affinity for oxygen during bicarbonate dialysis and hemodiafiltration, *Int. J. Artif. Organs*, **13**, 321-322.
 48. Cichoż-Lach, H., and Michalak, A. (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 8082-8091, doi: 10.3748/wjg.v20.i25.8082.
 49. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Lopata, O., Muravyov, N., Kaminsky, A., Hermenegildo, C., and Felipo, V. (1998) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, prevents changes in superoxide radical and antioxidant

- enzymes induced by ammonia intoxication, *Metab. Brain Dis.*, **13**, 29-41, doi: 10.1023/a:1020626928259.
50. Kiefer, C. R., and Snyder, L. M. (2000) Oxidation and erythrocyte senescence, *Curr. Opin. Hematol.*, **7**, 113-116, doi: 10.1097/00062752-200003000-00007.
 51. Kirkman, H. N., and Gaetani, G. F. (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4343-4347, doi: 10.1073/pnas.81.14.4343.
 52. Test, S. T., and Weiss, S. J. (1984) Quantitative and temporal characterization of the extracellular H₂O₂ pool generated by human neutrophils, *J. Biol. Chem.*, **259**, 399-405, doi: 10.1016/S0021-9258(17)43674-X.
 53. Giulivi, C., Hochstein, P., and Davies, K. J. (1994) Hydrogen peroxide production by red blood cells, *Free Radic. Biol. Med.*, **16**, 123-129, doi: 10.1016/0891-5849(94)90249-6.
 54. Mohanty, J. G., Nagababu, E., and Rifkind, J. M. (2014) Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.*, **5**, 84, doi: 10.3389/fphys.2014.00084.
 55. Johnson, R. M., Goyette, G., Ravindranath, Y., and Ho, Y.-S. (2005) Hemoglobin autooxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, **39**, 1407-1417, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.002.
 56. Jones, D. P. (2006) Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging, *Rejuvenation Res.*, **9**, 169-181, doi: 10.1089/rej.2006.9.169.
 57. Scott, M. D., Zuo, L., Lubin, B. H., and Chiu, D. T. (1991) NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes, *Blood*, **77**, 2059-2064, doi: 10.1182/blood.V77.9.2059.bloodjournal7792059.
 58. Veech, R. L., Eggleston, L. V., and Krebs, H. A. (1969) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver, *Biochem. J.*, **115**, 609-619, doi: 10.1042/bj1150609a.
 59. Wurster, B., and Hess, B. (1970) Kinetic analysis of the glucosephosphate isomerase-glucose-6-phosphate dehydrogenase system from yeast *in vitro*, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **351**, 1537-1544, doi: 10.1515/bchm2.1970.351.2.1537.
 60. Pandolfi, P. P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., and Luzzatto, L. (1995) Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress, *EMBO J.*, **14**, 5209-5215, doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00205.x.
 61. Arese, P., Gallo, V., Pantaleo, A., and Turrini, F. (2012) Life and death of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient erythrocytes – role of redox stress and Band 3 modifications, *Transfus. Med. Hemother.*, **39**, 328-334, doi: 10.1159/000343123.
 62. Kosenko, E., Tikhonova, L., Alilova, G., Urios, A., and Montoliu, C. (2020) The erythrocytic hypothesis of brain energy crisis in sporadic Alzheimer disease: possible consequences and supporting evidence, *J. Clin. Med.*, **9**, 206, doi: 10.3390/jcm9010206.
 63. Romero-Gómez, M., Jover, M., Galán, J. J., and Ruiz, A. (2009) Gut ammonia production and its modulation, *Metab. Brain Dis.*, **24**, 147-157, doi: 10.1007/s11011-008-9124-3.
 64. Elgouhari, H. M., and O'Shea, R. (2009) What is the utility of measuring the serum ammonia level in patients with altered mental status? *Cleve Clin. J. Med.*, **76**, 252-254, doi: 10.3949/ccjm.76a.08072.

IMPAIRED ENZYMATIC ANTIOXIDANT DEFENSE IN ERYTHROCYTES OF RATS WITH AMMONIA-INDUCED ENCEPHALOPATHY: ROLE NMDA RECEPTORS

E. Kosenko*, G. Alilova, and L. Tikhonova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Russia; e-mail: eakos@rambler.ru*

Hepatic encephalopathy (HE), a medical term that deals with a neuropsychiatric disorder seen in patients with severe hepatic dysfunction, has been known for more than a century, however, pathogenetic mechanisms underlying cerebral dysfunction during conditions of liver disease are still not entirely understood. There is a consensus that an accumulation of ammonia in brain as a result of impaired detoxification capacity of the liver or the appearance of a portosystemic shunt is a primary cause of HE. Current evidence suggests that ammonia toxicity is mediated by hyperactivation of glutamate receptors, mainly N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-R) and affects many processes of aerobic metabolism that provides energy for a myriad of specific functions and viability of nerve cells. Recent reports on the presence of functional NMDA receptors in erythrocytes and deviations from normal ranges in many blood test parameters that was indicative of impaired hemodynamics and reduced carrying capacity for oxygen in erythrocytes in most patients with HE

implicate the relationship between “erythrocyte damage” and cerebral dysfunction. In order to understand how, during hyperammonemia, disturbances in energy metabolism in brain that needs a constant supply of a high level of oxygen in the blood lead to encephalopathy, it is necessary to reveal ammonia-induced disorders in energy metabolism and antioxidant defense system of erythrocytes and explore the potential role of ammonia in reduced brain oxygenation. To detect the said missing link, the activities of erythrocyte antioxidant enzymes and concentrations of GSH, GSSG and H_2O_2 were measured in animals with hyperammonemia by using MK-801, a powerful noncompetitive NMDA receptor antagonist. It was found that the accumulation of ammonia in the blood of animals with hyperammonemia occurs within rat erythrocytes in large amounts and makes these cells which do not contain enzymes for the removal of ammonia, more susceptible to a prooxidant environment of ammonia created during oxidative stress that was completely or partially inhibited with the help of MK-801. Data obtained provide a support to identification of extra risk factors in cognitive disorders and in the prediction of unfavorable outcome with hypoperfusion in patients with elevated concentrations of ammonia in the blood.

Keywords: hyperammonemia, hepatoencephalopathy, erythrocytes, NMDA receptors, oxidative stress