

## NMDA-РЕЦЕПТОРЫ И ПОКАЗАТЕЛИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА В ЭРИТРОЦИТАХ: НЕДОСТАЮЩЕЕ ЗВЕНО ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ГЕПАТОЭНЦЕФАЛОПАТИИ

© 2024 Г.А. Алилова, Л.А. Тихонова, Е.А. Косенко\*

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

Поступила в редакцию 13.05.2024

После доработки 16.06.2024

Принята к публикации 23.06.2024

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) – это психоневрологический синдром, развивающийся у пациентов с тяжёлым нарушением функции печени и/или портокавальным шунтированием. Несмотря на более чем вековую историю исследования взаимосвязи между повреждением печени и развитием энцефалопатии, патогенетические механизмы гепатоэнцефалопатии до сих пор полностью не выяснены, однако общепризнано, что главным триггером неврологических осложнений при гепатоэнцефалопатии является нейротоксин – аммиак/аммоний, концентрация которого в крови при нарушении детоксикационной функции печени увеличивается до токсического уровня (гипераммониемия). Беспрепятственно проникая в клетки мозга и влияя на опосредованную NMDA-рецепторами сигнализацию, аммиак/аммоний запускает патологический каскад, приводящий к резкому торможению аэробного обмена глюкозы, окислительному стрессу, гипоперфузии мозга, повреждению нервных клеток и формированию неврологического дефицита. Гипоперфузия мозга, в свою очередь, может быть связана с нарушением кислородтранспортной функции эритроцитов, сопряжённой с нарушением метаболических/энергетических процессов, протекающих в мембранах и внутри эритроцитов и контролирующих сродство гемоглобина к кислороду, определяющее степень оксигенации крови и тканей. Недавно мы подтвердили указанную причинно-следственную взаимосвязь и выявили новое, опосредованное гиперактивацией NMDA-рецепторов аммоний-индуцированное прооксидантное действие на эритроциты, нарушающее их кислородтранспортную функцию. Для более полной оценки «эритроцитарных» факторов, нарушающих оксигенацию мозга и приводящих к энцефалопатии, в данной работе мы определили активность ферментов и концентрацию метаболитов гликолиза, шунта Рапопорта–Люберинг, а также морфологические характеристики эритроцитов крыс с острой гипераммониемией. Для выяснения роли NMDA-рецепторов в указанных процессах мы использовали неконкурентный антагонист рецепторов, МК-801. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что аммоний-индуцированные нарушения формы и функций эритроцитов и гемоглобинемия следует рассматривать как дополнительный системный «эритроцитарный» патогенетический фактор, приводящий к прогрессированию гипоперфузии мозга при гепатоэнцефалопатии, сопровождающейся гипераммониемией.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гипераммониемия, гепатоэнцефалопатия, NMDA-рецепторы, эритроциты, гликолиз, шунт Рапопорта–Люберинг.

**DOI:** 10.31857/S0320972524080071 **EDN:** KDXBWV

### ВВЕДЕНИЕ

Гепатоэнцефалопатия (ГЭ) – это сложный психоневрологический синдром, возникающий

в результате острых или хронических заболеваний печени и/или портокавального шунтирования, клинические симптомы которого варьируют от минимальных расстройств сознания

Принятые сокращения: 2,3-ДФГ – 2,3-дифосфоглицерат; ГА – гипераммониемия; ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; ГК – гексокиназа; ГЭ – гепатоэнцефалопатия; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ПК – пируваткиназа; ФФК – фосфофруктокиназа; Hb – гемоглобин; NMDA-R – NMDA-рецепторы.

\* Адресат для корреспонденции.

и поведения [1] до деменции и комы, которая, как правило, приводит к смерти [2]. Несмотря на многочисленные исследования, посвящённые проблеме поражения центральной нервной системы, патогенетические механизмы дисфункции головного мозга при ГЭ до сих пор полностью не выяснены.

Согласно совокупным литературным данным, этиологические факторы, вызывающие развитие ГЭ, множественны. К ним относятся бактериально-грибковые инфекции [3], системное воспаление [4], дисбаланс аминокислот и продукты их аномального метаболизма [5], некоторые медикаментозные средства [6], различные токсины [7] и многие другие [8]. Общеизвестно, однако, что главным нейротоксином, играющим центральную роль в патогенезе ГЭ, является аммиак/аммоний [9], который при сочетанном нарушении детоксикационной функции печени, вызванном повреждением гепатоцитов и/или портокавальным шунтированием, накапливается в крови (гипераммониемия, ГА) до токсического уровня и беспрепятственно проникает в мозг, где его патологическое действие, опосредованное гиперактивацией NMDA-рецепторов (NMDA-R) [10], распространяется на многие энергообразующие кислородзависимые биохимические процессы [2, 11], лежащие в основе жизнедеятельности нервных клеток и организма в целом [12]. Следует отметить, однако, что появление данных, подтверждающих наличие NMDA-R не только в мозге, но и в некоторых периферических органах, таких как печень, сердце, поджелудочная железа, а также в эритроцитах [13], давало возможность предположить, что токсические эффекты аммиака/аммония при ГЭ, усиленные гиперактивацией NMDA-R в периферических тканях, могут быть более генерализованными, чем предполагалось раньше. Недавно полученные нами данные частично подтвердили это предположение и позволили выявить дополнительный механизм причинно-следственной NMDA-R-зависимой взаимосвязи между дисфункцией печени – «гепато» и повреждением мозга – «энцефалопатией». Учитывая облигатную зависимость клеток мозга от незаменимых энергетических субстратов, глюкозы и кетонных тел [14], образуемых исключительно в печени в процессе глюконеогенеза и кетогенеза, мы, в частности, показали, что аммоний-индуцированное и опосредованное гиперактивацией NMDA-R нарушение работы дыхательной цепи митохондрий печени крыс приводит к быстрому и резкому торможению глюконеогенеза и кетогенеза. Это, в свою очередь, вызывало значительное падение уровня обоих энергетических субстратов в печени и крови и предшествовало начальной стадии неврологических нарушений

(вялость, сонливость, нарушение координации движений, тремор и миоклонические судороги) у животных с острой ГА. Терминальным же событием, предшествующим развитию комы, являлось полное торможение глюконеогенеза и кетогенеза, приводящее к резко выраженной гипогликемии и гипокетонемии и, соответственно, к катастрофическому снижению концентраций глюкозы и кетонных тел в мозге этих животных [15]. Помимо этого, нам удалось выявить другое, внепечёночное, аммоний-индуцированное патологическое звено, а именно нарушение равновесия про- и антиоксидантного баланса в эритроцитах, имеющее прямое отношение к нарушению их функциональных способностей. В частности, мы обнаружили, что у животных с ГА большая часть аммиака/аммония накапливается не в плазме, а в эритроцитах, что делает эти клетки, лишённые аммиак-обезвреживающих ферментов, более восприимчивыми (чем другие не-нейрональные ткани) к аммоний-индуцированному NMDA-R-опосредованному окислительному стрессу [16]. Как известно, окислительный стресс нарушает кислородтранспортную функцию эритроцитов [17, 18], сопряжённую с метаболическими/энергетическими процессами, протекающими в мембранах и внутри эритроцитов [19] и регулируемыми сродством гемоглобина (Hb) к кислороду, которое для максимально возможного связывания кислорода в лёгких должно быть высоким, но уменьшаться для беспрепятственного высвобождения кислорода из Hb и поступления в ткани [20, 21]. Следует отметить, что первые сообщения о взаимосвязи между энергетическими/метаболическими процессами в эритроцитах и способностью Hb связывать, транспортировать и доставлять кислород к тканям были опубликованы более 50 лет назад [20, 22], но эти научные открытия, как и тот факт, что для выполнения своих функций эритроциты должны быть абсолютно «здоровыми» [23], в основном игнорируются. Например, увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ, гематологический показатель, который обязательно определяют у каждого пациента вне зависимости от жалоб) обычно связывают с появлением воспалительных процессов в организме [24], тогда как уменьшение отрицательного заряда мембраны эритроцитов (что и лежит в основе увеличения СОЭ), приводящее к структуральным и биохимическим нарушениям, агрегации эритроцитов, повышению вязкости крови, «застою» в капиллярах, что нарушает микроциркуляторный кровоток и снабжение тканей кислородом [25], обычно остаётся «за скобками». А эритроциты, являющиеся одним из важных компонентов в интегрированной системе транспорта кислорода (помимо сердечно-сосудистой и дыхательной систем), из-за видимой

«простоты» организации по-прежнему рассматриваются как маленькие «мешочки», наполненные Hb, который даже в нефизиологических условиях легко связывает кислород в лёгких и так же легко отдаёт его тканям. Такая точка зрения на безграничные возможности эритроцитов подтверждается в ситуациях, когда степень гипоксемии/гипоксии выявляется по измеряемым обычно в клинических условиях показателям  $\text{SaO}_2$  (насыщение Hb кислородом в артериальной крови) и  $\text{PaO}_2$  (парциальное давление кислорода). Отклонение от нормы хотя бы одного показателя высокоинтегрированной системы метаболических путей в эритроцитах [26] может увеличивать сродство Hb к кислороду и нарушить его переход в ткани. Это может привести к мультиорганной гипоксии [27, 28] и стойким когнитивным нарушениям [23, 29–31] даже при нормальных значениях  $\text{SaO}_2$  и  $\text{PaO}_2$  [32], что не учитывается во врачебной практике.

Следовательно, мы должны признать, что в настоящее время не существует инструмента для диагностики метаболических показателей в эритроцитах, связанных с нарушением их кислородтранспортной функции и с развитием энцефалопатии, возникающей под действием аммиака/аммония, концентрация которого в крови и мозге при многих патологиях может увеличиваться в десятки раз по сравнению с нормой [33–35].

ГЭ не является исключением. Несмотря на то что аммоний-индуцированная энцефалопатия, с одной стороны, сопровождается отклонениями от нормы многих гематологических параметров [36], влияющих на доставку кислорода в ткани, с другой – мультиорганной гипоксией [37] и в том числе сниженной оксигенацией мозга [38], неминуемо приводящей к патологии мозга [39] и прогрессированию стойкой когнитивной дисфункции [30], причинно-следственная связь между нарушением энергетического обмена в эритроцитах и нарушением их функций в настоящее время не установлена.

Для выявления дополнительных изменений внутриклеточных параметров метаболического/энергетического обмена эритроцитов, необходимых для более полной оценки эффективности их кислородтранспортной функции [20] и своевременного распознавания факторов риска развития аммоний-индуцированной энцефалопатии, мы измерили активность регуляторных ферментов и концентрацию метаболитов гликолиза и шунта Рапопорта–Люберинг в эритроцитах крыс с острой ГА. Для выявления участия NMDA-R исследования проводились с использованием неконкурентного антагониста рецепторов, МК-801.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В работе были использованы следующие реактивы: ацетат аммония, МК-801,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$ , Tris, ТЭА, АТФ, АДП, ЭГТА, ЭДТА, фосфоэнолпируват, глюкоза, пируват, убаин, сапонин, миокиназа, пируваткиназа (ПК), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФДГ),  $\alpha$ -целлюлоза, гемикристаллинцеллюлоза тип 50 – фирмы «Sigma-Aldrich» (США). Набор для определения концентрации 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) – фирмы «Roche» (Австрия). Все остальные реагенты были отечественного производства квалификации «особо чистые» и «химически чистые».

**Животные.** В работе использовались крысы линии Wistar (половозрелые самцы) массой 210–230 г, содержащиеся в виварии при комнатной температуре, естественном режиме освещения, свободном доступе к корму и воде. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Животным 1 группы (группа «ацетат аммония») вводился ацетат аммония в виде однократной внутрибрюшинной инъекции (в/б) в сублетальной дозе 7 ммоль/кг, декапитация производилась, как в ранее выполненных исследованиях, через 15 мин после инъекции, обычно после прохождения двух судорожных эпизодов [16]. Этот временной интервал был выбран на основе наших предыдущих результатов, показавших, что влияние острой интоксикации аммонием на энергетический обмен мозга крыс можно чётко увидеть через 15 мин после инъекции [40]. Животным 2 группы (контроль) вводился в/б 0,9%-ный ( $m/v$ ) NaCl в том же объёме, что и ацетат аммония. Декапитация животных производилась через 15 мин после инъекции. Физиологический раствор был выбран в качестве контрольного на основании наших предыдущих исследований, показавших, что введение ацетата натрия, так же как и введение физиологического раствора, не оказывает влияния на измеряемые показатели. Животным 3 группы (группа «МК-801») в/б вводился МК-801 в дозе 2,0 мг/кг, необходимой для полной блокировки рецепторов, и декапитация животных проводилась через 30 мин после инъекции. Животным 4 группы («МК-801 + ацетат аммония») вначале в/б вводился 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 собранная при декапитации кровь (в качестве антикоагулянта использовался 130 mM 3Na-цитрат, pH 7,4) делилась на две части. Для получения плазмы крови форменные

элементы удалялись центрифугированием первой части крови в течение 10 мин при 1000 *g* (+4 °C). Полученный супернатант немедленно использовался для измерения концентрации свободно-го Hb.

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%-ным (w/v) NaCl [41]. Кровь элюировали (1 : 5) при комнатной температуре раствором, содержащим 10 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 7,4, 150 мМ NaCl. Эритроциты осаждали центрифугированием при +4 °C в течение 10 мин при 1000 *g* и дважды промывали раствором, содержащим 10 мМ КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, рН 7,4, 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,8 мМ глюкозу, 0,5 мМ К-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 гипоосмотического буфера (50 мМ ТЭА, рН 7,4, 0,15 мМ К-ЭГТА, 3 мМ β-меркаптоэтанол), содержащего 0,2% сапонина. Активность ферментов определяли в течение первых двух часов после получения лизатов. Пробы во время измерения хранились при +4 °C.

**Определение активности ферментов в лизатах эритроцитов.** Активность Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы (КФ 3.6.3.9), гексокиназы (ГК, КФ 2.7.1.1), фосфофруктокиназы (ФФК, КФ 2.7.1.11), ПК (КФ 2.7.1.40), ГАФДГ (КФ 1.2.1.12) и ЛДГ (КФ 1.1.1.27) определяли спектрофотометрически по скорости образования NAD<sup>+</sup> или NADPH при 340 нм с помощью методов ферментативного анализа эритроцитов, разработанных международным комитетом по стандартизации в гематологии [41] и подробно описанных нами ранее [42].

**Получение экстрактов эритроцитов для определения концентрации метаболитов.** Очищенные эритроциты смешивали с охлажденной смесью (–20 °C) 6% HClO<sub>4</sub>/40% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH в соотношении 1 : 10. Центрифугировали 5 мин при температуре +4 °C при 10 000 *g*. Осадок удаляли, рН супернатанта доводили до 5–6, используя 30%-ный (m/m) КОН и сухой КНСO<sub>3</sub>. Осадок перхлората калия удаляли центрифугированием при тех же режимах. Прозрачный супернатант немедленно использовали для определения концентрации метаболитов.

**Определение концентрации АТФ, АДФ, АМР, лактата, пирувата и 2,3-ДФГ в экстрактах эритроцитов.** Концентрация адениннуклеотидов, лактата и пирувата определялась по стандартным спектрофотометрическим методам [43], подробно описанным нами ранее [42].

Энергетический заряд (ЭЗ) рассчитывали по уравнению Аткинсона [44]:  $ЭЗ = (АТФ + 0,5 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМР)$ .

Отношение NAD<sup>+</sup>/NADH рассчитывали по методу Williamson et al., 1968 [45], с учётом константы равновесия лактатдегидрогеназной реакции, равной  $1,11 \times 10^4$ .

Концентрация 2,3-ДФГ определялась спектрофотометрически при помощи коммерческого набора «Roche» (10 148 334 001, Германия) при сочетанном действии ферментов фосфоглицератмутаза, фосфоглицераткиназы, ГАФДГ, триозофосфатизомеразы и глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, согласно прилагаемой инструкции. Концентрация всех измеряемых субстратов выражалась в микро-моль/литр клеток (мкМ).

**Определение концентрации Hb в крови и плазме. Осмотическая резистентность и морфологический анализ эритроцитов.** Концентрацию Hb измеряли на гематологическом анализаторе DH 36 Vet («Dymind», Китай). Для исследования использовали цельную стабилизированную 3Na<sup>+</sup>-цитратом кровь или плазму. Степень гемолиза эритроцитов рассчитывали по формуле: % гемолиза =  $[(1 - Hct) \times \text{свободный Hb (г/дл)} \times 100] / \text{общий Hb (г/дл)}$ , Hct – гематокрит [46].

Морфологический анализ выполняли флуоресцентной визуализацией клеток с помощью системы CELENA® S Digital Imaging System («LogosBio», Республика Корея), объектив ×40. Нативные мазки из цельной крови готовили стандартным способом на обезжиренных предметных стёклах путём высушивания на воздухе при комнатной температуре и использовали без дополнительной фиксации и окраски.

Осмотическая резистентность эритроцитов определялась по степени лизиса эритроцитов после их инкубации в растворе NaCl различной концентрации (от 0 до 154 мМ (0,9%) NaCl). Степень лизиса эритроцитов анализировалась спектрофотометрически путём измерения оптической плотности по высвобождению Hb при 540 нм после остановки гемолиза путём добавления к пробам равного объёма NaCl в концентрации, необходимой для восстановления изотоничности. Для количественной оценки осмотической резистентности эритроцитов учитывалась концентрация NaCl, при которой наблюдался минимальный (первоначальный) и 50%-ный лизис клеток.

**Статистический анализ** выполняли с помощью компьютерной программы Prizm V8 («GraphPad», Сан-Диего, 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

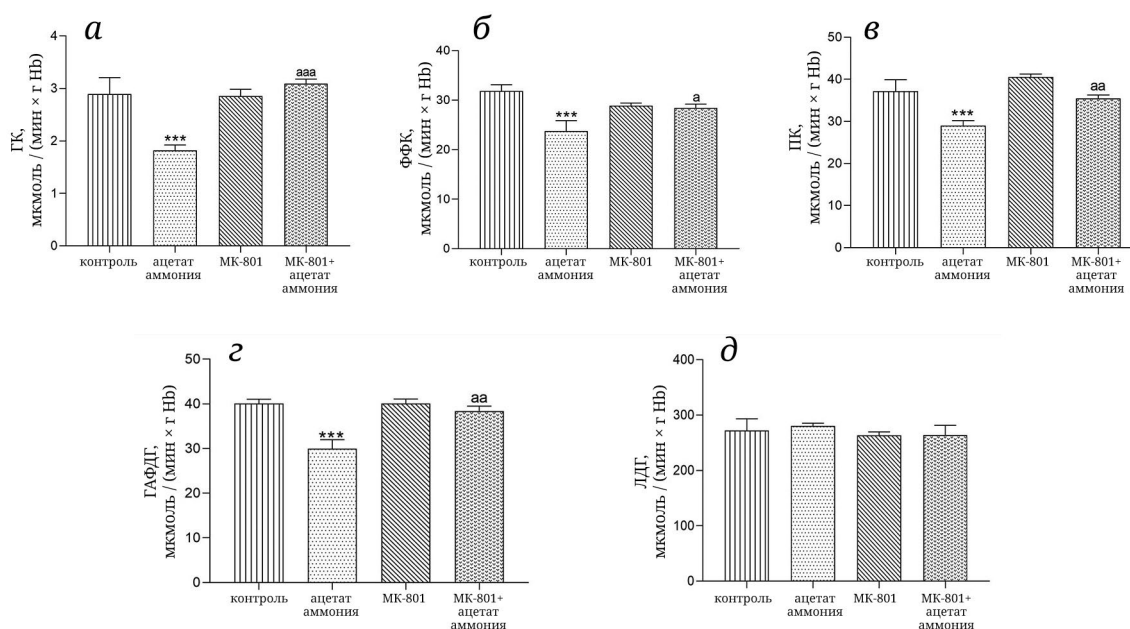
**Влияние аммиака/аммония и МК-801 на активность регуляторных ферментов гликолиза эритроцитов крыс.** В первой части исследования [16] мы показали, что содержание аммония в эритроцитах крыс контрольной группы составляло  $0,300 \pm 0,038$  мМ, что входит в допустимый диапазон значений, соответствующих физиологической норме для эритроцитов этих животных [47]. Концентрация аммония после одиночной инъекции МК-801 не отличалась от контрольного значения, тогда как после введения ацетата аммония в дозе 7 ммоль/кг уровень аммония в эритроцитах животных увеличился до  $3,602 \pm 0,126$  мМ ( $p < 0,001$ ). При сочетанном введении МК-801 с ацетатом аммония концентрация аммония в эритроцитах снижалась (20%,  $p < 0,05$ ), но оставалась достаточно высокой ( $3,320 \pm 0,06$  мМ) по сравнению с контролем, что делало эритроциты, лишённые аммоний-детоксицирующих ферментов, наиболее восприимчивыми (по сравнению с другими не-нейрональными тканями)

к аммоний-индуцированному окислительному стрессу [48].

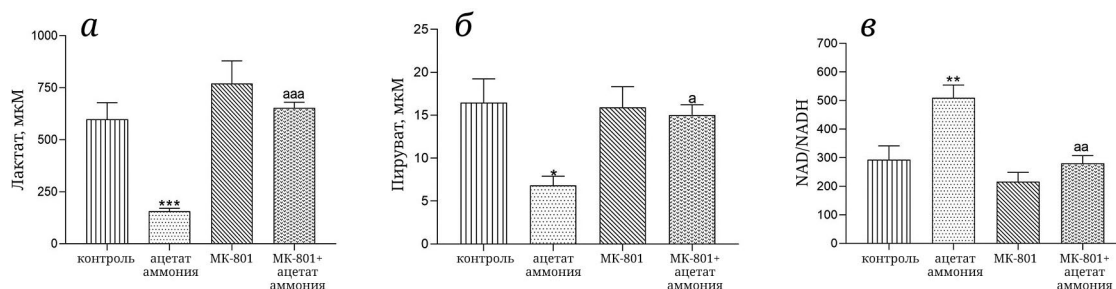
Окислительный стресс, как известно, нарушает взаимосвязь между кислородтранспортной функцией эритроцитов и их гликолитической системой [49], метаболиты и ферменты которой, как уже было сказано, контролируют сродство Нb к кислороду [20]. Поэтому для выявления дополнительных показателей, необходимых для оценки способности эритроцитов доставлять кислород тканям, мы вначале выяснили, связано ли накопление аммиака/аммония в эритроцитах, оснащённых NMDA-R, с нарушением гликолиза, главного метаболического пути, необходимого для поддержания функционального состояния и жизнеспособности эритроцитов в целом. Для этого мы измерили активность основных регуляторных ферментов гликолиза ГК, ФФК, ПК, а также ГАФДГ и ЛДГ.

Результаты определения активности ферментов гликолиза в эритроцитах крыс разных исследуемых групп суммированы на рис. 1.

Как видно из рис. 1 (а–д), введение ацетата аммония снижало активность ферментов в эритроцитах животных в разной степени. Так, активность ГК, ФФК, ПК и ГАФДГ снижалась на 38% ( $p < 0,001$ ), 26% ( $p < 0,001$ ), 22% ( $p < 0,001$ ), 30% ( $p < 0,001$ ) соответственно, тогда как значения



**Рис. 1.** Активность ГК (а), ФФК (б), ПК (в), ГАФДГ (г) и ЛДГ (д) в эритроцитах крыс исследуемых групп ( $n = 10$  для каждой группы). Крысам в/б вводили ацетат аммония (7 ммоль/кг, группа «ацетат аммония»), МК-801 (2 мг/кг в/б) вводился в одиночной инъекции (группа «МК-801») и за 15 мин до инъекции ацетата аммония (группа «МК-801 + ацетат аммония»). Крысам контрольной группы («контроль») вводился физиологический раствор. Время декапитации животных и методы определения активности ферментов указаны в разделе «Материалы и методы». Активность ферментов выражена в мкмоль/(мин × г Нb). Результаты представлены в виде «среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM)». \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с животными контрольной группы; а –  $p < 0,05$ , aa –  $p < 0,01$ , aaa –  $p < 0,001$  по сравнению с животными группы «ацетат аммония». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони



**Рис. 2.** Концентрация лактата (а), пирувата (б) и расчётное отношение  $NAD^+/NADH$  (в) в эритроцитах животных исследуемых групп ( $n = 10$  для каждой группы). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Методы определения концентрации пирувата и лактата указаны в разделе «Материалы и методы». Концентрация метаболитов выражена в мкмоль/литр клеток (мкМ). Отношение  $NAD^+/NADH$  рассчитывали по методу Williamson et al. [45]:  $NAD^+/NADH = [\text{пируват}]/[\text{лактат}] \times 1/k$ , где  $k$  – константа равновесия лактатдегидрогеназной реакции, равная  $1,11 \times 10^4$ . Данные выражены в виде «среднее значение  $\pm$  SEM». \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с животными контрольной группы; а –  $p < 0,05$ , aa –  $p < 0,01$ , aaa –  $p < 0,001$  по сравнению с животными группы «ацетат аммония». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони

активности ЛДГ при аммиачной интоксикации не отличались от измеренных в эритроцитах контрольных животных (рис. 1, д). Введение МК-801 поддерживало активность всех измеряемых ферментов в пределах, характерных для контрольных значений. Совместное введение МК-801 с ацетатом аммония восстанавливало активность всех измеряемых ферментов до контрольного уровня и свидетельствовало о том, что аммоний-индуцированное торможение ферментов гликолиза опосредовано активацией NMDA-R.

Дополнительным подтверждением NMDA-R-зависимого торможения гликолитического потока являлось также восстановление до контрольных значений резко сниженной концентрации лактата и пирувата и увеличенного отношения  $NAD^+/NADH$  в эритроцитах животных с ГА под воздействием МК-801, введённого совместно с ацетатом аммония (рис. 2, а–в).

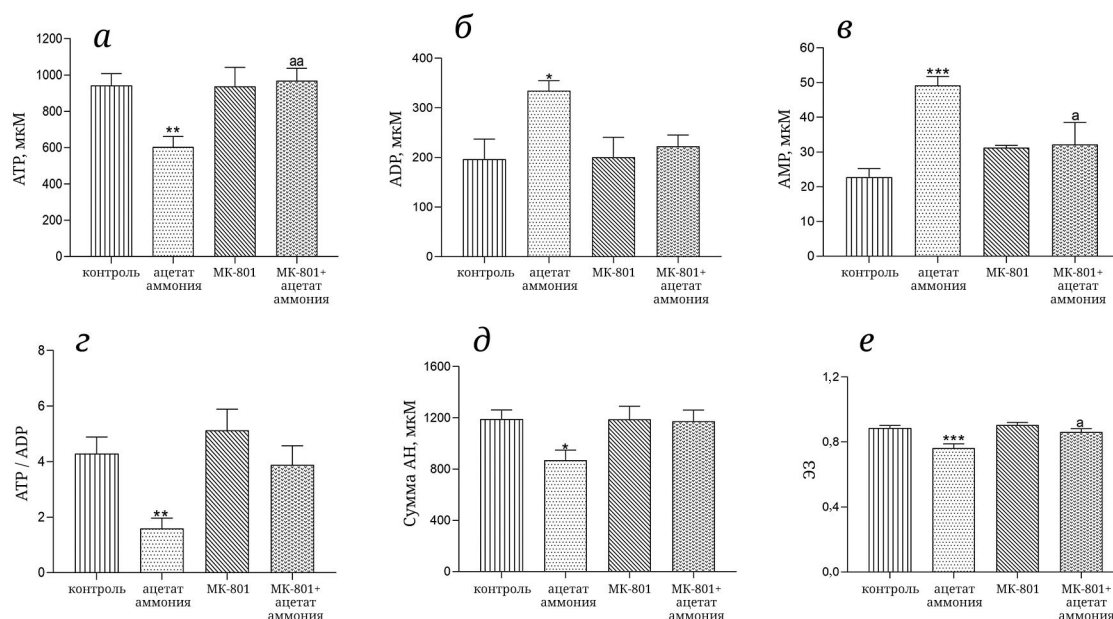
Эти данные частично объясняют причины торможения гликолитического потока, связанного в основном с нарушением метаболического контроля в эритроцитах крыс с ГА, приводящим к дисбалансу отношения  $NAD^+/NADH$  (рис. 2, в) из-за недостатка пирувата (рис. 2, б) и NADH, необходимых для регенерации  $NAD^+$  в ЛДГ-реакции и возобновления гликолиза на стадии ГАФДГ-реакции [50].

Согласно общепринятому мнению, скорость метаболизма глюкозы в эритроцитах регулируется в основном адсорбционным механизмом [51], основанным на обратимом связывании ферментов гликолиза с трансмембранным белком полосы 3 (band 3). Суть этого механизма состоит в том, что опосредованное посттрансляционными модификациями белка полосы 3 [52] отсоединение ферментов от белка (активация ферментов) или их присоединение к белку (неактивная форма ферментов) [53] позволяет зрелым эритроцитам,

лишённым митохондрий, мгновенно адаптивно реагировать на эндогенные или появляющиеся в кровяном русле факторы и, переключая поток глюкозы от гликолиза на пентозофосфатный путь (ПФП) (и в обратном направлении), удерживать состояние своего энергетического обмена и антиоксидантной системы в пределах, необходимых для формирования многоуровневого адаптивного ответа [54]. Из этого следует, что снижение активности ферментов гликолиза в эритроцитах крыс с ГА может быть адаптивным ответом, поддерживающим внутриклеточный антиоксидантный баланс путём торможения гликолитического потока и активации ПФП [55], обеспечивающего синтез NADPH, необходимого для предотвращения перехода ферроформы ( $Fe^{2+}$ ) Нв в ферриформу ( $Fe^{3+}$ ) в присутствии активных форм кислорода, накопившихся в эритроцитах животных с ГА [56].

Однако, как показали наши недавние исследования, активность ключевого фермента ПФП, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), в эритроцитах крыс с ГА достоверно снижалась по сравнению с контролем. Совместно с резким падением отношения  $NADPH/NADP^+$  и  $GSH/GSSG$  это свидетельствовало о торможении ПФП, что являлось одной из причин трёхкратного накопления перекиси водорода и развития окислительного стресса в эритроцитах гипераммониемированных животных [16], что, в свою очередь, исключает возможность рассматривать снижение активности гликолитических ферментов при острой ГА (рис. 1) даже в виде краткосрочного адаптивного ответа эритроцитов.

С другой стороны, обнаруженное нами участие NMDA-R в аммоний-индуцированном торможении гликолиза даёт возможность предположить наличие взаимосвязи между  $Ca^{2+}$ -зависимым сигнальным каскадом, запускаемым гиперактивными NMDA-R и приводящим к усиленному



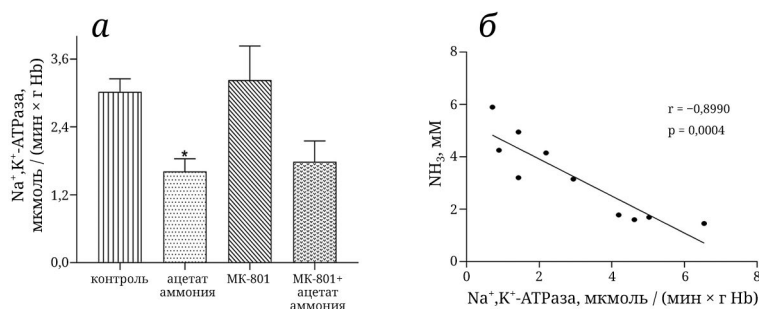
**Рис. 3.** Концентрация АТФ (а), АДФ (б), АМР (в), отношение АТФ/АДФ (г), их суммарное содержание, АН (д), и ЭЗ (е) в эритроцитах крыс исследуемых групп ( $n = 10$  для каждой группы). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Методы определения концентрации АТФ, АДФ, АМР указаны в разделе «Материалы и методы». Концентрация метаболитов выражена в мкмоль/литр клеток (мкМ). Энергетический заряд рассчитывали по уравнению Аткинсона [44]:  $ЭЗ = (АТФ + 0,5 АДФ) / (АТФ + АДФ + АМР)$ . Данные выражены в виде «среднее значение  $\pm$  SEM». \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с животными контрольной группы; а –  $p < 0,05$ , аа –  $p < 0,01$  по сравнению с животными группы «ацетат аммония». Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони

образованию  $NO^{\bullet}$  в эритроцитах [13], и  $NO^{\bullet}$ -опосредованной посттрансляционной модификацией белка полосы 3 [52], регулирующей скорость метаболизма глюкозы [54]. Исходя из этого, можно предположить, что одна из причин торможения регуляторных ферментов гликолиза в эритроцитах животных с ГА в условиях окислительного стресса может быть связана с  $NO^{\bullet}$ -зависимым ингибированием фосфотирозинкиназы, что параллельно с нитрозилированием по остаткам тирозина белка полосы 3 приводит к необратимому торможению гликолиза [57]. Не исключено также, что  $NO^{\bullet}$  и его производные могут оказывать прямое ингибирующее действие на ферменты гликолиза в эритроцитах [58]. Хотя, если учесть множественные причины, приводящие к торможению гликолитического пути, включая ингибирование ферментов продуктами реакций [59] и посттрансляционными модификациями [60], влияние рН, наличие дезокси-Нб, конкурирующего с ферментами гликолиза за места связывания с цитоплазматическим доменом белка полосы 3 [54], состояние глюкозного транспортера [61], наличие в крови гормонов [62] и многие другие факторы, становится очевидным, что для выявления механизмов, ответственных за торможение утилизации глюкозы в эритроцитах в условиях окислительного стресса, обнаруженного нами у животных с ГА, необходимы специальные, более

углублённые исследования (и, конечно, проведённые с учётом обнаруженного участия NMDA-R в аммоний-индуцированном торможении гликолитического потока).

**Влияние аммиака/аммония и МК-801 на содержание адениннуклеотидов в эритроцитах крыс.** Отличительной особенностью анаэробного гликолиза в эритроцитах является то, что это основной путь производства АТФ, который используется клетками для поддержания ряда жизненно важных функций. Поэтому при обнаруженном торможении гликолиза в эритроцитах крыс с ГА (рис. 1, 2) снижение концентрации АТФ и общего пула адениннуклеотидов было ожидаемым. На рис. 3 (а–д) представлены результаты определения концентрации АТФ, АДФ, АМР, их суммарное содержание (АН), а также отношение АТФ/АДФ и расчётное значение энергетического заряда (ЭЗ), характеризующего энергетический статус клеток.

Как видно из рис. 3, в эритроцитах крыс с ГА в соответствии со снижением активности гликолитического потока наблюдалось достоверное снижение внутриклеточной концентрации АТФ (40%,  $p < 0,01$ ). Усиленный гидролиз АТФ приводил к увеличению концентрации АДФ и АМР на 69% ( $p < 0,05$ ) и 113% ( $p < 0,001$ ) соответственно (рис. 3, а–в) и к трёхкратному уменьшению отношения АТФ/АДФ (рис. 3, г,  $p < 0,01$ ). Сумма АН (рис. 3, д) и ЭЗ (рис. 3, ж) при сравнении с контролем



**Рис. 4.** Активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в эритроцитах крыс исследуемых групп (n = 10 для каждой группы) (а). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Метод определения активности Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы указан в разделе «Материалы и методы». Активность фермента выражена в мкмоль/мин × г Hb. Данные выражены в виде «среднее значение ± SEM». \* p < 0,05 по сравнению с животными контрольной группы. Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони. Для выявления взаимосвязи между концентрацией аммония в эритроцитах и активностью Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы использовался коэффициент корреляции Пирсона (б). Анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V8. Достоверная отрицательная корреляция между концентрацией аммония и активностью Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в эритроцитах крыс с ГА (r = -0,899, p = 0,0004)

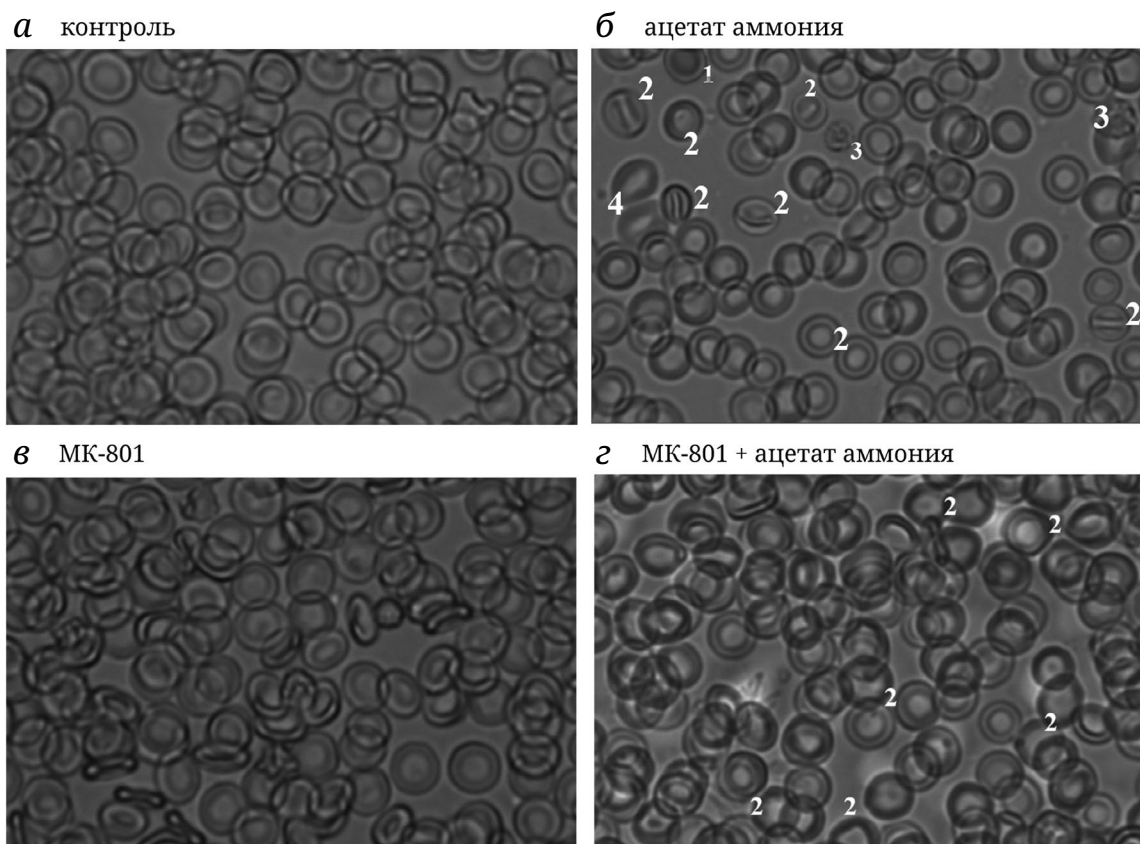
снижались на 27% (p < 0,05) и 20% (p < 0,001) соответственно. Введение МК-801 в виде однократной инъекции не изменяло (по отношению к контролю) эти показатели, а при сочетанном действии МК-801 с ацетатом аммония наблюдалось полное восстановление до контрольных значений всех измеренных показателей адениновых нуклеотидов (рис. 3, а–е). Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышенная утилизация АТР, некомпенсированная заторможенным гликолизом и приводящая к нарушению энергетического обмена в эритроцитах животных с ГА, опосредована гиперактивацией NMDA-R.

**Влияние аммиака/аммония и МК-801 на активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в эритроцитах крыс.** Большая часть энергии АТР, образуемой в эритроцитах в процессе гликолиза, используется для активации Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы [63], основная роль которой заключается в поддержании градиента концентраций Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>, необходимого для регуляции водного гомеостаза, объёма, формы клеток, играющих важную роль в сохранении функциональных свойств эритроцитов [64]. Для выявления взаимосвязи между NMDA-R-зависимым аммоний-индуцированным гидролизом АТР и функциональной способностью Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы мы измерили активность этого фермента в эритроцитах крыс всех исследуемых групп. Данные представлены на рис. 4.

Как видно (рис. 4, а), в эритроцитах животных, получивших сублетальную дозу ацетата аммония, активность Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы почти в 2 раза ниже (p < 0,05), чем у животных контрольной группы. МК-801 ни в одиночной инъекции, ни при сочетанном введении с ацетатом аммония не влиял на активность фермента. Это указывало на то, что аммоний-индуцированное торможение Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в эритроцитах не зависит от NMDA-R, а связано исключительно с действием

аммония, что подтверждалось наличием достоверной отрицательной корреляции между концентрацией аммония, накопившегося в эритроцитах животных с ГА, и активностью Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы (r = -0,899, p = 0,0004, рис. 4, б).

В биологических жидкостях аммиак существует в двух формах: в виде NH<sub>3</sub>, незаряженной липофильной формы, что обеспечивает его быструю проницаемость через мембрану эритроцитов [65], и в протонированной форме, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (ион аммония), транспорт которого в клетки более медленный (по сравнению с газообразным NH<sub>3</sub>) [66] и осуществляется при помощи специфических транспортёров, локализованных на мембране эритроцитов [67]. Если учесть, что транспорт NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в эритроциты животных может приводить к снижению внутриклеточной концентрации K<sup>+</sup> и увеличению концентрации Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup> [68], то можно предположить, что одной из причин аммоний-индуцированного снижения активности Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы является резкое снижение концентрации АТР, которое не удовлетворяет повышенную потребность в энергии, необходимой для функциональной активности фермента, направленной на поддержание ионного градиента, значительно нарушенного усиленным транспортом обеих форм аммиака в эритроциты животных с ГА. По-видимому, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-зависимое закисление внутриклеточной среды эритроцитов (торможение гликолиза), сменяющее защелачивание, вызванное первоочередным транспортом NH<sub>3</sub> в клетки [67], играет важную роль в торможении гликолиза, снижении уровня АТР и торможении Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФазы в эритроцитах животных с ГА [69]. Также хорошо известно, что активность фермента в значительной степени ингибируется в условиях окислительного стресса [70], что частично объясняется многочисленными свободнорадикальными



**Рис. 5.** Изменение морфологии эритроцитов у крыс с ГА. Влияние МК-801. Условия введения препаратов, доза, время декапитации животных ( $n = 6$  для каждой группы) указаны в подписи к рис. 1. Морфологический анализ выполняли флуоресцентной визуализацией клеток с помощью системы CELENA® S Digital Imaging System («LogosBio»), объектив  $\times 40$ . Способ подготовки клеток для микроскопии указан в разделе «Материалы и методы». 1 – Дискоциты-нормоциты, 2 – стоматоциты (наличие поперечной щели или белого пятна в центре), 3 – эхиноциты, 4 – овалоциты

модификациями, приводящими к конформационным изменениям и нарушению функции  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы [71]. Это хорошо согласуется с данными, показывающими, что неспецифическое ингибирование  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы в условиях окислительного стресса характерно не только для эритроцитов пациентов с заболеваниями печени [72], но и для пациентов со многими другими патологиями [73].

Интересно, что несмотря на то что механизмы торможения  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы являются множественными и могут различаться в зависимости от конкретных условий [64], блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы в эритроцитах, наблюдаемая при многих патологиях, обычно приводит к изменению формы, ухудшению способности к деформации и усиленному лизису эритроцитов в кровяном русле [74].

В связи с этим следует отметить: хотя и общепризнано, что основной причиной ГЭ является ГА, и более века известно, что соли аммония увеличивают объем эритроцитов и вызывают их лизис [75], наличие внутрисосудистого гемолиза у пациентов с ГЭ в основном объясняется повышенным давлением в воротной вене (портальная гипертензия), кровотечением из варикозно-рас-

ширенных вен желудочно-кишечного тракта [76], травмированием вены при взятии крови на анализ [77] и многими другими причинами [78], тогда как роль аммиака/аммония в лизисе эритроцитов *in vivo* практически не рассматривается в повседневной клинической практике. Для выявления недостающего звена следующий этап наших исследований был связан с изучением влияния ГА на морфологию циркулирующих эритроцитов, на их осмотическую резистентность, степень лизиса и связанную с ней концентрацию свободного  $\text{Hb}$  в плазме крови животных.

**Влияние ГА и МК-801 на морфологию, концентрацию  $\text{Hb}$  и степень лизиса эритроцитов крыс.** Микроскопическое исследование мазков крови показало, что для популяции эритроцитов животных с ГА характерна некоторая неоднородность, возникающая из-за трансформации дискоцитов-нормоцитов (рис. 5, а) в стоматоциты (рис. 5, б (2)) – клетки, практически не способные не только поддерживать прочность мембран, но и деформироваться в кровотоке [79]. МК-801 в одиночной инъекции заметно не изменял морфологию нормальных клеток (рис. 5, в), а при со-

четанном действии с ацетатом аммония только частично способствовал восстановлению стоматоцитов до дисковидной формы, в результате чего, как можно видеть, большая часть клеток в кровотоке животных с ГА в присутствии МК-801 оставалась в виде набухших стоматоцитов (рис. 5, з (2)).

Это свидетельствовало о том, что аммоний-индуцированные морфологические изменения и переход нормальных эритроцитов в стоматоциты в кровяном русле животных с ГА не зависят от NMDA-R, а связаны в основном с действием аммиака/аммония, накопившегося в эритроцитах животных. Согласно литературным данным, причины появления стоматоцитов в кровяном русле животных и человека множественны [80]. В основном считается, что трансформация нормальных дискоцитов в стоматоциты связана со сниженным транспортом  $K^+$  в эритроциты [81] и усиленным входом  $Na^+$ , приводящим к аномально высокому содержанию воды в клетках и их лизису в кровотоке [82]. Учитывая, что концентрация аммония у животных с ГА увеличивалась более чем в 10 раз по сравнению с контролем [16] и что его транспорт в эритроциты, как было сказано выше, сопряжен со снижением внутриклеточной концентрации  $K^+$  и увеличением концентрации  $Na^+$  [68], можно предположить, что одна из причин образования стоматоцитов, набухших прелизисных клеток, в кровотоке животных с ГА связана с аммоний-индуцированным нарушением градиента концентраций  $Na^+$  и  $K^+$ , способствующим усиленному входу воды, что, как было обнаружено, не зависит от активации NMDA-R. Аммоний-индуцированные нарушения, такие как

совместный с  $NH_4^+$  избыточный котранспорт  $Cl^-$ , снижение pH [83], конформационные изменения интегральных мембранных белков [84], ингибирование активности  $Na^+, K^+$ -АТФазы [64], снижение концентрации АТФ [85], окислительный стресс [16, 86], прямо или косвенно вызывающие усиленный вход воды в эритроциты, также могут быть связаны с образованием стоматоцитов в кровяном русле животных с ГА.

Полученные результаты находятся в соответствии с многочисленными литературными данными, показавшими, что появление атипичной формы эритроцитов, в частности, стоматоцитов, наблюдается в общей популяции эритроцитов пациентов с различными заболеваниями печени [78, 87]. Однако в связи с этим необходимо отметить: несмотря на то что стоматоциты являются клетками, легко лизирующими в кровяном русле [88], вопрос о роли накопившегося в эритроцитах аммония в лизисе клеток *in vivo* при патологиях, сопровождающихся ГА, как было отмечено выше, в настоящее время всё ещё остаётся открытым. Поскольку концентрация свободного Hb в плазме крови является одним из главных показателей внутрисосудистого гемолиза [89], мы измерили концентрацию этого показателя и с учётом других гематологических параметров рассчитали степень лизиса эритроцитов (% гемолиза) [90], а затем по степени устойчивости к сниженной концентрации NaCl определили осмотическую резистентность эритроцитов животных всех исследуемых групп. Данные представлены в табл. 1.

Как видно из приведённых данных, величина Hct, концентрация общего и свободного Hb,

**Таблица 1.** Влияние ацетата аммония и МК-801 на величину гематокрита, концентрацию общего и свободного Hb, осмотическую резистентность и степень лизиса эритроцитов (% гемолиза)

|                                                 | Контроль       | Ацетат аммония    | МК-801         | МК-801 + ацетат аммония       |
|-------------------------------------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------------------|
| Концентрация Hb в крови, г/100 мл               | 13,35 ± 0,1753 | 11,49 ± 0,1339*** | 12,81 ± 0,1833 | 12,43 ± 0,2930 <sup>a,*</sup> |
| Гематокрит, %                                   | 52,24 ± 1,391  | 43,30 ± 2,253***  | 52,00 ± 0,8876 | 46,03 ± 0,8048*               |
| Концентрация свободного Hb в плазме, г/100 мл   | 0,096 ± 0,008  | 0,55 ± 0,11***    | 0,084 ± 0,009  | 0,12 ± 0,013***               |
| % гемолиза                                      | 0,32 ± 0,02    | 2,2 ± 0,12***     | 0,30 ± 0,02    | 0,64 ± 0,04 <sup>aaa,**</sup> |
| Осмотическая резистентность                     |                |                   |                |                               |
| Концентрация NaCl (%), вызывающая 50%-ный лизис | 0,41 ± 0,007   | 0,49 ± 0,011**    | 0,42 ± 0,02    | 0,44 ± 0,016                  |

Примечание. Введение препаратов, доза, время декапитации животных ( $n = 10$  для каждой группы) указаны в подписи к рис. 1. Концентрацию Hb, осмотическую резистентность и процент гемолиза определяли, как указано в разделе «Материалы и методы». Результаты представлены в виде «среднее ± SEM». \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с животными контрольной группы; <sup>a</sup> –  $p < 0,05$ , <sup>aaa</sup> –  $p < 0,001$  по сравнению с животными группы «ацетат аммония».

осмотическая устойчивость эритроцитов крыс контрольной группы входят в допустимый диапазон значений, соответствующих физиологической норме для этих животных [91].

У животных с ГА наблюдалось достоверное и почти равнозначное уменьшение содержания общего Hb и Hct на 14% (\*\* $p < 0,001$ ) и 17% (\* $p < 0,05$ ) соответственно, что в совокупности с окрашенной в красный цвет плазмой свидетельствовало о происходящем внутрисосудистом лизисе эритроцитов и выходе Hb в плазму. Действительно, прямые измерения показали, что содержание свободного Hb в плазме и степень лизиса эритроцитов животных с ГА увеличивались тоже почти в одинаковой степени (в 6–7 раз, \*\*\* $p < 0,001$ ) при сравнении с контролем (табл. 1). Большая осмотическая хрупкость эритроцитов животных с ГА под воздействием накопившегося в них аммиака/аммония подтверждалась данными, показавшими, что первоначальный (6%) лизис клеток был зарегистрирован в растворе с достаточно высокой концентрацией NaCl, равной 0,7%, тогда как минимальный лизис эритроцитов контрольных животных (1,6%) наблюдался в присутствии 0,58%-ного раствора NaCl (не показано). 50%-ный лизис эритроцитов животных с ГА также происходил при более высокой концентрации NaCl ( $0,49 \pm 0,011\%$ , \* $p < 0,05$ ) при сравнении с контролем ( $0,41 \pm 0,0073\%$ ) (табл. 1).

При одиночной инъекции МК-801 не влиял на измеряемые показатели, и они соответствовали контрольным значениям (табл. 1). Введённый совместно с ацетатом аммония МК-801 частично восстанавливал аммоний-индуцированное нарушение гематологических параметров, но их значения оставались достоверно завышенными по сравнению с контролем. Можно видеть, что при сниженном по отношению к контролю содержании общего Hb, Hct на 7% (\* $p < 0,05$ ) и 12% (\* $p < 0,05$ ) соответственно и повышенной концентрации свободного Hb (25%, \*\*\* $p < 0,001$ ) степень (%) внутрисосудистого гемолиза эритроцитов животных с ГА в присутствии МК-801 оставалась двукратно завышенной ( $0,64 \pm 0,04$ , \*\* $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем ( $0,32 \pm 0,02$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Полученные данные указывают на то, что морфологические изменения, а также нарушение регуляции объёма клеток, осмотической резистентности и усиленный вход воды [92], способствующий внутрисосудистому гемолизу эритроцитов и накоплению свободного Hb в плазме крови животных с ГА, являются результатом токсического действия аммиака/аммония (частично сопряжённого с гиперактивными NMDA-R), который усиленно транспортируется *in vivo* в эритроциты крыс с ГА. Не исключено, что в дестабилизирующем действии мембран и последующем лизисе эритро-

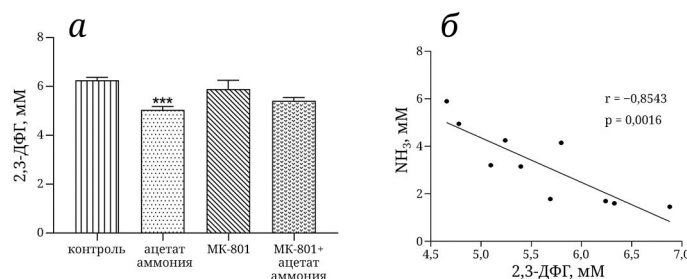
цитов могут участвовать и окисленные формы Hb, образуемые в условиях окислительного стресса [93] в эритроцитах животных с ГА [16]. В совокупности, согласно литературным данным, обнаруженные нарушения могут приводить к увеличению вязкости крови, ухудшению кровотока в микроциркуляторном русле [94], нарушению связывания и освобождения кислорода Hb и, следовательно, к гипоперфузии [95], которая лежит в основе мультиорганных повреждений [89] и в том числе неврологических расстройств и когнитивных нарушений [96, 97], которые к тому же могут прогрессировать под действием токсических эффектов внеклеточного Hb [98].

В целом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что морфофункциональные нарушения эритроцитов и гемоглобинемию, вызванные аммоний-индуцированным нарушением высокоинтегрированной системы метаболических путей, следует рассматривать как дополнительный системный «эритроцитарный» патогенетический фактор, приводящий к прогрессированию мультиорганной гипоксии [99] при ГА.

**Изменение концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах гипераммониемированных крыс. Влияние МК-801.** Другим эритроцитарным маркером нарушенной оксигенации тканей является 2,3-ДФГ, который образуется в шунте Рапопорта–Люберинг, обходной стадии гликолиза. Снижая сродство Hb к кислороду [100], 2,3-ДФГ обеспечивает облегчённое высвобождение кислорода из комплекса с Hb и его переход в ткани. Для дополнительной оценки кислородтранспортной функции эритроцитов далее мы выяснили, как изменяется концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах животных с ГА, для которых характерна сниженная скорость гликолитического потока (рис. 1, 2), и какова роль МК-801 в поддержании нормальной внутриклеточной концентрации этого метаболита.

Полученные данные суммированы на рис. 6. Как можно видеть, концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ГА уменьшалась достоверно (20%, \*\*\* $p < 0,001$ ) при сравнении с контролем. Одиночная инъекция МК-801 не влияла на стационарную концентрацию этого метаболита, а совместное введение МК-801 с ацетатом аммония не восстанавливало концентрацию 2,3-ДФГ до контрольного значения, и она оставалась такой же сниженной, как и в эритроцитах животных с ГА (рис. 6).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что снижение концентрации 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ГА происходит независимо от сигнального каскада, запускаемого гиперактивными NMDA-R, и связано исключительно с действием накопившегося в клетках аммиака/аммония, что дополнительно подтверждалось достоверной от-



**Рис. 6.** Концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс исследуемых групп ( $n = 10$  для каждой группы) (а). Условия введения препаратов, доза, время декапитации указаны в подписи к рис. 1. Методы определения концентрации 2,3-ДФГ указаны в разделе «Материалы и методы». Концентрация метаболита выражена в ммоль/литр клеток (мм). Данные выражены в виде «среднее значение  $\pm$  SEM». \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с животными контрольной группы. Различия между группами анализировали с помощью метода ANOVA с поправкой Бонферрони. Для выявления взаимосвязи между концентрацией аммония в эритроцитах и концентрацией 2,3-ДФГ использовался коэффициент корреляции Пирсона (б). Анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism V8. Достоверная отрицательная корреляция между концентрацией аммония и активностью 2,3-ДФГ в эритроцитах крыс с ГА,  $r = -0,854$ ,  $p = 0,0016$

рицательной корреляционной связью ( $r = -0,854$ ,  $p = 0,0016$ ) между этими показателями (рис. 6, б). Если учесть, что активность фермента дифосфоглицератмутаза (ДФГМ), катализирующей образование 2,3-ДФГ из 1,3-дифосфоглицерата (1,3-ДФГ), резко тормозится при уменьшении внутриклеточного pH [101], то можно предположить, что роль аммиака/аммония в ингибировании ДФГМ, как и других ферментов гликолиза (рис. 1), не прямая, а связана, как уже было сказано выше, с закислением внутриклеточной среды эритроцитов, вызванным транспортом  $\text{NH}_4^+$  в клетки [67]. Повышенная концентрация ADP, обнаруженная в эритроцитах крыс с ГА (рис. 3, б) и перенаправляющая 1,3-ДФГ в реакцию, катализируемую фосфоглицераткиназой, по-видимому, также может быть косвенным скоростью-лимитирующим фактором при синтезе 2,3-ДФГ [102]. NO-Радикал ( $\text{NO}^\bullet$ ), образуемый в избытке при окислительном стрессе [103] в результате каталитического действия эндотелиальной [104] и эритроцитарной NO-синтазы [105], тоже может подавлять синтез 2,3-ДФГ, поскольку ингибирует ГАФДГ, катализирующую реакцию образования 1,3-ДФГ [106].

Следует также отметить, что сходство между обнаруженными нами характеристиками эритроцитов животных с ГА с характеристиками эритроцитов пациентов с энзимопатиями [107], диабетической нейропатией [108], эндотоксиновым шоком [109], синдромом Дауна [110], спорадической формой болезни Альцгеймера [31, 42], а также у пожилых людей [111], связанными [112] или не связанными с ГА [113], позволяет сделать вывод о наличии дополнительных и неизвестных в настоящее время регуляторов синтеза 2,3-ДФГ.

Конечно, помимо 2,3-ДФГ на сродство Hb к кислороду могут влиять и другие факторы, такие как pH,  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$ ,  $\text{Cl}^-$ , АТР,  $\text{Mg}^{2+}$ , Pi [114], конформация и структура Hb, температура [115]. Однако

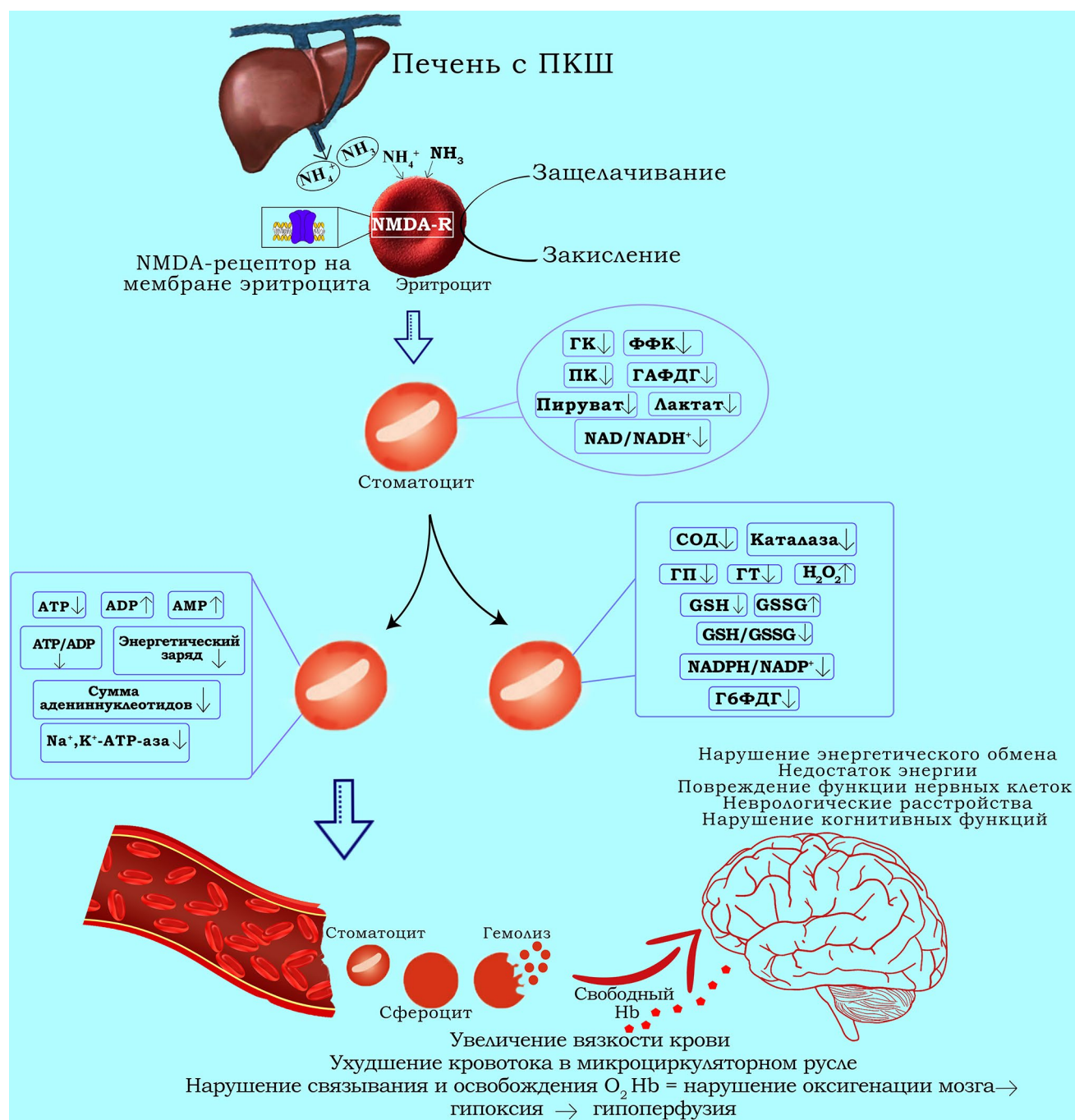
общепризнано, что 2,3-ДФГ является первоочередным биологическим индикатором тканевой гипоксии [116], сопрягающим метаболизм эритроцитов с системным кислородзависимым метаболическим гомеостазом, лежащим в основе жизнедеятельности всех тканей и органов организма.

Выявленная нами высокая восприимчивость эритроцитов крыс к повреждающему действию аммиака/аммония указывает на то, что нарушение морфологических характеристик, показателей энергетического обмена и антиоксидантного статуса [16] эритроцитов является важнейшим недостающим сигнальным звеном, предупреждающим о нарушении оксигенации тканей, которая может привести к возникновению неврологических расстройств при ГЭ [117], сопровождающейся ГА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов мы сделали следующий вывод: при рассмотрении жизнедеятельности клеток центральной нервной системы в изоляции от интегрированной системы транспорта кислорода упускается из виду, что мозг имеет самый высокий уровень окислительного метаболизма [118] и при ограниченных запасах кислорода [39] требует постоянного снабжения насыщенной кислородом кровью [119, 120].

Эритроциты являются единственными клетками в интегрированной системе транспорта кислорода (помимо сердечно-сосудистой и дыхательной систем), способными переносить кислород и поддерживать необходимый уровень окислительного метаболизма в тканях. В настоящем исследовании нам удалось выявить последовательность событий, показывающих, как аммиак-индуцированные нарушения энергетических/метаболических процессов, контролирующих мор-



**Рис. 7.** Предполагаемая последовательность нарушений на метаболическом уровне, приводящая к взаимозависимой дисфункции эритроцитов и клеток мозга при ГЭ, индуцированной гипераммониемией. ПКШ – портокавальный шунт, ГК – гексокиназа, ФФК – фосфофруктокиназа, ПК – пируваткиназа, ГАФДГ – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, СОД – супероксиддисмутаза, ГП – глутатионпероксидаза, ГТ – глутатионтрансфераза, Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

фологические и реологические характеристики эритроцитов [20, 22], могут быть связаны с нарушением их кислородтранспортной функции и энцефалопатией (рис. 7).

Согласно полученным данным, самые первые этапы повреждающего «токсического» действия аммиака/аммония на эритроциты сопряжены с его внутриклеточным транспортом (обеих форм),

приводящим к нарушению ионного гомеостаза ( $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ), торможению гликолиза, снижению концентрации АТФ, что не удовлетворяет повышенной потребности в энергии, необходимой для активности  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФазы, направленной на восстановление ионного градиента, значительно нарушенного усиленным транспортом аммиака/аммония в эритроциты животных с ГА.

Блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы в эритроцитах животных с ГА, как показали наши исследования, не зависит от функциональной активности NMDA-R, тогда как морфологические изменения, переход нормальных эритроцитов в стоматоциты, нарушение регуляции объёма клеток, осмотической резистентности, усиленный лизис эритроцитов, накопление свободного Hb в плазме крови являются результатом токсического действия аммиака/аммония, частично сопряжённого с гиперактивными NMDA-R. Напротив, аммиак-индуцированное уменьшение активности гликолитических ферментов, внутриклеточной концентрации АТР, энергетического заряда и других показателей АН (кроме 2,3-ДФГ), по-видимому, полностью взаимосвязаны с  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{NO}^+$ -зависимым сигнальным каскадом, запускаемым гиперактивными NMDA-R. Блокада  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпы, вызванная недостатком АТР, лежит в основе изменения формы эритроцитов (образование стоматоцитов), ухудшения способности к деформации и увеличения вязкости крови, ухудшения кровотока в микроциркуляторном русле [74]. Уменьшение концентрации АТР и 2,3-ДФГ приводит к нарушению связывания и освобождения кислорода Hb и, следовательно, к гипоперфузии [95], которая лежит в основе мультиорганных повреждений [89], в том числе неврологических расстройств и когнитивных нарушений [23, 96, 97], которые к тому же могут прогрессировать под действием окислительного стресса [16] и токсических эффектов внеклеточного Hb, накопление которого приводит к развитию несовместимых с жизнью осложнений [89, 121].

Учитывая важность причинно-следственной взаимосвязи «ГЭ – ГА – повреждение эритроцитов – дисфункция мозга», мы считаем, что данные о биохимических отклонениях эритроцитов должны быть использованы в качестве дополнительных инструментов для выявления факторов риска развития гипоксии и сопряжённых с ней неврологических расстройств и когнитивных нарушений. Эти дополнительные сведения особенно важны при лечении пациентов, у которых показатели внутриклеточных процессов эритроцитов значительно отклонены от нормы, как, например, у пожилых людей [31], у которых подобные неврологические расстройства могут возникать даже при нормальных значениях  $\text{SaO}_2$  и  $\text{PaO}_2$  [32].

А разработка новых научно обоснованных медицинских технологий восстановления внутриклеточного метаболизма в эритроцитах [122] и снижения концентрации аммиака/аммония в системной циркуляции [123–125] позволит создать инновационные лекарственные препараты индивидуального назначения, имеющие важное значение для использования новых терапевтических стратегий, направленных на улучшение транспорта кислорода в клетки и, следовательно, на снижение органной недостаточности и неврологических расстройств у пациентов с заболеваниями, сопровождающимися ГА.

На основании полученных результатов мы приводим схему последовательности событий, показывающую, как первоначальный каскад аммиак-индуцированных нарушений энергетических/метаболических процессов, контролирующих морфологические и реологические характеристики эритроцитов [20, 22], может приводить к нарушению их кислородтранспортной функции, гипоперфузии, энергетическому кризису мозга и энцефалопатии (рис. 7).

**Вклад авторов.** Е.А. Косенко – концепция и руководство работой, написание текста статьи; Л.А. Тихонова, Г.А. Алилова – проведение экспериментов; Е.А. Косенко, Л.А. Тихонова, 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; № 10/2024 от 18.03.2024).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Решетняк В. И. (2005) Печёночно-клеточная недостаточность, *Общая реаниматология*, **1**, 68-79, <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2005-3-68-79>.
2. Häussinger, D., Dhiman, R. K., Felipo, V., Görg, B., Jalan, R., Kircheis, G., Merli, M., Montagnese, S., et al. (2022) Hepatic encephalopathy, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **8**, 43, <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00366-6>.

3. Merli, M., Lucidi, C., Pentassuglio, I., Giannelli, V., Giusto, M., Di Gregorio, V., Pasquale, C., Nardelli, S., Lattanzi, B., Venditti, M., and Riggio, O. (2013) Increased risk of cognitive impairment in cirrhotic patients with bacterial infections, *J. Hepatol.*, **59**, 243-250, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.012>.
4. Seyan, A. S., Hughes, R. D., and Shawcross, D. L. (2010) Changing face of hepatic encephalopathy: role of inflammation and oxidative stress, *World J. Gastroenterol.*, **16**, 3347-3357, <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i27.3347>.
5. Walker, C. O., and Schenker, S. (1970) Pathogenesis of hepatic encephalopathy with special reference to the role of ammonia, *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 619-632, <https://doi.org/10.1093/ajcn/23.5.619>.
6. Walker, V. (2012) Severe hyperammonaemia in adults not explained by liver disease, *Ann. Clin. Biochem.*, **49**, 214-228, <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011206>.
7. Lockwood, A. H. (1987) Hepatic encephalopathy: experimental approaches to human metabolic encephalopathy, *Crit. Rev. Neurobiol.*, **3**, 105-133.
8. Häussinger, D., and Schliess, F. (2008) Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy, *Gut*, **57**, 1156-1165, <https://doi.org/10.1136/gut.2007.122176>.
9. 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, <https://doi.org/10.1007/BF02833598>.
10. 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, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00339-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00339-6).
11. Kosenko, E., Felipo, V., Montoliu, C., Grisolia, S., and Kaminsky, Y. (1997) Effects of acute hyperammonemia *in vivo* on oxidative metabolism in nonsynaptic rat brain mitochondria, *Metab. Brain Dis.*, **12**, 69-82, <https://doi.org/10.1007/BF02676355>.
12. 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, [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00029-3](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00029-3).
13. 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**, 1315-1325, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00407.2009>.
14. Sherwin, R. S. (1980) Role of the liver in glucose homeostasis, *Diabetes Care*, **3**, 261-265, <https://doi.org/10.2337/diacare.3.2.261>.
15. 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, <https://doi.org/10.3390/jcm9072259>.
16. Kosenko, E. A., Alilova, G. A., and Tikhonova, L. A. (2023) Impaired enzymatic antioxidant defense in erythrocytes of rats with ammonia-induced encephalopathy: role of NMDA receptors, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1404-1415, <https://doi.org/10.1134/S0006297923090195>.
17. Sivilotti, M. L. A. (2004) Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte, *Toxicol. Rev.*, **23**, 169-188, <https://doi.org/10.2165/00139709-200423030-00004>.
18. Gyawali, P., Richards, R. S., Bwititi, P. T., and Nwose, E. U. (2015) Association of abnormal erythrocyte morphology with oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome, *Blood Cells Mol. Dis.*, **54**, 360-363, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.01.005>.
19. Brewer, G. J., Oelshlegel, F. J., Moore, L. G., and Noble, N. A. (1974) *In vivo* red cell glycolytic control and DPG-ATP levels, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **241**, 513-523, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1974.tb21907.x>.
20. Brewer, G. J., and Eaton, J. W. (1971) Erythrocyte metabolism: interaction with oxygen transport, *Science*, **171**, 1205-1211, <https://doi.org/10.1126/science.171.3977.1205>.
21. Mairbäurl, H., Oelz, O., and Bärtsch, P. (1993) Interactions between Hb, Mg, DPG, ATP, and Cl determine the change in Hb-O<sub>2</sub> affinity at high altitude, *J. Appl. Physiol.* (1985), **74**, 40-48, <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.74.1.40>.
22. Walder, J. A., Chatterjee, R., Steck, T. L., Low, P. S., Musso, G. F., Kaiser, E. T., Rogers, P. H., and Arnone, A. (2015) The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10238-10246.
23. 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, <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00198>.
24. Bray, C., Bell, L. N., Liang, H., Haykal, R., Kaiksow, F., Mazza, J. J., and Yale, S. H. (2016) Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements and their relevance in clinical medicine, *WMJ*, **115**, 317-321.
25. Podzolkov, V., Koroleva, T., Bragina, A., Kudryavtseva, M., Druzhinina, N., and Pisarev, M. (2018) Change in the functional state of erythrocytes as a component of microcirculatory disorders in metabolic syndrome, *Rational Pharmacother. Cardiol.*, **14**, 184-189, <https://doi.org/10.20996/1819-6446-2018-14-2-184-189>.
26. Ahmed, M. H., Ghatge, M. S., and Safo, M. K. (2020) Hemoglobin: structure, function and allostery, *Subcell. Biochem.*, **94**, 345-382, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14).

27. Orvain, C., Joly, P., Pissard, S., Badiou, S., Badens, C., Bonello-Palot, N., Couque, N., Gulbis, B., and Aguilar-Martinez, P. (2017) Diagnostic approach to hemoglobins with high oxygen affinity: experience from France and Belgium and review of the literature, *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, **75**, 39-51, <https://doi.org/10.1684/abc.2016.1204>.
28. Юсипович А. И., Браже Н. А., Лунева О. Г., Паршина Е. Ю., Чуринов А. А., Родненков О. В., Максимов Г. В. (2013) Изменения состояния гемоглобина у больных ишемической болезнью сердца и больных с недостаточностью кровообращения, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **155**, 201-203.
29. Blass, J. P., and Gibson, G. E. (1999) Cerebrometabolic aspects of delirium in relationship to dementia, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **10**, 335-338, <https://doi.org/10.1159/000017165>.
30. De la Torre, J. C. (2000) Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's pathogenesis, *Neurobiol. Aging*, **21**, 331-342, [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00111-1](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00111-1).
31. 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, <https://doi.org/10.3390/jcm9010206>.
32. Zur, B., Bagci, S., Ludwig, M., and Stoffel-Wagner, B. (2012) Oxygen saturation in pulse oximetry in hemoglobin anomalies, *Klin. Padiatr.*, **224**, 259-265, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1312612>.
33. Snyder, M. J., Bradford, W. D., Kishnani, P. S., and Hale, L. P. (2003) Idiopathic hyperammonemia following an unrelated cord blood transplant for mucopolysaccharidosis I, *Pediatr. Dev. Pathol.*, **6**, 78-83, <https://doi.org/10.1007/s10024-001-0271-3>.
34. Lichtenstein, G. R., Yang, Y. X., Nunes, F. A., Lewis, J. D., Tuchman, M., Tino, G., Kaiser, L. R., Palevsky, H. I., Kotloff, R. M., Furth, E. E., Bavaria, J. E., Stecker, M. M., Kaplan, P., and Berry, G. T. (2000) Fatal hyperammonemia after orthotopic lung transplantation, *Ann. Intern. Med.*, **132**, 283-287, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-132-4-200002150-00006>.
35. Hoyer, S., Nitsch, R., and Oesterreich, K. (1990) Ammonia is endogenously generated in the brain in the presence of presumed and verified dementia of Alzheimer type, *Neurosci. Lett.*, **117**, 358-362, [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90691-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90691-2).
36. Gupte, P., and Nagral, A. (2009) Hematological problems and liver disease, *Trop. Gastroenterol.*, **30**, 65-70.
37. Fuhrmann, V., Kneidinger, N., Herkner, H., Heinz, G., Nikfardjam, M., Bojic, A., Schellongowski, P., Angermayr, B., Kitzberger, R., Warszawska, J., Holzinger, U., Schenk, P., and Madl, C. (2009) Hypoxic hepatitis: underlying conditions and risk factors for mortality in critically ill patients, *Intensive Care Med.*, **35**, 1397-1405, <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1508-2>.
38. Nakata, H., Miyamoto, T., Ogoh, S., Kakigi, R., and Shibasaki, M. (2017) Effects of acute hypoxia on human cognitive processing: a study using ERPs and SEPs, *J. Appl. Physiol.*, **123**, 1246-1255, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00348.2017>.
39. Bailey, D. M., Willie, C. K., Hoiland, R. L., Bain, A. R., MacLeod, D. B., Santoro, M. A., DeMasi, D. K., Andrijanic, A., Mijacika, 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, <https://doi.org/10.1089/ham.2016.0081>.
40. Kosenko, E., Kaminsky, Y., Grau, E., Miñana, M. D., Grisolia, S., and Felipe, V. (1995) Nitroarginine, an inhibitor of nitric oxide synthetase, attenuates ammonia toxicity and ammonia-induced alterations in brain metabolism, *Neurochem. Res.*, **20**, 451-456, <https://doi.org/10.1007/BF00973101>.
41. 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, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1977.tb00589.x>.
42. Kosenko, E. A., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2016) Relationship between chronic disturbance of 2,3-diphosphoglycerate metabolism in erythrocytes and Alzheimer disease, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **15**, 113-123, <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821103444>.
43. Beutler, E. (1971) *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, Grune & Stratton, ISBN 978-0-8089-0687-2.
44. Atkinson, D. E. (1968) The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers, *Biochemistry*, **7**, 4030-4034, <https://doi.org/10.1021/bi00851a033>.
45. Williamson, D. H., Lund, P., and Krebs, H. A. (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver, *Biochem. J.*, **103**, 514-527, <https://doi.org/10.1042/bj1030514>.
46. Borsakova, D. V., Koleva, L. D., Protasov, E. S., Ataulakhanov, F. I., and Sinauridze, E. I. (2022) Ammonium removal by erythrocyte-bioreactors based on glutamate dehydrogenase from *Proteus* Sp. jointly with Porcine heart alanine aminotransferase, *Sci. Rep.*, **12**, 5437, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09435-y>.
47. Huizenga, J. R., Tangerman, A., and Gips, C. H. (1994) Determination of ammonia in biological fluids, *Ann. Clin. Biochem.*, **31** (Pt 6), 529-543, <https://doi.org/10.1177/000456329403100602>.

48. 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, <https://doi.org/10.3390/jcm11030827>.
49. Edwards, C. J., and Fuller, J. (1996) Oxidative stress in erythrocytes, *Comp. Haematol. Int.*, **6**, 24-31, <https://doi.org/10.1007/BF00368098>.
50. Tilton, W. M., Seaman, C., Carriero, D., and Piomelli, S. (1991) Regulation of glycolysis in the erythrocyte: role of the lactate/pyruvate and NAD/NADH ratios, *J. Lab. Clin. Med.*, **118**, 146-152.
51. Kurganov, B. I., Sugrobova, N. P., and Mil'man, L. S. (1985) Supramolecular organization of glycolytic enzymes, *J. Theor. Biol.*, **116**, 509-526, [https://doi.org/10.1016/s0022-5193\(85\)80086-2](https://doi.org/10.1016/s0022-5193(85)80086-2).
52. Minetti, M., Mallozzi, C., and Di Stasi, A. M. M. (2002) Peroxynitrite activates kinases of the Src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 744-754, [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00891-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00891-2).
53. Chu, H., Breite, A., Ciraolo, P., Franco, R. S., and Low, P. S. (2008) Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties, *Blood*, **111**, 932-938, <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100180>.
54. Chu, H., McKenna, M. M., Krump, N. A., Zheng, S., Mendelsohn, L., Thein, S. L., Garrett, L. J., Bodine, D. M., and Low, P. S. (2016) Reversible binding of hemoglobin to band 3 constitutes the molecular switch that mediates O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties, *Blood*, **128**, 2708-2716, <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-692079>.
55. Nemkov, T., Reisz, J. A., Xia, Y., Zimring, J. C., and D'Alessandro, A. (2018) Red blood cells as an organ? How deep omics characterization of the most abundant cell in the human body highlights other systemic metabolic functions beyond oxygen transport, *Expert Rev. Proteomics*, **15**, 855-864, <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1531710>.
56. Mohorovic, L., Lavezzi, A., Jonjic, N., Stifter, S., Perry, G., Malatestinic, D., Micovic, V., Materljan, E., Haller, H., and Petrovic, O. (2017) Methemoglobinemia as biomarker and precursor of brain capillary oxidative damage link to ferric iron accumulation and originator of neurodegenerative diseases, *J. Syst. Integr. Neurosci.*, **3**, 1-5, <https://doi.org/10.15761/JSIN.1000180>.
57. Harrison, M. L., Rathinavelu, P., Arese, P., Geahlen, R. L., and Low, P. S. (1991) Role of band 3 tyrosine phosphorylation in the regulation of erythrocyte glycolysis, *J. Biol. Chem.*, **266**, 4106-4111.
58. Ansari, F. A., Ali, S. N., and Mahmood, R. (2015) Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes, *Toxicol. In Vitro*, **29**, 1878-1886, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.022>.
59. Chandel, N. S. (2021) Glycolysis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **13**, a040535, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535>.
60. Schmalhausen, E. V., Medvedeva, M. V., Serebryakova, M. V., Chagovets, V. V., and Muronetz, V. I. (2022) Products of S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: relation between s-nitrosylation and oxidation, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1866**, 130032, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130032>.
61. Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., and Yan, N. (2014) Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1, *Nature*, **510**, 121-125, <https://doi.org/10.1038/nature13306>.
62. Zancan, P., and Sola-Penna, M. (2005) Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function, *Mol. Genet. Metab.*, **86**, 401-411, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.06.011>.
63. Clausen, T., Van Hardeveld, C., and Everts, M. E. (1991) Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis, *Physiol. Rev.*, **71**, 733-774, <https://doi.org/10.1152/physrev.1991.71.3.733>.
64. Radosinska, J., and Vrbjar, N. (2016) The role of red blood cell deformability and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia, *Physiol. Res.*, **65**, 43-54, <https://doi.org/10.33549/physiolres.933402>.
65. Cooper, A. J., and Plum, F. (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia, *Physiol. Rev.*, **67**, 440-519, <https://doi.org/10.1152/physrev.1987.67.2.440>.
66. 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**, 686-699, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.3.C686>.
67. Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D.-O.D., and Foskett, J. K. (2002) Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter, *J. Biol. Chem.*, **277**, 12499-12502, <https://doi.org/10.1074/jbc.C200060200>.
68. Martinelle, K., and Häggström, L. (1993) Mechanisms of ammonia and ammonium ion toxicity in animal cells: transport across cell membranes, *J. Biotechnol.*, **30**, 339-350, [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90148-g](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90148-g).

69. Whittam, R., and Ager, M. E. (1965) The connexion between active cation transport and metabolism in erythrocytes, *Biochem. J.*, **97**, 214-227, <https://doi.org/10.1042/bj0970214>.
70. Tozzi-Ciancarelli, M. G., Di Giulio, A., Troiani-Sevi, E., D'Alfonso, A., Amicosante, G., and Oratore, A. (1989) Human erythrocyte damage at the initial stages of oxidative stress, *Cell Biophys.*, **15**, 225-234, <https://doi.org/10.1007/BF02989685>.
71. Liu, J., Nie, Y., Chaudhry, M., Bai, F., Chuang, J., Sodhi, K., and Shapiro, J. I. (2020) The redox-sensitive Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase signaling in uremic cardiomyopathy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1256, <https://doi.org/10.3390/ijms21041256>.
72. Owen, J. S., and McIntyre, N. (1978) Erythrocyte lipid composition and sodium transport in human liver disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 168-176, [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90138-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90138-4).
73. Korff, J. M., Siebens, A. W., and Gill, J. R. (1984) Correction of hypokalemia corrects the abnormalities in erythrocyte sodium transport in Bartter's syndrome, *J. Clin. Invest.*, **74**, 1724-1729, <https://doi.org/10.1172/JCI111590>.
74. Maturu, P., Vaddi, D. R., Pannuru, P., and Nallanchakravarthula, V. (2010) Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in chronic alcoholics, *Mol. Cell Biochem.*, **339**, 35-42, <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0367-z>.
75. Hedin, S. G. (1897) Ueber die Permeabilität der Blutkörperchen [in German], *Pflüger. Arch.*, **68**, 229-338, <https://doi.org/10.1007/BF01661862>.
76. Gonzalez, R., Zamora, J., Gomez-Camarero, J., Molinero, L.-M., Bañares, R., and Albillos, A. (2008) Meta-analysis: combination endoscopic and drug therapy to prevent variceal rebleeding in cirrhosis, *Ann. Intern. Med.*, **149**, 109-122, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-2-200807150-00007>.
77. Лазебник Л. Б., Голованова Е. В., Алексеенко С. А., Буеверов А. О., Плотникова Е. Ю., Долгушина А. И., Ильченко Л. Ю., Ермолова Т. В., Тарасова Л. В., Ли Е. Д., Цыганова Ю. В., Ахмедов В. А., Агеева Е. А., Лосев В. М., Куприянова И. Н., Серикова С. Н., Корочанская Н. В., Вологжанина Л. Г., Циммерман Я. С., Сас Е. И., Журавель С. В., Оковитый С. В., Осипенко М. Ф., Радченко В. Г., Солдатова Г. С., Ситкин С. И., Селиверстов П. В., Шавкута Г. В., Бутова Е. Н., Кожевникова С. А. (2021) Российский консенсус «Гипераммониемии у взрослых» (Версия 2021), *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*, 97-118, <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-187-3-97-118>.
78. Morse, E. E. (1990) Mechanisms of hemolysis in liver disease, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **20**, 169-174.
79. Diez-Silva, M., Dao, M., Han, J., Lim, C.-T., and Suresh, S. (2010) Shape and biomechanical characteristics of human red blood cells in health and disease, *MRS Bull.*, **35**, 382-388, <https://doi.org/10.1557/mrs2010.571>.
80. Lim, H. W. G., Wortis, M., and Mukhopadhyay, R. (2002) Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16766-16769, <https://doi.org/10.1073/pnas.202617299>.
81. Oski, F. A., Naiman, J. L., Blum, S. F., Zarkowsky, H. S., Whaun, J., Shohet, S. B., Green, A., and Nathan, D. G. (1969) Congenital hemolytic anemia with high-sodium, low-potassium red cells. Studies of three generations of a family with a new variant, *N. Engl. J. Med.*, **280**, 909-916, <https://doi.org/10.1056/NEJM196904242801701>.
82. Parker, J. C., and Welt, L. G. (1972) Pathological alterations of cation movements in red blood cells, *Arch. Intern. Med.*, **129**, 320-332.
83. Gedde, M. M., Davis, D. K., and Huestis, W. H. (1997) Cytoplasmic PH and human erythrocyte shape, *Biophys. J.*, **72**, 1234-1246, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78770-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78770-8).
84. Wong, P. (1999) A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte, *J. Theor. Biol.*, **196**, 343-361, <https://doi.org/10.1006/jtbi.1998.0845>.
85. Wolf, P. L., and Koett, J. (1980) Hemolytic anemia in hepatic disease with decreased erythrocyte adenosine triphosphate, *Am. J. Clin. Pathol.*, **73**, 785-788, <https://doi.org/10.1093/ajcp/73.6.785>.
86. Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., Velentzas, A. D., Kokkalis, A. C., Georgakopoulou, S.-C., and Papassideri, I. S. (2011) Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis, *J. Proteomics*, **74**, 2441-2452, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.009>.
87. Wislöff, F., and Boman, D. (1979) Acquired stomatocytosis in alcoholic liver disease, *Scand. J. Haematol.*, **23**, 43-50, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1979.tb02852.x>.
88. Wiley, J. S. (1976) Hereditary stomatocytosis: a disease of cell water regulation, in *Membranes and Disease* (Bolis, L., Hoffman, J. F., and Leaf, A., eds), Raven Press, N.Y., pp. 89-94.
89. Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., and Gladwin, M. T. (2005) The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease, *JAMA*, **293**, 1653-1662, <https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653>.
90. Кумукова И. Б., Трахтман П. Е., Старостин Н. Н., Борсакова Д. В., Игнатова А. А., Федотов А. Ю., Плахотник М. Е., Атауллаханов Ф. И. (2018) Сравнение лабораторных показателей патогенредуцированных и рент-

- геноблученных эритроцитных взвесей, *Вопр. Гематол. Онкол. Иммунопатол. Педиатр.*, **17**, 64-74, <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2018-17-1-64-74>.
91. He, Q., Su, G., Liu, K., Zhang, F., Jiang, Y., Gao, J., Liu, L., Jiang, Z., Jin, M., and Xie, H. (2017) Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method, *PLoS One*, **12**, e0189837, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189837>.
  92. Bruce, L. J. (2009) Hereditary stomatocytosis and cation-leaky red cells – recent developments, *Blood Cells Mol. Dis.*, **42**, 216-222, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.01.014>.
  93. Kosmachevskaya, O. V., and Topunov, A. F. (2018) Alternate and additional functions of erythrocyte hemoglobin, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 1575-1593, <https://doi.org/10.1134/S0006297918120155>.
  94. Helms, C. C., Gladwin, M. T., and Kim-Shapiro, D. B. (2018) Erythrocytes and vascular function: oxygen and nitric oxide, *Front. Physiol.*, **9**, 125, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00125>.
  95. Berisavac, I. I., Jovanović, D. R., Padjen, V. V., Ercegovac, M. D., Stanarčević, P. D. J., Budimkić-Stefanović, M. S., Radović, M. M., and Beslač-Bumbaširević, L. G. (2017) How to recognize and treat metabolic encephalopathy in neurology intensive care unit, *Neurol. India*, **65**, 123-128, <https://doi.org/10.4103/0028-3886.198192>.
  96. Stevenson, A., Lopez, D., Khoo, P., Kalara, R. N., and Mukaetova-Ladinska, E. B. (2017) Exploring erythrocytes as blood biomarkers for Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **60**, 845-857, <https://doi.org/10.3233/JAD-170363>.
  97. 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, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00728>.
  98. Oh, D. J., Kim, J. S., Lee, S., Yang, H. W., Bae, J. B., Han, J. W., and Kim, K. W. (2022) Association between serum free hemoglobin level and cerebral white matter hyperintensity volume in older adults, *Sci. Rep.*, **12**, 3296, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07325-x>.
  99. Moreau, R., Lee, S. S., Soupison, T., Roche-Sicot, J., and Sicot, C. (1988) Abnormal tissue oxygenation in patients with cirrhosis and liver failure, *J. Hepatol.*, **7**, 98-105, [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(88\)80512-9](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(88)80512-9).
  100. Benesch, R., and Benesch, R. E. (1967) The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 162-167, [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90228-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90228-8).
  101. Rapoport, I., Berger, H., Elsner, R., and Rapoport, S. (1977) pH-dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states *in vitro*, *Eur. J. Biochem.*, **73**, 421-427, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11333.x>.
  102. Duhm, J., Deuticke, B., and Gerlach, E. (1968) Metabolism of 2,3-diphosphoglycerate and glycolysis in human red blood cells under the influence of dipyrindamole and inorganic sulfur compounds, *Biochim. Biophys. Acta*, **170**, 452-454, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(68\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(68)90033-0).
  103. Hsu, L. L., Champion, H. C., Campbell-Lee, S. A., Bivalacqua, T. J., Mancini, E. A., Diwan, B. A., Schimel, D. M., Cochard, A. E., Wang, X., Schechter, A. N., Noguchi, C. T., and Gladwin, M. T. (2007) Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability, *Blood*, **109**, 3088-3098, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-039438>.
  104. Tejero, J., Shiva, S., and Gladwin, M. T. (2019) Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation, *Physiol. Rev.*, **99**, 311-379, <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>.
  105. Cortese-Krott, M. M., and Kelm, M. (2014) Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.*, **2**, 251-258, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.027>.
  106. Bertrand, R. (2012) Nitric oxide-mediated suppression of 2,3-bisphosphoglycerate synthesis: therapeutic relevance for environmental hypoxia and sickle cell disease, *Med. Hypotheses*, **79**, 315-318, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.05.020>.
  107. Valentine, W. N., Tanaka, K. R., and Paglia, D. E. (1985) Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies, *Ann. Intern. Med.*, **103**, 245-257, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-2-245>.
  108. Nakamura, J., Koh, N., Sakakibara, F., Hamada, Y., Wakao, T., Hara, T., Mori, K., Nakashima, E., Naruse, K., and Hotta, N. (1995) Polyol pathway, 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes and diabetic neuropathy in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, **294**, 207-214, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00531-5](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00531-5).
  109. Matsumoto, Y. (1995) The function of red blood cells during experimental hemorrhagic and endotoxic shock, *Masui*, **44**, 342-348.
  110. Kedziora, J., Hübner, H., Kański, M., Jeske, J., and Leyko, W. (1972) Efficiency of the glycolytic pathway in erythrocytes of children with Down's syndrome, *Pediatr. Res.*, **6**, 10-17, <https://doi.org/10.1203/00006450-197201000-00002>.
  111. Kaminsky, Y. G., Reddy, V. P., Ashraf, G. M., Ahmad, A., Benberin, V. V., Kosenko, E. A., and Aliev, G. (2013) Age-related defects in erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate metabolism in dementia, *Aging Dis.*, **4**, 244-255, <https://doi.org/10.14336/AD.2013.0400244>.

112. Kosenko, E. A., Solomadin, I. N., Tikhonova, L. A., Reddy, V. P., Aliev, G., and Kaminsky, Y. G. (2014) Pathogenesis of Alzheimer disease: role of oxidative stress, amyloid- $\beta$  peptides, systemic ammonia and erythrocyte energy metabolism, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **13**, 112-119, <https://doi.org/10.2174/18715273113126660130>.
113. MacDonald, R. (1977) Red cell 2,3-diphosphoglycerate and oxygen affinity, *Anaesthesia*, **32**, 544-553, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.1977.tb10002.x>.
114. Larsen, V. H., Waldau, T., Gravesen, H., and Siggaard-Andersen, O. (1996) Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate depletion associated with hypophosphatemia detected by routine arterial blood gas analysis, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **224**, 83-87, <https://doi.org/10.3109/00365519609088626>.
115. Lichtman, M. A., Miller, D. R., Cohen, J., and Waterhouse, C. (1971) Reduced red cell glycolysis, 2, 3-diphosphoglycerate and adenosine triphosphate concentration, and increased hemoglobin-oxygen affinity caused by hypophosphatemia, *Ann. Intern. Med.*, **74**, 562-568, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-74-4-562>.
116. Juel, R. (1979) 2,3-diphosphoglycerate: its role in health and disease, *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **10**, 113-146, <https://doi.org/10.3109/10408367909147131>.
117. Cordoba, J., Ventura-Cots, M., Simón-Talero, M., Amorós, À., Pavesi, M., Vilstrup, H., Angeli, P., Domenicali, M., Ginés, P., Bernardi, M., Arroyo, V., and CANONIC Study Investigators of EASL-CLIF Consortium (2014) Characteristics, risk factors, and mortality of cirrhotic patients hospitalized for hepatic encephalopathy with and without acute-on-chronic liver failure (ACLF), *J. Hepatol.*, **60**, 275-281, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.10.004>.
118. Hall, C. N., Klein-Flügge, M. C., Howarth, C., and Attwell, D. (2012) Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing, *J. Neurosci.*, **32**, 8940-8951, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0026-12.2012>.
119. Leithner, C., and Royle, G. (2014) The oxygen paradox of neurovascular coupling, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 19-29, <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.181>.
120. Peers, C., Dallas, M. L., Boycott, H. E., Scragg, J. L., Pearson, H. A., and Boyle, J. P. (2009) Hypoxia and neurodegeneration, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1177**, 169-177, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05026.x>.
121. Meegan, J. E., Bastarache, J. A., and Ware, L. B. (2021) Toxic effects of cell-free hemoglobin on the microvascular endothelium: implications for pulmonary and nonpulmonary organ dysfunction, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **321**, 429-439, <https://doi.org/10.1152/ajplung.00018.2021>.
122. Papassotiriou, I., Kister, J., Griffon, N., Abraham, D. J., Kanavakis, E., Traeger-Synodinos, J., Stamoulakatou, A., Marden, M. C., and Poyart, C. (1998) Synthesized allosteric effectors of the hemoglobin molecule: a possible mechanism for improved erythrocyte oxygen release capability in hemoglobinopathy H disease, *Exp. Hematol.*, **26**, 922-926.
123. Kosenko, E. A., Venediktova, N. I., Kudryavtsev, A. A., Ataulakhanov, 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, <https://doi.org/10.1139/O08-134>.
124. Godfrin, Y., Horand, F., Franco, R., Dufour, E., Kosenko, E., Bax, B. E., Banz, A., Skorokhod, O. A., Lanao, J. M., Vitvitsky, V., Sinauridze, E., Bourdeaux, V., and Gunter, K. C. (2012) International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **12**, 127-133, <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.631909>.
125. Protasov, E. S., Borsakova, D. V., Alexandrovich, Y. G., Korotkov, A. V., Kosenko, E. A., Butylin, A. A., Ataulakhanov, F. I., and Sinauridze, E. I. (2019) Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood, *Sci. Rep.*, **9**, 1455, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37828-5>.

## NMDA RECEPTORS AND INDICES OF ENERGY EXCHANGE IN ERYTHROCYTES: THE MISSING LINK TO THE ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY OF OXYGEN TRANSPORT IN HEPATIC ENCEPHALOPATHY

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

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

Hepatic encephalopathy (HE) is a prevalent neuropsychiatric syndrome occurring in patients with severe liver dysfunction and/or portocaval shunt. Despite more than a one hundred year history of study on interrelationships between liver failure and brain pathology, pathogenetic mechanisms leading

to development of encephalopathy in liver diseases have not been fully elucidated yet however, it is generally accepted that the main trigger of neurological complications of HE is a neurotoxin – ammonia, the concentration of which in the blood increases to toxic levels (hyperammonemia, HA) when the detoxification function of the liver is impaired. Seamlessly penetrating into brain cells and affecting NMDA receptor-mediated (NMDA-R) signaling, ammonia triggers a pathological cascade leading to dramatic inhibition of aerobic glucose metabolism, oxidative stress, cerebral hypoperfusion, nerve cell damage, and the formation of neurological deficits. Brain hypoperfusion, in turn, may be associated with impaired oxygen transport function of erythrocytes, associated with impaired metabolic/energetic processes occurring in the membranes and inside erythrocytes and controlling the affinity of hemoglobin to oxygen, which determines the degree of oxygenation of blood and tissues. We recently confirmed the above causal relationship and identified a novel NMDA-R hyperactivation-mediated ammonium-induced prooxidant effect on erythrocytes that impairs their oxygen transport function. For a more complete assessment of “erythrocytic” factors that impair brain oxygenation and lead to encephalopathy, in this study we determined enzyme activity and concentration of metabolites of glycolysis, Rapoport-Luebering shunt, and morphological characteristics of erythrocytes from rats with acute HA. To assess the role of NMDA-R in the said processes, the study was conducted using MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist. The results obtained allow us to conclude that morphofunctional disorders of erythrocytes and hemoglobinemia resulting from ammonium-induced disruption of a highly integrated system of metabolic pathways should be considered as an additional systemic “erythrocytic” pathogenetic factor leading to the progression of cerebral hypoperfusion in HE accompanied by HA.

**Keywords:** hyperammonemia, hepatic encephalopathy, NMDA receptors, erythrocytes, glycolysis, Rapoport-Luebering shunt