

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

*На правах рукописи*

Борсакова Дарья Валериевна

**РАЗРАБОТКА БИОРЕАКТОРА НА ОСНОВЕ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА  
ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АММОНИЯ ИЗ КРОВОТОКА**

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Синауридзе Е.И.

Москва, 2019

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b> .....	2
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1. Эритроцит, его метаболизм и регуляция объема.....	12
1.1.1. Физиология эритроцитов человека.....	12
1.1.2. Регуляция объема эритроцита.....	13
1.1.3. Эритроцит в гипотонических условиях.....	15
1.1.4. Размер пор в мембране и выход гемоглобина.....	16
1.1.5. Восстановление целостности мембраны эритроцита после гипоосмотического стресса.....	19
1.1.7. Эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность.....	19
1.2. Методы включения препаратов в эритроциты.....	24
1.2.1. Электропорация.....	24
1.2.2. Эндоцитоз.....	25
1.2.3. Ультразвук.....	26
1.2.4. Использование пептидов, проникающих в клетку.....	26
1.2.5. Пульсовый метод гемолиза с применением диметилсульфоксида.....	27
1.2.6. Осмотические методы.....	27
1.2.6.1. Обратимый гипоосмотический лизис.....	28
1.2.6.2. Метод предварительной сферуляции клеток.....	28
1.2.6.3. Метод гипотонического диализа.....	30
1.2.6.4. Метод проточного диализа.....	31
1.3. Обмен аммиака в организме.....	32
1.4. Транспорт аммиака/аммония через мембрану клетки.....	35
1.5. Гипераммониемия.....	36
1.5.1. Что такое гипераммониемия.....	36
1.5.2. Механизмы токсического действия аммиака и развития гипераммониемии.....	38
1.5.3. Лечение гипераммониемии.....	39
1.5.4. Попытки использования эритроцитов-биореакторов для удаления аммония из крови.....	41
1.6. Сведения о ферментах, использованных в данной работе.....	48
1.6.1. Глутаматдегидрогеназа из печени быка.....	48
1.6.2. Глутаматдегидрогеназа из <i>Proteus species</i> .....	51
1.6.3. Аланинтрансаминаза.....	53
<b>2. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ</b> .....	57
<b>3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	62
3.1. Материалы.....	62

3.2.	Выделение эритроцитов.....	62
3.3.	Включение глутаматдегидрогеназы из печени быка в эритроциты методом обратимого гипоосмотического лизиса.....	63
3.4.	Включение ферментов (ГДГ или ГДГ совместно с АЛТ) в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа.....	64
3.5.	Метод проточного диализа.....	65
3.5.1.	Изготовление диализатора малого объема и проверка его на герметичность.....	66
3.5.2.	Проведение процедуры проточного диализа в диализаторе малого объема.....	68
3.6.	Измерение активности ферментов в эритроцитах.....	69
3.7.	Расчет процента инкапсуляции ферментов и выхода клеток после процедуры включения.....	70
3.8.	Измерение убыли аммония в буферной среде <i>in vitro</i> , содержащей ферменты (ГДГ+АЛТ) в свободном или включенном в ЭБР виде.....	71
3.9.	Модель гипераммониемии на мышах.....	72
3.10.	Хранение эритроцитов–биореакторов.....	73
3.11.	Измерение эритроцитарных индексов.....	73
3.12.	Измерение осмотической резистентности клеток.....	74
3.13.	Измерение гемолиза эритроцитов.....	74
3.14.	Измерение осмоляльности растворов.....	75
3.15.	Микроскопия в дифференциально-интерференционном контрасте (конфокальная микроскопия).....	75
3.16.	Статистический анализ данных.....	75
<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>76</b>
4.1.	Совместное включение ГДГ и АЛТ в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа.....	76
4.1.1.	Эффективность включения.....	76
4.1.2.	Скорость утилизации аммония с помощью ЭБР, содержащих ГДГ+АЛТ, в системе <i>in vitro</i> .....	78
4.1.3.	Скорость убыли аммония <i>in vivo</i> в модели гипераммониемии на мышах.....	80
4.1.4.	Изменение качества ЭБР в процессе хранения.....	81
4.1.4.1.	<i>Изменение активности ферментов внутри ЭБР в ходе хранения.....</i>	<i>82</i>
4.1.4.2.	<i>Стандартные эритроцитарные индексы.....</i>	<i>82</i>
4.1.4.3.	<i>Осмотическая резистентность исходных эритроцитов и ЭБР в ходе хранения.....</i>	<i>85</i>
4.1.4.4.	<i>Гемолиз исходных эритроцитов и ЭБР в ходе хранения.....</i>	<i>86</i>

4.2. Сравнение эффективности включения ГДГ в эритроциты различными гипоосмотическими методами.....	89
4.3. Характеристики ЭБР, полученных разными методами.....	91
4.3.1. Стандартные эритроцитарные индексы.....	91
4.3.2. Осмотическая резистентность различных аммоцитов.....	93
4.3.3. Форма контрольных эритроцитов, прошедших разные гипоосмотические процедуры обработки.....	95
4.4. Сравнение ГДГ из печени быка и <i>Proteus sp.</i> .....	97
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>102</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>105</b>
<b>СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>107</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>130</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>131</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы**

Одной из важнейших задач фармакологии всегда был и остается поиск новых лекарственных форм препаратов, которые обеспечивали бы лучшую эффективность, пролонгированность действия и снижение отрицательных побочных эффектов лекарств, улучшали бы их безопасность. Одной из таких лекарственных форм являются эритроциты. Использование эритроцитов в качестве носителей лекарственных препаратов остается актуальной задачей в научном сообществе на протяжении вот уже более 40 лет. Об этом свидетельствуют многочисленные обзоры, посвященные данной теме, которые периодически собирают все новые и новые знания об этой лекарственной форме [1–5].

Об актуальности, перспективах и практической значимости создания эритроцитов-носителей говорит также наличие клинических исследований по этой теме. Так, включение препаратов внутрь эритроцитов и введение этой лекарственной формы в организм позволяет снизить кардиотоксичность антрациклиновых антибиотиков [6–8], иммунный ответ на L-аспарагиназу [9–11], увеличить время циркуляции и обеспечить биотрансформацию пролекарств для дальнейшего получения в клетке и постепенного освобождения в кровоток дексаметазона [12] и азидотимидина [13].

Преимущества включения лекарств в эритроциты во многом связаны с физиологическими особенностями этих клеток [1,4]:

- эритроциты живут в русле крови долго (до 120 дней), что позволяет надеяться на то, что эритроциты-носители, полученные щадящими клетку методами, также смогут циркулировать в кровотоке достаточно долго;
- эритроциты являются относительно крупными и самыми многочисленными клетками крови, с которыми просто работать, и которые доступны для манипуляций в больших количествах;

- эритроцит может защитить «включенное» вещество от преждевременной инактивации и разрушения эндогенными факторами в плазме и предотвратить возникновение острых реакций иммунной системы организма, а также защитить

пациента от токсических эффектов, так как концентрация свободного препарата в крови может быть сильно снижена;

- использование эритроцитов, особенно аутологичных, обеспечивает идеальную биосовместимость и полную биodeградацию этих клеток без образования токсичных продуктов.

Эритроцит-носитель может работать как контейнер, постепенно высвобождающий препарат в кровь, или как биореактор, который содержит в себе ферменты, катализирующие реакции по удалению нежелательных веществ из кровотока. Использование эритроцитов в качестве биореакторов открывает возможности для терапии различных ферментопатий: болезни Гоше [14], тяжелого комбинированного иммунодефицита [15], наследственной гипераргининемии [16] и других болезней накопления, а также для удаления из кровотока таких токсичных веществ, как аммоний [17], этанол [18], метанол [19] и др.

Одним из перспективных применений эритроцитов-биореакторов (ЭБР) может быть удаление аммония из крови больных в состоянии гипераммониемии. Это состояние возникает при острых и хронических заболеваниях печени, а также при болезнях, связанных с нарушением цикла выведения мочевины, которые сопровождаются повышенным содержанием аммония в крови. В силу токсичности аммония для центральной нервной системы, у пациентов при высоких концентрациях аммония развивается печеночная энцефалопатия, наблюдаются тремор, судороги, возникает угроза комы и летального исхода [20,21]. Такое состояние требует обязательной и быстрой коррекции, однако, к сожалению, существующие лекарства снижают уровень аммония в крови достаточно медленно. Использование эритроцитов, перерабатывающих аммоний, может быть перспективным для быстрого снижения концентрации аммония в крови у пациентов, для которых существующие методы лечения гипераммониемии недостаточно эффективны [22–28].

### **Цель работы**

Цель данной работы – поиск и разработка новых подходов для создания эффективных ЭБР для удаления аммония из крови.

### **Задачи исследования**

1. Создание методом обратимого гипоосмотического диализа биореактора для удаления из крови аммония на основе совместного включения в эритроциты двух ферментов: глутаматдегидрогеназы (ГДГ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ).
2. Проверка эффективности работы такого биореактора в системах *in vitro* и *in vivo*.
3. Исследование хранения ЭБР, полученных методом обратимого гипоосмотического диализа, содержащих ГДГ и АЛТ.
4. Сравнение эффективности включения в эритроциты крупной молекулы ГДГ с помощью различных гипоосмотических методов. Выбор оптимального метода для создания ЭБР, содержащих этот фермент.
5. Исследование ГДГ из *Proteus sp.* в качестве кандидата для увеличения активности ГДГ в эритроцитах.

### **Научная новизна**

1. Впервые был создан биореактор для удаления аммония из кровотока на основе совместного включения в эритроцит двух ферментов (ГДГ+АЛТ). Показана эффективность таких биореакторов *in vitro* и *in vivo*.
2. Проведено систематическое сравнение различных гипоосмотических методов включения ГДГ из печени быка в эритроциты и показано, что наиболее оптимальным (по эффективности включения фермента и качеству полученных ЭБР) является метод проточного диализа.
3. Для повышения активности ГДГ внутри эритроцитов, в клетки впервые вместо ГДГ из печени быка была включена бактериальная ГДГ из *Proteus sp.*, которая обладает большей удельной активностью. Впервые показано, что она не агрегирует при повышении концентрации ферментного белка в растворе, что является важным преимуществом данного препарата ГДГ, позволяя получать большую активность фермента внутри эритроцита.

## **Научно-практическое значение**

Разработанный на основе включения в эритроциты двух ферментов (ГДГ и АЛТ) новый вид ЭБР для удаления аммония из кровотока (аммоцитов) способен работать в организме более длительное время, чем любые ранее известные варианты аммоцитов. Это обеспечивается независимостью его работы от скорости транспорта через мембрану эритроцита таких плохо проникающих метаболитов как  $\alpha$ -кетоглутарат и глутаминовая кислота. Правильный выбор оптимального метода включения ГДГ (метода проточного диализа) и использование для включения бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* позволяют сильно повысить активность ГДГ в эритроците. Все это открывает возможности для получения эффективных ЭБР, включающих достаточные дозы ферментов, убирающих аммоний, для применения данных ЭБР в клинике.

## **Методология и методы исследования**

Методология работы была подчинена основной цели исследования и решению всех поставленных задач. Сначала принципиально новые ЭБР, содержащие два фермента (ГДГ и АЛТ), были получены с помощью традиционного метода гипоосмотического диализа в мешках. Было показано, что такие ЭБР способны убирать аммоний как из среды *in vitro*, так и из крови мышей *in vivo*. Следующей задачей было повысить активность ГДГ, включенной в эритроциты, т.к. именно этот фермент является в выбранном тандеме ферментов основным аммоний-утилизирующим, однако эффективность его включения очень низка. Решение этой задачи шло по двум направлениям: 1) выбор наиболее оптимального метода включения препарата в эритроциты (путем систематического сравнения трех различных гипоосмотических методов) и 2) использование для включения в эритроциты ГДГ из другого источника (бактериальной ГДГ из *Proteus sp.*), обладающей более высокой удельной активностью.

Получение ЭБР в работе проводили различными гипоосмотическими методами, основанными на обратимом образовании пор в мембране эритроцита при нахождении клеток в гипоосмотической среде. Активности ферментов измеряли биохимическими методами (спектрофотометрически, при  $\lambda=340$  нм).

Качество получаемых ЭБР (как свежеприготовленных, так и в ходе недельного хранения при +4°C) было оценено по уровню гемолиза в суспензии ЭБР, кривой их осмотической резистентности и стандартным эритроцитарным индексам. Уровни свободного гемоглобина и процент нелизированных эритроцитов при измерении кривой осмотической резистентности, также измеряли спектрофотометрически (при  $\lambda=540$  нм и 620 нм, соответственно). Стандартные эритроцитарные индексы были измерены на клиническом гематологическом анализаторе. Форму эритроцитов оценивали методом конфокальной микроскопии. Кинетику убыли аммония в среде *in vitro* измеряли с помощью ион-селективного аммониевого электрода, а при работе с малыми образцами крови мышей (*in vivo*) – микрофлуориметрическим методом. Все полученные результаты были статистически обработаны.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. ГДГ и АЛТ могут быть включены в эритроциты совместно с помощью метода гипоосмотического диализа. Полученные ЭБР удаляют аммоний как из среды *in vitro*, так и *in vivo* в модели индуцированной гипераммониемии на мышах. Низкая эффективность включения ГДГ может ограничивать эффективность биореактора.
2. ЭБР с ГДГ и АЛТ, полученные методом гипоосмотического диализа, сохраняют хорошее функциональное состояние при хранении в течение, по крайней мере, 1 недели при +4°C.
3. Систематическое сравнение различных гипоосмотических методов включения больших по размеру молекул ГДГ из печени быка в эритроциты показывает, что оптимальным методом их включения является метод проточного диализа.
4. Использование для включения в эритроциты вместо ГДГ из печени быка фермента из *Proteus sp.* позволяет увеличить эффективность инкапсуляции ГДГ и ее удельную активность в клетках за счет более высокой удельной активности исходного фермента и отсутствия его агрегации при повышении концентрации белка в растворе.

### **Личный вклад автора**

Все работы по получению эритроцитов-биореакторов, измерению активности ферментов, исследованию функциональной активности ЭБР *in vitro*, исследованию характеристик полученных эритроцитов, систематическое сравнение методов получения эритроцитов-биореакторов, а также написание статей и тезисов конференций по материалам диссертации проводились либо лично автором, либо при его непосредственном участии. Опыты *in vivo* по исследованию эффективности разработанных ЭБР в модели индуцированной гипераммониемии на мышах были проведены в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино д.б.н. Еленой Александровной Косенко и статистически обработаны автором.

### **Достоверность и обоснованность результатов**

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов обеспечивались использованием общепринятых современных методов, таких как спектрофотометрия в УФ и видимой области, ионометрия, статистическая обработка результатов с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Использование аттестованных средств измерения позволяло получать результаты с удовлетворительным уровнем точности. Достоверность полученных результатов подтверждалась также их согласованностью с литературными данными и внутренней согласованностью данных, полученных разными методами.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы были представлены на IX Симпозиуме «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний» в рамках II Международного симпозиума «Трансляционная и регенеративная медицина» (Москва, Россия, 6-8 февраля, 2015 г.); II Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 3-5 декабря, 2015 г.); 10-ом Конгрессе азиатского подразделения международного общества детской онкологии (10<sup>th</sup> SIOP Asia Congress) (Москва, Россия 25-28 мая, 2016); International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Science and Pharmacognosy (November 16-18, 2017,

Barcelona, Spain); Международной научно-практической конференции «Трансляционная медицина» (15-17 декабря, 2017, Орёл, Россия); 35<sup>th</sup> International Congress of the ISBT (Toronto, Canada 2-6 June 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, в том числе, 7 статей в рецензируемых журналах и 6 публикаций в трудах конференций и съездов.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста и включает введение, литературный обзор (глава 1), постановку задачи (глава 2), описание материалов и методов (глава 3), результаты и обсуждение (глава 4), заключение, выводы, список цитированной литературы (207 библиографических ссылок), список сокращений и обозначений и благодарности. Работа содержит 27 рисунков и 7 таблиц.

## **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Эритроцит, его метаболизм и регуляция объема**

#### **1.1.1. Физиология эритроцитов человека**

Эритроциты – красные клетки крови, основной функцией которых является транспорт кислорода и углекислого газа. Скорость образования эритроцитов в костном мозге здорового взрослого человека составляет порядка  $160 \times 10^6$  кл./мин [29]. В норме в 1 микролитре крови содержится  $4-5 \times 10^6$  эритроцитов [4]. Объемная доля эритроцитов (гематокрит) в человеческой крови составляет 40-45%. В кровотоке при физиологических условиях эритроцит имеет форму двояковогнутого диска, его диаметр составляет 7,5-8,7 мкм, а толщина - 1 мкм в центре и 2 мкм по ободу диска [30,31]. Эритроцит не содержит ядра и других клеточных органелл. Его мембрана представляет собой липидный бислой, в который вкраплены разнообразные белки-гликопротеины, называемые интегральными. Липидный бислой состоит, в основном, из холестерина и фосфолипидов [32]. Внутренний слой мембраны содержит сеть периферических белков – цитоскелет. Мембрана эритроцита имеет большой отрицательный заряд на поверхности, что обеспечивает стабильность взвеси эритроцитов в суспензии. Из всех белков эритроцита 95% составляет гемоглобин, его концентрация равна примерно 5 ммоль/л эритроцитов (или 320-360 г/л эритроцитов) [33]. Учитывая, что 1 г гемоглобина может связать примерно 1,34 мл кислорода можно посчитать, что такое содержание гемоглобина позволяет связывать около 450-500 мл кислорода на 1 л эритроцитов. Зрелый эритроцит живет в русле крови 90-120 дней [34]. При старении механические свойства эритроцитов ухудшаются. Клетки теряют возможность легко деформироваться. Такие эритроциты застревают в узких капиллярах селезенки толщиной 0,2-0,5 мкм [35] и уничтожаются макрофагами. Макрофаги уничтожают старые и потерявшие нормальные механические свойства эритроциты также в печени и красном костном мозге. Небольшая доля эритроцитов может лизировать прямо в кровотоке, высвобождая гемоглобин (внутрисосудистый гемолиз) [36]. Свободный гемоглобин быстро связывается находящимся в плазме гаптоглобином, и образовавшийся комплекс удаляется клетками ретикулоэндотелиальной системы,

а также поглощается печенью. Содержание свободного гемоглобина в плазме здорового человека может достигать 0,33 г/л и зависит от генотипа гаптоглобина [37]. Таким образом, уровень гемолиза эритроцитов в кровотоке может достигать 0,3-0,5%. Основные метаболические системы в эритроците представлены гликолизом (главным источником АТФ), пентозофосфатным путем, системой реакций для защиты от окисления (с участием супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы), и системой синтеза глутатиона [38].

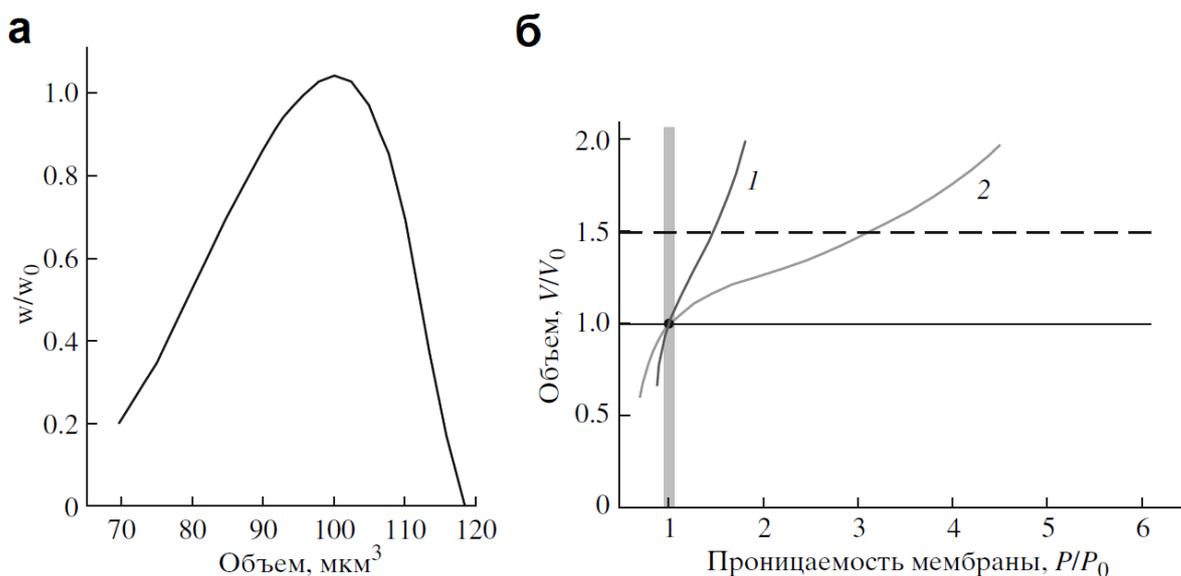
Площадь поверхности эритроцита составляет в среднем 120-155 мкм<sup>2</sup>, а его объем – 84-107 мкм<sup>3</sup> [39]. Таким образом, объем эритроцита составляет примерно 60% от того объема, который могла бы вмещать данная площадь поверхности. Мембрана эритроцита нерастяжима [30,40,41], однако легко изгибается [42,43]. Это, а также наличие избытка площади поверхности позволяет эритроциту обратимо деформироваться в течение всего времени циркуляции в кровотоке, благодаря чему он может проходить через капилляры диаметром 2-3 мкм [34]. Протискиваясь через узкие капилляры, клетка может сворачиваться и принимать различную форму (рогалика (круассана), гантели, парашюта или тапочки) [44].

Когда объем клетки по каким-либо причинам увеличен, эритроциту недостаточно поверхности, чтобы легко деформироваться и втянуться в узкий капилляр. Если объем, наоборот, уменьшен (при том же нормальном количестве гемоглобина), клетке тоже потребуется больше времени чтобы пройти узкий капилляр, так как внутриклеточная вязкость будет выше, что замедлит деформацию. Таким образом, зависимость относительной скорости прохождения эритроцита через узкий капилляр от объема эритроцита имеет максимум (рисунок 1а) [45].

### **1.1.2. Регуляция объема эритроцита**

Для выполнения своей основной функции эритроциту важно поддерживать постоянный объем. Основные проблемы, с которыми для этого должен справляться эритроцит – это: 1) противостоять внутреннему осмотическому давлению, которое создается за счёт непроникающих через мембрану внутренних компонентов (гемоглобин и другие белки, низкомолекулярные метаболиты) и 2) быть

способным моментально реагировать на изменение проницаемости мембраны, которое вызывается, в основном, окислением липидов мембраны и может возникнуть под воздействием различных факторов (питание, стрессы, воспаления) [45].



**Рисунок 1.** Зависимость относительной скорости прохождения эритроцитов ( $w/w_0$ ) через капилляр диаметром 3 мкм от объема эритроцитов (а), а также теоретически рассчитанная зависимость относительного изменения объема эритроцита ( $V/V_0$ ) от относительного изменения пассивной проницаемости мембраны для катионов ( $P/P_0$ ) (б). Здесь  $w$  и  $w_0$  – скорости прохождения через поры диаметром 3 мкм эритроцитов определенного среднего объема и эритроцитов нормального объема (100  $\mu\text{m}^3$ ), соответственно. На панели (б) кривая 1 получена в предположении, что для стабилизации объема используется только  $\text{Na}^+$ -насос, кривая 2 – для стабилизации объема используется  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насос, кривая 3 – для стабилизации объема эритроцита используются градиенты  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , создаваемые  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азой и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми  $\text{K}^+$ -каналами.  $V_0$  и  $P_0$  – объем и пассивная проницаемость (для катионов) мембраны исходного эритроцита, а  $V$  и  $P$  – соответствующие параметры эритроцита после изменения проницаемости его мембраны [45].

Первая проблема решается в эритроците с помощью осморегуляции. Клетка для противостояния внутриклеточному давлению выкачивает изнутри ионы натрия против градиента концентрации. Для того чтобы скомпенсировать внутриклеточное давление, достаточно было бы снизить концентрацию ионов

натрия внутри на 30-40 мМ. Однако эритроциты выкачивают натрия намного больше, но при этом закачивают внутрь почти столько же калия. Главный насос, который выполняет эту перекачку -  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза. Она обменивает 3 иона  $\text{Na}^+$  на 2 иона  $\text{K}^+$ , расходуя при этом молекулу АТФ. Так как этот процесс требует затраты энергии, нарушения в энергетическом метаболизме эритроцита могут приводить к нарушению регуляции объема и изменению формы эритроцитов. Процесс встречной перекачки катионов против их градиентов необходим как раз для регуляции объема в условиях изменения проницаемости мембраны. Выкачивания одного только натрия недостаточно, так как при нарушении проницаемости мембраны пассивный поток натрия внутрь клетки может перегнать активный транспорт натрия из клетки и привести к увеличению объема эритроцита. Встречный транспорт натрия и калия выгоднее, так как при нарушении проницаемости мембраны для этих ионов, встречные пассивные потоки натрия и калия приводили бы не к таким драматическим изменениям объема, т.к. один из них (вток натрия в клетку) приводил бы к увеличению объема, а второй (выток калия из клетки) наоборот, к уменьшению. Дополнительно в клетке существует система калиевых каналов, которые регулируются концентрацией кальция. Это помогает еще точнее регулировать объем и стабилизировать его в широком диапазоне возмущающих воздействий (рисунок 1б) [45].

### **1.1.3. Эритроцит в гипотонических условиях**

В гипотонической среде эритроцит может увеличиваться в объеме и принимать форму сфероцита. Площадь поверхности эритроцита позволяет без растяжения заключить в него объем (в виде сферы) в 1,8 раза превышающий его нормальный объем [46].

В физиологических условиях эритроцит сохраняет форму дискоцита. При помещении в гипоосмотическую среду происходит постепенное увеличение объема клетки, так как вода из внешней среды начинает поступать внутрь, чтобы скомпенсировать разность осмотического давления внутри и снаружи мембраны, возникающую из-за того, что внутри клетки присутствует в высокой концентрации ( $\sim 5$  мМ) белок гемоглобин. Вода будет «разбавлять» содержимое клетки до

выравнивания концентраций осмотических частиц внутри и вне клетки [47]. Начинается осмотическое набухание эритроцита, в ходе которого он превращается в сферу. Площадь поверхности эритроцита на 30–40 % превышает площадь поверхности сферы такого же объема [48], поэтому сначала, вследствие притока воды, происходит увеличение объема клетки при постоянной площади ее поверхности. Мембрана эритроцита легко изгибается, поэтому такое деформирование практически не влияет на обменные процессы – пассивный транспорт ионов и воды. Механические свойства мембраны не влияют на процессы, происходящие в эритроците, при относительном увеличении объема клетки менее чем в 1,8 раза (т.е. при внешней осмоляльности  $> 150$  мОсм/кг) [49]. Диаметр нормального эритроцита составляет 7,5 – 8 мкм, а диаметр сферического эритроцита составляет около 6,5 – 7,0 мкм [31].

При дальнейшем снижении осмоляльности внешней среды происходит натяжение сферической поверхности, по мере увеличения которого нарушается целостность липидной мембраны - более тонкие ее участки еще более утончаются и образуют обратимые расширяющиеся дефекты (поры), которые способствуют увеличению проницаемости мембраны для ионов и компонентов внутриклеточного содержимого эритроцита, не проникающих через мембрану в норме [41,48-51]. Этот процесс лежит в основе гипоосмотических методов включения различных соединений, в том числе и высокомолекулярных, в эритроцит. Необходимым условием успешного включения какого-либо вещества в эритроцит с помощью этого метода является достаточный размер поры, через которую это вещество сможет пройти в клетку по градиенту концентрации.

#### **1.1.4. Размер пор в мембране и выход гемоглобина**

В работе Калягиной [41] показано, что диаметр пор теоретически может достигать размеров ячеек спектриновой сети, которые в гипотонической среде в расширенном состоянии составляют 115–200 нм [52]. При увеличении объема эритроцита до 2,4 раза спектриновая сеть сохраняет целостность, так как относительное удлинение её тетрамеров не превышает 15% [41].

Размер пор, способных образоваться в мембране эритроцита, был исследован экспериментально, но сильно различался в разных работах. Так по данным работ [53–56] диаметры пор достигают 8-10 нм при отношении объема сферических эритроцитов к исходным 1,73-1,84. При отношении этих объемов равном 2,02, диаметр пор, который был измерен экспериментально после помещения эритроцитов в гипотонический раствор и последующей обработки клеток глутаровым альдегидом, составлял 20-50 нм [56]. В статье [52] авторы получили размер пор 35 нм после обработки поверхности эритроцитов антибиотиком амфотерицином В, в несколько раз увеличивающим проницаемость мембраны клетки для ионов и воды.

При отношении объемов сферических эритроцитов к исходным равном 1,95, диаметр пор, рассчитанный в результате математического моделирования [41], составил 20-40 нм, что было близко к результатам работы [56]. Однако автор отметил, что уже при увеличении диаметра пор до 8-10 нм (это наблюдается при осмоляльности среды ниже 130 мОсм/кг) создается возможность выхода гемоглобина, что, в свою очередь, сопровождается падением давления в эритроците и закрыванием пор. Из всех белков внутри эритроцита 99% составляет гемоглобин [57]. Его тетрамер имеет сфероидную форму, размером 65×55×50 ангстрем, и радиус вращения приблизительно 30 ангстрем [58]. Таким образом, для того, чтобы он мог свободно выходить из эритроцита, вполне достаточно пор размером 8-10 нм [56].

Время выхода гемоглобина из эритроцита варьирует в разных работах от долей секунд [59] и секунд [59–63] до минут [62,64]. Гемоглобин выходит из клеток до тех пор, пока не наступит равновесие в его концентрациях внутри и снаружи клетки. Когда это равновесие достигнуто, поры закрываются и клетка, даже находясь в раздутом состоянии (т.е. имея объем, при котором возможен гемолиз), не пропускает гемоглобин ни внутрь, ни наружу, тогда как проницаемость для ионов натрия, калия и хлора сохраняется [65]. В литературе существуют данные о том, что разрывные дефекты мембраны могут существовать в течение 3-5 минут после возникновения осмотического стресса, не приводя к гибели клетки [66].

Для переноса лекарственных молекул извне в эритроциты, необходимо, чтобы размер пор в мембране соответствовал эффективному диаметру включаемых веществ. Для этого необходимо подвергать клетку существенному осмотическому шоку в гипотоническом растворе [67]. В то же время, при включении вещества, воздействие процедуры на клетки-носители желательно делать минимальным, сохраняя их количество и жизнеспособность.

Теоретически можно рассчитать размер молекул фермента (считая его сферой), исходя из предположения, что молекулярная масса молекулы связана с ее размером соотношением:  $R=0,066 \times M^{1/3}$ , где  $M$  – молекулярная масса молекулы, а  $R$  – ее радиус [68]. Для молекул ГДГ из печени быка и АЛТ, которые использованы в данной работе, приблизительный диаметр сферической молекулы составит около 50 и 35 ангстрем, учитывая, что их молекулярные массы равны 332 [69] и 115 кДа [70], соответственно. Это соизмеримо с размерами тетрамера гемоглобина, значит теоретически, эти ферменты могут проходить через поры эритроцита всё время, пока из него выходит гемоглобин. Однако реальная молекула бычьей ГДГ не имеет сферической формы. Есть литературные данные о том, что ее диаметр составляет 43 Å, а длина 133 Å [71], что чуть более чем в 2 раза превышает длину тетрамера гемоглобина. Очевидно, что такая молекула хотя и будет способна проходить через поры диаметром до 10 нм, но не при всяком положении молекулы относительно мембраны. Это ограничивает эффективность инкапсуляции данного фермента.

В норме, как было обсуждено выше, внутренний и внешний гемоглобин достигают равновесия во время гемолиза, однако можно создать такие условия, при которых такого равновесия не наблюдается. В работах [72–75] было показано, что во время гемолиза эритроцитов в присутствии макромолекул разного размера (декстранов или альбумина) потеря клетками гемоглобина была уменьшена. Симэн [76] предположил, что ингибирование выхода гемоглобина другими макромолекулами может возникать из-за конкуренции этих молекул с гемоглобином за поры в мембранах.

Математическое моделирование [41] и некоторые экспериментальные работы [56,77] показывают, что поры распределены равномерно по всей поверхности эритроцита. Известно, что липидный состав мембран под действием осмотического

гемолиза не изменяется [78], однако есть доказательства того, что нормальная асимметрия в распределении фосфолипидов мембраны (бислоя) в результате гемолиза теряется, но вновь восстанавливается после запечатывания пор в мембране [79].

#### **1.1.5. Восстановление целостности мембраны эритроцита после гипоосмотического стресса**

Т. Теорелл первый увидел, что воздействие осмотического стресса на эритроцит может быть обратимым. При возвращении нормальной осмотичности среды клетки могут восстанавливать проницаемость своей мембраны для ионов натрия и калия. Таким образом, эритроциты могут вести себя как осмометры [80]. Более поздние исследования показали, что в отношении проницаемости мембраны клетки для натрия и калия, эритроциты в суспензии после гипоосмотического воздействия делятся на три популяции, те, которые спонтанно резко закрыли поры («запечатались»), те, которые закрывают поры медленно и те, у которых целостность мембраны не восстанавливается. Относительное содержание трех типов эритроцитов зависит от условий, существующих в суспензии клеток, до и после гемолиза. Так в работах [76,81] гемолиз был проведен при 0°C, а последующая инкубация эритроцитов в изотонической среде – при 37°C. В результате авторам удалось получить эритроциты с минимальной гетерогенностью в отношении проницаемости мембран для ионов натрия и калия.

#### **1.1.6. Эритроцитарные индексы и осмотическая резистентность**

Оценить размер клеток и содержание гемоглобина в эритроцитах после обратимого гипоосмотического воздействия можно с помощью эритроцитарных индексов, которые определяют с помощью гематологического анализатора. Эти индексы являются относительно стабильными параметрами, так как характеризуют сами клетки, а не их количество. Основными эритроцитарными индексами являются:

MCV (mean cell volume) – средний объем одного эритроцита в фемтолитрах (1 фл= $10^{-15}$  л= $1$  мкм<sup>3</sup>). Данный параметр анализатор измеряет как усредненный путем оценки многих тысяч эритроцитов. Нормальная величина MCV для взрослого пациента составляет  $92 \pm 9$  фл (среднее  $\pm 2$  SD) [82].

MCH (mean cell hemoglobin) – показатель, который отражает, какое количество гемоглобина в среднем содержится в одном эритроците. Рассчитывается как отношение количества гемоглобина к количеству эритроцитов. Измеряется в пикограммах (1 пг= $10^{-12}$  г) на эритроцит. Норма данного параметра для взрослого пациента равна  $29 \pm 2,5$  пг (среднее  $\pm 2$  SD) [82]. Обычно величина MCH в эритроците является основой для дифференциальной диагностики анемий.

MCHC (mean cell hemoglobin concentration) – средняя концентрация гемоглобина в клетке. Рассчитывается этот показатель как отношение общего количества гемоглобина в суспензии к ее гематокриту (т.е. объему клеток в суспензии). Характеризует концентрацию гемоглобина в клетке, т.е. его содержание в единице объема клеток ("плотность" заполнения клетки гемоглобином), а не общее количество гемоглобина в клетке как в случае MCH. Измеряется в г/л или г/дл. Нормальная величина данного параметра для взрослого пациента обычно равна  $330 \pm 15$  г/л (среднее  $\pm 2$  SD) [82].

Патологией принято считать все значения параметров, которые ниже или выше нормы. Так, например, микроцитоз – это  $MCV < 80$  мкм<sup>3</sup>, а макроцитоз –  $MCV \geq 100$  мкм<sup>3</sup> [34].

Как и ряд других параметров, эритроцитарные индексы имеют некоторый диапазон физиологических вариаций. При рождении некоторые из них несколько увеличены ( $MCV = 110 \pm 10$  фл,  $MCH = 34 \pm 3$  пг,  $MCHC = 330 \pm 30$  г/л. Гематокрит -  $0,6 \pm 0,15$ ) [82]. Эти значения сохраняются примерно до двух месяцев жизни. Затем они постепенно снижаются, для MCH и MCV даже ниже нормальных уровней взрослой популяции. Эритроцитарные показатели, характерные для взрослых пациентов, возвращаются примерно к 2-6 годам (таблица 1).

Снижение эритроцитарных индексов более чем на 3 SD от нормы наблюдается примерно у 1% взрослой популяции [82].

**Таблица 1.** Значения эритроцитарных индексов у здоровых детей в различные периоды времени после рождения [82].

Параметр	Возраст				
	Рождение	3-6 мес	1 год	2 года-6 лет	6-12 лет
MCV, фл	110±10	76±8	78±6	81±6	86±9
MCH, пг	34±3	27±3	27±2	27±3	29±4
MCHC, г/л	330±30	330±30	340±20	340±30	340±30

Еще одним важным параметром при исследовании качества эритроцитов, особенно после гипоосмотического воздействия, является их осмотическая резистентность, которая характеризует, в первую очередь, состояние эритроцитарной мембраны. Осмотическая резистентность показывает, какое количество воды может дополнительно войти в клетку до наступления лизиса. Это количество прямо определяется отношением в клетке площади поверхности к объему. Эритроциты, которые уже имеют сферическую форму, т.е. являются сфероцитами (не важно, по какой причине), практически не могут далее увеличивать свой объем за счет входящей воды без лизиса клеток, тогда как нормальные клетки способны на 70% увеличивать свой объем перед тем, как лизировать.

Так как способность эритроцитов деформироваться и проходить через тонкие капиллярные сосуды также прямо связана с наличием избытка площади поверхности клетки относительно ее объема, осмотическая резистентность опосредованно характеризует способность эритроцитов деформироваться. Чем выше осмоляльность, при которой достигается гемолиз, тем менее осмотически устойчив (резистентен) эритроцит, а значит хуже способен деформироваться и проникать в тонкие капилляры. В клинике измерение осмотической резистентности используется как способ диагностики анемий.

В прошлом, осмотическую резистентность выражали в терминах самой высокой концентрации раствора NaCl, при которой лизис становится детектируемым (это начальный лизис, при котором лизируют клетки с минимальной резистентностью) и самой низкой концентрации раствора, при

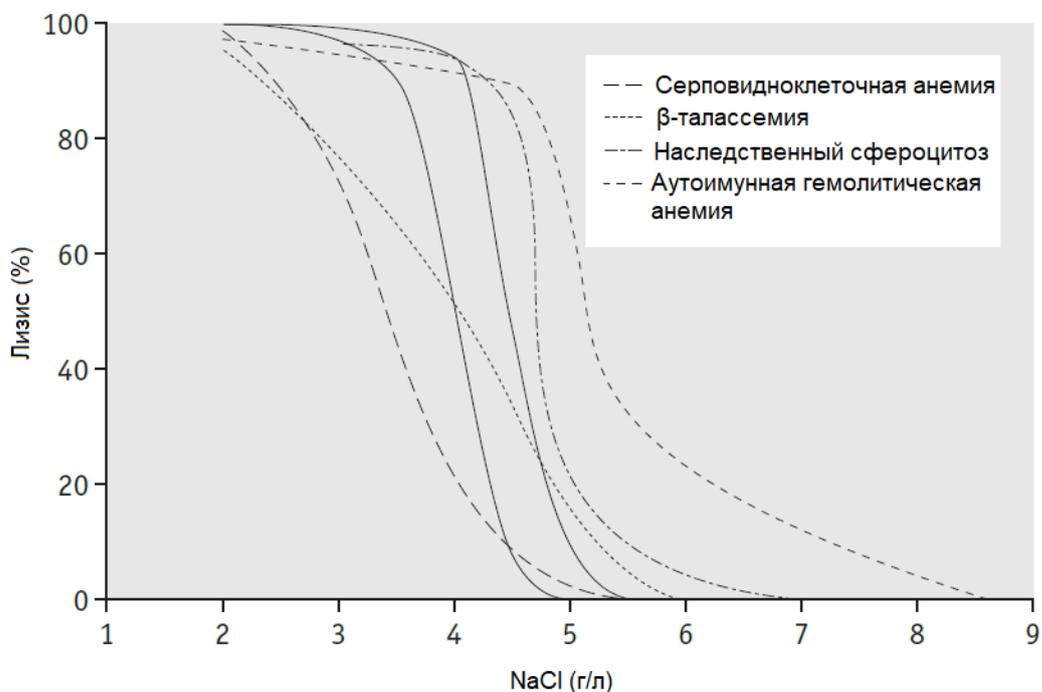
которой лизис почти завершился (это полный лизис или лизис клеток с максимальной резистентностью). В настоящее время исследуют полную кривую осмотической резистентности (рисунок 2), которую характеризуют двумя основными параметрами: концентрацией раствора NaCl (или его осмоляльностью), при которой наблюдается лизис 50% эритроцитов (MCF - mean cell fragility, или  $H_{50}$ ), и шириной распределения клеток по осмотической резистентности (W), за которую принимают разность концентраций растворов NaCl (или их осмоляльностей), в которых лизировано 10 и 90% клеток. Этот параметр отражает однородность эритроцитов по их осмотической устойчивости. Чем выше ширина распределения, тем более разнородны эритроциты в популяции. Значения различных параметров осмотической резистентности у здоровых людей приведены в таблице 2.

**Таблица 2.** Параметры осмотической резистентности у здоровых людей [82].

Параметр	Величина в свежей крови
Начальный лизис, концентрация NaCl в г/л (или мОсм/кг)	5,0 г/л (167 мОсм/кг)
Полный лизис, концентрация NaCl в г/л (или мОсм/кг)	3,0 г/л (100 мОсм/кг)
MCF или $H_{50}$ , концентрация NaCl в г/л (или мОсм/кг)	4,0-4,45 г/л (133-148,5 мОсм/кг)
Ширина распределения клеток по осмотической резистентности (W), (мОсм/кг)	(32,8±9,5 мОсм/кг)

Осмотическая резистентность может изменяться в ходе различных заболеваний. При наличии сплюснутых клеток (лептоцитов), у которых отношение площади поверхности к объему увеличено, осмотическая резистентность увеличивается. Такие изменения наблюдаются, например, при недостаточности железа (железодефицитной анемии) и  $\beta$ -талассемии, при которых клетки с низкими MCH и MCV необычно устойчивы к лизису [82] (рисунок 2). Увеличение осмотической резистентности наблюдается и при

серповидноклеточной анемии, когда в эритроцитах происходит частичная полимеризация гемоглобина S. Ретикулоциты и клетки пациентов после удаления селезенки также имеют тенденцию к увеличению площади мембраны по сравнению с нормальными клетками, и к большей осмотической резистентности.



**Рисунок 2.** Кривые осмотической резистентности эритроцитов пациентов, страдающих различными заболеваниями. Диапазон нормальных значений ограничен сплошными линиями. Воспроизведено из работы [82].

При некоторых других анемиях, таких, например, как наследственный сфероцитоз, аутоиммунная гемолитическая анемия или несфероцитарная гемолитическая анемия, осмотическая резистентность эритроцитов, наоборот, снижена (рисунок 2) [82]. Снижение осмотической резистентности может быть вызвано набуханием клеток из-за избыточного накопления натрия, которое может быть связано с измененными свойствами клеточной мембраны, отвечающей за пассивный транспорт ионов в клетку, а также с нарушениями работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса (например, из-за недостаточного количества АТФ при наличии дефицитов определенных гликолитических ферментов).

Осмотическая резистентность уменьшается, например, в процессе хранения в стандартном консервирующем растворе SAGM рентген-облученных эритроцитных взвесей и взвесей, полученных из цельной крови, предварительно обработанной ультрафиолетом в присутствии рибофлавина [83]. При хранении в течение 3 недель клетки набухают, из них выходит калий и осмоляльность буфера, при которой лизирует 50% эритроцитов ( $H_{50}$ ) вырастает со 138,8 мОсм/кг до 141,2 мОсм/кг, а ширина распределения эритроцитов по осмотической резистентности ( $W$ ) с 32,8 до 73,7 мОсм/кг [83,84].

При проведении экспериментов по введению лекарственного препарата в эритроциты возможно изменение их объема, содержания и концентрации гемоглобина в клетках, а также изменение их осмотической резистентности. Поэтому данные параметры необходимо отслеживать. Задача при проведении таких экспериментов – подобрать условия, при которых изменения в приведенных выше параметрах будут минимальны.

## **1.2. Методы включения препаратов в эритроциты**

Существует достаточно много методов, которые могут быть использованы для включения различных соединений в эритроциты. Ниже некоторые из них рассмотрены подробнее.

### **1.2.1. Электропорация**

Метод заключается в том, что клетки, помещенные в изотонический раствор, содержащий включаемый препарат, подвергаются импульсному воздействию электрического поля высокой напряженности (1-5 кВ) [85]. Такая разность потенциалов, создаваемая на различных сторонах диэлектрического по своей сути мембранного слоя, создает в нём множественные пробои, что приводит к образованию пор. Через поры препарат заходит внутрь клетки по градиенту концентрации. Стадия увеличенной проницаемости клеточной мембраны и наступления равновесия концентраций длится до 60 мин при температуре 0°C. При инкубации клеток при температуре 37°C в течение от нескольких минут до часа проницаемость мембраны восстанавливается до нормальной [86]. Установлено, что при электропорации разрушается  $Na^+/K^+$ -АТФ-аза [87]. При этом калий начинает

выходить из клеток наружу, а натрий поступает внутрь клетки. Вместе с натрием поступает вода, клетка набухает и лизирует. Лизис контролируют добавлением во внешний раствор белков (например, бычьего сывороточного альбумина) для выравнивания осмотического давления внутри и снаружи клетки. Существует промышленная проточная система электропорации для загрузки инозитолгексафосфата [88], однако это устройство имеет ограниченное клиническое применение, т.к. пригодно для обработки только небольших объемов крови (20–50 мл).

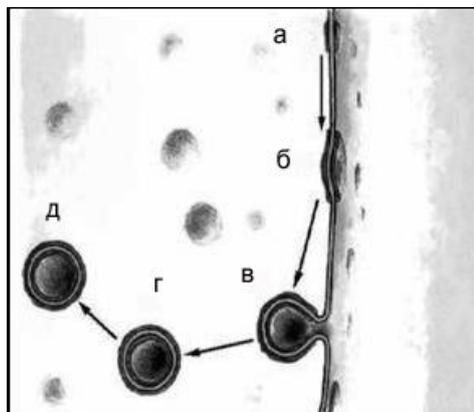
### **1.2.2. Эндоцитоз**

В зрелых эритроцитах с помощью молекул определенной химической структуры можно индуцировать эндоцитоз [89]. При этом близкие друг к другу участки фосфолипидного бислоя клеточной мембраны эритроцитов приводятся в контакт, образуя как бы пузырьки, которые и захватывают вещество извне (рисунок 3). Полость в мембране смыкает свои края, а внутри клетки появляется эндосома с включенной молекулой. Среди препаратов, индуцирующих эндоцитоз, наиболее изучены винбластин, хлорпромазин, гидрокортизон и тетракаин [90,91]. Метод эндоцитоза подходит только для переноса молекул, имеющих как гидрофобные, так и гидрофильные группы. Эффективность метода сильно зависит от концентрации включаемого вещества, pH и температуры (37°C). Эти ограничения в сочетании с плохой воспроизводимостью процесса делают его мало совместимым с промышленным применением.

### **1.2.3. Ультразвук**

Эритроцитную взвесь с гематокритом 1% обрабатывают три секунды ультразвуком с частотой 0-1,5 мГц в специальной кювете при 10°C, а затем добавляют запечатывающий раствор с целевым белком и инкубируют взвесь несколько минут при 37°C. Преимуществами данного метода являются простота, небольшое количество времени, требуемое для «включения» белков в эритроциты и возможность использования высококонцентрированных растворов белковых препаратов. Среди недостатков можно отметить низкую эффективность

«включения» (приблизительно 2-3%) вследствие низкого гематокрита используемой суспензии эритроцитов (1%) [93].



**Рисунок 3.** Основные стадии эндоцитоза: а, б – втягивание мембраны внутрь клетки; в – стягивание “горловины” полости; г, д – образование автономной внутриклеточной везикулы [92].

#### 1.2.4. Использование пептидов, проникающих в клетку

Идея метода заключается в связывании препарата с мембрано-проникающим пептидом (cell penetrating peptide, CPP). Пептид входит в клетку через клеточную мембрану, не создавая в ней повреждений, и проносит за собой сцепленную с ним терапевтическую молекулу. Такой метод позволяет переносить препараты через мембраны клеток всех органов, включая мозг [94]. Авторы работы [95] получили 4%-ную эффективность загрузки L-аспарагиназы в эритроциты овцы, и возможность вместить 8 МЕ аспарагиназы в 100 мкл эритроцитов. Внутри эритроцита CPP диссоциирует при восстановлении дисульфидных связей глутатионредуктазой. В результате аспарагиназа освобождается от пришитого пептида. Хотя этот метод обладает важным преимуществом - практически полным отсутствием каких-либо повреждений мембраны клетки, его использование в клинике осложнено несколькими аспектами. Во-первых, до сих пор не показано, что CPP-опосредованный вход лекарства является необратимым; достаточно мало сведений существует о взаимодействиях CPP- переносчиков во внутриклеточной среде. Во-вторых, эффективность подобной инкапсуляции в большой степени зависит от активности клеточной глутатионредуктазы, что создает трудности с

воспроизводимостью результатов метода при переходе на промышленный уровень [96].

### **1.2.5. Пульсовый метод гемолиза с применением диметилсульфоксида**

Метод заключается в создании кратковременного осмотического градиента диметилсульфоксида (ДМСО) через клеточную мембрану, в результате которого препараты переносятся в эритроциты [97,98]. Суспензию эритроцитов инкубируют с ДМСО, который быстро входит в клетки до выравнивания его концентрации внутри и снаружи эритроцита. Затем добавляют изотонический раствор включаемого вещества. ДМСО начинает частично выходить из клеток по градиенту концентрации, а внутрь клетки заходит вода и препарат. Процесс продолжается до восстановления равновесия между концентрацией ДМСО внутри и снаружи клеток. Данный метод был использован для введения в эритроциты инозитолгексафосфата [99,100] - аллостерического эффектора гемоглобина, в клинически значимых объемах. Это позволило получить высокую концентрацию включенного вещества в эритроците, но для небольшого количества (9–25%) клеток. Были предприняты некоторые попытки сепарировать фракцию загруженных клеток, но технология оказалось слишком длительной и дорогой [96]. Это ограничило широкое применение метода для клинических нужд.

### **1.2.6. Осмотические методы**

Эти методы основаны на набухании эритроцита в гипоосмотическом растворе, сопровождающемся увеличением проницаемости мембраны. Для всех этих методов общими этапами при получении нагруженных препаратом эритроцитов являются: выделение клеток из крови и отмывание их в изотоническом растворе; контакт с гипотонической средой и осмотический шок, позволяющий открывать поры в мембране эритроцитов; диффузия лекарственного средства в клетки; «запечатывание» образовавшихся в мембране пор путем восстановления физиологической тоничности внешней среды. На сегодняшний день гипоосмотические методы считаются лучшими для включения в эритроцит ферментных препаратов и последующего масштабирования технологии [1,2,96].

Простота и надежность этих методов привели к тому, что на их основе несколько компаний приступили к промышленной разработке эритроцитов с включенным в них лекарственным средством (фармакоцитов) и разработке соответствующих устройств, пригодных для клинического применения [96]. В настоящее время существует несколько вариантов гипоосмотических методов включения препаратов в эритроциты.

#### **1.2.6.1. Обратимый гипоосмотический лизис**

Этот метод считается наиболее простым в исполнении. Эритроциты добавляют в среду низкой осмоляльности (0-50 мОсм) и инкубируют в ней при 0°C до 10 минут [101]. Происходит мгновенное образование пор в мембране, через которые включаемое вещество входит в клетки, а из них выходит гемоглобин и другие внутриклеточные вещества. Соотношение объемов гипотонической среды (воды) и суспензии эритроцитов должно быть, по крайней мере, 1 : 3 или 1 : 4, поэтому около 60-70% цитоплазматических веществ могут быть потеряны, что отразится на уменьшении срока циркуляции таких эритроцитов *in vivo* [102].

#### **1.2.6.2. Метод предварительной сферуляции клеток**

Этот метод может выполняться в различных вариантах, но основная его идея заключается в том, что гипотоническая инкубация клеток проводится в две или более стадии [103]. На первом этапе клетки промываются гипотоническим буферным раствором с осмоляльностью 180–200 мОсм/кг. В этих условиях наиболее хрупкие клетки разрушаются, а оставшиеся неповрежденные начинают набухать, но не лизируют. После этого проводят центрифугирование, супернатант удаляют и выделяют осадок эритроцитов. На второй стадии готовят гипотонический водный раствор препарата (иногда это просто раствор в дистиллированной воде) и добавляют его в промытые эритроциты в небольших объемах либо сразу (двухступенчатый лизис), либо в несколько последовательных стадий (метод пресвеллинга). После каждой стадии добавления лекарственного средства суспензию центрифугируют. Процесс продолжают до достижения точки лизиса (исчезновения четкой границы между упакованными клетками и

надосадком после центрифугирования). В результате такого ступенчатого лизиса процесс набухания идет медленно, что приводит к хорошему удерживанию в клетке цитоплазматических компонентов. Иногда, чтобы сократить выход внутриклеточных компонентов по градиенту их концентрации, на осадок предварительно набухших, но не лизированных эритроцитов (после первой ступени процесса) осторожно наслаивают лизат эритроцитов, содержащий все внутриклеточные метаболиты [104]. При этом на 1 мл упакованных эритроцитов добавляют сначала 4 мл гипоосмотического буфера (с осмоляльностью 2/3 от нормальной) и 0,2 мл лизата эритроцитов, а затем 0,2 мл раствора включаемого вещества в воде. При добавлении лекарства суспензию перемешивают, а затем центрифугируют, но супернатант не удаляют, а наслаивают прямо на него следующую порцию лекарства и снова перемешивают и центрифугируют. Таких ступеней добавления лекарства может быть 5 или 6. Затем эритроциты «запечатывают» путем добавления рассчитанного объема гипертонического буфера и последующей инкубации при 37°C в течение 30-60 мин [103]. Эта процедура имеет преимущество в виде сохранения в клетке большинства небольших молекул, таких как АТФ. Клетки, полученные данным методом, показали довольно хорошую выживаемость *in vivo* [105]. В лабораторном масштабе при использовании этого метода успешно инкапсулируются малые молекулы [103]. В 1998 году группой авторов во главе с Маньяни [106] на основе метода двухступенчатого лизиса было разработано медицинское устройство для автоматизированной загрузки эритроцитов лекарственными препаратами «Red Cell Loader». Процедура состоит из двух последовательных гипотонических разведений отмытых эритроцитов, за которыми следует шаг концентрирования суспензии с использованием гемофильтра [106]. Процесс обычно проводится в службе переливания крови в больнице с использованием гомологичных или аутологичных эритроцитов. К недостаткам метода относят длительность – манипуляции с клетками идут свыше двух часов. Ограничением также считают маленький и стандартизированный объем крови - 50 мл, который был выбран для предотвращения дискомфорта пациентов [4] так как этого объема может быть недостаточно для включения в эритроциты терапевтической дозы фермента.

### ***1.2.6.3. Метод гипотонического диализа***

Основная идея диализных методов заключается в том, чтобы использовать для инкубации эритроцитов в гипотонической среде (с целью уменьшить потери внутриклеточного содержимого во время процедуры) полупроницаемые мембраны, пропускающие соединения с молекулярной массой 12-15 кДа.

Технически существует два основных устройства для проведения гипотонического диализа. Для этого используют диализные мешки различных размеров или диализаторы (а также модифицированные диализные картриджи, блоки и т.д.) с волокнами из полупроницаемых мембран.

В исходном виде диализный мешок представляет собой диализную мембрану цилиндрической формы. Герметично зажимая одну сторону мембраны, получают мешок, в который помещают суспензию эритроцитов с целевым препаратом. Сам мешок помещают в гипотонический буфер. Во время инкубации мешка в буфере, через его мембрану свободно проникают соли и вода, а также другие низкомолекулярные вещества, но не проникают белки и клетки. Поэтому удается снизить осмоляльность окружающей клетки среды и добиться открытия пор в мембране эритроцита без значительного разведения самой суспензии клеток и потери ими гемоглобина. Мембраны могут состоять из разных материалов, наиболее распространенный – это целлюлоза. Диализная мембрана содержит большое количество пор с определенным диаметром. Минимальную молекулярную массу вещества, которое не проходит через поры данной мембраны, часто называют «коэффициентом отсеки». Эти коэффициенты могут составлять от нескольких десятков до нескольких десятков тысяч дальтон.

Процедура гипотонического диализа была успешно использована в клинике [15]. В течение 17 лет пациент, страдающий дефицитом аденозиндезаминазы (ADA), получал каждые 2-3 недели ADA, загруженную в аутологичные эритроциты (препарат был приготовлен методом гипоосмотического диализа в диализных мешках). Лечение оказалось метаболически и клинически эффективным [107], но достаточно уникальным и не масштабируемым на большое количество пациентов.

#### ***1.2.6.4. Метод проточного диализа***

В 1980 г. Делю и соавторы разработали диализатор, реализующий метод проточного диализа, который позволял использовать 150 мл эритроцитов [108]. Этот метод, гораздо более быстрый и демонстрирующий высокую эффективность, до сих пор остается недостаточно описанным в литературе. Диализный мешок в нем заменяется диализным картриджем, состоящим из множества полых волокон (гемодиализатор, или диализатор), увеличивающим площадь поверхности контакта клеточной суспензии с гипоосмотическим раствором и гораздо более удобным для обработки больших объемов крови. Суспензия эритроцитов, содержащая лекарственное средство, прокачивается по внутреннему пространству волокон в диализаторе с помощью перистальтического насоса. Ввод лекарственного средства в эритроциты осуществляется при набухании и открытии пор в мембране клетки в результате контакта клеточной суспензии с гипотоническим буфером, омывающим волокна и протекающим в противоток по внешнему контуру диализатора [109,110]. Автоматизированный процесс проточного диализа был впервые запатентован в 1982 году Ропаром для включения инозитолгексафосфата как иллюстративного соединения [111]. Единственная автоматизированная система на основе проточного диализа, используемая в клинике в настоящее время (EryCaps) создана в 2006 году французской фирмой EryTech. Согласно данным патента весь процесс загрузки препарата в эритроциты занимает примерно 3 часа. После обработки 250–350 мл упакованной эритроцитарной массы могут быть получены около 150 мл загруженных эритроцитов с гематокритом 70% [112].

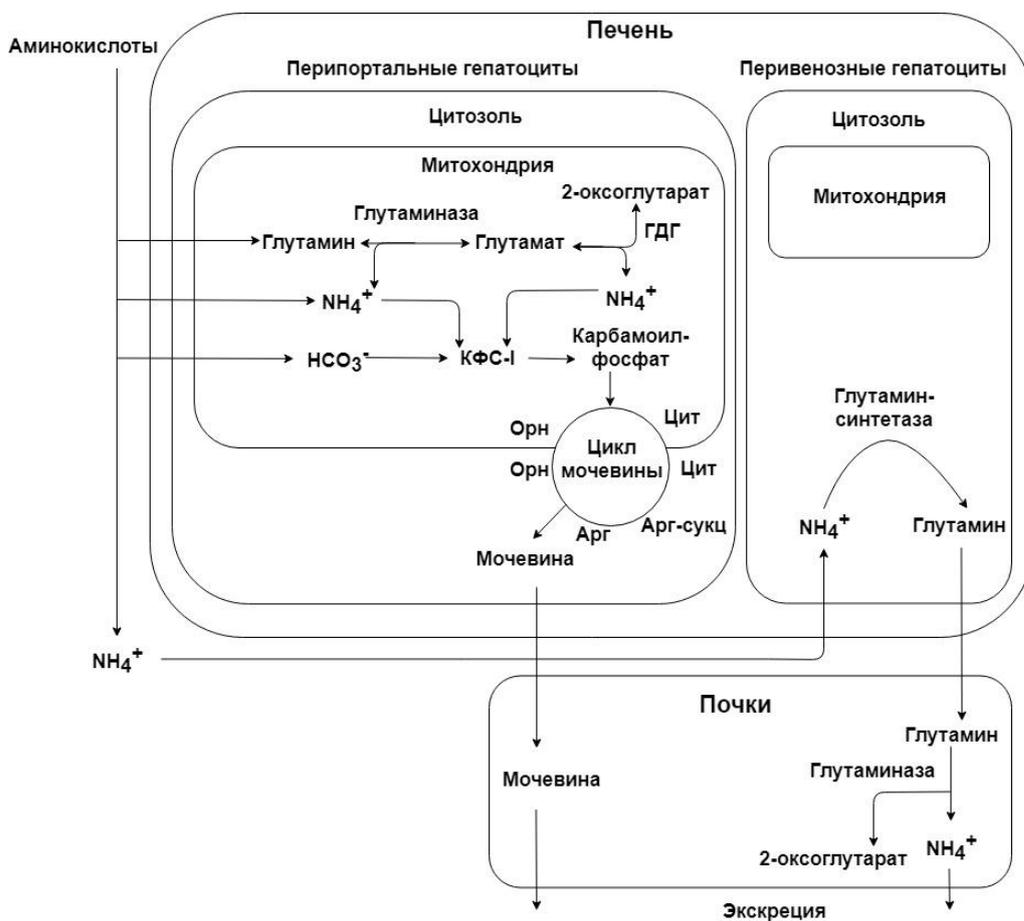
Для включения высокомолекулярных препаратов в эритроциты методом проточного диализа, в клинике использовали коммерческие гемодиализаторы, предназначенные для очищения крови пациентов от низкомолекулярных токсических веществ [9,10,113,114]. Объем коммерческих диализаторов для проведения гемодиализа может быть от 18 до 120 мл с эффективной площадью поверхности от 0,2 до 1,8 м<sup>2</sup>, что существенно больше по сравнению с диализным мешком (площадь 10-40 см<sup>2</sup>). Поэтому главный недостаток использования готовых диализаторов в лабораторных условиях для исследования новых препаратов - высокий расход клеточной суспензии и включаемого препарата.

### 1.3. Обмен аммиака в организме

Так как данная работа посвящена созданию эритроцитов-биореакторов для удаления избыточного аммония из кровотока, далее будут представлены сведения об обмене аммиака в организме, причинах его нарушения и проницаемости эритроцитарных мембран для аммиака/аммония.

Основной источник аминного азота в организме – это деградация аминокислот в тканях. Накапливающийся при этом аминный азот поступает в кровь в виде глутамина и аланина. В печени глутамин дезаминируется глутаминазой с образованием глутамата и иона аммония ( $\text{NH}_4^+$ ), а аланин подвергается трансаминированию, в результате которого аминокетильная группа переносится с аланина на 2-оксоглутарат и образуется глутамат. Весь глутамат дезаминируется глутаматдегидрогеназой с образованием  $\text{NH}_4^+$  [29]. Эти реакции происходят в митохондриях перипортальных гепатоцитов (рисунок 4). Помимо этого в результате катаболизма аминокислот в перипортальных гепатоцитах накапливается гидрокарбонат. Вместе свободный аммоний и гидрокарбонат включаются в цикл мочевины (рисунок 5), в результате которого образуется мочевины, которая далее выводится из организма почками [115].

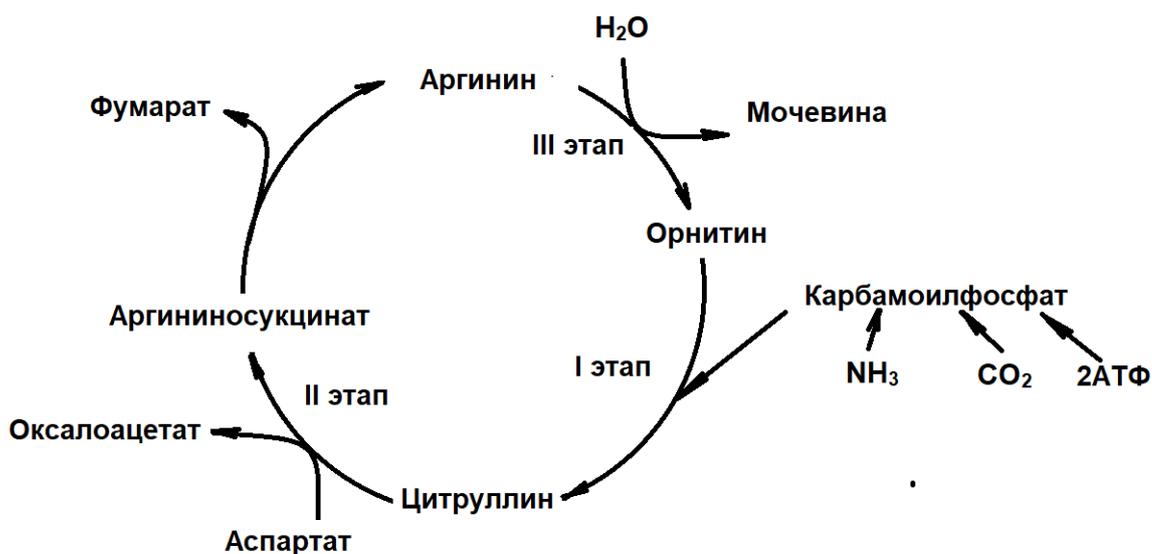
В перивенозных гепатоцитах свободный аммоний и глутамат также превращаются в менее токсичный глутамин под действием глутаминсинтетазы (рисунок 4). Глутамин может снова поступать в перипортальные гепатоциты и в почки. Это позволяет всегда поддерживать нетоксичный низкий уровень аммония в крови, несмотря на низкую аффинность к аммоний фермента карбамоилфосфатсинтетазы I (фермента цикла мочевины, связывающего аммоний на первой стадии цикла) [115]. Максимальная скорость синтеза глутамина перивенозными клетками составляет около 8-10 мкмоль/мин на грамм клеток, что в 2 раза выше, чем скорость элиминирования аммония перипортальными гепатоцитами [116]. Константы Михаэлиса ( $K_m$ ) для аммония составляют у карбамоилфосфатсинтетазы 3,6 мМ, а у глутаминсинтетазы – 0,11 мМ [117].



**Рисунок 4.** Метаболизм аммиака в организме. Орн – орнитин, цит – цитруллин, арг-сукц – аргининосукцинат, арг – аргинин. ГДГ – глутаматдегидрогеназа, КФС-I – карбамоилфосфатсинтетаза I. Адаптировано из [115].

В почках дополнительно происходит последовательное дезаминирование глутамина до глутамата, и глутамата до  $\alpha$ -кетоглутарата, а образовавшийся свободный аммоний может частично выводиться с мочой [115]. В почках выделившийся аммиак нейтрализует кислые продукты обмена, образуя с ними соли вместо ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  и защищает тем самым организм от излишней потери этих ионов, которые в нормальных условиях могут использоваться для выведения анионов и утрачиваться [118].

Мочевина - основной конечный продукт азотистого обмена, в составе которого из организма выделяется до 90% всего выводимого азота. Экскреция мочевины в норме составляет 10-15 мг азота/ч на кг веса тела, а максимально может составлять до 55-65 мг азота/ч на кг веса тела [119]. Это соответствует



**Рисунок 5.** Орнитиновый цикл (цикл мочевины). Состоит из трех основных ступеней: I – превращение орнитина в цитруллин (идет в 2 этапа, через образование карбамоилфосфата из NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> и двух молекул АТФ (реакция активируется N-ацетилглутаминовой кислотой) и образование цитруллина из карбамоилфосфата и орнитина); II – превращение цитруллина в аргинин (также идет в 2 этапа: сначала цитруллин взаимодействует с аспарагиновой кислотой, образуя аргининоянтранную кислоту (с участием АТФ), а затем эта кислота расщепляется на фумаровую кислоту и аргинин); III – гидролиз аргинина на мочевину и орнитин, который вновь вступает в цикл [29].

примерно 25,2-109,2 г азота/сутки (при весе 70 кг) или примерно 0,9-3,9 моля мочевины/сутки, соответственно [119].

Мочевина содержит 2 атома азота. Источником одного из них является аммиак, который в печени связывается с гидрокарбонатом с образованием карбамоилфосфата под действием карбамоилфосфатсинтетазы I. На эту реакцию затрачивается 1 молекула АТФ. Далее орнитинкарбамоилтрансфераза переносит карбамоильную группу карбамоилфосфата на орнитин, и образуется цитруллин. В следующей реакции аргининосукцинатсинтетазы связывает цитруллин с аспартатом (который несет второй атом азота для мочевины) и образует аргининосукцинат (аргининоянтранную кислоту). Этот фермент нуждается в ионах Mg<sup>2+</sup>. В реакции затрачивается еще 1 молекула АТФ. Далее фермент аргининосукцинатлиаза

(аргининосукциназа) расщепляет аргининосукцинат на аргинин и фумарат, при этом аминогруппа аспартата оказывается в молекуле аргинина. Аргинин подвергается гидролизу под действием аргиназы, при этом образуются орнитин и мочевины. Кофакторами аргиназы являются ионы  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mn}^{2+}$ . Образующийся орнитин взаимодействует с новой молекулой карбамоилфосфата, и цикл замыкается [29] (рисунок 5).

N-ацетилглутаматсинтетаза – фермент, не участвующий в цикле мочевины, но являющийся важной частью метаболического пути от аммиака до мочевины. Этот фермент производит N-ацетилглутамат, без которого карбамоилфосфатсинтетаза I совершенно неактивна [120]. Ранее считалось, что полный набор ферментов орнитинового цикла есть только в гепатоцитах. Но в последнее десятилетие выяснилось, что все ферменты цикла мочевины функционируют также в тонком кишечнике крысы и человека [121,122], и что эпителиальные клетки кишечника синтезируют мочевины из аммиака [123,124], но происходит это крайне медленно. Отдельные ферменты орнитинового цикла обнаруживаются не только в печени и кишечнике, но также и в других клетках: почках, мозге, сердце, жировой ткани, эритроцитах и др. [120].

#### **1.4. Транспорт аммиака/аммония через мембрану клетки**

Аммиак и аммоний в водном растворе всегда находятся в равновесии:



которое зависит от pH и определяется уравнением Гендерсона-Гассельбаха:

$$\log \left( \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]} \right) = \text{pH} - \text{pK}_a \quad (2)$$

Равновесие этой реакции достигается за миллисекунды. В крови и цитозоле клеток при физиологических значениях pH (где  $\text{pK}_a=9,01$ ) количество неионизированного  $\text{NH}_3$  составляет около 1% от общего количества  $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$  [125]. Молекула аммиака хорошо растворима в воде, но плохо растворима в липидах, однако проницаемость мембран различных клеток для аммиака достаточно высокая (108 мкм/сек для эритроцитарной мембраны), так как аммиак, вероятно, проникает через мембраны не только за счёт простой диффузии, но и с участием белковых каналов [126]. Ион аммония положительно заряжен, поэтому

он не диффундирует через гидрофобную, отрицательно заряженную мембрану и не переносится трансмембранными белками типа аквапоринов [127]. Однако, ион аммония имеет некоторую аффинность к различным транспортерам ионов, таких как  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза,  $\text{K}^+$ -транспортеры и др., так как может конкурировать с ионом калия в порах этих каналов [125]. В последнее время было обнаружено, что в клетках млекопитающих (в том числе и эритроцитах) за транспорт аммиака/аммония могут отвечать резус-гликопротеины, гомологичные специфическим транспортерам аммиака у различных растений и бактерий [128]. В работе [129] было показано, что транспорт аммиака/аммония обусловлен преимущественно белками-транспортерами, а не простой диффузией, и вклад в транспорт аммония вносит активность анионных транспортеров, функционально связанных с резус-гликопротеинами.

## **1.5. Гипераммониемия**

### **1.5.1. Что такое гипераммониемия**

У здорового человека концентрация аммиака (далее, говоря об аммиаке или аммонии мы всегда будем иметь в виду сумму свободного аммиака и ионов аммония) в крови обычно составляет 27 мкМ и варьирует в пределах 10-30 мкМ [130]. В медицинской практике встречались случаи, когда концентрация аммиака в крови внешне здорового человека достигала 50-100 мкМ [131].

Гипераммониемия – это повышенное содержание аммония в крови. Высокие концентрации аммония токсичны для центральной нервной системы, поэтому у пациентов с гипераммониемией развивается печеночная энцефалопатия. Клинические симптомы возникают при повышении концентрации аммиака в 3-10 раз. Гипераммониемия средней тяжести может протекать без видимых симптомов. Повышение концентрации аммиака в мозге до 600 мкМ приводит к возникновению судорог [118]. Гипераммониемия сопровождается появлением следующих симптомов: тошнота, многократные приступы рвоты; головокружение, судороги; потеря сознания, отёк мозга, кома (в тяжёлых случаях), которая может привести к летальному исходу; отставание в умственном развитии (при хронической врождённой форме).

Гипераммониемия возникает при хронических и острых заболеваниях печени и почек, циррозе, гепатэктомии, раковом перерождении печени, и любом повреждении печени, вызванном гепатотоксинами, вирусами или нарушением кровотока в печени [20,120]. При циррозе активность всех ферментов цикла мочевины снижается на 40-70%, а концентрация аммиака достигает 200-500 мкМ [132,133]. Кроме того, существует ряд генетических заболеваний, связанных с недостаточностью различных ферментов цикла мочевины, которые приводят либо сразу к острой гипераммониемии, либо к задержке умственного развития при хронической интоксикации аммонием [134]. Основные нарушения ферментов цикла мочевины перечислены в таблице 3.

Помимо этого существуют генетические заболевания, связанные с нарушением деградации аминокислот, транспорта метаболитов и другие, которые также сопровождаются гипераммониемией: пропионовая ацидемия, метилмалоновая ацидемия, изовалериановая ацидемия, болезнь кленового сиропа, гиперлизинемия, множественная недостаточность карбоксилаз, синдром Рейе, синдром гиперорнитинемии-гипераммониемии-гомоцитруллинурии [20].

**Таблица 3.** Возможные наследственные нарушения ферментов цикла мочевины

Тип заболевания	Причина
Гипераммониемия I типа	Недостаточность карбамоилфосфатсинтетазы
Гипераммониемия II типа (семейная гипераммониемия или чувствительность к вальпроату)	Недостаточность орнитинкарбамоилтрансферазы
Гипераммониемия III типа	Недостаточность N-ацетилглутаматсинтетазы
Цитруллинемия	Недостаточность аргининсукцинатсинтетазы
Аргининемия	Недостаточность аргиназы
Аргининоянтранная ацидурия	Недостаточность аргининосукцинатлиазы

### **1.5.2. Механизмы токсического действия аммиака и развития гипераммониемии**

Токсическое действие аммиака является комплексным процессом, не все механизмы которого на данный момент достаточно изучены. Е.А. Косенко в своей работе [120] попыталась систематизировать исследования в данной области и описать каскад событий, происходящих при острой гипераммониемии.

Первоначально нарушения происходят в печени: из-за повреждения ферментных систем нарушается синтез мочевины, глутамина, тормозятся процессы, связанные с энергообеспечением всех тканей и клеток организма, особенно мозга. Ион аммония может проникать через мембраны и, в высоких концентрациях, препятствовать транспорту ионов калия и натрия [135]. Проникая внутрь митохондрий, он нарушает работу электрон-транспортной цепи [136], вызывая нарушения аэробного окисления глюкозы. В межклеточном пространстве нейронов повышается концентрация глутамата (это может быть связано с нарушением энергозависимого захвата глутамата из синаптической щели). Глутамат – нейромедиатор возбуждения, он гиперактивирует глутаматные рецепторы здоровых нейронов и приводит к их гибели [137]. Гиперактивация глутаматных рецепторов вызывает избыточный вход кальция, натрия и воды в нейроны, что, в свою очередь, приводит к набуханию клеток и активации кальций-зависимых фосфолипазы А и NO-синтазы. Под действием фосфолипазы А в клетках начинается распад мембранных фосфолипидов, образование арахидоновой кислоты и генерация свободных кислородных радикалов, а под действием NO-синтазы - образование свободного радикала  $\text{NO}^{\cdot}$ . Все это в сумме приводит к перекисному окислению липидов и гибели клетки [120].

Высокие концентрации аммиака стимулируют также синтез глутамина из глутамата в нервной ткани (при участии глутаминсинтетазы). Накопление глутамина в клетках нейроглии приводит к повышению в них осмотического давления, что приводит к набуханию астроцитов и отеку мозга. Кроме того, повышение концентрации аммиака в крови сдвигает ее рН в щелочную сторону (вызывает алкалоз). Это увеличивает сродство гемоглобина к кислороду, что

приводит к гипоксии тканей, накоплению CO<sub>2</sub> и гипоэнергетическому состоянию, от которого, главным образом, страдает головной мозг [118].

### 1.5.3. Лечение гипераммониемии

Лечение гипераммониемии, в основном, направлено на снижение концентрации аммиака в крови. Этого добиваются за счёт низкобелковой диеты, введения в рацион кетоаналогов аминокислот, адсорбции аммиака в кишечнике за счет изменения pH, усиленного выведения аммиака с калом за счет слабительных средств, снижения продукции аммиака в кишечнике за счет антимикробных препаратов, стимуляции синтеза мочевины за счет введения орнитина, ключевого метаболита цикла мочевины, а также за счет восстановления уровня АТФ при введении L-карнитина и ацетил-L-карнитина и т.д. [20]. При наследственных дефектах ферментов цикла мочевины проводят стимуляцию выведения аммиака в обход нарушенных реакций, путём связывания и выведения NH<sub>3</sub> в составе фенилацетилглутамина и гиппуровой кислоты, или повышением концентраций промежуточных метаболитов цикла, образующихся вне блокируемых реакций (аргинина при аргининосукцинатаурии, цитруллина при гипераммонемии II типа с дефектом орнитинкарбамоилтрансферазы, глутамата) [118]. При острых состояниях или на последних стадиях печеночной энцефалопатии проводят процедуру гемодиализа или пересаживают печень [20].

Основные методы медикаментозного лечения гипераммонемии представлены в таблице 4 с указанием известной приблизительной эффективности терапии в терминах скорости снижения стационарной концентрации аммиака в крови.

**Таблица 4.** Современные медикаментозные препараты, используемые для лечения гипераммониемии.

№ п/п	Препарат	Доза	Снижение стационарной концентрации аммония	Ссылка
1	Лактулоза или Лактулоза + рифаксимин	30-60 мл 3 раза в день Лактулоза: 30-60 мл 3 раза в день + рифаксимин: 1200 мг в день	На 10 мкМ за 10 дней  На 18 мкМ за 10 дней	[138]

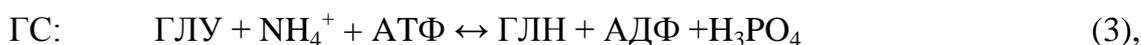
2	Лактилол	20 г 2 раза в день (5-10 дней)	На 8,4 мкМ после 5-дневного лечения.	[139]
3	Рифаксимин	400 мг 3 раза в день (5-10 дней)	На 28,3 мкМ после 5 дней лечения	[139]
4	Неомицин или эритромицин	1 г 4 раза в день  250 мг 4 раза в день	Снижение концентрации в сыворотке на 31±92 мкМ в течение 6-7 дней.  И на 31±49 мкМ в течение 6-7 дней.	[140]
5	Раствор маннита	2000 мл/день (1-2 дня)	На 25,8 мкМ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /день	[25]
6	Карбаглю (карглумовая кислота)	100-250 мг/кг 3 раза в день	Уменьшение в среднем на ~ 113,7 мкМ/день (от 36,5 до 352,9 мкМ/день).	[141]
7	N-карбамил-глутамат	100 мг/кг в день (в 4 разделенных дозах) (3 дня)	На 43-59 мкМ за 3 дня. На 33 мкМ за 3 дня.	[142] [27]
8	Бензоат натрия	5 г два раза в день (~ 12 дней)  250 мг/кг в день (2 дня)	Уменьшение в среднем на 20,1 мкМ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> за 12 дней  На 205,5 мкМ за 2 дня	[25] [143]
9	Фенилацетат натрия	9-12 г/день	88±20 мкМ в неделю	[144]
10	Аммонул (комбинация натрия бензоата и натрия фенилацетата)	По 250 мг/кг бензоата и фенилацетата в течение 24 часов	На 100 мкМ за 4 часа	[26]
11	Гепа-мерц (L-орнитин-L-аспартат)	30 г ежедневно в 500 мл 5% глюкозы в течение 7 дней.	Снижение на 20 мкМ в течение 4-7 дней.	[145]
12	Аргинин или цитруллин	0.6 ммоль/кг и  1 ммоль/кг (однократно)	Защита от гипераммониемии в течение 4х часов после введения аланина (6,6 ммоль/кг). Без препаратов наблюдалось увеличение концентрации аммония до 600 мкМ за 4 часа. Препараты снижают это увеличение NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> в среднем на 200-350 мкМ в час.	[146]
13	L-карнитин	2 г дважды в день (90 дней).	Уровень аммония у пациентов трёх групп с гипераммониемией и различной степенью энцефалопатии уменьшался с 68,2 до 13,1 мкМ, 19,1 мкМ, и 28,1 мкМ после 30, 60 и 90 дней	[147]

			лечения, соответственно (у пациентов со средней энцефалопатией (МНЕ)). С 82,1 мкМ до 12,0 мкМ, 23,9 мкМ или 41,0 мкМ после 30, 60 и 90 дней лечения, соответственно (в группе с энцефалопатией 1 (HE1)). И с 89,2 мкМ до 15,1 мкМ или 36,0 мкМ после 60 и 90 дней лечения, соответственно (в группе с энцефалопатией 2 (HE2)).	
--	--	--	--	--

#### 1.5.4. Попытки использования эритроцитов-биореакторов для удаления аммония из крови

Биореакторы для удаления аммония на основе мышинных и человеческих эритроцитов были исследованы различными группами. При этом для удаления аммония из кровотока были использованы 2 различных фермента.

В работах [17,148] методом гипоосмотического диализа в мышинные эритроциты была включена глутаминсинтетаза (ГС), катализирующая реакцию образования глутамина из L-глутаминовой кислоты в присутствии АТФ и аммиака (3):



где ГЛУ – L-глутаминовая кислота, ГЛН – L-глутамин, АТФ и АДФ – аденозинтри- и аденозиндифосфорная кислота, соответственно,  $\text{NH}_4^+$  - ионы аммония, а  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – фосфорная кислота.

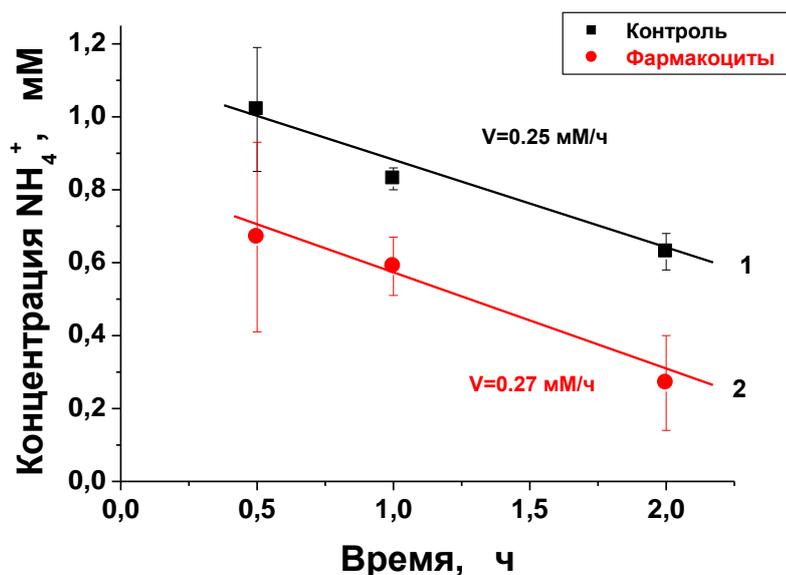
Инкапсуляция глутаминсинтетазы в эритроциты составила 16%, конечная удельная активность в эритроцитах была равна  $3,00 \pm 0,25$  МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>. Активность гликолитических ферментов после диализа, таких как гексокиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, пируват киназа, лактатдегидрогеназа, а также активность трансаминаз (аспартаттрансаминазы, аланинтрансаминазы) и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы, были снижены на 10-29% по сравнению с нативными эритроцитами. Активность фосфофруктокиназы в диализированных эритроцитах оставалась соизмеримой с нативными клетками. Авторы делают вывод, что она не теряется при диализе, так как связана с внутренней поверхностью эритроцита [17,148].

Исследование уровней метаболитов в полученных клетках показало снижение лактата и пирувата на 60%, однако соотношение NAD/NADH осталось прежним. Концентрации адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ), также как и отношение АТФ/АДФ не изменились после процедуры диализа. Концентрация в эритроцитах  $\alpha$ -кетоглутарата также не изменилась и составила  $21 \pm 1$  нмоль/мл клеток.

Проведенное в работах [17,148] исследование осмотической резистентности нативных эритроцитов и аммоцитов показало, что в целом аммоциты после диализа оказались более осмотически резистентны. Например, при осмоляльности раствора 60 мОсм/кг 100% нормальных клеток было гемолизировано, тогда как 40-50% аммоцитов оставались интактными. Показатель  $N_{50}$  для аммоцитов составил 55 мОсм/кг, а для нативных эритроцитов 80-90 мОсм/кг. Однако при высоких осмоляльностях (100-150 мОсм/кг) около 10% аммоцитов было лизировано.

Исследование выживаемости эритроцитов на мышах *in vivo* показало, что аммоциты живут в русле мышцы как минимум 48 часов (далее исследование не проводили), при этом активность глутаминсинтетазы в них не падает. Убыль аммония *in vivo* наблюдали у мышей с гипераммониемией, индуцированной однократной инъекцией раствора ацетата аммония в дозе 2,5 ммоль/кг. Концентрации аммония у мышей в кровотоке были измерены через 30, 60 и 120 минут после инъекции ацетата аммония. Полученные результаты представлены на рисунке 6. Из этих данных можно посчитать, что скорость убыли аммония в крови *in vivo* у контрольных мышей составляла примерно 0,25 мМ/час, а у мышей, которым вводили аммоциты – примерно 0,27 мМ/час, что соизмеримо.

Хотя в абсолютных значениях концентрация аммония в каждой временной точке была ниже у мышей, получивших аммоциты, это может быть обусловлено тем, что значительная часть аммония переработалась аммоцитами в первые полчаса после инъекции ацетата аммония, когда эти аммоциты, по-видимому, были значительно активнее. После этого времени их вклад в убыль аммония сильно сократился, что, по-видимому, связано с замедлением скорости глутаминсинтетазной реакции, из-за снижения в эритроцитах необходимого для реакции субстрата - глутаминовой кислоты, которая практически не проникает через эритроцитарную мембрану.



**Рисунок 6.** Построенные по данным работы [17] графики убыви концентрации аммония в крови мышей после инъекции им ацетата аммония в дозе 2,5 ммоль/кг. Прямая 1 – контрольные животные, получившие эритроциты, прошедшие все этапы процедуры, но без включения фермента; прямая 2 – аммоциты, содержащие глутаминсинтетазу (~ 0,48 МЕ/мышь). Представлены средние значения ± SD (n=5-6).

Вторым ферментом, который был ранее использован для создания эритроцитов-биореакторов, способных убирать из крови аммоний [149–151], была глутаматдегидрогеназа (ГДГ), которая катализирует реакцию образования глутаминовой кислоты из α-кетоглутарата в присутствии ионов аммония и NADPH (4):



где АКГ - α-кетоглутарат, а NAD, NADP и NADH, NADPH – окисленные и восстановленные формы, соответственно, никотинамидадениндинуклеотида или никотинамидадениндинуклеотидфосфата.

В работе [149] ГДГ из печени быка была загружена в эритроциты человека методом гипоосмотического диализа. При этом исходная активность фермента в суспензии составляли 50 МЕ/мл<sub>сусп</sub> (что соответствовало его концентрации 1 мг/мл). Гипоосмотический диализ проводили в течение 45 мин при 4°C против

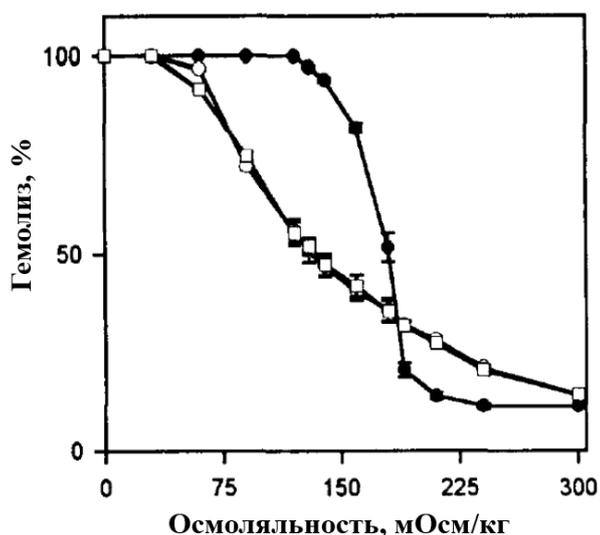
гипотонического буфера Хэнкса с рН 7,4 и осмоляльностью 40 мОсм/кг. Затем клетки инкубировали 10 мин при 37°C, после чего запечатывали добавлением гипертонического раствора в объеме 1/10 от объема суспензии, и вновь инкубировали эритроциты при 37°C в течение получаса. Полученные аммоциты отмывали три раза и окончательно ресуспендировали в аутологичной плазме. Инкапсуляция ГДГ составила  $1,9 \pm 0,2\%$ . Авторы предположили, что такой низкий процент инкапсуляции обусловлен высокой концентрацией фермента в суспензии (1 мг/мл), которая вызывает агрегацию ГДГ. Выход клеток составил  $63,2 \pm 2,8\%$ . Авторы показали, что в ходе процедуры фермент не связывался с мембраной эритроцитов неспецифическим образом. Об этом говорило то, что после инкубации эритроцитов в изотонической среде в присутствии фермента и последующей отмывки клеток, активности ГДГ в суспензии обнаружено не было.

В работе также была исследована стабильность свободного фермента и фермента, включенного в эритроциты, которые хранили в растворе CPDA при 4 и 37°C в течение 170 часов. В первые 56 часов хранения при 4°C фермент в эритроцитах не потерял свою активность, тогда как свободная ГДГ потеряла примерно 25% активности. Если хранение проводили при 37°C, то чуть больше активности потерял инкапсулированный фермент. Суммарно за 170 часов хранения при +4°C свободный фермент потерял около 40% активности, а инкапсулированный около 25-30%. Авторы сделали вывод, что эта температура является оптимальной для хранения эритроцитов с ГДГ для их последующего использования в *in vivo* и *in vitro* исследованиях, а также, что эритроциты несколько защищают фермент при хранении. Было показано, что в течение 170 часов хранения из эритроцитов постепенно выходила ГДГ. При +4°C за все это время из эритроцитов вышло около 25-30% всей ГДГ, а при 37°C - около 50%.

Авторы исследовали также способность эритроцитов, содержащих ГДГ, удалять аммоний из среды *in vitro*. Аммоциты с гематокритом 30% в кювете с буфером Хэнкса, содержащим 300 мкМ аммония и 13 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата за 24 часа удалили практически весь аммоний (осталось 15 мкМ, которые за оставшиеся 48 часов также были переработаны). Нативные эритроциты при этом аммоний не удаляли.

В работе [150] в мышинные эритроциты включали ГДГ из печени быка методом гипоосмотического диализа. Активность фермента в исходной суспензии составляла 40 МЕ/мл. Выход клеток составил  $56,1 \pm 2,1\%$ , а инкапсуляция ГДГ –  $3,8 \pm 1,8\%$ .

Качество полученных аммоцитов в работе характеризовали, измеряя стандартные эритроцитарные индексы и осмотическую резистентность полученных аммоцитов. Средний объем эритроцита (MCV) уменьшился после диализа примерно на 15-20%, количество гемоглобина в эритроците (MCH) также снизилось примерно на 10%, в результате чего средняя концентрация гемоглобина (MCHC) не изменилась. Исследование осмотической резистентности нативных эритроцитов и полученных после диализа биореакторов показало, что характер кривой резистентности изменился (рисунок 7). Кривая резистентности нативных эритроцитов имела сигмоидный вид, тогда как кривая резистентности аммоцитов становилась более полой. При этом 50% нативных эритроцитов лизировали при большей осмоляльности (180 мОсм/кг), чем 50% аммоцитов (135 мОсм/кг). Как и в случае с глутаминсинтетазой [17], при больших осмолялностях (180-300 мОсм/кг) некоторый процент аммоцитов уже лизировал, тогда как нативные клетки оставались еще целыми.

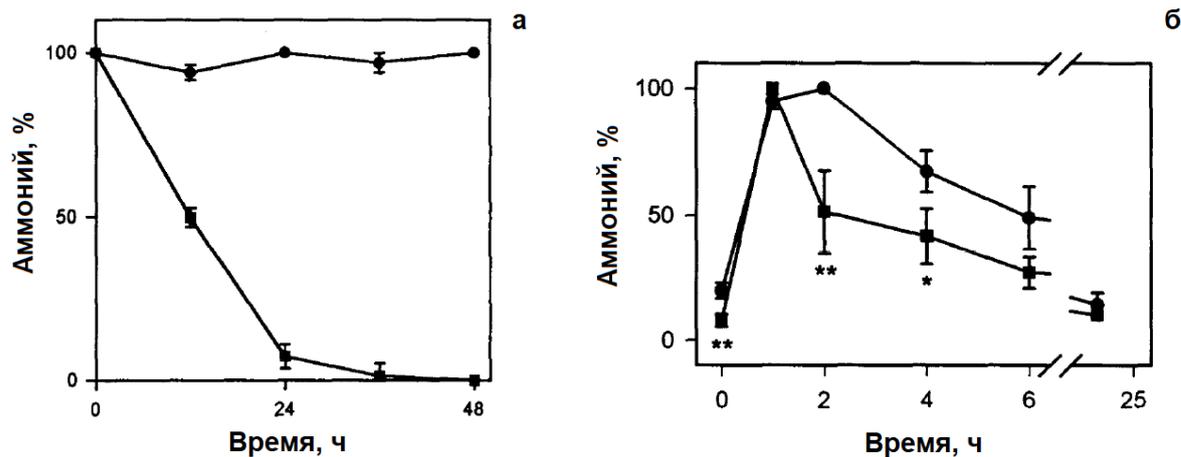


**Рисунок 7.** Кривые осмотической резистентности нативных эритроцитов (●), аммоцитов, полученных из эритроцитов мыши (□) и контрольных эритроцитов (без добавления ГДГ), прошедших процедуру диализа (○). Представлены средние величины  $\pm$  SD (n=4) [150].

Авторы исследовали также способность полученных биореакторов удалять аммоний *in vitro* и *in vivo*. *In vitro* в среде с буфером Хэнкс-PBS, содержащим 300 мкМ аммония, 13 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата и 0,1 мМ NADPH, аммоциты с гематокритом 30% (активность ГДГ не указана) удаляли аммоний в течение 48 часов (рисунок 8а). Причем, в первые 24 часа был переработан практически весь аммоний (95%). При этом контрольные эритроциты (прошедшие процедуру диализа, но не содержащие ГДГ) аммоний не удаляли. Основываясь на литературных данных, авторы предположили, что аммоний проходит сквозь мембрану эритроцита очень быстро [152], и такие низкомолекулярные субстраты, как  $\alpha$ -кетоглутарат и NADPH также способны проникать в эритроцит, т.к. после диализа в его мембране могут оставаться поры, пропускающие молекулы с молекулярной массой менее 12-14 кДа [153].

В исследованиях *in vivo* гипераммониемию индуцировали введением животным фермента уреазы. Контрольным мышам ввели по 400 мкл эритроцитов с гематокритом 50%, а мышам в опытной группе ввели полученные аммоциты (400 мкл с гематокритом 50%). Концентрация аммония в кровотоке у таких мышей в первый час после инъекции уреазы повышалась с 50-80 мкМ до  $1,33 \pm 0,47$  мМ. У мышей с введенными аммоцитами концентрация аммония упала на 50% в течение следующего часа, тогда как у контрольных мышей концентрация практически не снизилась (рисунок 8б). В течение следующих 5 часов концентрация аммония у аммоцитных мышей снизилась на 25%, а у контрольных на 50%. На протяжении последующих 20 часов концентрация аммония снижалась в опыте и контроле примерно с одинаковой скоростью пока не достигла базального уровня.

Таким образом, можно посчитать, что скорость убыли аммония в среде *in vitro* (в первые 24 часа) составила 11,9 мкМ/час (или около 40 мкмоль/час на литр аммоцитов, т.к. в среде было 30% аммоцитов), а *in vivo* - в среднем 140 мкМ/час (или около 1,4 ммоль/час на л аммоцитов, т.к. на общий объем крови 2 мл, аммоцитов было введено 200 мкл). К сожалению, авторы не приводят величину активности ГДГ, введенную в образцы в опытах *in vitro* и *in vivo*, что не позволяет сравнить эффективность работы аммоцитов в этих случаях.



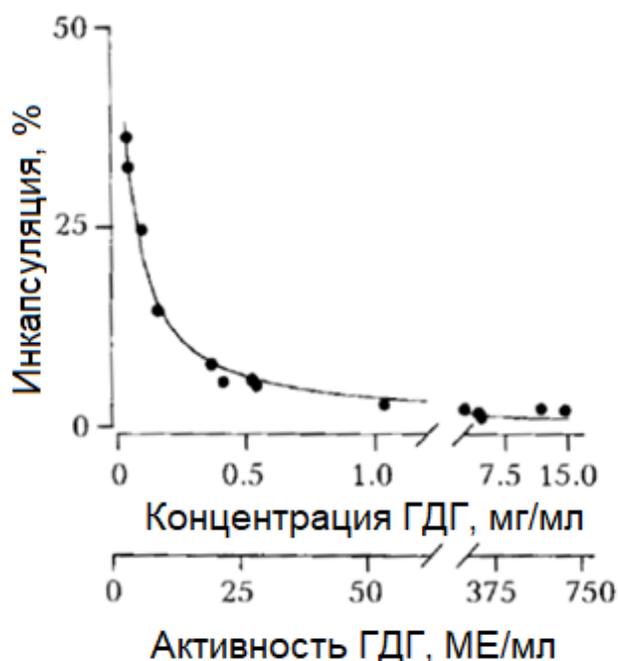
**Рисунок 8.** Удаление аммония из среды *in vitro* (а) и в модели гипераммониемии на мышях, индуцированной введением животным уреазы (~1 МЕ на мышью) *in vivo* (б). Контроль (●) - мыши, получившие по 400 мкл отмытых эритроцитов без ГДГ (Ht=50%); опыт (■) - мыши, получившие по 400 мкл аммоцитов, содержащих ГДГ (Ht=50%). Адаптировано из [150].

В работе [151] исследовали влияние концентрации ГДГ из печени быка и алкогольдегидрогеназы на включение каждого из этих ферментов в эритроциты. ГДГ включали в эритроциты овцы и человека методом гипотонического диализа. Выход клеток составил 30-34% для эритроцитов овцы, и 61-65% для эритроцитов человека. При этом ГДГ из печени быка при исходной активности в суспензии 100 МЕ/мл (то есть при концентрации 2 мг/мл) включилась в человеческие эритроциты всего на  $1,8 \pm 0,3\%$ , а в эритроциты овцы на  $2,8 \pm 0,4\%$  (от общей активности в исходной суспензии).

Зависимость процента инкапсуляции от концентрации ГДГ в исходной суспензии имела экспоненциальный характер (рисунок 9). При этом для активности ГДГ в суспензии равной 2 МЕ/мл (т.е. при концентрации 0,04 мг/мл) инкапсуляция составила 36,2%, а для активности 750 МЕ/мл (т.е. при концентрации 15 мг/мл) инкапсуляция составила только 2%.

Исследование эритроцитарных индексов и осмотической резистентности полученных аммоцитов показало, что ни для эритроцитов человека, ни для эритроцитов овцы полученные результаты принципиально не отличались от результатов предыдущей работы, описанной выше [150]. По параметру  $H_{50}$  (т.е. по

величине осмоляльности, при которой достигается 50% лизис клеток) полученные аммоциты были более резистенты, чем исходные эритроциты, и характер самой кривой резистентности оказался такой же (более пологий по сравнению с исходными клетками).



**Рисунок 9.** Зависимость процента инкапсуляции бычьей глутаматдегидрогеназы от концентрации фермента в исходной суспензии эритроцитов. Нижняя шкала «х» представляет активности ГДГ в суспензии, соответствующие данным концентрациям фермента. Адаптировано из [151].

## 1.6. Сведения о ферментах, использованных в данной работе

### 1.6.1. Глутаматдегидрогеназа из печени быка

Глутаматдегидрогеназа (ЕС 1.4.1.2-4) катализирует реакцию (4) превращения  $\alpha$ -кетоглутарата в L-глутамат [154]. Кофакторами в этой реакции служат NADH или NADPH. Изоферменты глутаматдегидрогеназы из печени или сердца животных, в большинстве своем, специфичны к обоим коферментам (1.4.1.3), а вот изоферменты, полученные из бактерий, как правило, специфичны только к одному из них, NADPH (1.4.1.4) [154].

Значения констант Михаэлиса для субстратов и продуктов реакции, катализируемой ГДГ из печени быка и ГДГ из *Proteus inconstans*, представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Значения  $K_m$  для ГДГ из печени быка или *Proteus inconstans* по отношению к различным субстратам, продуктам и кофакторам реакции

Субстрат/продукт	Км, мМ	
	ГДГ из печени быка [155]	ГДГ из <i>Proteus inconstans</i> [156]
$\text{NH}_4^+$	3,2	0,37
NAD	0,7	-
NADH	0,024	-
NADP	0,047	0,023
NADPH	0,025	0,003
L-глутамат	1,8	3,7
$\alpha$ -кетоглутарат	0,7	2,3

Мономер ГДГ из печени быка состоит из 6 идентичных и одинаковых по размеру субъединиц [157]. Субъединицы соединены между собой в две группы по 3 субъединицы в форме двух треугольников, лежащих друг на друге. Длина мономера 133 Å, диаметр 43 Å [71]. Молекулярные массы олигомера варьируют в различных работах от 280 кДа [158] до 400 кДа [159], что говорит о том, что довольно сложно определить это значение из-за агрегации фермента. Значение, посчитанное, исходя из последовательности нуклеотидов фермента, составляет 332 кДа [69]. Молекулярный вес одной субъединицы, посчитанный исходя из последовательности нуклеотидов, составляет 55,39 кДа [69].

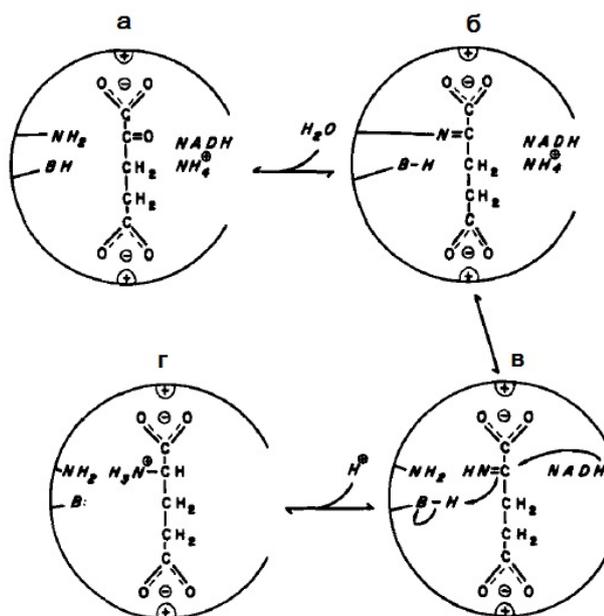
Биосинтез ГДГ животных происходит в микросомах, а затем белок транспортируется в матрикс митохондрий [160]. Глутаматдегидрогеназы из печени быка и сердца свиньи подвержены агрегации при концентрациях выше 0,1 мг/мл [154]. Эта агрегация обратима и может наблюдаться вплоть до 4 мг/мл. Степень агрегации зависит от концентрации белка, pH, ионной силы раствора. При этом

специфическая активность от степени агрегации не зависит [161,162]. Ферменты из печени крысы [163], морского котика [164] не агрегируют. Не агрегируют также ГДГ неживотного происхождения [69,157].

ГДГ формирует линейные полимеры (агрегаты) стержневой формы. Дедолимеризация наблюдается при разбавлении раствора и происходит очень быстро [165]. На дедолимеризацию фермента кроме разбавления может влиять ГТФ в присутствии NADH, предположительно, из-за конкуренции за один сайт связывания с другим олигомером фермента при образовании димера или полимера [161]. Добавление этих веществ вызывает дедолимеризацию намного быстрее, чем разбавление фермента. Если фермент инкубировать с NADH (но не с NADPH) до добавления ГТФ, его дедолимеризация оказывается значительно ниже. Было сделано предположение, что, если связывание с активным центром фермента ассоциировано с дедолимеризацией, то связывание с регуляторным центром, напротив, ответственно за защиту от дедолимеризации [154].

Механизм реакции ГДГ, предложенный авторами работы [154], представлен на рисунке 10.

В работе [166] было показано, что добавление пиридоксальфосфата к бычьей ГДГ в молярном соотношении 80:1 уже спустя 15 мин вызывало инактивацию фермента. Было установлено, что пиридоксальфосфат ковалентно связывается с аминогруппой лизина в этом белке. Высказано предположение, что, так как глутаматдегидрогеназа является одним из тех немногих ферментов, вовлеченных в метаболизм аминокислот, которые не нуждаются в пиридоксальфосфате как кофакторе, ингибирование ее активности этим соединением может иметь какое-то физиологическое значение в метаболизме аминокислот. В другой работе [167] было установлено, что пиридоксальфосфат связывается с белком нековалентно и его ингибирование обратимо. Ингибирование происходит в две стадии: первая довольно быстрая с обратимым связыванием и образованием нековалентного комплекса фермента и пиридоксальфосфата; и вторая, медленная, но тоже обратимая, с образованием основания Шиффа.



**Рисунок 10.** Механизм реакции глутаматдегидрогеназы. (а) – Незаряженная аминогруппа лизина-126 формирует с α-кетоглутаратом основание Шиффа (б). При этом отщепляется молекула воды и образуется α-иминоглутаратный комплекс (в). Этот комплекс восстанавливается коферментом NADH (или NADPH) с образованием глутамата (г) [154].

Потенциальными ингибиторами для ГДГ также являются кислоты с двумя или одним карбоксильным остатком, такие как изофталевая, глутаровая, α-кетоглутаровая, 2-метилглютаровая [168] и группы м-галогенобензоатов, отличительной чертой которых является наличие одной или двух карбоксильных групп [169]. ГТФ ингибирует фермент, а АДФ и АМФ – наоборот, активируют его. NADH в высоких концентрациях вызывает ингибирование фермента, замедляя собственное окисление [161]. Стабильность фермента увеличивается при увеличении ионной силы раствора [170].

### 1.6.2. Глутаматдегидрогеназа из *Proteus species*

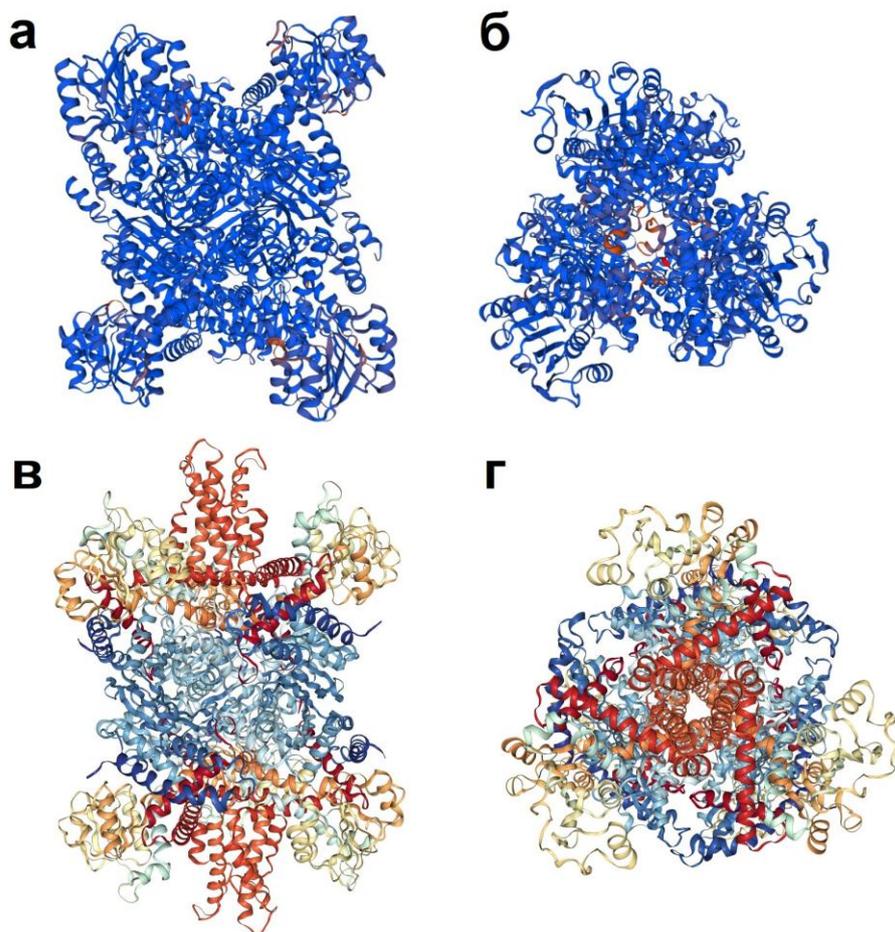
ГДГ из *Proteus sp.* (*Proteus inconstans*) является NADPH специфичной. Оптимум активности у неё наблюдается при рН 10 в реакции дезаминирования глутамата, и при рН 8,5 в реакции аминирования α-кетоглутарата. Оптимальная температура для обеих реакций составляет 40°C. Молекулярный вес фермента

равен приблизительно 300 кДа с массой каждой субъединицы около 50 кДа [156]. Изоэлектрическая точка соответствует рН 5,1. Фермент дезаминирует другие аминокислоты со скоростью меньше, чем 1% от скорости дезаминирования глутамата, и не аминирует никакие другие кислоты, кроме  $\alpha$ -кетоглутарата [156,171].

Реакции дезаминирования слегка ингибируются такими нуклеотидами, как АМФ и АДФ (примерно на 20%), а реакции аминирования, наоборот, ускоряются под воздействием различных нуклеотидов (АМФ, АТФ, АДФ, ГТФ, ИТФ, УТФ, ТТФ). Фермент полностью ингибируется солями ртути и частично некоторыми тиолами [156]. ГДГ из *Proteus sp.* обладает высокой удельной активностью (~400 МЕ/мг) [171].

Несмотря на то, что большинство бактериальных ГДГ и ГДГ млекопитающих являются гексамерами с одинаковым способом укладки субъединиц (рисунок 11) [172], наблюдаемые различия в их активности и специфичности обусловлены, возможно, в первую очередь, различием в аминокислотной последовательности и количеством аминокислотных остатков: бактериальный фермент имеет 446 аминокислотных остатков [173], тогда как бычий фермент имеет 496 и более остатков [174].

Авторы, сравнивавшие бычий фермент с некоторыми бактериальными глутамат дегидрогеназами [175], показали, что основное отличие, ГДГ из печени быка и бактерий – это наличие у бычьего фермента своеобразной вставки из 48 аминокислот в районе 395 аминокислоты - «антенны», которая выходит из NADP-связывающего домена и особым образом связывает субъединицы фермента, что, возможно, отвечает за аллостерическую регуляцию бычьего фермента. У бактериальных ферментов субъединицы относительно автономны и не связаны антенной. Еще одно отличие ферментов - это глицин-богатый мотив (называемый Р1-Р6), который отвечает за специфичность к NADPH у всех ферментов и который у бактериального фермента имеет характерный поворот, а также меньший по размеру и не заряженный остаток Р7, который позволяет ферменту лучше взаимодействовать с аденозин-2'-фосфатом (частью молекулы кофактора NADP/NADPH) [172].



**Рисунок 11.** Структурные формулы молекул бактериальной глутаматдегидрогеназы и глутаматдегидрогеназы из печени быка (в 2 разных проекциях каждая). (а, б) – 3D-модель бактериальной ГДГ из *Proteus sp.*, построенная по аминокислотной последовательности из базы данных EMBL [173] с помощью сервиса swiss-model [176]; (в, г) – структурная формула ГДГ из печени быка, полученная методом рентгеноструктурного анализа, из базы данных PDB [174].

### 1.6.3. Аланинтрансминаза

Аланинтрансминаза (аланинамнотрансфераза, АЛТ) (КФ - 2.6.1.2) – фермент, катализирующий реакцию глутаминовой кислоты с пируватом с образованием  $\alpha$ -кетоглутарата и аланина (5):



где ПИР – пируват, а АЛА – аланин.

Коферментом в реакции является пиридоксальфосфат. Он присоединяется к лизиновому остатку фермента. Существуют две изоформы фермента – цитозольная и митохондриальная [177].

Молекулярная масса изоферментов различна: для АЛТ свиньи масса митохондриальной АЛТ составляет около 80 кДа [178], в то время как для цитозольной формы - 115-125 кДа [70]. В тканях овцы, свиньи и быка преобладает митохондриальная форма фермента. Аланинтрансминаза очень специфична к L-аланину. D-аланин – конкурентный ингибитор АЛТ по отношению к L-аланину. Максимальная активность АЛТ наблюдается в диапазоне рН от 7,5 до 8,5 (в комбинированном буфере глицин-Трис-НСl). Значения Км для субстратов и продуктов реакции представлены в таблице 6 [178].

**Таблица 6.** Значения констант Михаэлиса для субстратов и продуктов реакции, катализируемой митохондриальной аланинаминотрансферазой из тканей свиньи.

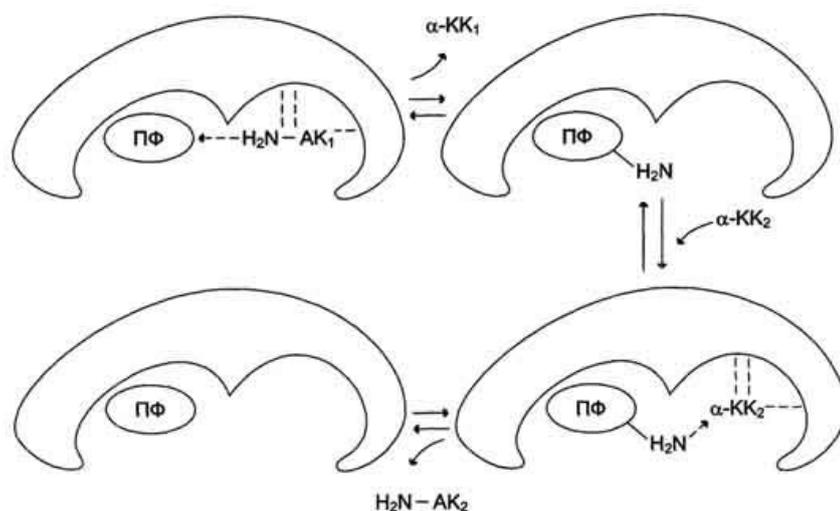
Субстрат	Км, мМ
L-аланин	2,0
Пируват	0,4
$\alpha$ -кетоглутарат	0,4
L-глутамат	32,0

*In vivo* цитозольная форма фермента может катализировать реакцию в обоих направлениях, тогда как митохондриальная катализирует только превращение аланина в пируват [179].

Механизм трансаминирования основан на принципе «пинг- понг» [118,180]. Во время процесса трансаминирования фермент существует в виде двух форм – пиридоксальфосфатной и пиридоксаминной (рисунок 12).

В ходе исследований ферментативной кинетики АЛТ [181] было показано, что при концентрации в 2 и 5 раз выше констант Михаэлиса аланин и глутамат, соответственно, проявляют ингибирующий эффект, а  $\alpha$ -кетоглутарат и пируват даже при концентрациях выше их Км в 100 раз такого эффекта не проявляют. Было установлено, что аминокислота-продукт является конкурентным ингибитором для

аминокислоты-субстрата, а глутаровая кислота – неконкурентный ингибитор относительно всех четырех субстратов, т.к. может соединяться как с пиридоксаль-, так и с пиридоксаминовой формой.



**Рисунок 12.** События в активном центре аминотрансферазы как пример механизма "пинг-понг". Пиридоксальфосфат (ПФ), связанный с ферментом, принимает  $\alpha$ -аминогруппу от первой аминокислоты ( $АК_1$ ), которая при этом превращается в  $\alpha$ -кетокислоту 1 ( $КК_1$ ) и высвобождается из активного центра фермента. Далее в активный центр фермента присоединяется  $\alpha$ -кетокислота 2 ( $КК_2$ ), которая забирает аминогруппу от кофермента и превращается в аминокислоту 2 ( $АК_2$ ) [118].

$\alpha$ -Аминоадипиновая кислота – первый высший гомолог глутаминовой кислоты, ингибирует трансаминирование аланина конкурентно. В более ранней работе [181] было показано, что пируват – конкурентный ингибитор как трансаминирования аланина, так и глутамата. Это явление подтверждает гипотезу, что не существует двух независимых центров связывания глутамата и аланина в фосфопиридоксальной форме фермента [182].

АЛТ присутствует в эритроцитах человека [183], где ее активность составляет от 0,022 МЕ/мл<sub>эп-тов</sub> [184] до 0,068 МЕ/мл<sub>эп-тов</sub> [185]. В некоторых работах сообщается о высокой активности АЛТ в нативных эритроцитах: 0,51 МЕ/мл<sub>эп-тов</sub> [17] и 0,25 МЕ/мл<sub>эп-тов</sub> [183].

В работах [186,187] было показано, что ГДГ и различные трансаминазы формируют комплексы. Существует специфическая активация ГДГ трансаминазой (АЛТ) из сердца свиньи, и аспаратаминотрансферазами (АСТ) из печени быка и

сердца свиньи. При образовании комплексов, трансаминазы соединяются предпочтительно с полимерными формами ГДГ. В опытах с ГДГ, АЛТ и АСТ было выяснено, что при работе ферментов не в комплексе, кетокислоты ингибируют дегидрогеназную реакцию, а комплексы двух ферментов (ГДГ+АЛТ, ГДГ+ АСТ) способствуют дегидрогенизации аминокислот, которые не реагируют с ГДГ. Эти дегидрогеназные реакции имеют место при низких концентрациях трансаминаз и не нуждаются в присутствии кетокислот. С другой стороны, было показано, что глутаматдегидрогеназа в присутствии NADPH и ионов аммония может реагировать с пиридоксальфосфатной формой трансаминазы и формировать пиридоксаминовую форму этого фермента, которая, в свою очередь, катализирует аминирование кетокислот. Эта реакция не опосредована присоединением какой-либо кето- или аминокислоты к ферменту. В ней трансаминаза не выступает как катализатор, она, по сути, доставляет пиридоксальфосфат к активному центру глутаматдегидрогеназы. Интересно, что в обычных условиях пиридоксальфосфат и пиридоксамин являются ингибиторами ГДГ [186,187].

## 2. ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Эритроцит-биореактор для удаления аммония (аммоцит) представляет собой эритроцит, внутри которого находится один или несколько ферментов, которые катализируют реакции превращения аммония в другие нетоксичные вещества. Скорость этих реакций зависит от нескольких факторов:

- от активности фермента, который катализирует реакцию превращения аммония;
- от концентраций субстратов, которые участвуют в этой реакции;
- от других биохимических и биофизических факторов, которые могут влиять на реакцию (ингибирование продуктами, pH, температура и т.д.).

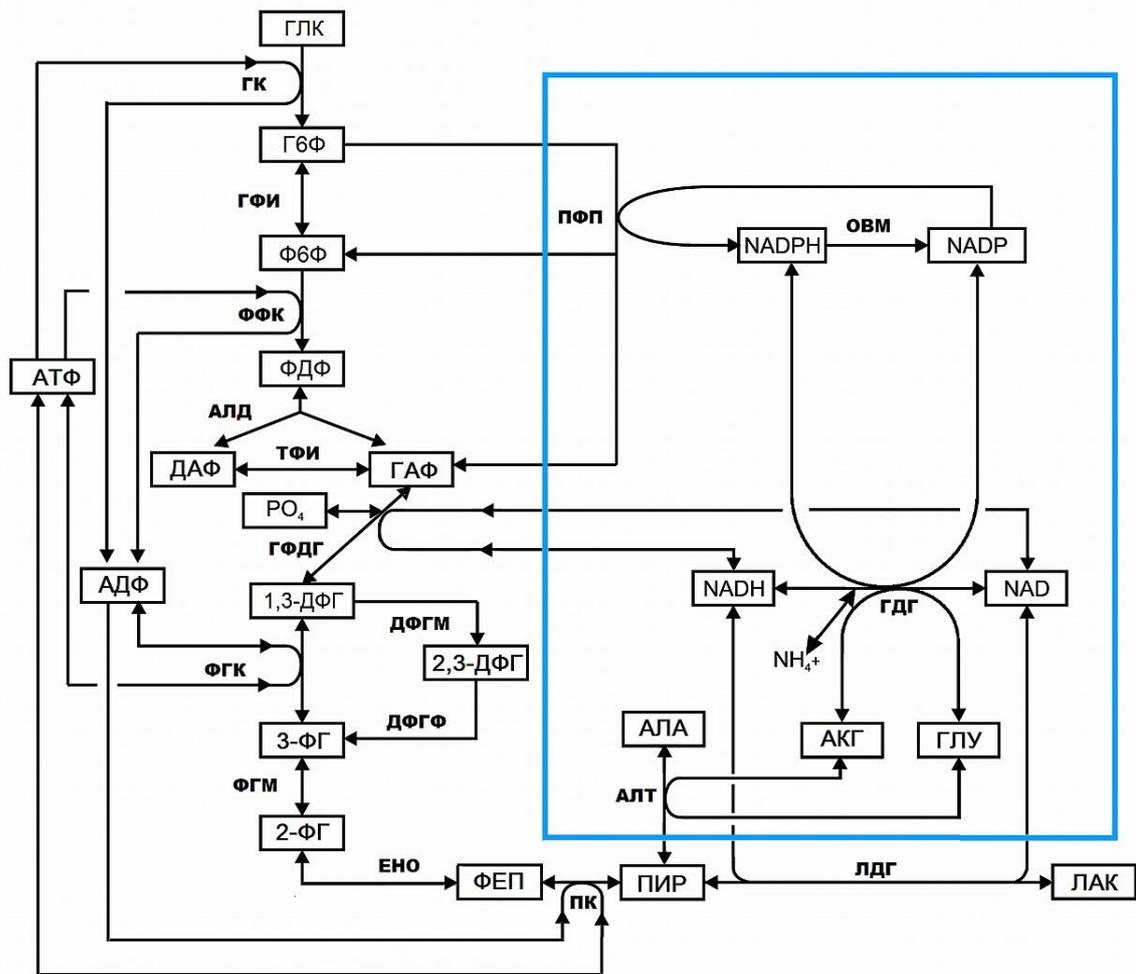
Концентрации субстратов, в свою очередь, определяются их содержанием внутри эритроцита в физиологических условиях, а также способностью проникать через мембрану эритроцита из плазмы. Важна также и проницаемость мембраны клетки для продуктов реакций, так как накопление осмотического материала в эритроците может привести к его лизису.

Соответственно, для непрерывной работы биореактора необходимо выбрать такие реакции, которые могут достаточно быстро протекать в физиологических условиях с использованием собственных метаболитов эритроцита, или субстратов, которые проникают в клетку из плазмы с достаточной скоростью. При этом активность фермента должна быть достаточной, чтобы обеспечить эффективное удаление аммония, и должна сохраняться как можно дольше.

Выше уже упоминалось о том, что попытки создания ЭБР для удаления из крови избыточного аммония предпринимались и ранее. Такие ЭБР были созданы на основе глутаминсинтетазы [17,148], а также глутаматдегидрогеназы [149–151]. Эти ЭБР были получены экспериментально методом обратимого гипоосмотического диализа (в диализных мешках). Была продемонстрирована их принципиальная способность снижать концентрацию аммония в системах *in vitro* и *in vivo*, однако работали эти биореакторы в кровотоке в течение короткого промежутка времени (не более чем 0,5-1 ч). Причины такого поведения в опубликованных статьях проанализированы не были. Только после того, как

подробный теоретический анализ функционирования этих и некоторых других аммоцитов был проведен в нашей работе [188] с использованием специально созданных математических моделей, стало ясно, что факторами, которые лимитируют эффективность и длительность работы ЭБР с глутаминсинтетазой и глутаматдегидрогеназой, являются концентрации субстратов - глутаминовой кислоты и  $\alpha$ -кетоглутарата, соответственно. Так как эти субстраты практически не проходят через мембрану эритроцита [184,189], их концентрации внутри клетки очень быстро исчерпываются. В результате обе реакции практически останавливаются. Равновесие в них сдвигается в сторону образования аммония. В этой же работе, на основании проведенного теоретического анализа, был предложен новый тип ЭБР, функционирование которого, как предполагалось, не должно зависеть от проницаемости клеточной мембраны для  $\alpha$ -кетоглутарата и глутаминовой кислоты. Теоретически это достигалось тем, что в эритроцит надо было совместно включить 2 фермента – глутаматдегидрогеназу (реакция (4)) и аланинаминотрансферазу (реакция (5))

Общая схема реакций гликолиза и ферментов, включенных в такие ЭБР, представлена на рисунок 13. В результате ГДГ реакции (4) АКГ расходуется, но образуется глутаминовая кислота, которая является субстратом АЛТ реакции (5), в которой снова образуется  $\alpha$ -кетоглутарат. Таким образом, АКГ и ГЛУ потребляются и вновь синтезируются внутри такого ЭБР циклически. Это обеспечивает независимость системы от транспорта данных метаболитов в эритроциты. Субстратом, который может лимитировать потребление аммиака в этой системе, является пируват. Он может поступать в эритроцит двумя путями – вырабатываться в качестве продукта гликолиза самим эритроцитом, а также производиться другими клетками и пассивно транспортироваться в эритроцит из плазмы крови по градиенту концентрации. Скорость производства пирувата в гликолизе зависит, в первую очередь, от энергетического заряда клетки и не подвержена влиянию со стороны встраиваемой системы ферментов. Скорость транспорта пирувата из плазмы зависит от проницаемости мембраны эритроцита



**Рисунок 13.** Реакции гликолиза и встроенных в эритроцит ферментов в ЭБР, содержащих ГДГ+АЛТ. Сокращения: ГЛК - глюкоза; Г6Ф - глюкозо-6-фосфат; Ф6Ф - фруктозо-6-фосфат; ФДФ - фруктозо-1,6-дифосфат; ДАФ - дигидроксиацетонфосфат; ГАФ - глицеральдегидфосфат; 1,3-ДФГ - 1,3-дифосфоглицерат; 2,3-ДФГ - 2,3-дифосфоглицерат; 3-ФГ - 3-фосфоглицерат; 2-ФГ - 2-фосфоглицерат; ФЕП - фосфоенолпируват; NAD - никотинамидадениндинуклеотид; NADP - никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ПИР - пируват; ЛАК - лактат; ГЛУ - глутаминовая кислота; АКГ -  $\alpha$ -кетоглутарат; АЛА - аланин; АТФ - аденозинтрифосфат; АДФ - аденозиндифосфат;  $PO_4$  - неорганический фосфат; ГК - гексокиназа; ГФИ - глюкозо-6-фосфатизомераза; ФФК - фосфофруктокиназа; АЛД - альдолаза; ТФИ - триозофосфатизомераза; ФГК - фосфоглицераткиназа; ГФДГ - глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; ФГМ - фосфоглицератмутаза; ДФГМ - дифосфоглицератмутаза; ДФГФ - дифосфоглицератфосфатаза; ЕНО - енолаза; РК - пируваткиназа; ЛДГ - лактатдегидрогеназа;  $NH_4^+$  - ион аммония; ГДГ - глутаматдегидрогеназа; АЛТ - аланинаминотрансфераза; ПФП - пентозофосфатный путь; ОВМ - окислительно-восстановительный метаболизм.

для пирувата и от разности его концентраций внутри клетки и в плазме крови. Концентрация пирувата в плазме достаточно высока (350 мкМ [190]), и он достаточно быстро проходит через мембрану эритроцита [191]. Расчеты показали [188], что при физиологических условиях максимальная скорость, с которой такие аммоциты могут убирать аммоний из кровотока, составляет 4,5-6 ммоль/ч $\times$ л<sub>ЭБР</sub>. Образующийся в результате этих реакций аланин также достаточно хорошо проникает через клеточную мембрану, поэтому не будет накапливаться в клетке и нарушать её осмотический баланс [192].

С точки зрения получения ЭБР, способных работать в организме длительное время, предложенный вариант аммоцитов может быть очень перспективным. Однако данные ЭБР никогда не были получены экспериментально.

Таким образом, первой задачей настоящей работы было получить ЭБР, содержащие совместно включенные в эритроцит ГДГ и АЛТ, и проверить эффективность их работы по утилизации аммония *in vitro* и *in vivo*.

Как уже было сказано выше, помимо доступности субстратов для реакций, важной является также активность ферментов, катализирующих эти реакции, включенная в эритроцит. Эта активность зависит от специфической активности используемого препарата фермента и от эффективности включения этого фермента в эритроцит, то есть процента его инкапсуляции.

Во всех ранее опубликованных работах в эритроциты загружали ГДГ из печени быка, а для включения ее в клетки был использован метод обратимого гипоосмотического диализа в диализных мешках. В этих условиях удавалось включить в клетки только 1,9-3,8% от всего присутствующего в системе фермента [149,150]. Такая низкая доля включения препарата обусловлена его большой молекулярной массой (332 кДа, ГДГ – один из самых больших белков, который включали в эритроциты) [1, 69], малой удельной активностью коммерческого препарата ГДГ из печени быка (примерно 40 МЕ/мг белка), а также его способностью обратимо агрегировать при уменьшении ионной силы раствора или увеличении концентрации ферментного белка в суспензии (в области от 0,1 до 4 мг/мл) [151,161,193,194]. Специфическая активность фермента не зависит от степени его агрегации [161,194], но увеличение размеров агрегатов молекул

фермента препятствует их входу в эритроциты через поры, возникающие в мембране клетки в условиях гипоосмотического стресса [151]. Для АЛТ, которая имеет меньшую молекулярную массу (115-125 кДа) [70] и, по-видимому, не агрегирует при увеличении концентрации фермента в системе, подобная проблема отсутствует. Таким образом, чтобы обеспечить возможность реального использования ЭБР для удаления аммония из крови пациентов, необходимо не только включить в клетки оптимальную ферментативную систему (ГДГ и АЛТ), надо также повысить в них активность основного фермента, перерабатывающего аммоний, т.е. активность ГДГ. Поэтому второй задачей данной работы являлось повышение в эритроцитах активности включенной ГДГ. Поскольку наиболее оптимальными методами включения ферментов в эритроциты на сегодняшний день считаются гипоосмотические методы [96], для решения этой задачи надо было сравнить различные гипоосмотические методы включения препарата и выбрать наиболее эффективный. Еще одной возможностью повысить внутри эритроцита активность включенной ГДГ, может быть использование для инкапсуляции препарата другого фермента, имеющего более высокую удельную активность. С этой целью было проведено сравнение обычно применяемого препарата ГДГ из печени быка и препарата бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* Этот препарат имел большую удельную активность, но основным его преимуществом, как предполагалось, должно было стать отсутствие агрегации при повышении концентрации в суспензии.

Таким образом, решение всех задач, поставленных в ходе данной работы, направлено на получение более эффективных ЭБР, способных убирать аммоний из кровотока.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3.1. Материалы

В работе были использованы L-глутаматдегидрогеназа (1.4.1.2) из печени быка, тип I (в суспензии 2 М сульфата аммония) или тип II (в буфере, содержащем 50% глицерина, 50 мМ фосфата калия (pH 7,2), 1 мМ ЭДТА, 2 мМ меркаптоэтанола) и L-глутаматдегидрогеназа из *Proteus sp.* (водный раствор), аланинаминотрансфераза (2.6.1.2) из сердца свиньи (в суспензии 1,8 М сульфата аммония и в сухом виде), а также лактатдегидрогеназа (1.1.1.27) из мышц кролика (в суспензии 3,2 М сульфата аммония) фирмы Sigma-Aldrich (USA). Глюкоза, аденин, инозин, аланин, АТФ, пиридоксальфосфат, пируват натрия и  $\alpha$ -кетоглутарат,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$ , NADH, NADPH, сухой PBS в виде таблеток, содержащий после растворения 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl и 10 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), сапонин, бычий сывороточный альбумин (BSA) также были приобретены в фирме Sigma-Aldrich (USA). В работе были использованы  $NH_4Cl$ , KCl, NaCl фирмы AppliChem (Германия), этиленгликоль-бис-( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота (ЭГТА) фирмы Serva (Германия) и ампициллин (лиофилизат) фирмы Синтез (Россия). Остальные реактивы (Реахим, Россия) были максимальной доступной степени чистоты. В работе были использованы диализные мешки на основе целлюлозных полупроницаемых мембран с уровнем отсечения примерно 12-15 кДа (Cellusep T3, Membrane Filtration Products, Inc., Seguin, TX, USA или Dialysis Tubing Cellulose Membrane D9777-100 FT Sigma-Aldrich, USA), волокна диализатора HF80S фирмы Fresenius (Германия), термоусадочные трубки фирмы Рексант (Россия), герметик «Силагерм 6080» фирмы ПО Технология-Пласт (Россия).

#### 3.2. Выделение эритроцитов

Кровь здоровых доноров забирали путём пункции локтевой вены в стандартные вакуумные пробирки фирмы Vacuette, содержащие 3.2% (0,109 М) цитрат натрия. Соотношение цитрат : кровь составляло 1 : 9. Эритроциты осаждали

путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин. Плазму и лейкотромбослой удаляли, а осевшие эритроциты отмывали три раза в четырехкратном объеме раствора PBS с последующим центрифугированием в течение 8 мин при 1000 g.

### **3.3. Включение глутаматдегидрогеназы из печени быка в эритроциты методом обратимого гипоосмотического лизиса**

Процедуру включения проводили по методике, описанной в работе [195] с некоторыми изменениями.

ГДГ из печени быка (тип I, 50 МЕ/мг, 11 мг/мл, в 2 М сульфате аммония, pH 7,0) отделяли от сульфата аммония путем центрифугирования при 13000 g в течение 10 мин. Исходный объем фермента восстанавливали, добавляя буфер для ресуспендирования (5 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7.4). Полученный фермент добавляли к суспензии эритроцитов с гематокритом  $83 \pm 2\%$  (к 100 мкл суспензии добавляли 10,5 мкл раствора фермента). Чтобы провести процедуру включения фермента при трех различных осмоляльностях, к 110,5 мкл суспензии эритроцитов с ГДГ добавляли по 400 мкл гипоосмотического раствора, содержащего 5 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,4, 1,5 мМ АТФ, 2 мМ  $MgCl_2$ , 5 мМ глюкозы, который имел суммарную осмоляльность 18 мОсм/кг. Растворы с большей осмоляльностью (50 и 75 мОсм/кг) получали путём добавления в исходный гипотонический раствор NaCl в соответствующих концентрациях. Конечная осмоляльность суспензий с гипоосмотическими растворами составляла 75, 100 и 120 мОсм/кг. Смесь инкубировали при 4°C в течение 3 мин. После этого добавляли запечатывающий раствор (1 М NaCl, 50 мМ калий-фосфатного буфера, 5 мМ АТФ, 50 мМ глюкозы, 50 мМ пирувата натрия, 2170 мОсм/кг, pH 7,4) в объеме 50 мкл, чтобы конечная осмоляльность суспензии составляла около 350 мОсм/кг, и инкубировали суспензию 30 мин при 37°C. Полученные аммоциты отмывали в растворе PBS три раза путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин.

### **3.4. Включение ферментов (ГДГ или ГДГ совместно с АЛТ) в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа**

Процедуру включения тандема ферментов ГДГ и АЛТ в эритроциты проводили при двух различных концентрациях запечатываемых ферментов в исходной суспензии эритроцитов.

В первом варианте совместного включения ГДГ и АЛТ (n=9) гематокрит суспензии исходных отмытых эритроцитов доводили до 70%, добавляя PBS. К 625 мкл дистиллированной H<sub>2</sub>O добавляли 20 мкл исходной суспензии ГДГ (тип II) и 10 мкл исходной суспензии АЛТ (осмоляльность полученного раствора смеси ферментов составляла ~ 300 мОсм/кг). Полученную смесь ферментов (655 мкл) добавляли к 1 мл суспензии исходных эритроцитов (с гематокритом (Ht) 70%). Конечный Ht полученной суспензии составлял ~ 42%, активности ферментов в этой суспензии были равны 10 МЕ/мл<sub>сусп</sub> и 5 МЕ/мл<sub>сусп</sub> для ГДГ и АЛТ, соответственно.

Во втором варианте диализа (n=10) исходные ферменты (ГДГ тип I и АЛТ), которые хранились в 2 М и 1,8 М растворе сульфата аммония, соответственно, были предварительно подвергнуты процедуре удаления избыточной соли. Для этого проводили диализ препаратов против дистиллированной воды в течение 1 ч при 4°C. Затем приготовленные растворы ферментов добавляли к 4 мл суспензии отмытых эритроцитов с гематокритом 83% (до финальной активности каждого фермента 50 МЕ/мл<sub>сусп</sub>). Объемы финальных смесей суспензии и ферментов несколько варьировали, и гематокрит в них в среднем составлял 58±12% (среднее ± SD).

При включении ГДГ без АЛТ (n=7) к 630 мкл дистиллированной воды добавляли 20 мкл исходного фермента L-глутаматдегидрогеназы из печени быка (тип II, концентрация 21 мг/мл, удельная активность 42 МЕ/мг в буфере с 50% глицерина). Полученную смесь добавляли к 1 мл суспензии отмытых эритроцитов с гематокритом 70%. Конечный Ht полученной суспензии составлял 42%, активность ГДГ в этой суспензии была равна примерно 10 МЕ/мл<sub>сусп</sub>.

Проведение всех последующих процедур совпадало для всех вариантов метода. Полученные смеси диализировали в мешках в течение 1 часа при 4°C

против гипоосмотического раствора. В первом варианте включения тандема ферментов и при включении одиночной ГДГ этот раствор содержал 2 мМ натрий фосфатного буфера (рН 7,4), 0,5 мМ КСl, 27 мМ NaCl и имел суммарную осмоляльность 60-65 мОсм/кг; во втором варианте включения ГДГ+АЛТ состав был дополнен 20 мМ глюкозы и суммарная осмоляльность составляла 70-75 мОсм/кг.

Растворы с большей осмоляльностью получали путём добавления в исходный гипотонический раствор NaCl в соответствующих концентрациях. Соотношение объемов суспензии и диализирующего буфера составляло 1:100.

После диализа суспензию извлекали из диализного мешка, помещали в пробирку и при включении тандема ферментов добавляли к ней NADH и кофактор АЛТ пиридоксаль-5'-фосфат до конечных концентраций 0,3 мМ и 0,2 мМ, соответственно. После перемешивания полученной суспензии к ней добавляли гиперосмотический раствор (с осмоляльностью 1020 мОсм/кг) в количестве 1/3 от объема диализированной суспензии, содержащий 30 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 мМ инозина, 1,5 мМ аденина, 8,4 мМ глюкозы, 1,5 мМ натриевой соли пирувата, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 55 мМ NaCl и 458 мМ КСl (рН 7,4). Инкубировали суспензию при 37°C 30 мин и отмывали полученные аммоциты в растворе PBS три раза путем центрифугирования в течение 8 мин при 1000 g.

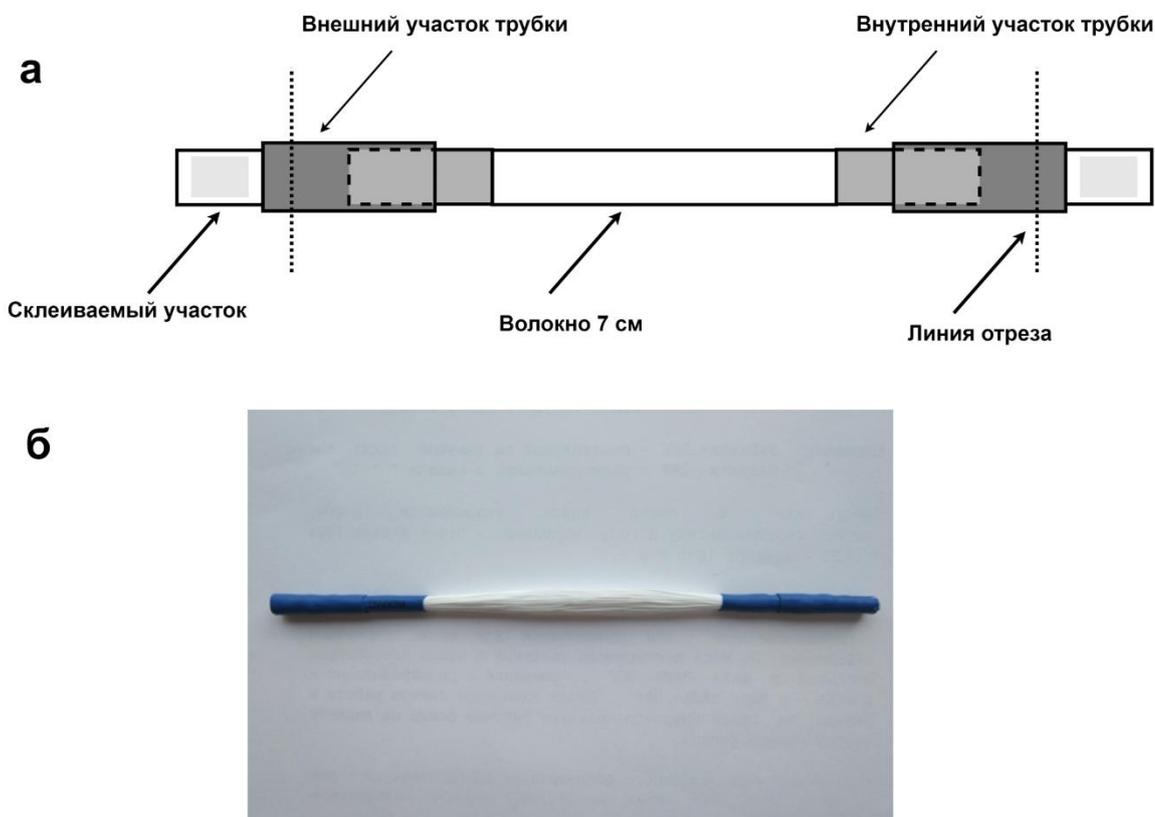
В ходе эксперимента измеряли гематокрит и активность каждого из ферментов в исходной суспензии клеток с добавленными ферментами (до процедуры диализа), а также в финальной суспензии полученных ЭБР.

### **3.5. Метод проточного диализа**

Принцип метода проточного гипоосмотического диализа состоит в том, что суспензию отмытых эритроцитов пропускают по внутреннему контуру диализатора (внутри его полупроницаемых волокон), который снаружи омывается гипоосмотическим раствором. С целью экономии материалов и реактивов, для исследования эффективности включения ГДГ в эритроциты методом проточного гипоосмотического диализа были сконструированы диализаторы малого объема [196].

### 3.5.1. Изготовление диализатора малого объема и проверка его на герметичность

Схема и фотография разработанного малого диализатора приведены на рисунок 14.

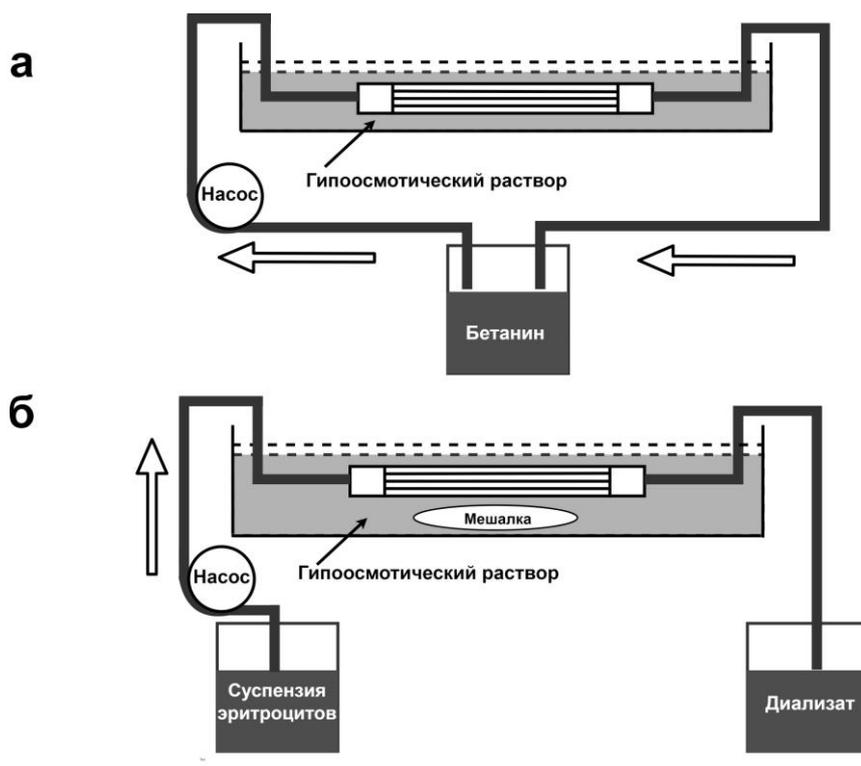


**Рисунок 14.** Схема устройства диализатора малого объема (а) и его фотография (б).

Для сборки малого диализатора из стандартного диализатора Fresenius HF 80S вырезали пучок полупроницаемых диализных волокон Fresenius Polysulfon длиной 16 см (толщина волокна 30-35 мкм, диаметр пор 5-8 нм, диаметр волокна примерно 200 мкм). Волокна взвешивали на весах. Масса пучка должна составлять 0,237-0,240 г, что соответствует примерно 450-455 волокнам. Массовый коэффициент на единицу длины одного волокна составляет  $2,92 \times 10^{-5}$  г/см. Для фиксации волокон на них насаживали четыре отрезка трубки из термоусадочного материала диаметром 7 мм. Два отрезка длиной 15 мм ближе к центру диализатора (внутренние) и два отрезка длиной 25 мм по краям (внешние). Внутренние фрагменты насаженных трубок сдвигали на расстояние 7 см (это рабочая длина диализатора) и нагревали

техническим феном (Hazan HS 60S) до 125°C для термоусадки. На концевые участки пучка волокон наносили двухкомпонентный полиуретановый клей «Силагерм 6080» (1 часть основной пасты полиуретана смешанная с 2 частями соответствующего отвердителя (4-метилфенилен-1,3-диизоцианата)) так, чтобы заполнить все пространство между волокнами. На промазанные клеем участки сдвигали внешние насаженные трубки таким образом, чтобы они перекрывали внутренние трубки на 10 мм, и прогревали их для термоусадки. Высыхание клея происходило за 12-24 ч. Края внешних трубок отрезали вместе с излишками отвердевшего клея. На концы диализатора плотно насаживали трубки с внутренним диаметром 4,5 мм, заканчивающиеся люеровским разъемом с наружным конусом (male luer). Объем собранного диализатора составлял 0,85-1 мл.

Для проверки готового диализатора на герметичность (рисунок 15а) его помещали



**Рисунок 15.** Схема проверки диализатора на герметичность (а) и проведения процедуры гипоосмотического диализа суспензии (б).

в кювету с раствором 0,9% NaCl и фиксировали таким образом, чтобы он находился в полностью погруженном состоянии. Диализатор был соединен с трубками люер-коннекторами. Через конструкцию сначала прокачивали воздух, чтобы исключить наличие пузырей, выходящих у стыков диализатора с ПВХ-трубками контура. Затем в течение 2 мин через диализатор прокачивали со скоростью 1,5 мл/мин нагретый до температуры 50-70°C 0,05% раствор бетанина (красного пищевого красителя E-162 не окрашивающего волокна диализатора). Наблюдали за появлением красной окраски в объеме внешнего буфера, которая свидетельствовала об отсутствии герметичности собранного диализатора. Диализаторы с обнаруженными дефектами для работы не использовали. После пропускания красителя, в контур запускали физиологический раствор и прокачивали его на максимально доступной скорости насоса в течение 10 мин с целью полностью отмыть пропущенный через диализатор бетанин.

### **3.5.2. Проведение процедуры проточного диализа в диализаторе малого объема**

ГДГ из печени быка (тип I, 50 МЕ/мг, 11 мг/мл, в 2 М сульфате аммония, pH 7,0) отделяли от сульфата аммония путем центрифугирования при 13000 g в течение 10 мин. Исходный объем фермента восстанавливали, добавляя буфер для ресуспендирования (5 мМ  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 7,4). Полученный фермент в объеме 60 мкл добавляли к 2 мл суспензии отмытых эритроцитов с гематокритом 70%.

При включении в эритроциты ГДГ из *Proteus sp.* (NADP-зависимая, 413 МЕ/мг, 19 мг/мл, водный раствор) фермент добавляли к 2 мл суспензии отмытых эритроцитов с гематокритом 70% либо в виде исходного неразведенного раствора (в объеме 3,8 мкл), либо в виде раствора, разведенного в PBS в 10 раз (в объеме 38 мкл). При исследовании зависимости эффективности включения фермента от его исходной концентрации в суспензии, в образцы добавляли различные объемы исходного фермента.

Полученные смеси пропускали через малый диализатор (волокна Fresenius Polysulfon диаметром 200 мкм и длиной 10 см), который был погружен в перемешиваемый гипосмотический раствор (5 мМ  $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ , 2 мМ  $MgCl_2$ , 5

мМ глюкозы, рН 7,4) на минимальной скорости насоса - 0,2 мл/мин (рисунок 15б). Соотношение объемов суспензия : раствор составляло 1 к 100. Полное время прохождения смеси через диализатор составляло около 10 мин. В полученный диализат добавляли запечатывающий раствор (1 М NaCl, 50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 мМ АТР, 50 мМ глюкозы, 50 мМ пирувата натрия, рН 7,4, 2170 мОсм/кг) таким образом, чтобы конечная осмоляльность суспензии составляла 350-400 мОсм/кг. Расчёт добавки ( $V_{\text{гипер. раствора}}$  (в мл)) проводили по формуле (6):

$$V_{\text{гипер. раствора}} = V_{\text{диализата}} \times (350 - S_{\text{диализата}}) / (2170 - 350) \quad (6),$$

где  $S_{\text{диализата}}$  – это осмоляльность диализата, которую считали равной осмоляльности гипосмотического раствора (в мОсм/кг), 350 – конечная желаемая осмоляльность полученной суспензии (в мОсм/кг), 2170 – осмоляльность гиперосмотического раствора (в мОсм/кг),  $V_{\text{диализата}}$  – измеренный объем полученного диализата (в мл).

После этого суспензию инкубировали 30 мин при 37°C и полученные аммоциты отмывали в растворе PBS три раза путем центрифугирования при 1000 g в течение 8 мин.

### 3.6. Измерение активности ферментов в эритроцитах

Для измерения активности ферментов, включенных в эритроциты, полученные ЭБР были лизированы путем добавления лизирующего буфера (50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,15 мМ ЭГТА, 0,2% сапонин, рН 7,4) в объемном соотношении клетки : лизирующий раствор 1 : 19.

Активность ГДГ и АЛТ в лизатах измеряли спектрофотометрически на микропланшетном фотометрическом ридере Anthos Zenyth 340rt (Biochrom, England) на длине волны  $\lambda=340$  нм.

Активность ГДГ из печени быка измеряли согласно Маккарти и Типтону [197] с некоторыми модификациями. К 320 мкл 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,16 мМ NADH добавляли 10 мкл пробы (лизата) и смесь инкубировали 10 мин при 30°C. После этого в каждую ячейку планшета добавляли

10 мкл 3,4 М раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и запускали реакцию добавлением 0,8 М раствора  $\alpha$ -кетоглутарата до конечной концентрации 5 мМ. Суммарный объем смеси в ячейке при измерении составлял 340 мкл.

Активность ГДГ из *Proteus sp.* измеряли согласно методике, предложенной производителем (Sigma-Aldrich, USA), но не при оптимальном pH 8,5, а при pH 7,4, при котором этот фермент будет реально работать в эритроцитах. При этом к 330 мкл среды, содержащей 220 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7,6 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата, 0,25 мМ NADPH, 85 мМ Трис-НСl (pH 7,4), предварительно проинкубированной 5 мин при 30°C, добавляли 10 мкл пробы (лизата) и запускали измерение.

Активность АЛТ измеряли согласно методике, описанной в работе [198] Реакционную смесь, содержащую 100 мМ Трис-НСl буфера (pH 7,4), 500 мМ аланина, 0,1 мМ пиридоксаль-5'-фосфата, 0,18 мМ NADH и 1,2 МЕ/мл лактатдегидрогеназы (ЛДГ), инкубировали в течение 10 мин при 30°C. Реакцию запускали добавлением  $\alpha$ -кетоглутарата до конечной концентрации 15 мМ. Суммарный объем реакционной смеси в ячейке при измерении составлял 340 мкл.

### **3.7. Расчет процента инкапсуляции ферментов и выхода клеток после процедуры включения**

Параметрами для оценки эффективности процедуры включения фермента в эритроциты в работе служили процент инкапсуляции (процент фермента, оказавшийся в эритроцитах после окончания процедуры) и выход клеток (процент клеток, выживших после процедуры). Эти показатели были рассчитаны по формулам (7, 8):

$$\text{Выход клеток (С, \%)} = V_{\text{конеч}} \times Ht_{\text{конеч}} \times 100 / (V_{\text{исх}} \times Ht_{\text{исх}}) \quad (7),$$

$$\text{Инкапсуляция (Е, \%)} = A_{\text{конеч}} \times V_{\text{конеч}} \times 100 / (A_{\text{исх}} \times V_{\text{исх}}) \quad (8),$$

где  $A_{\text{исх}}$  и  $A_{\text{конеч}}$  – активности фермента в исходной суспензии эритроцитов до процедуры и конечной суспензии фармакоцитов с включенной ГДГ,

соответственно,  $V_{исх}$  и  $V_{конеч}$  – объемы, а  $Ht_{исх}$  и  $Ht_{конеч}$  — гематокриты этих суспензий, соответственно.

### **3.8. Измерение убыли аммония в буферной среде *in vitro*, содержащей ферменты (ГДГ+АЛТ) в свободном или включенном в ЭБР виде**

Измерение концентрации аммония в среде проводили с помощью ион-селективного аммониевого электрода «Элит 2000» (Нико Аналит, Москва, Россия) и мультиметра Мультитест ИПЛ 112 (СЕМИКО, Новосибирск, Россия), который был предварительно откалиброван путем последовательного внесения добавок 100 мМ раствора  $NH_4Cl$  до конечных концентраций в диапазоне 0,05-0,5 мМ в измерительный буфер (рН 7,4), содержащий 130 мМ фосфата натрия, 2,7 мМ  $KCl$ , 10 мМ глюкозы и 10 мМ пирувата натрия.

При измерении скорости убыли аммония суммарный объем образца в герметично закрытой кювете составлял 10 мл. Измерения были проведены при комнатной температуре в течение 60-90 мин с интервалами в 10 сек.

При работе с ЭБР, содержащими ГДГ и АЛТ, финальные активности ферментов в кювете составляли в среднем  $0,103 \pm 0,006$  и  $0,283 \pm 0,005$  МЕ/мл суспензии для ГДГ и АЛТ, соответственно (n=3). В измерительную кювету помещали буферный раствор (рН 7,4), содержащий 130 мМ фосфата натрия, 10 мМ глюкозы, 2,7 мМ  $KCl$ , 0,2 мМ  $\alpha$ -кетоглутарата, 10 мМ пирувата натрия, 0,5 мМ  $NH_4Cl$  и полученную суспензию ЭБР (до гематокрита в образце 8-10%). В контрольных экспериментах были использованы нативные эритроциты (без включенных ферментов) (n=4).

Измерение убыли аммония в буферной среде *in vitro* (в отсутствии ЭБР) проводили по описанной выше методике, но вместо суспензии ЭБР в среду добавляли растворы ферментов ГДГ (в 50% растворе глицерина) и АЛТ (в 0,2 М Tris-HCl). Конечная активность ГДГ и АЛТ в кювете для измерения составляла 0,3 МЕ/мл и 1,5 МЕ/мл, соответственно. В пробу добавляли также NADH и пиридоксальфосфат до конечных концентраций 1 мМ и 0,1 мМ соответственно.

### 3.9. Модель гипераммониемии на мышах

Функциональная активность ЭБР с ГДГ и АЛТ была тестирована *in vivo* в модели индуцированной гипераммониемии на мышах. Содержание и условия работы с животными строго соответствовали международным требованиям [199]. Были предприняты все возможные усилия, чтобы минимизировать страдание. Были использованы мыши самцы линии Swiss весом 25-30 г (виварий Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино). Аммоциты были получены с помощью метода обратимого гипоосмотического диализа, описанного выше, из смешанной крови, полученной после декапитации части животных. Активности каждого из ферментов (ГДГ и АЛТ) в суспензии эритроцитов при загрузке были равны 50 МЕ/мл<sub>суспензии</sub> (финальный Ht суспензии составлял 65%). Диализ был проведен в течение 2 ч при осмоляльности гипоосмотического буфера 60-65 мОсм/кг при 4°C. Процедуры для запечатывания и отмывки полученных ЭБР были стандартные. Показано, что процент включения обоих ферментов в клетки был незначительный. Средняя удельная активность ферментов, включенных в ЭБР, была равна (среднее  $\pm$  SEM) 1,313 $\pm$ 0,106 и 1,612 $\pm$ 0,197 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub> для ГДГ и АЛТ, соответственно (n=12). Активность этих ферментов не детектировалась в супернатанте, полученном после последнего отмывания ЭБР, и на внешней стороне мембраны аммоцитов, что указывало на то, что ферменты находились внутри клеток. Разработанный метод включения позволял получить 50-70% клеток, которые практически не отличались от исходных нативных эритроцитов по своим биохимическим параметрам.

Чтобы определить функциональную активность аммоцитов *in vivo*, они были разбавлены в 2 раза физиологическим раствором (конечный Ht составлял в среднем 33,75%), содержащим дополнительно 5 мМ глюкозы, и введены в объеме 0,4 мл в хвостовую вену мышей весом 30 гр. Финальный гематокрит аммоцитов в крови мышей составлял примерно 5,4%. Немедленно после этого мышам вводили раствор ацетата аммония в дозе 2,5 ммоль/кг, что приводило к быстрому увеличению концентрации аммония в крови до примерно 1,1-1,2 мМ. Эта концентрация не вызывала у животных изменения поведенческих реакций (полностью летальная доза аммония (LD<sub>100</sub>) для мышей составляет 12 ммоль/кг). Кровь для анализа на

содержание аммония отбирали из ретроорбитального синуса через 5, 30, 60 и 120 мин после введения ацетата аммония, что позволяло определить динамику изменения этой концентрации в крови каждого животного. Аммоний в образцах был определен с помощью микрофлюориметрического метода с использованием ГДГ реакции, т.е. по снижению флюоресценции NADH в реакции  $\alpha$ -кетоглутарата с аммонием, сопряженной с реакцией окисления NADH ( $\lambda_{\text{возбуждения}}=340$  нм,  $\lambda_{\text{испускания}}=450$  нм) [200].

В качестве контроля были использованы животные, которые получили вместо аммоцитов эритроциты, прошедшие все стадии процедуры инкапсуляции, но без введения ферментов.

### **3.10. Хранение эритроцитов–биореакторов**

В этих экспериментах были использованы ЭБР, полученные с помощью первого варианта процедуры включения (т.е. при исходных концентрациях ГДГ и АЛТ в суспензии эритроцитов до диализа равных 10 МЕ/мл<sub>сусп</sub> и 5 МЕ/мл<sub>сусп</sub>, соответственно). Для проверки изменения качества клеток в ходе длительного хранения, исходные нативные эритроциты и полученные ЭБР ресуспендировали до гематокрита 10% в растворе, содержащем 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ глюкозы, 5% (по массе) BSA, 30 мМ HEPES, 0,28 мМ аденина и 0,02 мг/мл ампициллина (рН 7,4). Суспензии хранили при 4°C. На разных сроках хранения проверяли осмотическую резистентность, эритроцитарные индексы клеток, активность ферментов внутри эритроцитов и уровень гемолиза в суспензии.

### **3.11. Измерение эритроцитарных индексов**

Эритроцитарные индексы (средний объем эритроцита (MCV, в фл), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH, в пг) и средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC, в г/л)) исходных нативных эритроцитов, контрольных эритроцитов, полученных методом гипоосмотического диализа, которые прошли все стадии процедуры, но в отсутствии включенных ферментов, а

также полученных разными методами аммоцитов были измерены с помощью автоматического гематологического анализатора Micros OT (ABX-France, France).

### 3.12. Измерение осмотической резистентности клеток

Измерения проводили по методике Щербаченко [201]. В лунки 96-луночного планшета вносили по 300 мкл гипоосмотических растворов различной осмоляльности (от 0 (дистиллированная вода) до 297 мОсм/кг, pH 7,4). В каждую лунку добавляли по 6 мкл пробы (суспензии эритроцитов, разбавленной в PBS до гематокрита 5%) и инкубировали смеси 30 мин при комнатной температуре. Затем тоничность растворов возвращали к норме, добавляя в каждую лунку по 40 мкл гипертонического раствора, содержащего 96,2 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15,6 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,54 М NaCl (pH 7,4). Измерение оптической плотности (поглощения) проб проводили на длине волны 620 нм на планшетном фотометрическом ридере Anthos Zenyth 340rt (Biochrom, England). Процент незлизированных клеток определяли как отношение (в %) оптической плотности, измеренной в конкретной пробе, к оптической плотности той же пробы при нулевом лизисе (в растворе с физиологической осмоляльностью). Величину осмотической резистентности характеризовали значением осмоляльности раствора, при которой 50% исходных клеток было лизировано (H<sub>50</sub>), а также шириной распределения клеток по осмотической резистентности (W), т.е. величиной разности осмоляльностей растворов, при которых наблюдали лизис 10 и 90% клеток.

### 3.13. Измерение гемолиза эритроцитов

Для оценки спонтанного гемолиза отбирали пробы из суспензий с Ht 10% и из надосадков этих суспензий, полученных путем центрифугирования образца 8 минут при 1000 g. Измерения оптической плотности гемоглобина проводили на длине волны 415 нм на спектрофотометре Cary 100 фирмы Varian (США). Суспензии разводили в воде в 1000 раз, а надосадки в 10 раз.

Гемолиз рассчитывали по формуле (9), учитывая разведение:

$$G = [(1 - Ht_{\text{сусп}}) \times (OD_{\text{надосадка}} / OD_{\text{сусп}})] \times 100 \quad (9),$$

где  $G$  –гемолиз (в %),  $Ht_{\text{сусп}}$  – гематокрит суспензии,  $OD_{\text{сусп}}$  и  $OD_{\text{надосадка}}$  – оптическая плотность гемоглобина в суспензии и надосадке, соответственно.

### **3.14. Измерение осмоляльности растворов**

Осмоляльность растворов измеряли на осмометре ОСКР-1 М фирмы КИВИ Осмометрия (Санкт-Петербург, Россия).

### **3.15. Микроскопия в дифференциально-интерференционном контрасте (конфокальная микроскопия)**

Форму исходных эритроцитов, а также контрольных эритроцитов (без включенных ферментов, но прошедших все стадии процесса обработки клеток, использующиеся в ходе различных гипоосмотических методов включения и последующего запечатывания клеток) исследовали с помощью конфокальной микроскопии (в капле). Для этого клетки были фиксированы в растворе 2,5% глутарового альдегида в PBS (pH 7,4) не менее часа. Фотографии получены с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss, Йена, Германия), иммерсионный объектив 100x, 1,3 NA, камера QuantEm 512sc.

### **3.16. Статистический анализ данных**

Распределения всех измеренных параметров согласно тесту Д'Агостино-Пирсона были нормальными (MedCalc Statistical Software, version 14.12, Belgium). Все экспериментальные результаты были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA и представлены как средние величины  $\pm$  стандартные отклонения (SD) или стандартные ошибки среднего (SEM). Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

Статистическая обработка данных и построение графиков были выполнены в программе OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, Northhampton, USA).

## **4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **4.1. Совместное включение ГДГ и АЛТ в эритроциты методом обратимого гипоосмотического диализа**

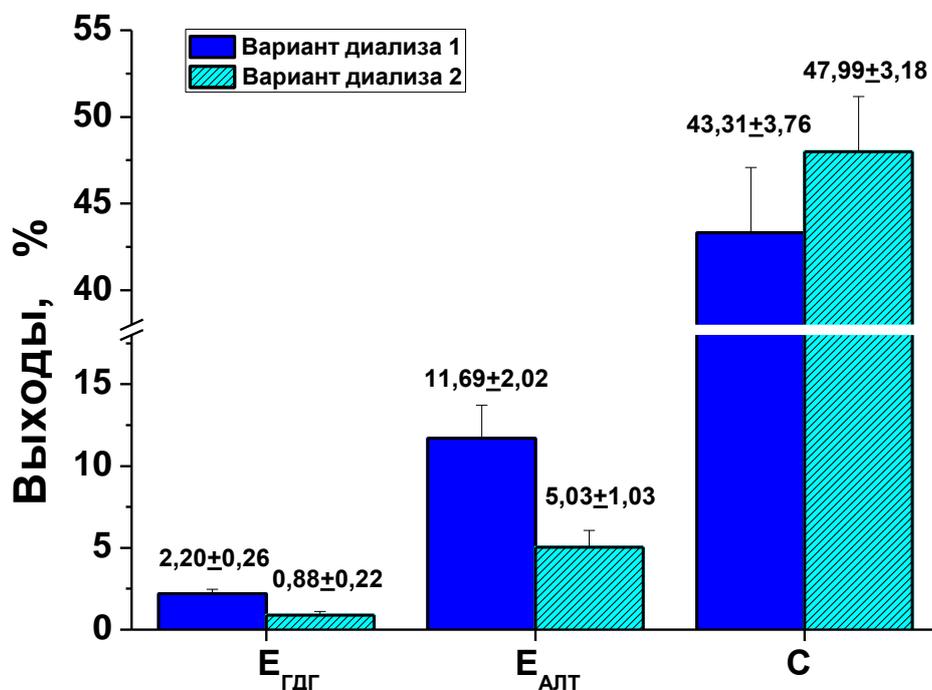
Как было сказано выше (см. раздел Постановка задачи), на основании проведенного в работе [188] теоретического исследования, для создания эффективных и длительно работающих в кровотоке аммоцитов, было предложено использовать ЭБР, содержащие одновременно два фермента – ГДГ и АЛТ. Такие ЭБР ранее экспериментально получены не были.

Совместное включение ГДГ и АЛТ в эритроциты было проведено тем же методом, которым получали другие аммоциты в предыдущих работах (методом обратимого гипоосмотического диализа). Диализ проводили в двух вариантах, несколько отличающихся концентрациями включаемых ферментов, а также гематокритом, осмоляльностью и объемом исходной суспензии (см. раздел 3.4. в Материалах и методах). Были исследованы параметры эффективности процедуры включения ферментов (процент инкапсуляции каждого из них, а также процент выживших клеток), характеристики полученных ЭБР в сравнении с аналогичными характеристиками исходных эритроцитов и изменение этих характеристик в ходе хранения суспензий исходных нативных эритроцитов и ЭБР в течение недели при 4°C. В качестве параметров, характеризующих клетки, были использованы стандартные эритроцитарные индексы, осмотическая резистентность, скорость гемолиза клеток в суспензиях, а также изменение активности каждого из ферментов в ЭБР в ходе хранения. Для характеристики функциональной эффективности полученных ЭБР были измерены скорости, с которыми эти ЭБР убирали аммоний из буферной среды *in vitro*, а также из крови мышей с индуцированной гипераммониемией *in vivo*.

#### **4.1.1. Эффективность включения**

Эффективность процедуры включения оценивали с помощью двух показателей: процента инкапсуляции каждого из ферментов (E, %) и выхода клеток

(С, %) (см. раздел 3.7 в Материалах и методах). Полученные результаты представлены на рисунок 16. Процент инкапсуляции для обоих ферментов был достоверно выше в первом варианте включения. В обоих вариантах метода инкапсуляция АЛТ была достоверно выше, чем для ГДГ (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Низкая



**Рисунок 16.** Показатели, характеризующие эффективность процедуры загрузки ГДГ и АЛТ в эритроциты с помощью двух вариантов обратимого гипоосмотического диализа в мешках. Представлены проценты инкапсуляции (E) для ГДГ и АЛТ, а также выход клеток (С). Активности ГДГ и АЛТ в исходной суспензии при загрузке составляли для первого варианта метода 10 МЕ/мл<sub>сусп</sub> и 5 МЕ/мл<sub>сусп</sub>, соответственно. Для второго варианта концентрации каждого из ферментов в исходной суспензии составляли 50 МЕ/мл<sub>сусп</sub>. Представленные на рисунке цифры соответствуют средним значениям ± SEM для каждого из показателей (n=9 и 10 для первого и второго варианта метода, соответственно).

эффективность включения ГДГ методом гипоосмотического диализа хорошо согласуется с ранее опубликованными работами других авторов, и объясняется тем, что молекулы ГДГ имеют большую молекулярную массу (332 кДа) и могут агрегировать с образованием молекулярных агрегатов еще большего размера при

увеличении концентрации белка ГДГ выше 0,1-0,3 мг/мл [151,202]. Молекулы АЛТ имеют примерно в 3 раза меньшую молекулярную массу (115 кДа) [203], и в литературе отсутствуют данные о возможности их агрегации.

Выходы клеток для двух вариантов метода включения достоверно не различались (ANOVA,  $p < 0,05$ ) и составляли (средние  $\pm$  SEM)  $43,3 \pm 3,8\%$  ( $n=9$ ) и  $48,0 \pm 3,2\%$  ( $n=10$ ) для первого и второго варианта процедуры, соответственно. Достоверные различия между процентами включения каждого из ферментов в двух вариантах метода связаны, по-видимому, с тем, что в первом варианте условия диализа были несколько жестче (осмоляльность гипоосмотического буфера в первом варианте метода составляла 60-65 мОсм/кг против 70-75 мОсм/кг во втором варианте), что привело к увеличению инкапсуляции. Кроме того, во втором варианте, концентрация ГДГ в исходной суспензии эритроцитов была в 5 раз выше, чем в первом. Это могло привести к агрегации фермента. Образовавшиеся агрегаты ГДГ слишком большой молекулярной массы не только не могли проникнуть через поры эритроцита сами, но могли также препятствовать включению в эритроцит АЛТ. В результате инкапсуляция обоих ферментов во втором варианте метода оказалась достоверно ниже, несмотря на небольшое увеличение в выходе эритроцитов.

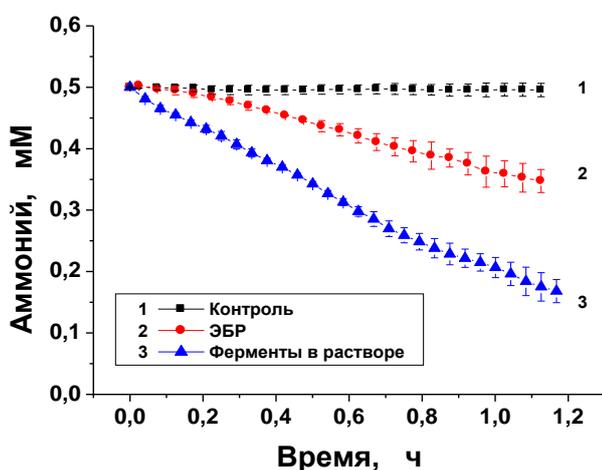
#### **4.1.2. Скорость утилизации аммония с помощью ЭБР, содержащих ГДГ+АЛТ, в системе *in vitro***

Для проверки способности новых аммоцитов, полученных методом гипоосмотического диализа, снижать концентрацию аммония в среде, были экспериментально измерены скорости убыли аммония *in vitro* в присутствии ГДГ и АЛТ либо непосредственно добавленных в буферный раствор, либо добавленных в раствор внутри ЭБР. Полученные результаты представлены на рисунок 17.

Для смеси ферментов, добавленной непосредственно в буферный раствор, содержащий 0,5 мМ аммония (финальные активности в среде составляли 0,3 МЕ/мл и 1,5 МЕ/мл для ГДГ и АЛТ, соответственно), полученная скорость убыли аммония составляла 0,39 мМ/ч ( $n=4$ ) (рисунок 17, кривая 3).

Если ферменты были добавлены в систему с той же исходной концентрацией аммония равной 0,5 мМ, не прямо, а внутри аммоцитов (конечный гематокрит 8-10%), скорость убыли аммония составляла после пересчета на 100% гематокрит 1,5 ммоль/ч $\times$ Л<sub>ЭБР</sub> (n=3) (рисунок 17, кривая 2). Аммоциты были получены по методике, описанной в разделе 3.4. Материалов и методов (вариант метода 2).

Чтобы доказать, что удаление аммония из среды связано с активностью включенных в ЭБР ферментов, был поставлен контроль, в котором в исходную буферную среду, содержащую 0,5 мМ аммония, были добавлены нативные эритроциты. Было показано, что сами эритроциты не способны убирать аммоний из буферной среды с заметной скоростью (рисунок 17, кривая 1).



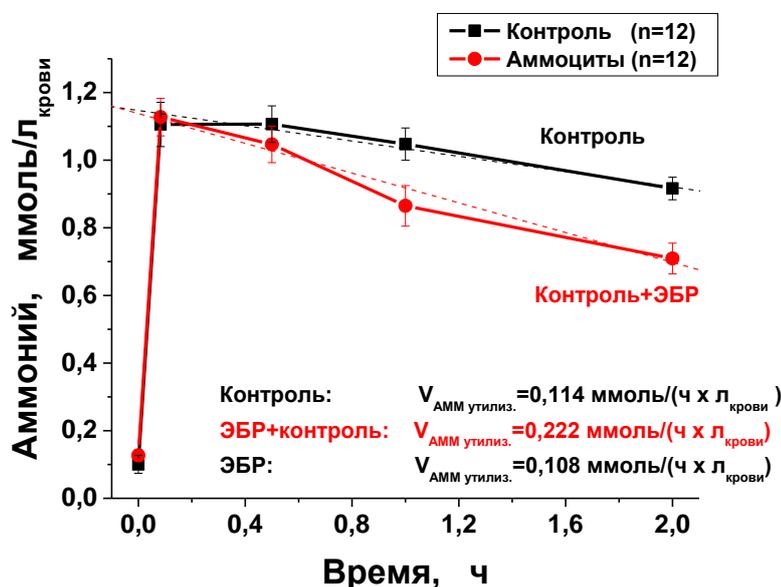
**Рисунок 17.** Измеренная *in vitro* скорость утилизации аммония ферментной системой ГДГ (из печени быка)+АЛТ. Кривая 1 – контроль. В буферный раствор, содержащий 0,5 мМ аммония, добавлены нативные эритроциты (без включенных ферментов) (n=4). Кривая 2 - в тот же буферный раствор добавлены ЭБР, содержащие ГДГ и АЛТ, финальные активности которых составляли 0,10 и 0,28 МЕ/мл<sub>образца</sub>, соответственно (Ht суспензии в среднем составлял 9.3%) (n=3). Кривая 3 - раствор смеси ферментов ГДГ и АЛТ был прямо добавлен в буфер, содержащий 0,5 мМ аммония (n=4). Финальные активности в смеси составляли 0,3 МЕ/мл и 1,5 МЕ/мл, для ГДГ и АЛТ соответственно.

Таким образом, полученные результаты показали возможность достаточно эффективного убирания аммония из среды *in vitro* с помощью ЭБР, содержащих АЛТ и ГДГ.

#### 4.1.3. Скорость убыли аммония *in vivo* в модели гипераммониемии на мышах

Функциональная эффективность ЭБР, содержащих ГДГ и АЛТ, была исследована также *in vivo* на мышах с индуцированной гипераммониемией. Исследование было проведено совместно с Еленой Александровной Косенко (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино). Аммоциты из эритроцитов мышей, использованные в исследовании, были получены стандартным методом обратимого гипоосмотического диализа. Средние активности ГДГ и АЛТ в аммоцитах были равны, соответственно,  $1,31 \pm 0,11$  и  $1,61 \pm 0,20$  МЕ/мл<sub>ЭБР</sub> (среднее  $\pm$  SEM). Эти аммоциты были введены мышам (по  $0,135$  мл<sub>ЭБР</sub> на мышь), после чего животным был введен ацетат аммония в дозе  $2,5$  ммоль/кг. Концентрацию аммония в крови мышей измеряли до введения ацетата аммония, а также через 5, 30, 60 и 120 мин после его введения ( $n=12$ ). Полученные результаты представлены на рисунок 18. В качестве контроля использовали животных, которые вместо аммоцитов получали эритроциты, полностью прошедшие все стадии процедуры получения ЭБР, но без включения ферментов ( $n=12$ ). Так как в опытах были использованы здоровые мыши, то введенный ацетат аммония быстро перерабатывался их здоровой печенью даже в отсутствие аммоцитов (рисунок 18, кривая 1 (контроль)). При введении аммоцитов (рисунок 18, кривая 2) скорость утилизации аммония ( $V_{\text{АММ утилиз.}}$ ) складывается из скорости, которую обеспечивают введенные ЭБР, а также из скорости удаления аммония здоровой печенью этих животных. Таким образом, чтобы рассчитать скорость удаления аммония непосредственно аммоцитами, надо из этой суммарной скорости вычесть скорость удаления аммония в контроле. В результате получилось, что сами ЭБР удаляют аммоний из крови мышей со скоростью  $0,108$  ммоль/ч $\times$ л<sub>крови</sub>, или при пересчете на 100% гематокрит, скорость убыли аммония, которую обеспечивали сами ЭБР, оказалась равна  $2$  ммоль/ч $\times$ л<sub>ЭБР</sub>. Эксперименты показали, что биореакторы продолжали работать на протяжении всего периода наблюдения (т.е. в течение двух часов после введения), что отличало их от биореакторов с одним

включенным ферментом (глутаминсинтетазой или глутаматдегидрогеназой), описанных ранее в литературе [17,150].



**Рисунок 18.** Модель индуцированной гипераммониемии на мышах. Изменение концентрации аммония в крови мышья (самцы линии Swiss весом 30 г) с гипераммониемией, которая была индуцирована введением в хвостовую вену ацетата аммония в дозе 2,5 ммоль/кг. Каждое животное (n=12) получило 135 мкл эритроцитов-биореакторов, содержащих ГДГ и АЛТ ( $1,31 \pm 0,11$  и  $1,61 \pm 0,20$  МЕ/мл<sub>ЭБР</sub> для ГДГ и АЛТ, соответственно) в физиологическом растворе (общий объем 0,4 мл (красная кривая). Конечный гематокрит эритроцитов-биореакторов в крови составил примерно 5,4%. В качестве контроля использовали мышья, которые получали эритроциты, прошедшие все этапы процедуры инкапсуляции, но без включения ферментов (n=12) (черная кривая). Для нулевых точек (до введения ацетата аммония) n=4. Приведены средние величины  $\pm$  SEM.

Суммируя приведенные выше результаты, можно сделать вывод, что ЭБР, содержащие ГДГ из печени быка и АЛТ, способны достаточно эффективно убирать аммоний как из буферной среды *in vitro*, так и из крови животных с индуцированной гипераммониемией *in vivo*.

#### 4.1.4. Изменение качества ЭБР в процессе хранения

Кроме эффективности включения ферментов, в настоящей работе были также исследованы другие характеристики полученных эритроцитов-биореакторов.

Чтобы оценить насколько сильно клетки повреждаются в процессе гипотонического диализа, запечатывания и последующей многократной отмывки, были измерены стандартные эритроцитарные индексы исходных эритроцитов и ЭБР, а также кривые их осмотической резистентности. Эти показатели оценивали не только сразу после получения аммоцитов, но и в процессе хранения суспензии ЭБР (и исходных эритроцитов) в течение 6-7 дней при 4°C. Кроме того, было измерено, как в процессе хранения изменяется активность включенных в ЭБР ферментов. Опыты были проведены с ЭБР, полученными с помощью первого варианта гипоосмотического диализного метода включения. Результаты представлены на рисунках 19 и 20.

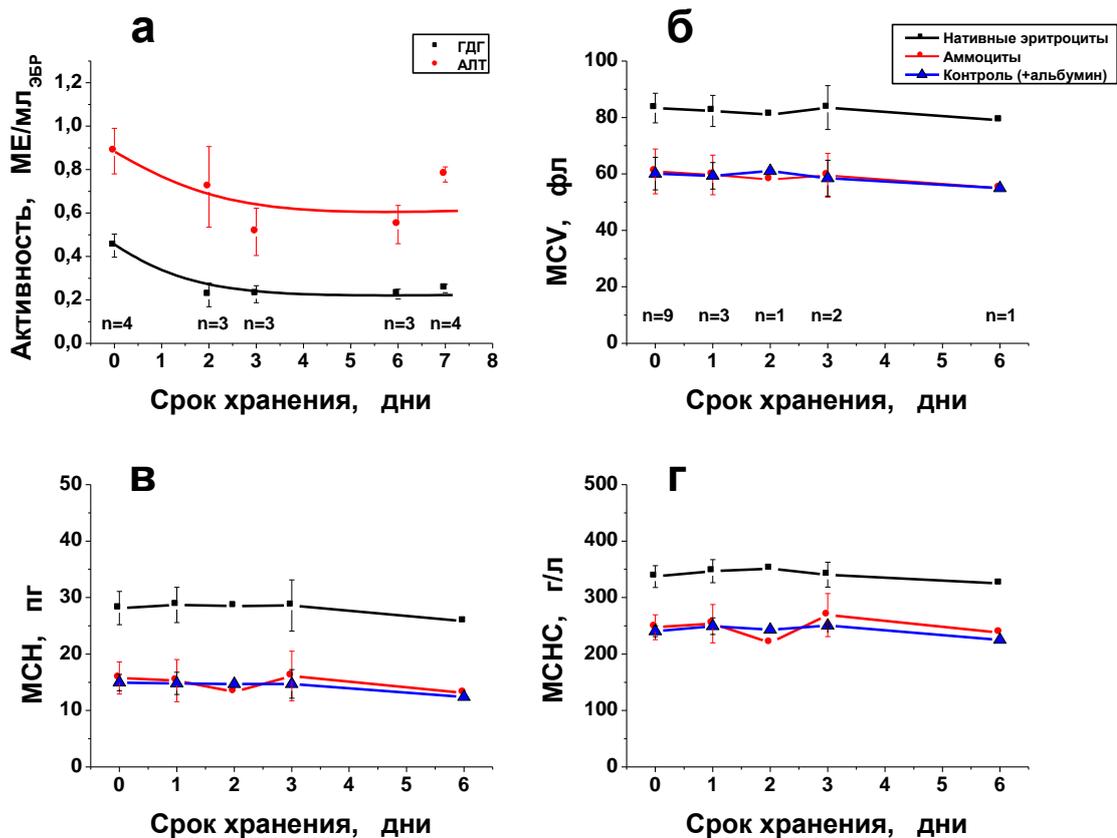
Дополнительно была исследована скорость нарастания гемолиза при хранении суспензии исходных нативных и контрольных эритроцитов, прошедших полную процедуру гипоосмотического диализа, но в отсутствии ферментов. Результаты представлены на рисунке 21.

#### ***4.1.4.1. Изменение активности ферментов внутри ЭБР в ходе хранения***

Активность каждого из ферментов в ЭБР была измерена сразу после окончания процедуры включения, а также в ходе последующего недельного хранения ЭБР в специальном растворе при 4°C (см. раздел Материалы и методы). Полученные результаты показали, что активность загруженных ферментов внутри клеток довольно быстро падала в течение первых двух дней хранения, после чего ее быстрое падение приостанавливалось. За 6 дней хранения (т.е. на 7 сутки после получения ЭБР), активность АЛТ и ГДГ в ЭБР упала в среднем примерно на 24% и 50%, соответственно (рисунок 19а).

#### ***4.1.4.2. Стандартные эритроцитарные индексы***

Величины стандартных эритроцитарных индексов при проведении процедуры включения ферментов в эритроцит с помощью гипоосмотического стресса изменяются, так как после образования в мембране эритроцита пор, часть внутриклеточного содержимого может выходить во внешнюю среду. Чем жестче воздействие на клетки, тем более сильным будет изменение эритроцитарных



**Рисунок 19.** Изменение параметров исходных эритроцитов, ЭБР, полученных методом обратимого гипоосмотического диализа, и контрольных эритроцитов в ходе их хранения в суспензии с гематокритом 10% при 4°C. Кроме стандартных компонентов, раствор для хранения содержал аденин (0,28 мМ), глюкозу (10 мМ) и антибиотик ампициллин (0,02 мг/мл). Контрольные эритроциты прошли процедуру гипоосмотического диализа и изоосмотического запечатывания аналогично ЭБР, но в присутствии в среде для диализа 1,1 мМ альбумина вместо ГДГ и АЛТ. День 0 соответствует дню приготовления ЭБР и контрольных эритроцитов. Активность ГДГ и АЛТ в исходной суспензии до включения ферментов составляла 10 МЕ/мл<sub>сусп</sub> и 5 МЕ/мл<sub>сусп</sub>, соответственно. (а) – Изменение активности ГДГ и АЛТ в эритроцитах в ходе хранения ЭБР. Представлены средние величины ± SEM. (б, в и г) – Изменения величин эритроцитарных индексов (MCV (в фл), MCH (в пг) и MCHC (в г/л), соответственно) в ходе хранения суспензий исходных и контрольных эритроцитов, а также ЭБР. Представлены средние величины ± SD. Величины n указаны на рисунках.

индексов, поэтому их измерение принято проводить при получении эритроцитоносителей для характеристики силы воздействия на клетки использованного метода включения фермента [151].

Средний клеточный объем и средняя концентрация гемоглобина в ЭБР и контрольных эритроцитах (прошедших диализ) были ниже, чем в исходных эритроцитах примерно на 30%. Особенно сильно (~ на 45%) снижалось в ЭБР и контрольных эритроцитах среднее содержание гемоглобина в клетках (рисунок 19б, 19г и 19в, соответственно). На величины эритроцитарных индексов не влияли включенные в клетки ферменты, так как их величины были очень близки для ЭБР и контрольных эритроцитов, прошедших все стадии процесса, но в отсутствии ГДГ и АЛТ, которые были заменены альбумином.

Полученные снижения величин эритроцитарных индексов в ЭБР были несколько больше, чем ранее опубликованные при включении ГДГ в эритроциты мыши [150]. Это может говорить о том, что процедура диализа в нашем случае была немного более жесткой, так как была проведена при более низкой осмоляльности диализного раствора (65 мОсм/кг вместо примерно 100 мОсм/кг в работе [150]).

Несмотря на то, что в ходе включения ферментов эритроцитарные индексы были достаточно сильно изменены, никакого дальнейшего падения этих показателей в процессе хранения суспензии ЭБР при 4°C практически не происходило (рисунок 19б-19г).

Необходимо отметить, что сам по себе наблюдаемый уровень снижения объема аммоцитов или содержания в них гемоглобина не являются предпосылками для сокращения жизни этих клеток в организме. Хотя способность их переносить кислород явно снижена, однако это не нарушает критически способность всех эритроцитов организма переносить кислород. Так как количество перелитых пациенту аммоцитов не будет превышать 10%, то даже снижение гемоглобина в них на 30-50% не нарушит кислород-переносящей функции, поскольку в организме в целом присутствует явный избыток гемоглобина, который эту функцию стабилизирует. Уровень гемоглобина, ниже которого начинается существенное снижение доставки кислорода, что требует переливания эритроцитов, зависит от

пола и возраста пациента, а также условий, в которых он находится. Для мужчин переливание может потребоваться при снижении уровня гемоглобина ниже 70 г/л, а для женщин – ниже 60 г/л [204]. Очевидно, что такое снижение не может быть достигнуто, если в 10% клеток гемоглобин будет снижен даже на 50%. Общее снижение его уровня при этом будет составлять только 5%, что абсолютно незначительно. С другой стороны, основной задачей аммоцитов (кроме удаления из крови аммония) является поддержание собственной жизнедеятельности. Источником энергии, которая для этого необходима, является гликолиз. Концентрации гликолитических ферментов в ходе раскрытия пор в мембранах клеток также снижаются. Можно предположить, что поскольку размеры большинства этих ферментов примерно соответствуют размеру молекул гемоглобина, то и снижение концентраций этих ферментов внутри клетки, также как и снижение гемоглобина, не будет превышать 30-50% [205]. В работе [17] было показано, что активности основных гликолитических ферментов эритроцитов мыши – гексокиназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, фосфофруктокиназы, а также пируваткиназы снижались в среднем на 10%. Такое снижение этих концентраций не может приводить к критическому снижению эффективности гликолиза в эритроците, т.к. все эти ферменты присутствуют в клетке в большом избытке [205].

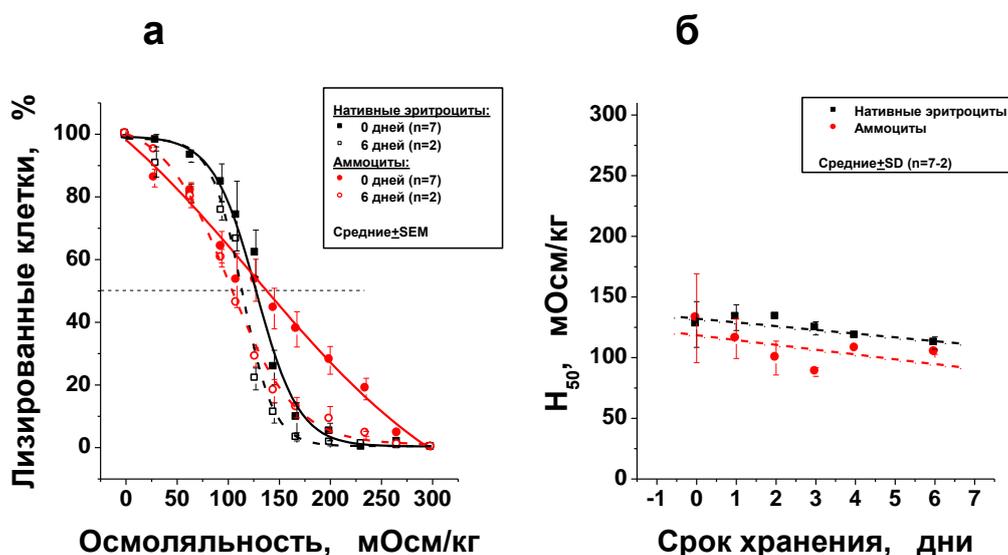
#### ***4.1.4.3. Осмотическая резистентность исходных эритроцитов и ЭБР в ходе хранения***

Кривые осмотической резистентности (рисунок 20а) были измерены для разных сроков хранения суспензий исходных эритроцитов и ЭБР с ферментами внутри. Чтобы не перегружать рисунок, приведены только усредненные кривые для исходного дня приготовления ЭБР (день 0) и кривые, полученные после 6 дней хранения.

Вид кривой осмотической резистентности для ЭБР в день их получения достаточно сильно отличался от вида кривой для исходных нативных эритроцитов. Это согласуется с результатами, полученными в более ранних работах для

аммоцитов, загруженных одним ферментом [17,150]. Однако в ходе хранения кривая для ЭБР меняла форму и сдвигалась влево (рисунок 20а).

После 6 дней хранения обе кривые почти не отличались на уровне 50% гемолиза. При этом ЭБР обладали даже несколько большей устойчивостью к низким осмоляльностям, чем суспензия исходных эритроцитов. Величины осмоляльности, при которой происходил 50% гемолиз, для обеих кривых в ходе хранения клеток несколько понижались, однако это понижение было не очень существенно (рисунок 20б).

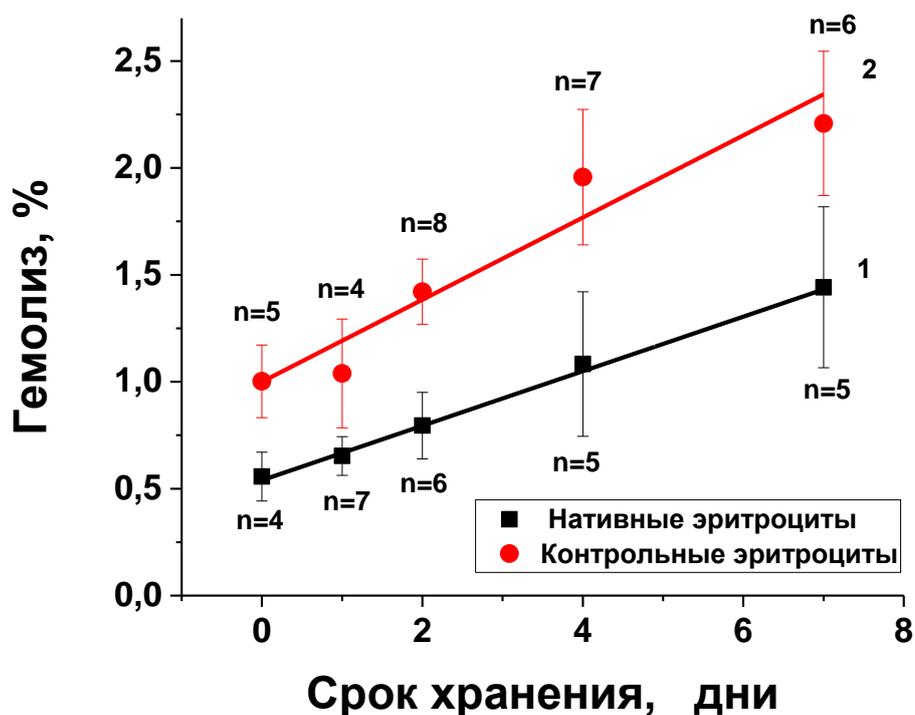


**Рисунок 20.** Изменение осмотической резистентности нативных эритроцитов и эритроцитов-биореакторов, полученных методом гипоосмотического диализа, в ходе хранения. (а) - Кривые осмотической резистентности нативных эритроцитов, а также ЭБР с включенными ГДГ и АЛТ, в день проведения процедуры (0 день), а также через 6 дней хранения в суспензии с гематокритом 10% при 4°C. Представлены средние величины ± SEM. (б) - Изменение величин осмоляльности, вызывающей 50% гемолиз ( $H_{50}$ ) нативных эритроцитов и ЭБР, в ходе хранения (средние величины ± SD). Величины n указаны на рисунке.

#### 4.1.4.4. Гемолиз исходных нативных и контрольных эритроцитов в ходе хранения

Одним из важнейших показателей клеточной суспензии, предназначенной для переливания в организм, является уровень гемолиза. В соответствии с принятыми

правилами [206], этот уровень не должен превышать 0,8% (при переливании 1 дозы эритромаcсы). Чтобы исследовать, насколько процедура включения ферментов в эритроциты может снизить устойчивость клеток и повысить уровень их гемолиза в процессе хранения, были проведены измерения доли лизированных клеток в суспензиях исходных нативных, а также контрольных эритроцитов (прошедших все процедуры диализа, запечатывания и отмывания, но без включения ферментов). Измерения проводили в день получения эритроцитов, а также на 1, 2, 4 и 7 день хранения. Из полученных зависимостей были посчитаны скорости лизиса клеток в каждой из суспензий (рисунок 21). Хотя абсолютные средние значения гемолиза контрольных эритроцитов (рисунок 21, прямая 2) были несколько выше, чем гемолиз



**Рисунок 21.** Значения гемолиза нативных эритроцитов (кривая 1) и контрольных эритроцитов, прошедших процедуру гипоосмотического диализа в мешках (вариант диализа 1) (2), на различных сроках хранения суспензий (Ht 10%, температура 4°C). Представлены средние значения  $\pm$  SEM. Количество экспериментов указано на графике.

нативных эритроцитов (рисунок 21, прямая 1), достоверных отличий между этими значениями не было ни в один из дней хранения, кроме дня 2 (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Средняя скорость гемолиза составила 0,12% в день для нативных эритроцитов и 0,19% в день для контрольных диализированных клеток. Это подтверждает, что процесс гипоосмотического диализа хотя и ухудшил несколько состояние клеток, но не привел к их критическим изменениям. Условия хранения и получения клеток, очевидно, были не самыми оптимальными, так как значительное увеличение гемолиза наблюдалось не только в обработанных контрольных, но и в нативных эритроцитах.

Таким образом, из приведенных выше экспериментов можно сделать вывод о том, что метод обратимого гипоосмотического диализа позволяет получить ЭБР, содержащие совместно включенные ГДГ и АЛТ. Эти биореакторы достаточно эффективно способны убирать аммоний как из буферной среды *in vitro*, так и *in vivo* у мышей с гипераммониемией, индуцированной введением ацетата аммония. Полученные ЭБР имеют приемлемые изменения стандартных эритроцитарных индексов и осмотической резистентности относительно исходных эритроцитов, сравнимые с обычно наблюдавшимися в работах других авторов, и хорошую жизнеспособность при хранении в течение недели при 4°C. Процесс диализа влияет на стабильность клеток, но увеличивает скорость гемолиза ЭБР относительно исходных эритроцитов не критически (~ в 1,6 раза). Учитывая, что более половины включенной активности ферментов сохраняется в ЭБР даже после недели хранения, можно полагать, что хранившиеся ЭБР также могут быть использованы для введения, но только после дополнительного отмывания клеток перед введением для снижения процента гемолиза в суспензии для переливания.

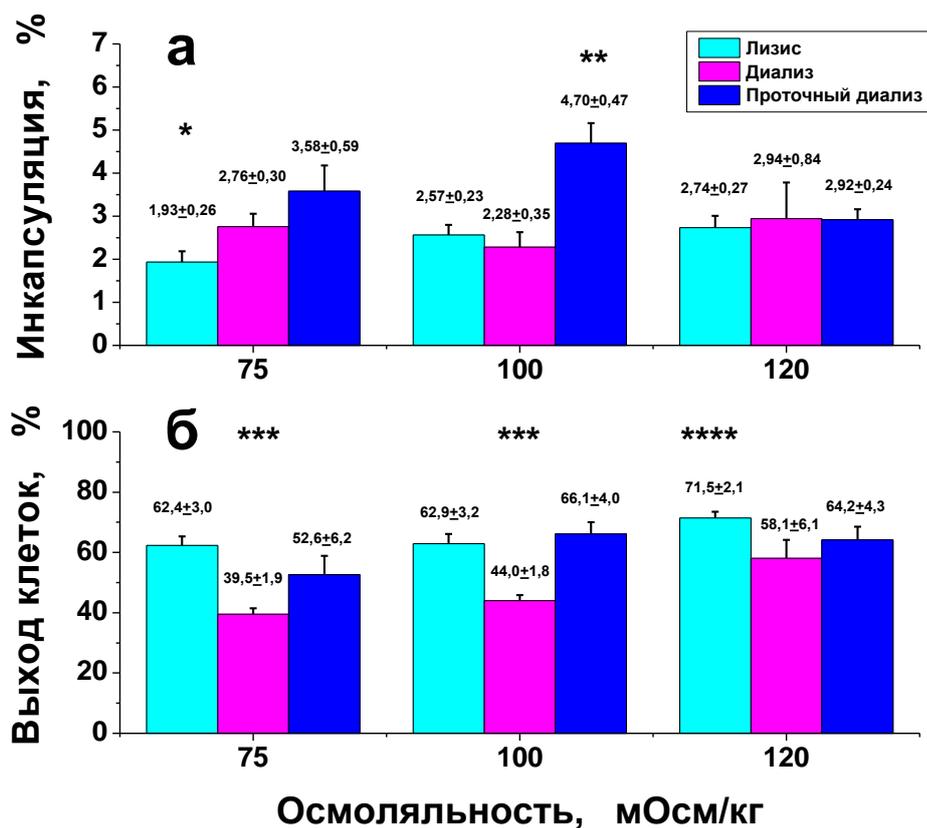
Основным недостатком полученных ЭБР является низкая активность включенной в клетки ГДГ. Это связано с большим размером молекулы этого фермента и его способностью агрегировать при концентрациях в суспензии выше 0,1-0,3 мг/мл. Низкая эффективность включения ГДГ не позволяет создать достаточно эффективные для клинического использования аммоциты, поэтому дальнейшие исследования данной работы были посвящены поискам возможностей увеличить активность ГДГ, включенную в эритроциты.

#### **4.2. Сравнение эффективности включения ГДГ в эритроциты различными гипоосмотическими методами**

Причинами низкой активности ГДГ, инкапсулированной в эритроциты, могут быть как не совсем оптимальный метод включения фермента, так и свойства самого фермента, использованного для создания ЭБР. На сегодняшний день наиболее оптимальными (по эффективности включения и свойствам получаемых клеток) методами инкапсуляции ферментов являются методы обратимого гипоосмотического стресса [96]. Поэтому, чтобы выбрать наиболее эффективный метод включения для такого крупного по размеру молекул фермента как ГДГ, было проведено сравнение трех различных гипоосмотических методов инкапсуляции: обратимого гипоосмотического лизиса (далее – лизис), гипоосмотического диализа в диализных мешках (далее – диализ) и гипоосмотического проточного диализа с использованием малых диализаторов (далее – проточный диализ). Во всех этих экспериментах была использована ГДГ из печени быка. На рисунке 22а представлены выходы инкапсуляции фермента для каждого из этих методов, полученные при различных осмоляльностях гипоосмотического буфера.

С ростом этой осмоляльности в методе лизиса наблюдали небольшой рост инкапсуляции, который становился достоверно различимым между осмоляльностями 75 и 120 мОсм/кг. На инкапсуляцию методом диализа осмоляльность гипоосмотического буфера существенно не влияла. В методе проточного диализа оптимум процента инкапсуляции наблюдали при осмоляльности буфера 100 мОсм/кг.

При 120 мОсм/кг эффективности включения ГДГ различными методами достоверно не различались, в то время как при 75 и 100 мОсм/кг инкапсуляция методом проточного диализа была достоверно выше, чем другими методами. При этом, хотя доля инкапсуляции ГДГ возросла незначительно (возможно, из-за размера фермента и его способности к агрегации), все же разница в инкапсуляции методом проточного диализа по сравнению с другими методами составила почти 2 раза.



**Рисунок 22.** Зависимость эффективности инкапсуляции ГДГ из печени быка (а) и выхода эритроцитов (б) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении фермента в эритроциты тремя различными гипоосмотическими методами (лизис, диализ в мешке, проточный диализ). Число экспериментов  $n=10$  и  $n=7$  для всех осмоляльностей в случае лизиса или диализа, соответственно. Для проточного диализа  $n=8$  (при 75 мОсм/кг),  $n=9$  (при 100 мОсм/кг) и  $n=5$  (при 120 мОсм/кг). Представлены средние значения  $\pm$  SEM. \* - Процент инкапсуляции достоверно отличался от полученных для метода лизиса при 120 мОсм/кг и для метода проточного диализа при 75 и 100 мОсм/кг (ANOVA,  $p<0,05$ ). \*\* - Значение инкапсуляции достоверно отличалось от всех остальных, кроме полученного для проточного диализа при 75 мОсм/кг (ANOVA,  $p<0,05$ ). \*\*\* - Выход клеток достоверно отличался от выходов клеток, полученных другими методами при тех же осмоляльностях, и от полученного методом диализа при 120 мОсм/кг (ANOVA,  $p<0,05$ ). \*\*\*\* - Выход клеток достоверно отличался от выходов клеток, полученных методом диализа при любых осмоляльностях, методом лизиса при осмоляльностях 75 и 100 мОсм/кг и методом проточного диализа при 75 мОсм/кг (ANOVA,  $p<0,05$ ).

Выход клеток (рисунок 22б) возрастал с ростом осмоляльности гипоосмотического буфера. При 120 мОсм/кг он достоверно отличался от выхода при других осмоляльностях (примерно на 10 % в методе лизиса и на 20% в методе диализа). В проточном диализе изменение осмоляльности гипоосмотического буфера не вызывало существенных изменений в выходе клеток. Метод диализа имел самые низкие выходы эритроцитов, которые достоверно отличались от выхода клеток в методе лизиса при всех осмоляльностях буфера, и от метода проточного диализа при осмоляльности буфера 100 мОсм/кг в среднем на 20-30%. Методы лизиса и проточного диализа по выходу клеток достоверно не различались.

Таким образом, наибольший процент инкапсуляции ГДГ из печени быка, равный  $4,70 \pm 0,47$  % (среднее  $\pm$  SEM, n=9), был достигнут в методе проточного диализа при осмоляльности 100 мОсм/кг. При этом выход клеток при этой осмоляльности также был максимальным и составлял  $66,1 \pm 4,0$ % (среднее  $\pm$  SEM, n=9).

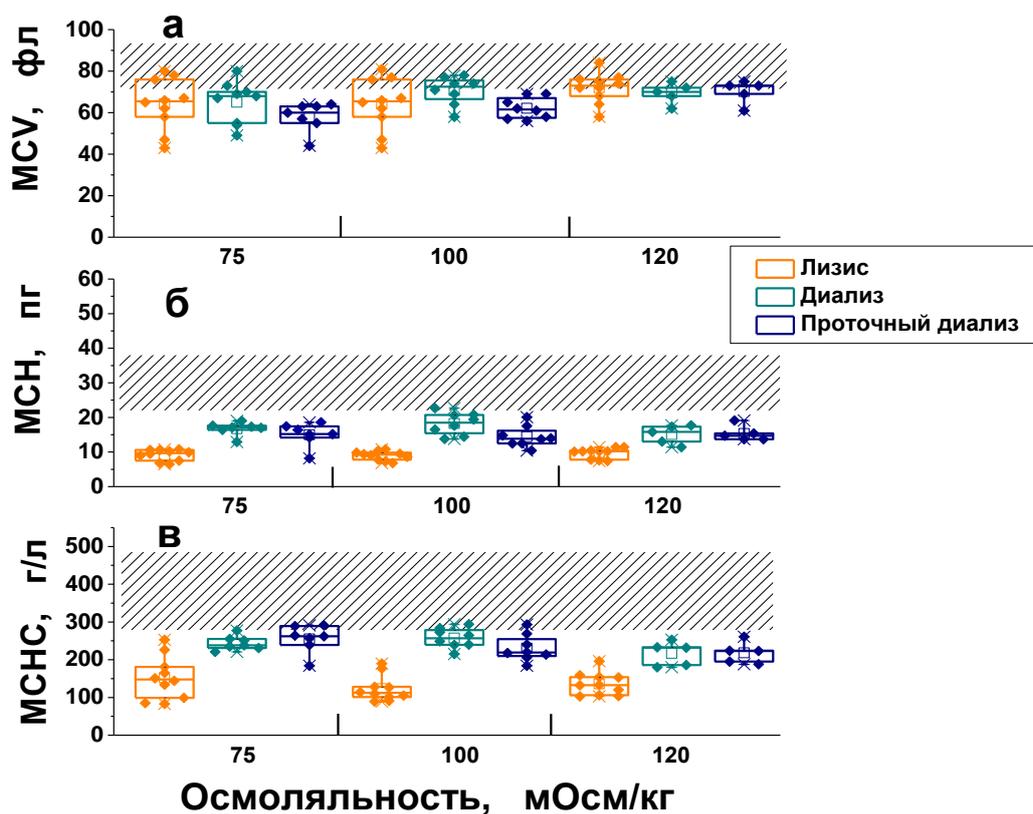
### **4.3. Характеристики ЭБР, полученных разными методами**

Аммоциты, полученные разными методами, могут отличаться не только эффективностью включения фермента, но и свойствами клеток после процедуры. В качестве параметров, характеризующих эти свойства, были выбраны стандартные эритроцитарные индексы (средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в клетке (MCH) и средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)), а также осмотическая резистентность исходных эритроцитов и полученных аммоцитов. Все эти параметры могут влиять на длительность циркуляции аммоцитов в кровотоке.

#### **4.3.1. Стандартные эритроцитарные индексы**

После включения фермента в эритроциты любым гипоосмотическим методом средний объем клетки снижался, уменьшалось также количество и концентрация в ней гемоглобина (рисунок 23).

При осмоляльности гипоосмотического буфера 75 мОсм/кг средний объем эритроцита после обработки становился ниже объема исходного эритроцита в среднем на 25% для лизиса и диализа (при этом часть обработанных эритроцитов имела объем близкий к исходному) и примерно на 30% для метода проточного диализа. При увеличении осмоляльности буфера, разница исходного и конечного объемов клеток сокращалась до 15% (рисунок 23а).



**Рисунок 23.** Зависимость среднего объема эритроцитов (MCV, фл) (а), среднего содержания гемоглобина (MCH, пг) (б) и средней концентрации гемоглобина в эритроците (MCHC, г/л) (в) от осмоляльности гипоосмотического буфера при включении ГДГ из печени быка в клетки методами лизиса, диализа в мешках или проточного диализа. Заштрихованные области соответствуют диапазонам соответствующих значений для исходных эритроцитов до начала процедуры. Размеры боксов соответствуют области значений, включающей от 25 до 75 перцентилей всех измеренных величин. Для каждого бокса представлены также среднее арифметическое значение (отмечено квадратом), медиана (горизонтальная линия) и разброс между минимальным и максимальным значениями (вертикальные линии).

Содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH) снижалось больше всего после процедуры обратимого лизиса (примерно на 66-70%) (рисунок 23б). Так как объем эритроцитов в среднем менялся примерно одинаково и незначительно для всех методов, концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC) также снижалась больше всего после процедуры обратимого лизиса (примерно на 60-70%).

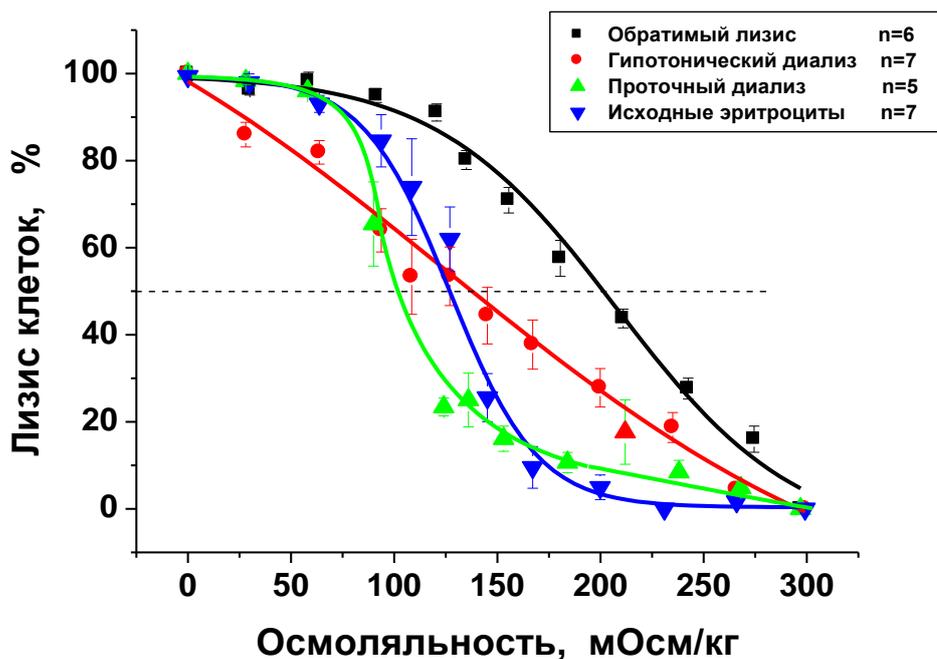
После диализа и проточного диализа клетки теряли примерно от 30 до 50% своего гемоглобина. И, в отличие от лизиса, в результате диализа и проточного диализа содержание гемоглобина внутри эритроцитов снижалось пропорционально уменьшению объема эритроцитов. Это приводило к тому, что концентрация гемоглобина в эритроцитах при проточном диализе изменялась слабо (не более чем на 15-30%) (рисунок 23в). При этом осмоляльность в исходном растворе на выход гемоглобина не влияла (во всех методах).

После лизиса было получено незначительное изменение объема эритроцитов и одновременно более сильное снижение в них содержания гемоглобина по сравнению с аммоцитами, полученными другими методами. Это может говорить о том, что эти эритроциты, хотя и потеряли большую часть своего осмотического материала (гемоглобина), но их объем не снизился пропорционально доле потерянного гемоглобина, т.к., возможно, в ходе процедуры включения ГДГ аммоциты набухли, что привело к более сильному снижению в них концентрации гемоглобина. Это может быть связано с неспособностью клеток регулировать свой объем после жестких условий лизиса. Если это так, то отношение площади поверхности к объему у этих эритроцитов должно быть уменьшено, что должно прямо отразиться на их осмотической резистентности. Деформируемость таких эритроцитов и их способность проходить через узкие капилляры должна быть снижена.

#### **4.3.2. Осмотическая резистентность различных аммоцитов**

Кривые осмотической резистентности исходных эритроцитов и аммоцитов, полученных разными методами, представлены на рисунке 24.

Как и было предположено выше, у эритроцитов, полученных методом лизиса, осмотическая резистентность оказалась самой низкой (рисунок 24). Кривая их



**Рисунок 24.** Кривые осмотической резистентности исходных эритроцитов и ЭБР, полученных тремя различными методами. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего; n – количество экспериментов.

осмотической резистентности сильно сдвинута вправо относительно аналогичной кривой для нативных клеток. Это подтверждает и параметр  $H_{50}$ , который численно характеризует осмоляльность буфера, при которой лизирует 50% клеток (таблица 7). Параметр  $H_{50}$  у этих аммоцитов был самый высокий. Половина этих клеток разрушалась при осмоляльности около 200 мОсм/кг, когда нативные эритроциты еще практически не лизированы (рисунок 24). После гипотонического диализа аммоциты по параметру  $H_{50}$  были близки к исходным клеткам, но становились очень разнородными. Об этом говорит то, что кривая осмотической резистентности этих ЭБР стала гораздо более пологой (рисунок 24), а ширина распределения аммоцитов по осмотической резистентности (W) после диализа была максимальна среди всех исследованных методов (таблица 7). Аммоциты после проточного диализа по параметру  $H_{50}$  были даже более осмотически устойчивы, чем исходные клетки (половина клеток была лизирована при снижении осмоляльности буфера на две трети от физиологической (рисунок 24)). Эти клетки имели также

минимальную величину  $W$  среди всех полученных ЭБР (таблица 7). Таким образом, результаты

**Таблица 7.** Параметры осмотической резистентности аммоцитов, полученных разными методами<sup>1)</sup>.

Параметр	Исходные эритроциты	Лизис	Диализ	Проточный диализ
$H_{50}$	128,4±13,4 (n=7)	198,2±4,0 (n=6)	132,5±13,8 (n=7)	100,6±6,0 (n=5)
$W$	35,0±2,7 (n=7)	171,3±7,6 (n=6)	183,5±5,9 (n=7)	101,6±11,2 (n=5)

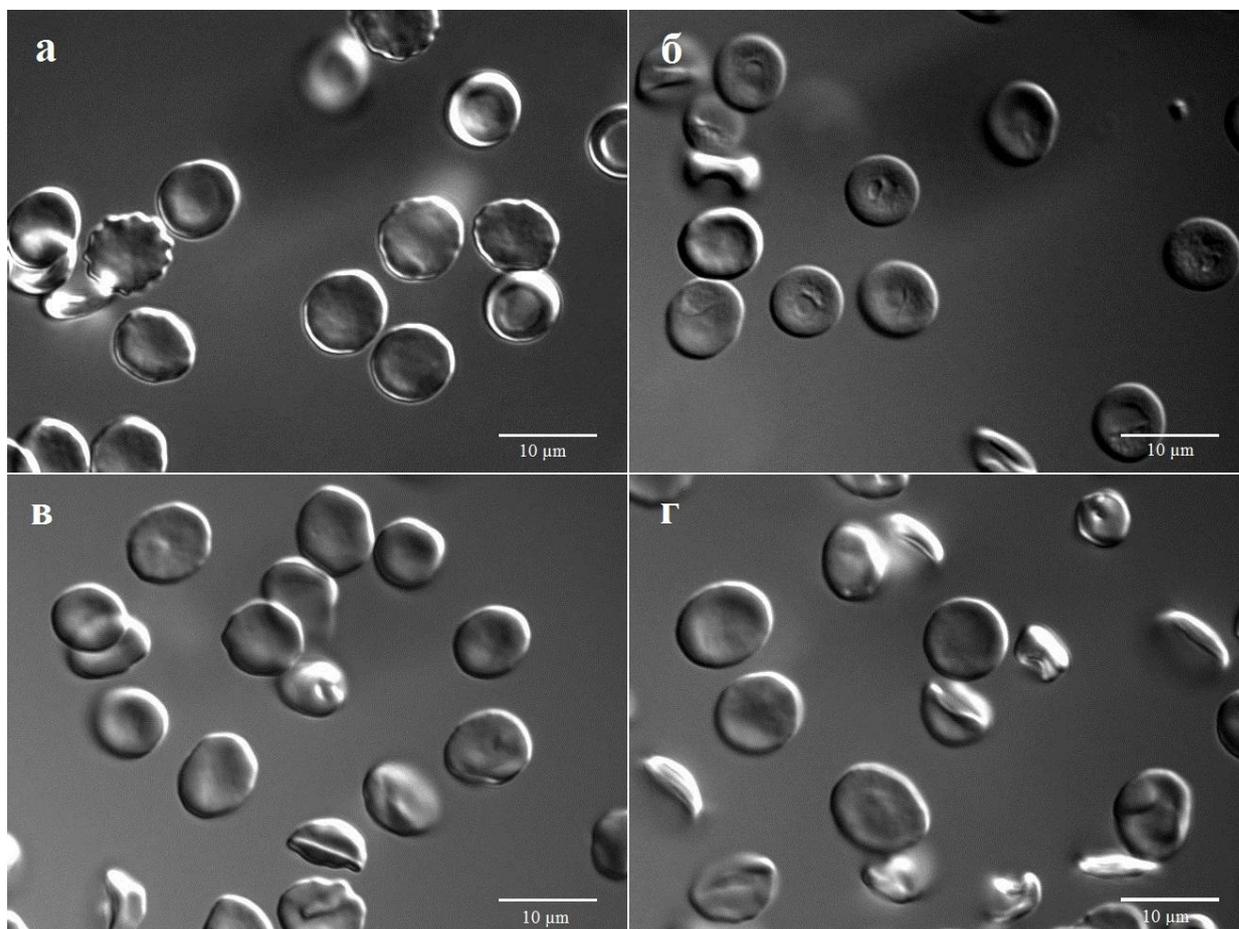
<sup>1)</sup>  $H_{50}$  – осмоляльность буфера, при которой лизирует половина клеток;  $W$  – ширина распределения эритроцитов по осмотической резистентности, равная разности осмоляльностей буферов, при которых лизирует 10 и 90% эритроцитов. Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. В скобках представлено количество экспериментов (n).

измерения осмотической резистентности дают косвенное представление о деформируемости полученных ЭБР, и позволяют предполагать, что эритроциты, полученные методом проточного диализа могут быть наиболее деформируемы, в то время как аммоциты, полученные методом лизиса, будут деформироваться хуже, и будут быстро выводиться из кровотока селезенкой.

#### **4.3.3. Форма контрольных эритроцитов, прошедших разные гипоосмотические процедуры обработки**

Методом конфокальной микроскопии были получены микрофотографии исходных, а также контрольных (диализованных и запечатанных, но в отсутствие ГДГ) эритроцитов, приготовленных тремя различными гипоосмотическими методами. Эти фотографии представлены на рисунке 25. Хорошо видно, что при любом из использованных в работе гипоосмотических методов включения белков в эритроциты, большинство полученных клеток восстанавливало свою форму

двояковогнутого диска, которая является оптимальной с точки зрения реологических свойств эритроцитов. Это говорит об обратимости гипоосмотического воздействия в ходе процедуры получения эритроцитов-биореакторов.



**Рисунок 25.** Микрофотографии эритроцитов, полученные с помощью конфокальной микроскопии. а – Исходные эритроциты, б – эритроциты после лизиса, в – эритроциты после диализа, г – эритроциты после проточного диализа. Клетки были фиксированы в 2,5% глутаровом альдегиде в PBS (pH 7,4) не менее часа. Фотографии получены с помощью микроскопа Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss, Йена, Германия), иммерсионный объектив 100x, 1,3 NA, камера QuantEm 512sc.

Эритроциты после лизиса имеют на поверхности следы локальных повреждений мембраны (рисунок 25б). По-видимому, резкое снижение осмоляльности во время лизиса повредило клетки настолько, что они не смогли

восстановить целостность мембраны до нативного уровня. В суспензиях ЭБР, полученных любым из методов, присутствует небольшая доля клеток с измененной формой и объемом, что согласуется с проведенными измерениями эритроцитарных индексов и осмотической резистентности эритроцитов в этих суспензиях.

Таким образом, метод проточного диализа давал самый высокий процент инкапсуляции при включении ГДГ в эритроциты. Выход клеток в этом методе также был высоким. По стандартным эритроцитарным индексам ЭБР, полученные методом проточного диализа, не уступали аммоцитам, полученным другими методами, а по осмотической резистентности даже несколько их превосходили. Все это вместе взятое позволило нам выбрать метод обратимого проточного диализа как наиболее оптимальный для включения ГДГ в эритроциты. Кроме того, переход от такого лабораторного рутинного метода, как гипоосмотический диализ в мешках, к методу проточного диализа с использованием стандартных диализаторов позволит в дальнейшем стандартизовать и ускорить получение таких эритроцитов-биореакторов для их применения в клинике.

#### **4.4. Сравнение ГДГ из печени быка и *Proteus sp.***

Второй возможностью повысить удельную активность ГДГ внутри аммоцитов может быть выбор другого фермента ГДГ. До настоящего времени во всех работах для включения в ЭБР был использован только коммерчески доступный препарат ГДГ из печени быка. Как уже было сказано выше, этот препарат имеет низкую удельную активность (~ 40 МЕ/мг белка) и не может быть использован в суспензии в высокой концентрации, так как агрегирует при концентрациях выше 0,1-0,3 мг/мл [151,202]. Глутаматдегидрогеназы, которые могут быть рассмотрены как потенциальные кандидаты на замещение ГДГ из печени быка, должны удовлетворять нескольким основным требованиям: 1) быть NADP-специфичными или универсальными (т.е. способными работать как с NAD, так и с NADP; 2) иметь, по возможности, минимальный молекулярный вес; 3) иметь максимальную удельную активность; 4) иметь более низкие константы связывания с субстратами, а также 5) не иметь склонности к агрегации. Многие ГДГ по этим параметрам

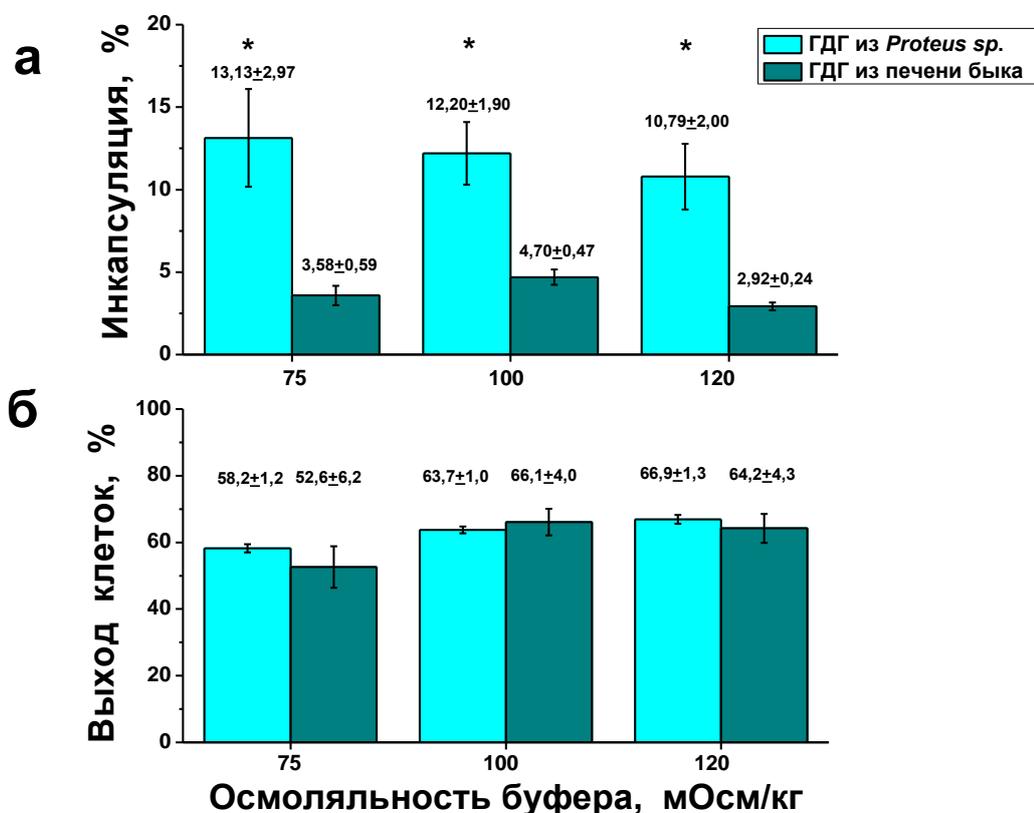
лучше соответствуют указанным требованиям, чем ГДГ из печени быка [193]. В основном, это ферменты бактериального происхождения. Кроме того, имеются литературные данные о том, что бактериальные ГДГ не склонны к агрегации [69,157], что также может оказаться очень важным их преимуществом.

ГДГ из *Proteus sp.* появилась как коммерчески доступный препарат недавно. По данным производителя (Sigma-Aldrich,USA), этот фермент обладает чуть меньшей молекулярной массой (около 300 кДа), имеет более низкие величины констант Михаэлиса ( $K_M$ ) по отношению к аммоний,  $\alpha$ -кетоглутарату и NADPH (1,1, 0,34 и 0,014 мМ против 3,2, 0,7 и 0,025 мМ для ГДГ из *Proteus sp.* и печени быка, соответственно), а также почти в 10 раз более высокую удельную активность (>400 МЕ/мг белка), чем фермент из печени быка. Таким образом, задачей нашей работы было исследовать перспективность этого препарата для включения в эритроциты. Для этого было проведено сравнение эффективности включения в клетки обычно используемой ГДГ из печени быка и бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* Оба фермента были включены в эритроциты методом проточного диализа при различных осмоляльностях гипоосмотического буфера. Полученные результаты представлены на рисунке 26. Процент инкапсуляции ГДГ из *Proteus sp.* был в 2,6-3,7 раза выше процента инкапсуляции бычьего фермента при осмоляльности буфера в диапазоне 75-120 мОсм/кг (рисунок 26а), в то время как выход клеток в том же диапазоне осмоляльностей достоверно не различался (рисунок 26б).

Для ГДГ из *Proteus sp.* также была исследована возможность неспецифического связывания с мембранами эритроцитов. Клетки двух доноров инкубировали 2 часа при комнатной температуре в присутствии фермента с активностью 10 МЕ/мл<sub>сусп</sub>, затем отмывали в PBS стандартным образом (см. Материалы и методы). Активность ГДГ в суспензии отмытых эритроцитов не была обнаружена, что говорит об отсутствии связывания исследованной ГДГ из *Proteus sp.* с мембранами эритроцитов.

Для обоих ферментов далее были исследованы зависимости удельной активности ГДГ внутри эритроцитов (рисунок 27а), а также процента инкапсуляции фермента (рисунок 27б) от концентрации фермента в исходной суспензии эритроцитов. Это сравнение показало, что, в то время как для ГДГ из печени быка

было характерно снижение процента инкапсуляции с ростом концентрации фермента в

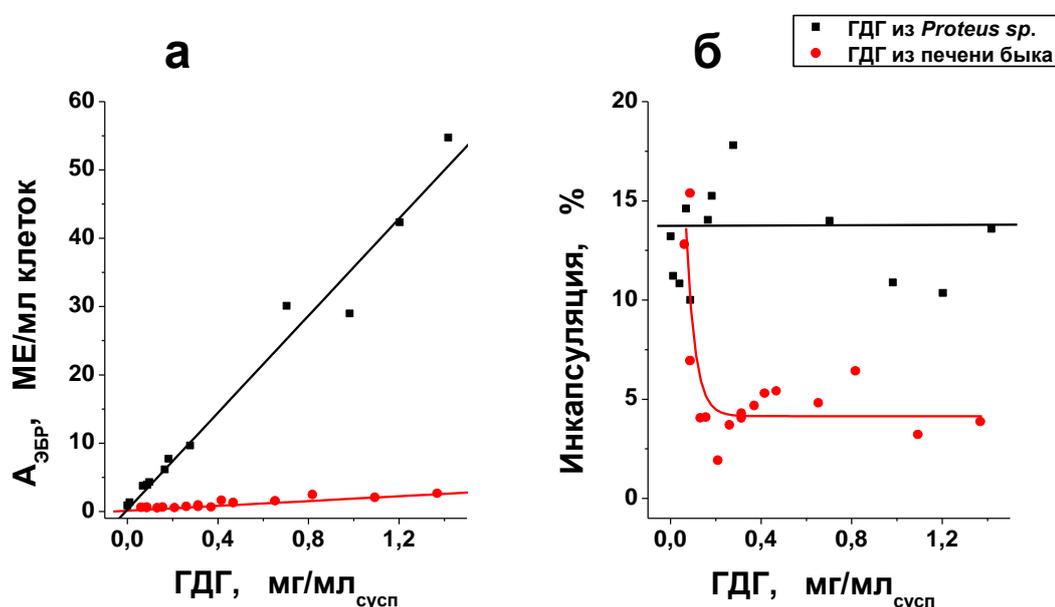


**Рисунок 26.** Зависимость процента инкапсуляции (а) и выхода клеток (б) от осмоляльности буфера при включении в эритроциты методом проточного диализа ГДГ из *Proteus sp.* (число экспериментов (n) равно 7, 5 и 6 при осмоляльностях буфера 75, 100 и 120 мОсм/кг, соответственно), и из печени быка (n равно 8, 9 и 5 при осмоляльностях буфера 75, 100 и 120 мОсм/кг, соответственно). Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего. \* - Достоверное отличие между ферментами при одинаковой осмоляльности буфера (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

суспензии, обусловленное, по-видимому, его агрегацией в области концентраций выше 0,1 мг/мл (рисунок 27б), для ГДГ из *Proteus sp.* процент инкапсуляции с ростом концентрации белка не снижался, а оставался практически неизменным (несмотря на большой разброс экспериментальных результатов) (рисунок 27б). Это приводило к тому, что для ГДГ из печени быка в диапазоне концентраций от 0,1 до 0,4 мг/мл<sub>сусп</sub> рост удельной активности фермента в аммоцитах практически не наблюдался. При дальнейшем увеличении концентрации фермента происходил

очень незначительный рост его удельной активности в ЭБР при сохранении процента инкапсуляции (рисунок 27). Такое поведение ГДГ из печени быка полностью согласуется с результатами работы [151].

Процент инкапсуляции ГДГ из *Proteus sp.* сохранялся постоянным при увеличении концентрации фермента в исходной суспензии клеток, а удельная активность фермента в аммоцитах увеличивалась прямо пропорционально увеличению этой концентрации (рисунок 27).



**Рисунок 27.** Зависимость активности фермента в эритроцитах-биореакторах ( $A_{ЭБР}$ ), измеренной при рН 7,4 (а), и процента инкапсуляции фермента (б) от концентрации фермента в исходной суспензии при включении в эритроциты ГДГ из печени быка ( $n=16$ ) или из *Proteus sp.* ( $n=12$ ). Ферменты были включены методом проточного диализа при осмоляльности гипоосмотического буфера 100 мОсм/кг.

Это подтверждает предположение о том, что для этого фермента не характерна агрегация при повышении концентрации, либо она очень слабо выражена. Несмотря на то, что для данной ГДГ максимальная активность наблюдается при рН 8,5 [156], в эритроцитах этот фермент должен работать при

физиологическом рН 7,4. Поэтому измерение активностей обеих ГДГ было проведено именно при рН 7,4. При этом активность ГДГ из *Proteus sp.*, все равно, значительно превышала активность бычьего фермента при тех же концентрациях (рисунок 27а). Максимальная полученная удельная активность ГДГ из *Proteus sp.* в эритроцитах при исходной концентрации фермента в суспензии 1,4 мг/мл<sub>сусп</sub> составила 54,5 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>. (Тогда как активность бычьей ГДГ при этой концентрации составляла лишь 2,4 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>).

Таким образом, результаты работы показали, что бактериальная ГДГ из *Proteus sp.*, действительно, не агрегирует в растворе при повышении концентрации, по крайней мере, до 1,4 мг/мл. При этом удельная активность этого фермента внутри ЭБР была прямо пропорциональна его концентрации в исходной суспензии клеток перед началом процедуры. Это свойство, вместе с высокой удельной активностью коммерчески доступного препарата данного фермента делает его очень перспективным для включения в эритроциты с целью создания высокоэффективных ЭБР для удаления аммония из плазмы пациентов в состоянии гипераммониемии. Применяя наиболее эффективный метод включения ГДГ в эритроциты (метод проточного диализа), а также используя ГДГ из *Proteus sp.* вместо стандартного фермента из печени быка, нам удалось достичь максимальной удельной активности ГДГ в ЭБР, которая была почти в 20 раз выше, чем активность, которую можно получить, используя ГДГ из печени быка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идея создания эритроцитов-биореакторов, удаляющих аммоний из крови пациентов в состоянии гипераммониемии (аммоцитов), появилась достаточно давно. Она казалась очень привлекательной, однако первые аммоциты, созданные путем включения в эритроциты ГДГ или глутаминсинтетазы, оказались недостаточно эффективными. Такие ЭБР работали в организме в течение только короткого промежутка времени. Причины этого стали понятны в результате теоретических исследований, проведенных в нашей лаборатории. Основными из них оказались низкая проницаемость мембраны эритроцита для субстратов, этих реакций, а также слишком низкая активность включенного в эритроциты фермента (в случае ГДГ). В том же исследовании было предложено создать аммоцит, путем включения в эритроцит двух ферментов, ГДГ и АЛТ. Эта идея была многообещающей, так как при совместной работе в эритроците двух этих ферментов должны были сниматься ограничения, связанные с транспортом в клетку субстратов этих реакций ( $\alpha$ -кетоглутарата и глутаминовой кислоты), так как они должны были расходоваться и производиться прямо внутри клетки в результате циклического процесса. Однако экспериментально эти предположения проверены не были.

В настоящей работе аммоциты, включающие ГДГ и АЛТ, были впервые получены экспериментально. Было показано, что данные ЭБР способны убирать аммоний как из буферной среды *in vitro*, так и из крови мышей с индуцированной гипераммониемией *in vivo*.

Исследование свойств полученных аммоцитов показало, что они не уступают свойствам ранее описанных ЭБР. Однако основным потребляющим аммоний ферментом в новых аммоцитах, по-прежнему, является ГДГ, для которой ранее не удавалось получать высокие проценты включения. Это связано с тем, что ранее для создания аммоцитов использовали только ГДГ из печени быка, а этот фермент не только имеет очень большой молекулярный вес, но и начинает агрегировать при концентрациях выше 0,1-0,3 мг/мл. При этом образуются еще большие по размеру агрегаты, которые не могут войти внутрь клетки через поры, образовавшиеся в мембране эритроцита в результате гипосмотического стресса.

Чтобы создать аммоциты, достаточно эффективные для клинического применения, необходимо было решить проблему низкой активности ГДГ внутри эритроцитов. Этому и была посвящена вторая часть настоящей работы.

Оптимизация процесса была проведена по двум направлениям. Сначала было проведено сравнение различных гипоосмотических методов включения ГДГ из печени быка в эритроциты, и выбран достаточно мягкий, но эффективный способ инкапсуляции – метод проточного диализа с использованием диализного патрона. Хотя применение этого метода и позволило увеличить процент инкапсуляции ГДГ в эритроциты, однако это увеличение было небольшим (примерно в 2 раза). Поэтому далее мы попытались повысить активность включенной в эритроцит ГДГ за счет использования фермента из другого источника. В качестве такого фермента была выбрана бактериальная ГДГ из *Proteus sp.* По своим свойствам этот фермент вполне соответствует требованиям, которым должна удовлетворять ГДГ для ее успешного применения в ЭБР. Этот фермент недавно появился как коммерчески доступный препарат. Специфическая активность фермента в этом препарате примерно в 10 раз выше, чем для ГДГ из печени быка. При включении в эритроциты методом проточного диализа фермент давал примерно в 2,6-3,7 раза более высокий процент инкапсуляции по сравнению с ГДГ из печени быка, несмотря на то, что его молекулярный вес был лишь немного меньше (~ 300 кДа). Основным преимуществом ГДГ из *Proteus sp.* оказалось то, что фермент не агрегировал при повышении концентрации в растворе. Это согласовывалось с общими тенденциями, описанными в литературе для бактериальных ГДГ, но для данного фермента было показано экспериментально впервые. В результате, активность этого фермента, включенная в эритроциты, была прямо пропорциональна его активности в исходной суспензии клеток в начале процедуры. Используя для включения метод проточного диализа, и заменив ГДГ из печени быка на ГДГ из *Proteus sp.*, мы смогли получить в эритроцитах активность ГДГ равную 54,5 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>, что более чем в 20 раз превосходило активность фермента из печени быка, включенного в тех же условиях (равную примерно 2,4 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>).

На животной модели (мышь с индуцированной гипераммониемией) было показано, что ЭБР, содержащие ГДГ и АЛТ, могут работать в организме. Однако вопрос о возможности практического применения данных ЭБР в клинике остается очень важным.

В физиологических условиях максимальная скорость утилизации аммония нашими ЭБР, рассчитанная теоретически, равна  $6 \text{ ммоль/ч} \times \text{л}_{\text{ЭБР}}$  [188]. Таким образом, максимальная скорость, которой можно достичь при переливании пациенту 200 мл ЭБР (что составляет примерно 10% от общего количества эритроцитов у человека весом 70 кг при гематокрите 45%) может быть равна  $1,2 \text{ ммоль/ч} \times 5 \text{ л крови}$ , т.е.  $0,24 \text{ ммоль/ч} \times \text{л крови}$  или  $5,76 \text{ ммоль/день} \times \text{л крови}$ , что почти на порядок выше, чем для лучших медикаментозных препаратов, применяемых для лечения гипераммониемии ( $\sim 600 \text{ мкмоль/сутки} \times \text{л крови}$ ). При активности ГДГ, которую удалось включить в эритроциты в данной работе, теоретический расчет скорости утилизации аммония с помощью математической модели, описанной в работе [188] дает скорость  $2,5 \text{ ммоль/ч} \times \text{л}_{\text{ЭБР}}$ , (или  $0,1 \text{ ммоль/ч} \times \text{л крови}$ , что соответствует  $2,4 \text{ ммоль/сутки} \times \text{л крови}$ ). Однако, судя по зависимости процента инкапсуляции от концентрации фермента в исходной суспензии, это пределом не является.

Сегодня мы не можем точно предсказать дозу, которую надо ввести каждому конкретному пациенту с гипераммониемией, так как концентрация аммония у пациентов может варьировать (от 0,1 до 4 мМ) [207]. Эта проблема требует дополнительного исследования, однако мы можем надеяться, что разработанные аммоциты будут достаточно эффективными в терапии гипераммониемии.

## ВЫВОДЫ

1. ГДГ и АЛТ могут быть включены в эритроциты методом гипоосмотического диализа. Полученные ЭБР удаляют аммоний как из среды *in vitro*, так и *in vivo* в модели гипераммониемии на мышах. Низкая эффективность включения ГДГ из печени быка в ЭБР (не более  $2,20 \pm 0,26\%$ ) может ограничивать эффективность биореактора.
2. Эритроциты-биореакторы, содержащие ГДГ и АЛТ, полученные методом гипоосмотического диализа, сохраняют хорошее функциональное состояние (активность ферментов, загруженных в эритроцит, эритроцитарные индексы и осмотическую резистентность клеток) при хранении в течение, по крайней мере, 1 недели при 4°C. Гемолиз в суспензии клеток при хранении достаточно быстро растет, поэтому, хранившиеся ЭБР подлежат обязательному дополнительному отмыванию перед введением.
3. Систематическое сравнение различных гипоосмотических методов включения ГДГ из печени быка в эритроциты (обратимого гипоосмотического лизиса, гипоосмотического диализа в диализных мешках и проточного диализа) показало, что оптимальным методом включения больших по размеру молекул ГДГ в эритроциты является метод проточного диализа. Гематологические характеристики эритроцитов и их осмотическая резистентность после проточного диализа меняются меньше, чем после других методов включения.
4. Использование для включения в эритроциты вместо ГДГ из печени быка бактериальной ГДГ из *Proteus sp.* увеличивает эффективность инкапсуляции фермента методом проточного диализа от 2,6 до 3,7 раза (для разных осмоляльностей гипоосмотического буфера). При этом удельная активность ГДГ, включенная в клетки, прямо пропорциональна активности фермента в исходной суспензии клеток в широком диапазоне активностей, что указывает на отсутствие агрегации этого белка при повышении концентрации. Эта активность может возрастать более чем в 20 раз по сравнению с активностью бычьей ГДГ при одинаковой исходной концентрации белка 1,4 мг/мл,

достигая более 50 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>, что позволяет надеяться на получение ЭБР с эффективностью, достаточной для клинического применения.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Millan, C.G. Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. / C.G. Millan, M.L.S. Marinero, A.Z. Castaneda, J.M. Lanao. // *Journal of Controlled Release*. – 2004. – V. 95. – № 1. – P. 27–49.
2. Pierige, F. Cell-based drug delivery. / F. Pierige, S. Serafini, L. Rossi, M. Magnani. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – V. 60. – № 2. – P. 286–295.
3. Gupta, A. Cell Based Drug Delivery System through Resealed Erythrocyte - A Review. / A. Gupta, A.K. Mishra, P. Bansal, S. Kumar, V. Gupta, R. Singh, G.S. Kalyan. // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. – 2010. – V. 2. – № 1. – P. 23–30.
4. Biagiotti, S. Drug delivery by red blood cells. / S. Biagiotti, M.F. Paoletti, A. Fraternali, L. Rossi, M. Magnani. // *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. – 2001. – V. 63. – № 8. – P. 621–631.
5. Villa, C.H. Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. / C.H. Villa, A.C. Anselmo, S. Mitragotri, V. Muzykantov. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – V. 106 (Pt 2). – P. 88–103.
6. Исаев, В.Г. Применение иммобилизованных форм даунорубицина у больных острыми лейкозами. / В.Г. Исаев, Т.Ц. Гармаева, А.А. Скороход, Е.Н. Паровичникова, Н.Г. Тюрина, Р.А. Кучер, В.М. Витвицкий, Ф.И. Атауллаханов, В.Г. Савченко. // *Терапевтический архив*. – 1999. – Т. 71. - № 10. – С. 32–37.
7. Skorokhod, O.A. Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded erythrocytes. / O.A. Skorokhod, E.V. Kulikova, N.M. Galkina, P.V. Medvedev, E.E. Zybnova, V.M. Vitvitsky, A.V. Pivnik, F.I. Ataulakhanov. // *The Hematology Journal*. – 2007. – V. 92. – № 4. – P. 570–571.
8. Skorokhod, O.A. Pharmacokinetics of erythrocyte-bound daunorubicin in patients with acute leukemia. / O.A. Skorokhod, T.T. Garmayeva, V.M. Vitvitsky, V.G. Isaev, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko, F.I. Ataulakhanov. // *Medical Science Monitor*. – 2004. – V. 10. – № 4. – P. 155-164.

9. Domenech, C. L-asparaginase loaded red blood cells in refractory or relapsing acute lymphoblastic leukaemia in children and adults: results of the GRASPALL 2005-01 randomized trial. / C. Domenech, X. Thomas, S. Chabaud, A. Baruchel, F. Gueyffier, F. Mazingue, A. Auvrignon, S. Corm, H. Dombret, P. Chevallier, C. Galambrun, F. Huguet, F. Legrand, F. Mechinaud, N. Vey, I. Philip, D. Liens, Y. Godfrin, D. Rigal, Y. Bertrand. // *British Journal of Haematology*. – 2001. – V. 153. – №. 1. – P. 58–65.
10. Hunault-Berger, M. A Phase 2 study of L-asparaginase encapsulated in erythrocytes in elderly patients with Philadelphia chromosome negative acute lymphoblastic leukemia: The GRASPALL/GRAALL-SA2-2008 study. / M. Hunault-Berger, T. Leguay, F. Huguet, S. Lepretre, E. Deconinck, M. Ojeda-Uribe, C. Bonmati, M. Escoffre-Barbe, P. Bories, C. Hemberlin, P. Chevallier, P. Rousselot, O. Reman, M.-L. Boulland, S. Lissandre, P. Turlure, D. Bouscary, L. Sanhes, O. Legrand, M. Lafage-Pochitaloff, M.C. Bene, D. Liens, Y. Godfrin, N. Ifrah, H. Dombret. // *American Journal of Hematology*. – 2015. – V. 90. – №. 9. – P. 811–818.
11. Борсакова, Д.В. L-аспарагиназа: новые подходы к улучшению фармакологических свойств. / Д.В. Борсакова, Е.И. Синауридзе // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2018. - Т. 17. - № 4. – С. 80-97.
12. Rossi, L. Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease. / L. Rossi, S. Serafini, L. Cenerini, F. Picardi, I. Panzani, M. Magnani. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2001. – V. 33. – Pt. 2. – P. 85–89.
13. Magnani, M. Red blood cells as a delivery system for AZT. / M. Magnani, M. Giovine, A. Fraternali, G. Damonte, L. Rossi, S. Scarfi, U. Benatti, A. Deflora. // *Drug Delivery*. – 1995. – V. 2. – № 1. – P. 57–61.
14. Beutler, E. Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: preliminary clinical trial of a new enzyme preparation. / E. Beutler, G.L. Dale, D.E. Guinto, W. Kuhl. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1977. – V. 74. – № 10. – P. 4620–4623.
15. Вак, В.Е. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with

- polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase. / B.E. Bax, M.D. Bain, L.D. Fairbanks, A.D.B. Webster, R.A. Chalmers. // *British Journal of Haematology*. – 2000. – V. 109. – № 3. – P. 549–554.
16. Adriaenssens, K. Use of enzyme-loaded erythrocytes in in-vitro correction of arginase-deficient erythrocytes in familial hyperargininemia. / K. Adriaenssens, D. Karcher, A. Lowenthal, H.G. Terheggen. // *Clinical Chemistry*. – 1976. – V. 22, № 3. – P. 323–326.
  17. Kosenko, E.A. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification. / E.A. Kosenko, N.I. Venediktova, A.A. Kudryavtsev, F.I. Ataulakhanov, Y.G. Kaminsky, V. Felipo, C. Montoliu. // *Biochemistry and Cell Biology*. – 2008. – V. 86. – № 6. – P. 469–476.
  18. Alexandrovich, Y.G. Rapid elimination of blood alcohol using erythrocytes: mathematical modeling and in vitro study. / Y.G. Alexandrovich, E.A. Kosenko, E.I. Sinauridze, S.I. Obydennyi, I.I. Kireev, F.I. Ataulakhanov, Y.G. Kaminsky. // *Biomed Research International*. – 2017. – V. 2017. – ID 5849593. P. 1–14.
  19. Magnani, M. Methanol detoxification by enzyme-loaded erythrocytes. / M. Magnani, A. Fazi, F. Mangani, L. Rossi, U. Mancini. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 1993. – V. 18. – № 3. – P. 217–226.
  20. Auron, A. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. / A. Auron, P.D. Brophy. // *Pediatric Nephrology*. – 2012. – V. 27. – № 2. – P. 207–222.
  21. Felipo, V. Neurobiology of ammonia. / V. Felipo, R. F. Butterworth. // *Progress in Neurobiology*. – 2002. – V. 67. – № 4. – P. 259–279.
  22. Als-Nielsen, B. Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systematic review of randomised trials. / B. Als-Nielsen, L.L. Gluud, C. Gluud. // *British Medical Journal*. – 2004. – V. 328. – № 7447. – P. 1046. (6 P.)
  23. Zhan, T. The diagnosis and treatment of minimal hepatic encephalopathy. / T. Zhan, W. Stremmel. // *Deutsches Arzteblatt International*. – 2012. – V. 109. – № 10. – P. 180–187.
  24. Tromm, A. Orthograde whole gut irrigation with mannite versus paromomycine + lactulose as prophylaxis of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis and

- upper gastrointestinal bleeding: results of a controlled randomized trial. / A. Tromm, T. Griga, I. Greving, H. Hilden, D. Huppe, U. Schwegler, G.H. Macklefield, B. May. // *Hepatogastroenterology*. – 2000. – V. 47. – № 32. – P. 473–477.
25. Sushma, S. Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial. / S. Sushma, S. Dasarathy, R. K. Tandon, S. Jain, S. Gupta, M.S. Bhist. // *Hepatology*. - 1992. – V. 16. - № 1. – P. 138-144.
  26. Ammonul. Clinical Review. NDA 20645. [Электронный ресурс] / W. Lubas // Center for Drug Evaluation and Research. – 2005. Режим доступа: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2005/020645s000\\_MedR.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2005/020645s000_MedR.pdf)
  27. Ah Mew, N., N-carbamylglutamate augments ureagenesis and reduces ammonia and glutamine in propionic acidemia. / N. Ah Mew, R. McCarter, Y. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, M. Tuchman. // *Pediatrics*. – 2010. – V. 126. – №. 1. – P. e208–e214.
  28. Kircheis, G. Therapeutic efficacy of L-ornithine-L-aspartate infusions in patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. / G. Kircheis, R. Nilius, C. Held, H. Berndt, M. Buchner, R. Gortelmeyer, R Hendricks, B. Kruger, B. Kuklinski, H. Meister, H. Otto, C. Rink, W. Rosch, S. Stauch. // *Hepatology*. – 1997. – V. 25. – № 6. – P. 1351–1360.
  29. Комов, В.П. Биохимия: учебник для вузов / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – 3-е изд., стереотип. – М. : Дрофа, 2008. – 638 с.
  30. Ивенс, И. Механика и термодинамика биологических мембран / И. Ивенс, Р. Скейлак; Перевод с англ. Ю.А. Ермакова. – М.: Мир, 1982. - 304 с.
  31. Singer, S.J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. / S.J. Singer, G.L. Nicolson. // *Science*. - 1972. – V. 175. - № 4023. – P. 720-731.
  32. Албертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф, К. Роберте, Дж. Уотсон. – в 3-х т. – 2-е изд., перераб. и доп. Пер. с англ. – М. : Мир, 1994 – Т. 1. – 517 с.
  33. Атауллаханов, Ф.И. Эритроцит: мешок с гемоглобином или живая, активная клетка? / Ф.И. Атауллаханов, Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, Е.И. Синауридзе,

- А.М. Зейналов. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2018. – Т. 17. - № 1. – С. 108-116.
34. Шиффман, Ф.Дж. Патопфизиология крови / Ф.Дж. Шиффман; пер. с англ. под ред. Е.Б. Жибурта, Ю.Н. Токарева; под общ. Ю.В. Наточина. – Москва: Бином, 2009. - 446 с.
35. Klausner, M.A. Contrasting splenic mechanisms in the blood clearance of red blood cells and colloidal particles. / M.A. Klausner, L.J. Hirsch, P.F. Leblond, J.K. Chamberlain, M.R. Klemperer, G.B. Segel. // Blood. – 1975. – V. 46. – № 6. – P. 965-976.
36. Harris, J. The Red Cell: Production, Metabolism, Destruction: Normal and Abnormal. / J. Harris, R. Kellermeyer. - Harvard University Press, Cambridge, Mass. - 1970. – 306 с.
37. Na, N. Serum free hemoglobin concentrations in healthy individuals are related to haptoglobin type. / N. Na, J. Ouyang, Y.E.C. Taes, J.R. Delanghe. // Clinical Chemistry. – 2005. – V. 51. – № 9. – P. 1754-1755.
38. Атауллаханов, Ф.И. Регуляция метаболизма в эритроцитах: дис. ... д-ра физ.-мат. наук: 03.00.02 / Атауллаханов Фазоил Иноятович. – М., 1982. – 296 с.
39. Canham, P.B. Distribution of size and shape in populations of normal human red cells. / P.B. Canham, A.C. Burton. // Circulation Research. – 1968. – V. 22. – № 3. – P. 405–422.
40. Markin, V.S. Lateral organization of membranes and cell shapes. / V.S. Markin. // Biophysical Journal. – 1981. – V. 136. - № 1. – P. 1-19.
41. Калягина, Н.В. Математическая модель осморегуляции объема эритроцита с учетом механических характеристик мембраны: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.01.02 / Калягина Надежда Вячеславовна. – М., 2015. – 151 с.
42. Рубин, А.Б. Биофизика: учеб. для студентов вузов, обучающихся по специальности "Биофизика" / А.Б. Рубин. – 3-е изд., испр. и доп. – М. : Изд-во Моск. ун-та : Наука, 2004. – 468 с.
43. Svetina, S. Curvature-dependent protein–lipid bilayer interaction and cell mechanosensitivity./ S. Svetina. // European Biophysics Journal. – 2015. – V. 44. - № 7. – P. 513-519.

44. Guckenberger, A. Numerical-experimental observation of shape bistability of red blood cells flowing in a microchannel. / A. Guckenberger, A. Kihm, T. John, C. Wagner, S. Gekle. // *Soft Matter*. - 2018. – V. 14. - № 11 – P. 2032-2043.
45. Атауллаханов, Ф.И. Как регулируется объем эритроцита, или что могут и чего не могут математические модели в биологии. / Ф.И. Атауллаханов, Н.О. Корунова, И.С. Спиридонов, И.О. Пивоваров, Н.В. Калягина, М.В. Мартынов. // *Биологические мембраны*. – 2009. – Т. 26. - № 3. – С. 163–179.
46. Bessis, M. Deformability of normal, shape altered and pathological red cells. / M. Bessis, N. Mohandas. // *Blood cells*. – 1975. – V. 1. – № 2. – P. 315-321.
47. Котык, А. Мембранный транспорт / А. Котык, К. Яначек; Пер. с англ. Ю.А. Ермакова, А.М. Юркевича. - М. : Мир, 1980. - 341 с.
48. Evans, E.A. Osmotic correction to elastic area compressibility measurements on red cell membrane. / E.A. Evans, R. Waugh. // *Biophysical Journal*. – 1977. - V. 20. – № 3. – P. 307-313.
49. Pribush, A. Kinetics of erythrocyte swelling and membrane hole formation in hypotonic media. / A. Pribush, D. Meyerstein, N. Meyerstein. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2002. – V. 1558. – № 2. – P. 119-132.
50. Skalak, R. Modelling the mechanical behavior of red blood cells. / R. Skalak. // *Biorheology*. – 1973. – V. 10. – № 2. – P. 229–238.
51. Hoffman, J.F. On red blood cells, hemolysis and resealed ghosts./ J.F.Hoffman. // *The Use of Resealed Erythrocytes as Carriers and Bioreactors*. Magnani M., Deloach J.R., Eds. – New York: Premium Press. - 1992. – P. 1-15.
52. McGough, A.M. On the structure of eErythrocyte spectrin in partially expanded membrane skeletons. / A.M. McGough, R. Josephs. // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1990. – V. 87. – № 13. – P. 5208-5212.
53. Linderkamp, O. Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red cells. / O. Linderkamp, H.J. Meiselman. // *Blood*. - 1982. – V. 59. – № 6. – P. 1121-1127.
54. Ponder, E. Diffractometric measurements of the tonicity volume relations of human red cells in hypotonic systems. / E. Ponder. // *Journal of General Physiology*. -1951. – V. 34. – № 5. – P. 567–571.

55. Evans, J. Fluctuations of the red blood cell membrane: Relation to mechanical properties and lack of ATP dependence. / J. Evans, W. Gratzer, N. Mohandas, K. Parker, J. Sleep. // *Biophysical Journal*. - 2008. - V. 94 - № 10 - P. 4134 - 4144.
56. Seeman, P. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. / P. Seeman. // *Journal of Cell Biology*. - 1967. - V. 32. - № 1. - P. 55-70.
57. Ackers, G.K. Molecular code for cooperativity in hemoglobin. / G.K. Ackers, M.L. Doyle, D. Myers, M.A. Daugherty. // *Science*. - 1990. - V. 255. - № 5040. - P. 54-63.
58. Perutz, M.F. *Proteins and Nucleic Acids. Structure and Function*. / M.F. Perutz. - London: Elsevier Publishing Company, 1962. - 211 p.
59. Ponder, E. The escape of hemoglobin from the red cell during hemolysis. / E. Ponder, D. Marsland. // *Journal of General Physiology*. - 1935. - V. 19. - № 1. - P. 35 - 44.
60. Rand, R.P. Area and volume changes in hemolysis of single erythrocytes. / R.P. Rand, A.C. Burton. // *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. - 1963. - V. 61. - № 3. - P. 245-253.
61. Heedman, P.A. Hemolysis of individual red blood cells. An interferometer microscopic investigation. / P.A. Heedman. // *Experimental Cell Research*. - 1958. - V. 14, № 1. - P. 9-22.
62. Danon, D. Osmotic hemolysis by a gradual decrease in the ionic strength of the surrounding medium. / D. Danon. // *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. - 2018. - V. 57. - № 2. - P. 111-117.
63. Jay, A.W. The stages of osmotic haemolysis. / A.W. Jay, S. Rowlands. // *Journal of Physiology*. - 1975. - V. 252. - № 3. - P. 817-832.
64. Canham, P.B. The area and volume of single human erythrocytes during gradual osmotic swelling to hemolysis. / P.B. Canham, D.R. Parkinson. // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. - 1970. - V. 48. - № 6. - P. 369-376.
65. Hoffman, J.F. Physiological characteristics of human red blood cell ghosts. / J.F. Hoffman. // *Journal of General Physiology*. - 1958. - V. 42. - № 1. - P. 9-28.
66. Saari, J.T. Hypotonic hemolysis of human red blood cells: a two-phase process. /

- J.T. Saari, J.S. Beck. // *Journal of Membrane Biology*. – 1975. – V. 23. – № 1. – P. 213–226.
67. Pribush, A. Osmotic swelling and hole formation in membranes of thalassemic and spherocytic erythrocytes. / A. Pribush, L. Hatskelzon, J. Kapelushnik, N. Meyerstein. // *Blood Cells, Molecules and Diseases*. – 2003. – V. 31. – № 1. – P. 43–47.
68. Erickson, H.P. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. / H.P. Erickson. // *Biological Procedures Online*. – 2009. – V. 11. – № 1. – P. 32–51.
69. Moon, K. Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. 8. Peptides produced by specific chemical cleavages; the complete sequence of the protein. / K. Moon, E.L. Smith. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1973. – V. 248. – № 9. – P. 3082–3088.
70. Saier, M.H. Alanine aminotransferase. I. Purification and properties. / M.H. Saier, W.T. Jenkins. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1967. – V. 242. – № 1. – P. 91–100.
71. Colman, R.F. Glutamate Dehydrogenase (Bovine Liver). - A Study of Enzymes. Chapt. 7. ed. by S.A. Kuby. - Boston: C.R.C. Press, 1991. – P. 173-192.
72. Marsden, N.V.B. The effect of dextran on the dry mass distribution in osmotic hemolysis. / N.V.B. Marsden, M. Zade-Oppen, L.P. Johansson. // *Experimental Cell Research*. – 1957. – V. 13. – № 1. – P. 177–181.
73. Marsden, N.V.B. Accumulation of dextran in human red cells after hæmolysis. / N.V.B. Marsden, S.G. Östling. // *Nature*. – 1959. – V. 184. – № 4687. – P. 723–724.
74. Davies, H.G. The effect of some neutral macromolecules on the pattern of hypotonic hemolysis. / H.G. Davies, N.V.B. Marsden, S.G. Östling, A.M.M. Zade-Oppen. // *Acta Physiologica Scandinavica*. – 2018. – V. 74. – № 4. – P. 577–593.
75. Lowenstein, L.M. The effect of albumin on osmotic hemolysis. / L.M. Lowenstein. // *Experimental Cell Research*. – 1960. – V. 20. – № 1. – P. 56–65.
76. Seeman, P. Macromolecules may inhibit diffusion of hemoglobin from lysing erythrocytes by exclusion of solvent. / P. Seeman. // *Canadian Journal of*

- Physiology and Pharmacology. – 1973. – V. 51. – P. 226.
77. Seeman, P. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. / P. Seeman, D. Cheng, G.H. Iles. // *Journal of Cell Biology*. – 1973. – V. 56. – № 2. – P. 519–527.
  78. Hanahan, D. Is lipid lost during preparation of erythrocyte membranes. / D. Hanahan, J. Ekholm, M. Luthra. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1974. – V. 363. – № 2. – P. 283–286.
  79. Schrier, S.L. Transmembrane redistribution of phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis. / S.L. Schrier, A. Zachowski, P. Hervé, J.C. Kader, P.F. Devaux. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1992. – V. 1105. – № 1. – P. 170–176.
  80. Teorell, T. Permeability properties of erythrocyte ghosts. / T. Teorell. // *Journal of General Physiology*. – 1952. – V. 35. – № 5. – P. 669–701.
  81. Bodemann, H. Factors controlling the resealing of the membrane of human erythrocyte ghosts after hypotonic hemolysis. / H. Bodemann, H. Passow. // *Journal of Membrane Biology*. – 1972. – V. 8. – № 1. – P. 1–26.
  82. Bain, B.J. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. / B.J. Bain, I. Bates, M.A. Laffan, S. M. Lewis. 11<sup>th</sup> Edition. – London: Elsevier, 2006.- 653 p.
  83. Кумукова, И.Б. Сравнение лабораторных показателей рентген облученных эритроцитных взвесей и взвесей, полученных из цельной крови, предварительно обработанной ультрафиолетом в присутствии рибофлавина. / И.Б. Кумукова, П.Е. Трахтман, Н.Н. Старостин, Д.В. Борсакова, А.А. Игнатова, А.Ю. Федотов, М.Е. Плахотник, Ф.И. Атауллаханов. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2018. – Т. 17. - № 1.- С. 64-74.
  84. Trakhtman, P.B. The pathogen-reduced red blood cell suspension: single center study of clinical safety and efficacy in children with oncological and hematological diseases. / P. Trakhtman, I. Kumukova, N. Starostin, D. Borsakova, D. Balashov, A. Ignatova, L. Kadaeva, G. Novichkova, A. Rumiantcev. *Vox Sanguinis*. – 2019. – V. 114. - № 3. – P. 223-231.
  85. Mitchell, D.H. Bioactivity of electric field-pulsed human recombinant interleukin-2

- and its encapsulation into erythrocyte carriers. / D.H. Mitchell, G.T. James, C.A. Kruse. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 1990. – V. 12. – № 3. – P. 264–75.
86. Kinosita, K. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. / K. Kinosita, T. Tsong. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1977. – V. 471. – № 2. – P. 227–242.
87. Teissié, J. Evidence of voltage-induced channel opening in Na/K ATPase of human erythrocyte membrane. / J. Teissié, T.Y. Tsong. // *Journal of Membrane Biology*. – 1980. – V. 55. – № 2. – P. 133–140.
88. Bruggemann, U. Low-oxygen-affinity red cells produced in a large-volume, continuous-flow electroporation system. / U. Bruggemann, E.C. Roux, J. Hannig, C. Nicolau. // *Transfusion*. – 1995. - V. 35. - № 6. – P. 478–486.
89. Ginn, F.L. Membrane alterations in hemolysis: internalization of plasmalemma induced by primaquine. / F.L. Ginn, P. Hochstein, B.F. Trump. // *Science*. – 1969. – V. 164. – № 3881. – P. 843 – 845.
90. Ben-Bassat, I. Drug-induced erythrocyte membrane internalization. / I. Ben-Bassat, K.G. Bensch, S.L. Schrier. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1972. – V. 51. – № 7. – P. 1833–1844.
91. Matovcik, L.M. Drug-induced endocytosis of neonatal erythrocytes. / L.M. Matovcik, I.G. Junga, S.L. Schrier. // *Blood*. – 1985. – V. 65. - № 5. – P. 1056–1063.
92. Сарбаш, В.И. Эритроциты - носители лекарственных препаратов. / В.И. Сарбаш, А.Г. Тихонова, Т.А. Вуймо, А.Л. Дербов, Ю.Г. Александрович, А.А. Бутылин, В.М. Витвицкий, Ф.И. Атауллаханов. // *Российский химический журнал*. – 2007. – Т. LI, № 1. – С. 143–149.
93. Yamagata, K. Encapsulation of concentrated protein into erythrocyte porated by continuous-wave ultrasound. / K. Yamagata, E. Kawasaki, H. Kawarai, M. Iino. // *Ultrasound in Medicine and Biology*. – 2008. – V. 34. – № 12. – P. 1924–1933.
94. Torchilin, V. Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. / V. Torchilin. // *Drug Discovery Today: Technologies*. – 2009. – V. 5. – № 2–3. – P. 95-103.

95. Kwon, Y.M. L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). / Y.M. Kwon, H.S. Chung, C. Moon, J. Yockman, Y.J. Park, S.D. Gitlin, A.E. David, V.C. Yang. // *Journal of Controlled Release*. – 2009. – V. 139. – № 3. – P. 182–189.
96. Bourgeaux, V. Drug-loaded erythrocytes: On the road toward marketing approval. V. Bourgeaux, J.M. Lanao, B.E. Bax, Y. Godfrin. // *Drug Design, Development and Therapy*. – 2016. – V. 10. – P. 665–676.
97. Mosca, A. IHP entrapment into human erythrocytes: comparison between hypotonic dialysis and DMSO osmotic pulse. / A. Mosca, R. Paleari, V. Russo, E. Rosti, R. Nano, A. Boicelli, S. Villa, A. Zanella. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 1992. – V. 326. – P. 19–26.
98. Franco, R.S. Incorporation of inositol hexaphosphate into red blood cells mediated by dimethyl sulfoxide. / R.S. Franco, M. Weiner, K. Wagner, O.J. Martelo. // *Life Sciences*. – 1983. – V. 32. – № 24. – P. 2763–2768.
99. Franco, R.S. Preparation of low-affinity red cells with dimethylsulfoxide-mediated inositol hexaphosphate incorporation: hemoglobin and ATP recovery using a continuous-flow method. / R.S. Franco, K. Wagner, M. Weiner, O.J. Martelo. // *American Journal Hematology*. – 1984. – V. 17. – № 4. – P. 393–400.
100. Franco, R.S. Effect of inositol hexaphosphate on the transient behavior of red cells following a DMSO-induced osmotic pulse. / R.S. Franco, R. Barker, S. Novick, M. Weiner, O.J. Martelo. // *Journal of Cellular Physiology*. – 1986. – V. 129. – № 2. – P. 221–229.
101. Updike, S.J. Infusion of red blood cell-loaded asparaginase in monkey. Immunologic, metabolic, and toxicologic consequences. / S.J. Updike, R.T. Wakamiya. // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1983. – V. 101. – № 5. – P. 679–691.
102. Ihler, G.M. Enzyme loading of erythrocytes. / G.M. Ihler, R.H. Glew, F.W. Schnure. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1973. – V. 70. – № 9. – P. 2663–2666.
103. Rechsteiner, M.C.C. Uptake of proteins by red blood cells. / M.C.C. Rechsteiner. // *Experimental Cell Research*. – 1975. – V. 93. – № 2. – P. 487–492.

104. Alpar, H.O. Therapeutic efficacy of asparaginase encapsulated in intact erythrocytes. / H.O. Alpar, D.A. Lewis. // *Biochemical Pharmacology*. – 1985. – V. 34. – № 2. – P. 257–261.
105. Humphreys, J.D. Enhanced stability of erythrocyte-entrapped glucocerebrosidase activity. / J.D. Humphreys, G. Ihler. // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1980. – V. 96. – № 4. – P. 682–692.
106. Magnani, M. Erythrocyte engineering for drug delivery and targeting. / M. Magnani, L. Rossi, M. D'ascenzo, I. Panzani, L. Bigi, A. Zanella. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 1998. – V. 28 (Pt. 1). – P. 1–6.
107. Bax, B.E. A 9-yr evaluation of carrier erythrocyte encapsulated adenosine deaminase (ADA) therapy in a patient with adult-type ADA deficiency. / B.E. Bax, M.D. Bain, L.D. Fairbanks, A.D. Webster, P.W. Ind, M.S. Hershfield, R.A. Chalmers. // *European Journal of Haematology*. – 2007. – V. 79. – № 4. – P. 338–348.
108. DeLoach, J.R. An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of a pesticide in erythrocyte ghosts. / J.R. DeLoach, R.L. Harris, G.M. Ihler. // *Analytical Biochemistry*. – 1980. – V. 102. – № 1. – P. 220–227.
109. Bourgeaux, V. Inositol hexaphosphate-loaded red blood cells prevent in vitro sickling. / V. Bourgeaux, O. Hequet, Y. Campion, G. Delcambre, A.M. Chevrier, D. Rigal, Y. Godfrin. // *Transfusion*. – 2010. – V. 50. – № 10. – P. 2176–2184.
110. Banz, A. In situ targeting of dendritic cells by antigen-loaded red blood cells: A novel approach to cancer immunotherapy. / A. Banz, M. Cremel, A. Rembert, Y. Godfrin. // *Vaccine*. – 2010. – V. 28. – № 17. – P. 2965–2972.
111. Ropars, C. Process and device for the encapsulation in erythrocytes of at least one biologically active substance, in particular hemoglobin allosteric effectors, and erythrocytes so obtained. / C. Ropars, C. Nicolau, M. Chassaing. // EP 0101341. – Tours, France: Craydon Printing Company Ltd., 1986. – 77 p.
112. Godfrin, Y. Lysis/resealing process and device for incorporating an active ingredient, in particular asparaginase or inositol hexaphosphate, in erythrocytes. / Y. Godfrin. // WO 2006/016247. – Lyon, France: The patent cooperation treaty, 2006.

– 40 p.

113. Kravtsoff, R. Improved pharmacodynamics of L-asparaginase-loaded in human red blood cells. / R. Kravtsoff, I. Desbois, J.P. Lamagnere, J.P. Muh, Ch. Valat, M. Chassaigne, Ph. Colombat, C. Ropars. // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 1996. – V. 49. – № 6. – P. 465–470.
114. Kravtsoff, R. Tolerance evaluation of L-asparaginase loaded in red blood cells. / R. Kravtsoff, Ph. Colombat, I. Desbois, C. Linassier, J.P. Muh, Th. Philip, J.Y. Blay, M. Gardenbas, P. Poumier–Gaschard, J.P. Lamagnere, M. Chassaigne, C. Ropars. // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 1996. – V. 51. – № 3–4. – P. 221–225.
115. Häussinger, D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. / D. Häussinger. // *Biochemical Journal*. – 1990. – V. 267. - № 2. – P. 281–290.
116. Stoll, B. Functional hepatocyte heterogeneity. / B. Stoll, D. Häussinger. // *European Journal of Biochemistry*. – 1989. – V. 181. - № 3. – P. 709–716.
117. Kaiser, S. Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonaemia in chronic liver disease. / S. Kaiser, W. Gerok, D. Häussinger. // *European Journal of Clinical Investigation*. – 1988. – V. 18. - № 5. – P. 535–542.
118. Алейникова, Т.Л. Биохимия: учебник для вузов. / Т.Л. Алейникова, Л.В. Авдеева, Л. Е. Андрианова; под ред. Е.С. Северина. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. - 779 с.
119. Rudman, D. Maximal rates of excretion and synthesis of urea in normal and cirrhotic subjects. / D. Rudman, T.J. DiFulco, J.T. Galambos, R.B.3<sup>rd</sup> Smith, A.A. Salam, W.D. Warren. // *Journal of Clinical Investigation*. – 1973. – V. 52. – № 9. – P. 2241–2249.
120. Косенко, Е.А. Клеточные механизмы токсичности аммиака / Е.А. Косенко, Ю.Г. Каминский. – М.: URSS, 2007. – 281 с.
121. De Jonge, W.J. Arginine-metabolizing enzymes in the developing rat small intestine. / W.J.De Jonge, M.A. Dingemans, P.A.J. De Boer, W.H. Lamers, A.F.M. Moorman. // *Pediatric Research*. – 1998. - V. 43. - № 4. – P. 442–451.

122. Dingemans, M.A. Expression patterns of ammonia-metabolizing enzymes in the liver, mesonephros, and gut of human embryos and their possible implications. / M.A. Dingemans, W.H. Lamers. // *The Anatomical Record*. – 1994. – V. 238. – № 4. – P. 480–490.
123. Wu, G. Urea synthesis in enterocytes of developing pigs. / G. Wu. // *Biochemistry Journal*. – 1995. – V. 312. – Pt. 3. – P. 717–723.
124. Davis, P.K. Compartmentation and kinetics of urea cycle enzymes in porcine enterocytes. / P.K. Davis, G. Wu. // *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 1998. – V. 119. – № 3. – P. 527–537.
125. Marcaggi, P. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. / P. Marcaggi, J.A. Cole. // *Progress in Neurobiology*. – 2001. – V. 64. – № 2. – P. 157–183.
126. Klocke, R. Permeability of human erythrocytes to ammonia and weak acids. / R. Klocke, K. Andersson, H. Rotman, R. Forster. // *American Journal of Physiology*. – 1972. – V. 222. – № 4. – P. 1004–1013.
127. Litman, T. Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins. / T. Litman, R. Søgaard, T. Zeuthen. // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2009. – V. 190 – P. 327–358.
128. Planelles, G. Ammonium homeostasis and human rhesus glycoproteins. / G. Planelles. // *Nephron Physiology*. – 2007. – V. 105. – № 1. – P. 11–17.
129. Судницина, Ю.С. Функциональная взаимосвязь аммонийного (RHAG) и анионного (AE1) транспортеров эритроцитов человека. / Ю.С. Судницина, Е.А. Скверчинская, И.А. Добрылко, Е.Р. Никитина, А.И. Кривченко, С.П. Гамбарян, И.В. Миндукшев. // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. – 2016. – Т. 33. – № 5. – С. 363 – 373.
130. Ishihara, A. Enzymatic determination of ammonia in blood plasma. / A. Ishihara, K. Kurahasi, H. Uehara. // *Clinica Chimica Acta*. – 1972. – V. 41. – P. 255–261.
131. Cooper, A.J. Biochemistry and physiology of brain ammonia. / A.J. Cooper, F. Plum. // *Physiology Review*. – 1987. – V. 67. – № 2. – P. 440–519.
132. Khatra, B.S. Activities of Krebs-Henseleit enzymes in normal and cirrhotic human

- liver. / B.S. Khatra, R.B. Smith III, W.J. Millikan, C.W. Sewell, W.D. Warren, D. Rudman. // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1974. – V. 84. – № 5. – P. 708–715.
133. Grisolia, S. Control of urea synthesis and ammonia detoxification. / S. Grisolia, M. Miñana, E. Grau, V. Felipo. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 1993. - V. 341. – P. 1–12.
134. McKusick, V.A. Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-linked Phenotypes. / V.A. McKusick. - 8th ed., Baltimore and London: The John Hopkins University Press, 1988. – 1626 p.
135. Guggenheim, S.J. Inhibition by ammonium of sodium transport across isolated toad bladder. / S.J. Guggenheim, J. Bourgoignie, S. Klahr. // *American Journal of Physiology*. – 1971. – V. 220. – № 6. – P. 1651–1659.
136. Brierley, G.P. Ion transport by heart mitochondria. XVIII. Swelling and contraction of heart mitochondria suspended in ammonium chloride. / G.P. Brierley, C.D. Stoner. // *Biochemistry*. – 1970. – V. 9. – № 4. – P. 708–713.
137. Olney, J.W. Excitotoxicity and N-methyl-D-aspartate receptors. / J.W. Olney. // *Drug Development Research*. – 1989. - V. 17. - № 4. – P. 299–319.
138. Sharma, B.C. A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy. / B.C. Sharma, P. Sharma, M.K. Lunia, S. Srivastava, R. Goyal, S.K. Sarin. // *American Journal of Gastroenterology*. – 2013. - V. 108. - № 9. – P. 1458–1463.
139. Mas, A. Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial. / A. Mas, J. Rodes, L. Sunyer, L. Rodrigo, R. Planas, V. Vargas, L. Castells, D. Rodriguez-Martinez, C. Fernandez-Rodriguez, I. Coll, A. Pardo, Spanish Association for the Study of the Liver Hepatic Encephalopathy Cooperative Group. // *Journal of Hepatology*. - 2003. – V. 38. - № 1. – P. 51-58.
140. Romeiro, F.G. Erythromycin versus neomycin in the treatment of hepatic encephalopathy in cirrhosis: A randomized double-blind study. / F.G. Romeiro, F. da Silva Yamashiro, M.F. Americo, L.A. Cora, G.F. Silva, J.R. Miranda, C.A. Caramori. // *BMC Gastroenterology*. - 2013. – V. 13. - № 13. – P. 1-7.

141. Valayannopoulos, V. Carglumic acid enhances rapid ammonia detoxification in classical organic acidurias with a favourable risk-benefit profile: A retrospective observational study. / V. Valayannopoulos, J. Baruteau, M.B. Delgado, A. Cano, M.L. Couce, M. Del Toro, M.A. Donati, A. Garcia-Cazorla, D. Gil-Ortega, P. Gomez-de Quero, N. Guffon, F.C. Hofstede, S. Kalkan-Ucar, M. Coker, R. Lama-More, M.M-P. Casanova, A. Molina, S. Pichard, F. Papadia, P. Rosello, C. Plisson, J. Le Mouhaer, A. Chakrapani. // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. - 2016.- V. 11. - № 32. – P. 1-11.
142. Ah Mew, N., Augmenting ureagenesis in patients with partial carbamyl phosphate synthetase 1 deficiency with N-carbamyl-L-glutamate. / N. Ah Mew, R. McCarter, Y. Daikhin, U. Lichter-Konecki, I. Nissim, M. Yudkoff, M. Tuchman. // *The Journal of Pediatrics*. – 2014. – V. 165. - № 2. – P. 401–403.
143. Husson, M.-C. Efficacy and safety of i.v. sodium benzoate in urea cycle disorders: a multicentre retrospective study. / M.-C. Husson, M. Schiff, A. Fouilhoux, A. Cano, D. Dobbelaere, A. Brassier, K. Mention, J.-B. Arnoux, F. Feillet, B. Chabrol, N. Guffon, C. Elie, P. de Lonlay. // *Orphanet Journal of Rare Diseases*. – 2016. – V. 11. - № 1. – P.127.
144. Honda, S. Successful treatment of severe hyperammonemia using sodium phenylacetate powder prepared in hospital pharmacy. / S. Honda, K. Yamamoto, M. Sekizuka, Y. Oshima, K. Nagai, G.-I. Hashimoto, H. Kaneko, T. Tomomasa, Y. Konno, R. Horiuchi. // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2002. – V. 25. - № 9. – P. 1244–1246.
145. Bai, M. Randomised clinical trial: L-ornithine-L-aspartate reduces significantly the increase of venous ammonia concentration after TIPSS. / M. Bai, C. He, Z. Yin, J. Niu, Z. Wang, X. Qi, L. Liu, Z. Yang, W. Guo, J. Tie, W. Bai, J. Xia, H. Cai, J. Wang, K. Wu, D. Fan, G. Han. // *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. – 2014. - V. 40. - № 1. – P. 63–71.
146. Mizutani, N. Oral administration of arginine and citrulline in the treatment of lysinuric protein intolerance. / N. Mizutani, T. Kato, M. Maehara, K. Watanabe, M. Ban. // *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. – 1984. – V. 142. - № 1. –

P. 15-24.

147. Malaguarnera, M. Effects of L-carnitine in patients with hepatic encephalopathy. / M. Malaguarnera, G. Pistone, R. Elvira, C. Leotta, L. Scarpello, R. Liborio. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2005. – V. 11. – № 45. – P. 7197–7202.
148. Venediktova, N.I. Studies on ammocytes: development, metabolic characteristics, and detoxication of ammonium. / N.I. Venediktova, E.A. Kosenko, Y.G. Kaminsky. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2008. – V. 146. – № 6. – P. 730–732.
149. Sanz, S. Biochemical properties of alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by a hypotonic-dialysis procedure. / S. Sanz, C. Lizano, M. I. Garin, J. Luque, M. Pinilla. *Erythrocytes as Drug Carriers in Medicine*, Sprandel U, Way JL, Eds. - New York: Springer Science+Business Media, 1997. – P. 101–108.
150. Sanz, S. In vitro and in vivo study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure. / S. Sanz, C. Lizano, J. Luque, M. Pinilla. // *Life Sciences*. – 1999. – V. 65. – № 26. – P. 2781–2789.
151. Sanz, S. The influence of enzyme concentration on the encapsulation of glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in red blood cells. / S. Sanz, M. Pinilla, M. Garin, K.F. Tipton, J. Luque. // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 1995. – V. 22. – № 2. – P. 223–231.
152. Labotka, R.J. Ammonia permeability of erythrocyte membrane studied by  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  saturation transfer NMR spectroscopy. / R.J. Labotka, P. Lundberg, P.W. Kuchel. // *American Journal of Physiology*. – 1995. – V. 268. – № 3. – P. 686 – 699.
153. Zolla, L. Encapsulation of proteins into human erythrocytes: a kinetic investigation. / L. Zolla, G. Lupidi, M. Marcheggiani, G. Falcioni, M. Brunori. // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 1990. – V. 1024. – № 1. – P. 5–9.
154. Smith, E.L. Glutamate Dehydrogenases. / E.L. Smith, B.M. Austen, K.M. Blumenthal, J.F. Nyc. - *The Enzymes*, 3<sup>rd</sup> ed.- vol. 2, Ed. Boyer. - New York: Academic Press, 1975. – P. 293–367.
155. Frieden, C. Glutamic dehydrogenase. III The order of substrate addition in the

- enzymatic reaction/ C. Frieden // *Journal of Biological Chemistry*. - 1959. - V. 234. - № 11. - P. 2891–2896.
156. Shimizu, H. Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from *Proteus inconstans*. / H. Shimizu, T. Kuratsu, F. Hirata. // *Journal of Fermentation Technology*. – 1979. – V. 57. – № 5. – P. 428–433.
157. Eisenberg, H. Molecular weight of the subunits, oligomeric and associated forms of bovine liver glutamate dehydrogenase. / H. Eisenberg, G.M. Tomkins. // *Journal of Molecular Biology*. – 1968. – V. 31. – № 1. – P. 37–49.
158. Sund, H. Sedimentation coefficient and molecular weight of beef liver glutamate dehydrogenase at the microgram and the milligram level. / H. Sund, W. Burchard. // *European Journal of Biochemistry*. – 1968. – V. 6. - № 2. – P. 202–206.
159. Colman, R.F. On the role of amino groups in the structure and function of glutamate dehydrogenase. I. Effect of acetylation on catalytic and regulatory properties. / R.F. Colman, C. Frieden. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1966. - V. 241. – № 16. – P. 3652–3660.
160. Godinot, C. Biosynthesis of glutamate dehydrogenase in rat liver. Demonstration of its microsomal localization and hypothetical mechanism of transfer to mitochondria. / C. Godinot, H.A. Lardy. // *Biochemistry*. – 1973. – V. 12. – № 11. – P. 2051–2060.
161. Goldin, B.R. L-Glutamate dehydrogenases. / B.R. Goldin, C. Frieden. // *Current Topics in Cellular Regulation*. – 1971. - V. 4. - P. 77–117.
162. Frieden, C. Glutamate dehydrogenase concentration as a determinant in the effect of purine nucleotides on enzymatic activity. / C. Frieden, R.F. Colman. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1967. – V. 242. - № 8. – P. 1705–1715.
163. King, K. The purification and physical properties of glutamate dehydrogenase from rat liver. / K. King, C. Frieden. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – V. 245. - № 17. – P. 4391–4396.
164. Corman, L. Purification and kinetic characteristics of dogfish liver glutamate dehydrogenase. / L. Corman, L. Prescott, N. Kaplan. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1967. - V. 242. - № 7. – P. 1383–1390.
165. Fisher, H.F. The kinetic measurement of the  $\alpha$ - $\beta$  dissociation of glutamate

- dehydrogenase. / H.F. Fisher, J.R. Bard. // *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure*. – 1969. – V. 188. - № 1. – P. 168–170.
166. Piszkiwicz, D. Bovine liver glutamate dehydrogenase. / D. Piszkiwicz, M. Landon, E.L. Smith. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1970. – V. 245. – № 5. – P. 2622–2626.
167. Chen, B.S. The equilibrium position of the reaction of bovine liver glutamate dehydrogenase with pyridoxal 5'-phosphate. / B.S. Chen, P.C. Engel. // *Biochemical Journal*. – 1975. – V. 147. - № 2. – P. 351–358.
168. Choudhury, R. Competitive inhibition of glutamate dehydrogenase reaction. / R. Choudhury, N.S. Punekar. // *The Federation of European Biochemical Societies Letters*. – 2007. – V. 581. – № 14. – P. 2733–2736.
169. Caughey, W.S. L-glutamic acid dehydrogenase; structural requirements for substrate competition; effect of thyroxine. / W.S. Caughey, L. Hellerman, J.D. Smiley. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1957. – V. 224. – № 1. – P. 591–607.
170. Grisolia, S. Glutamate-dehydrogenase inactivation by reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. / S. Grisolia, M. Fernandez, R. Amelunxen, C. L. Quijada. // *Biochemical Journal*. – 1962. – V. 85. - № 3. – P. 568–576.
171. L-Glutamic Dehydrogenase (NADP) from *Proteus* sp. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g4387>.
172. Oliveira, T. Crystal structure of a chimaeric bacterial glutamate dehydrogenase. / T. Oliveira, M.A. Sharkey, P.C. Engel, A.R. Khan. // *Acta Crystallographica. Section. F. Structural Biology Communications*. - 2016. - V. 72. - Pt. 6. - P. 462–466.
173. The Universal Protein Resource (UniProt) [Электронный ресурс]. / Режим доступа: <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A2J9L6C9>.
174. The Protein Data Bank (PDB) [Электронный ресурс]. / Режим доступа: <http://www.rcsb.org/structure/1NR7>.
175. Peterson, P.E. The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. / P.E. Peterson, T.J. Smith. // *Structure*. – 1999. – V. 7. – № 7. – P. 769–782.
176. Swiss-model Interactive Workspace [Электронный ресурс]. / Режим доступа: <https://swissmodel.expasy.org/interactive>.

177. Tanase, S. Pyridoxal 5'-phosphate binding site of pig heart alanine aminotransferase. / S. Tanase, H. Kojima, Y. Morino. // *Biochemistry*. – 1979. – V. 18. - № 14. – P. 3002–3007.
178. De Rosa, G. Isolation and characterization of mitochondrial alanine aminotransferase from porcine tissue. / G. De Rosa, T. Burk, R. Swick. // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 1979. - V. 567. - № 1. - P. 116–124.
179. Cleland, W.W. 1 Steady State Kinetics. / W. W. Cleland. – *The Enzymes*, vol. 2. E. Boyer, Ed. - New York: Academic Press, 1970. - P. 1–65.
180. Cleland, W.W. The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. / W.W. Cleland. // *Biochimica et Biophysica Acta - Specialized Section on Enzymological Subjects*. – 1963. – V. 67. – P. 188–196.
181. Bulos, B. Kinetics of beef heart glutamic-alanine transaminase. / B. Bulos, P. Handler. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1965. – V. 240. – № 8. – P. 3283–3294.
182. Saier, M. Alanine aminotransferase II. The basis for substrate specificity. / M. Saier, W. Jenkins. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1967. – V. 242. - № 1. – P. 101–108.
183. Friedmann, H. Enzymes of red cell. A critical catalogue. / H. Friedmann, S. Rapoport; in *Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes*. - H. Yoshikawa, S. Rapoport, Eds.: Univ. Tokyo. Press, 1974. - P. 181–259.
184. Whillier, S. Glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. / S. Whillier, B. Garcia, B.E. Chapman, P.W. Kuchel, J.E. Raftos. // *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. – 2011. – V. 278. - № 17. – P. 3152–3163.
185. Woodring, M.J. Effect of pyridoxine supplementation on glutamic-pyruvic transaminase and in vitro stimulation in erythrocytes of normal women. / M.J. Woodring, C.A. Storvick. // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1970. – V. 23. – № 11. – P.1385–1395.
186. Fahien, A.L. The enzyme-enzyme complex of transaminase and glutamate dehydrogenase. / A.L. Fahien, E. Smith. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1974.

– V. 249. - № 9. – P. 2696–2703.

187. Fahien, A. The effect of transaminases on reactions catalyzed by glutamate dehydrogenase. / A. Fahien, E. Smith. // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1969. - № 135. – P. 136–151.
188. Protasov, E.S. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood. / E.S. Protasov, D.V. Borsakova, Y.G. Alexandrovich, A.V. Korotkov, E.A. Kosenko, A.A. Butylin, F.I. Ataulakhanov, E.I. Sinauridze. // Scientific Reports. – 2019. – V. 9. – № 1455. – P. 1-16.
189. Sass, M.D. Utilization of alpha-ketoglutarate by red blood cells for glutathione synthesis. / M.D. Sass. // Nature. – 1963. – V. 200. - № 4912. – P. 1209–1210.
190. Paik, M. Simultaneous clinical monitoring of lactic acid, pyruvic acid and ketone bodies in plasma as methoxime/tertbutyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography–mass spectrometry in selected ion monitoring mode. / M. Paik, E. Cho, H. Kim, K. Kim. / Biomedical Chromatography. – 2008. – V. 22. – P. 450–453.
191. Halestrap, A.P. Transport of pyruvate nad lactate into human erythrocytes. Evidence for the involvement of the chloride carrier and a chloride-independent carrier. / A.P. Halestrap. // Biochemical Journal. – 1976. – V. 156. – № 2. – P. 193–207.
192. Young, J.D. Amino acid transport in human and in sheep erythrocytes. / J.D. Young, S.E. Jones, J.C. Ellory. // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 1980. – V. 209. - № 1176. – P. 355–375.
193. Hudson, R.C. L-glutamate dehydrogenases: Distribution, properties and mechanism. / R.C. Hudson, R.M. Daniel. // Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Comparative Biochemistry. – 1993. – V. 106. - № 4. – P. 767–792.
194. Sund, H. Glutamate Dehydrogenase. / H. Sund, K. Markau, R. Koberstein; in Subunits in Biological Systems. T. 7c. - S.N. Timasheff, G.D. Fasman, Eds. - New York: Marcel Dekker, 1975. - P. 225.
195. Борсакова, Д.В. Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты. / Д.В. Борсакова, М.Е. Плахотник, Л.Д. Колева,

- Е.А. Бовт, Ю.Г. Александрович, Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе. // Онкогематология. – 2018. – Т. 13. – № 3. – С. 91-101.
196. Борсакова, Д.В. Способы повышения активности глутаматдегидрогеназы в эритроцитах-биореакторах для удаления аммония. / Д.В. Борсакова, Е.С. Протасов, С.В. Назаренко, Ю.Г. Александрович, А.А. Бутылин, Ф.И. Атауллаханов, Е.И. Синауридзе. // Биологические мембраны. – 2019. – Т. 36. - № 3. – С. 192–206.
197. McCarthy, A.D. Ox glutamate dehydrogenase. Comparison of the kinetic properties of native and proteolysed preparations. / A.D. McCarthy, K.F. Tipton. // Biochemical Journal. – 1985. – V. 230. - № 1. – P. 95–99.
198. Bergmeyer, H.U. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. / H.U. Bergmeyer. // Clinica Chimica Acta. – 1980. – V. 105. - № 1. – P. 147–154.
199. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8<sup>th</sup> Edition. - Washington DC, USA: National Acad Press, 2011. – P. 41–103.
200. Nazar, B. An improved microfluorometric enzymatic assay for the determination of ammonia. / B. Nazar, A. Schoolwerth. // Analytical Biochemistry. – 1979. – V. 95. - № 2. – P. 507–511.
201. Shcherbachenko, I.M. Oxidation-induced calcium-dependent dehydration of normal human red blood cells. / I.M. Shcherbachenko, I.L. Lisovskaya, V.P. Tikhonov. // Free Radical. Research. – 2007. – V. 41. – № 5. – P. 536–545.
202. Inoue, T. Effect of pH on the kinetics of bovine liver glutamate dehydrogenase self-association. / T. Inoue, R. Tashiro, M. Shibata, R. Shimosawa. // Biochimica et Biophysica Acta. Protein Structure. - 1982. – V. 708. - № 3. – P. 343–347.
203. Burnett, G. Mechanism-based inactivation of pig heart L-alanine transaminase by L-propargylglycine. Half-site reactivity. / G. Burnett, P. Marcotte, C. Walsh. // Journal of Biological Chemistry. – 1980. – V. 255. - № 8. – P. 3487–3491.
204. Klein, H.G. Transfusion of Blood, Blood Components and Plasma Alternatives in Oligoemia. / H.G. Klein, D.J. Anstee; in Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, 11 ed., Chapter 2. - Massachusetts: Blackwell Publishing Inc, 2014. P. 19–47.

205. Martinov, M.V. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. / M.V. Martinov, A.G. Plotnikov, V.M. Vitvitsky, F.I. Ataulakhanov. // *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. – 2000. – V. 1474. – № 1. – P. 75–87.
206. Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии: утвержден Правительством Российской Федерации от 26. 01. 2010 г. № 29. - Москва : Стандартинформ, 2010. – 19 с.
207. Chow, S.L., The significance of a high plasma ammonia value. / S.L. Chow, V. Gandhi, S. Krywawych, P.T. Clayton, J.V. Leonard., A.A. Morris. // *Archives of Disease in Childhood*. - 2004. - V. 89. - № 6. – P. 585-596.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

- Аммоцит – эритроцит-биореактор, способный утилизировать аммиак
- АДГ - аланиндегидрогеназа
- АДФ – аденозиндифосфат
- АКГ -  $\alpha$ -кетоглутарат;
- АЛА – аланин
- АЛТ – аланинатрансаминаза, аланинаминотрансфераза
- АМФ – аденозинмонофосфат
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ANOVA – дисперсионный анализ (analysis of variances)
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- ГДГ - глутаматдегидрогеназа
- ГЛН – глутамин;
- ГЛУ - глутаминовая кислота;
- ГС – глутаминсинтетаза
- H<sub>50</sub> – осмоляльность, при которой лизировано 50% клеток
- HEPES - 4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота
- Ht - гематокрит
- Км – константа Михаэлиса
- ЛАК - лактат;
- ЛД<sub>100</sub> – летальная доза соединения, вызывающая гибель 100% животных
- МЕ – международная единица активности фермента
- МСН – среднее клеточное содержание гемоглобина
- МСНС – средняя клеточная концентрация гемоглобина
- MCV – средний клеточный объем
- NAD, NADH - никотинамидадениндинуклеотид в окисленной и восстановленной форме, соответственно
- NADP, NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат в окисленной и восстановленной форме, соответственно
- ПИР - пируват;
- ПФ – пиридоксаль-5'-фосфат
- PBS – фосфатный буферный раствор
- SD – стандартное отклонение
- SEM – стандартная ошибка среднего
- Трис - трис(гидроксиметил)аминометан
- W – ширина распределения клеток по осмотической резистентности
- ЭБР – эритроцит-биореактор

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Я глубоко признательна моему научному руководителю Елене Ивановне Синауридзе и главному научному сотруднику, лаборатории физиологии и биофизики клетки Фазоилю Иноятвичу Атауллаханову за всестороннюю помощь, обсуждение постановки работы и ее результатов. Я благодарна также Юлии Геннадьевне Александрович, Евгению Сергеевичу Протасову, Анатолию Викторовичу Короткову и Андрею Александровичу Бутылину за помощь на разных этапах работы. Выражаю особую благодарность Елене Александровне Косенко и другим сотрудникам лаборатории метаболического моделирования и биоинформатики Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пущино) за плодотворное сотрудничество. Также я хотела бы поблагодарить коллектив лаборатории биофизики Национального медицинского исследовательского центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева за постоянную помощь и поддержку.