## Министерство науки и высшего образования Российской Федерации ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ <u>ШЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ</u> РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ЦΤΠ ΦΧΦ РАН)

УДК 577.3.01 577.38 577.3:51-76 612.111 Рег. N НИОКТР АААА-А17-117112420087-0 Рег N ИКРБС

**УТВЕРЖДАЮ** 

ВРИО Директора ЦТП ФХФ РАН

доктор физ.-мат. наук

М.А. Пантелеев

Voureled WIN Hallend

2020 г.

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ УВЕЛИЧЕНИЯ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ОРГАНИЗМА ПУТЕМ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ, СОЗДАВАЕМЫХ В КЛЕТКАХ НАШЕГО ОРГАНИЗМА

(промежуточный, этап 2)

Руководитель НИР,

Научный руководитель ЦТП ФХФ РАН,

гл. науч.сотр.

д-р. биол. наук, проф., член-корр. РАН

Ф.И. Атауллаханов

Москва 2020

подпись, дата

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР Научный руководитель ЦТП ФХФ РАН, гл. науч. сотр., д-р.биол.наук, член-корр. РАН

Отв.исполнитель, Заведующая лабораторией физиологии и биофизики клетки д-р. биол. наук

Исполнители:

Аспирант

Науч. сотр., канд. биол. наук

Ст. науч. сотр., докт. биол. наук

Аспирант

Вед. науч.сотр., канд. физ-мат. наук

Стажер-исследователь

Инженер-исследователь

подпись, дата

Ф. И. Атауллаханов (введение)

ō

Е.И. Синауридзе (введение, заключение, раздел 1, 2, нормоконтроль)

подпись, дата

Е.А. Бовт

(раздел 1)

Д.В. Борсакова

(раздел 1)

В.М. Витвицкий

(раздел 1)

Л.Д. Колева

(раздел 2)

М.В. Мартынов

(раздел 2)

Е.С. Протасов

(раздел 1, 2)

С.С. Суров

(раздел 1)

#### РЕФЕРАТ

Отчет 43 с., 5 рис., 10 табл., 53 источн., 1 прил.

ЭРИТРОЦИТ-БИОРЕАКТОР ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АММОНИЯ, АММОНИЙ, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, ГЛИКОЛИЗ, ПИРУВАТ, АЛАНИН, ГЛУТАМИНСИНТЕТАЗА, ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗА,  $\alpha$ -КЕТОГЛУТАРАТ, ГЛУТАМАТ, АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА, АЛАНИНДЕГИДРОГЕНАЗА

Объектом исследования были эритроциты-биореакторы (ЭБР), способные удалять из крови аммоний.

Цель работы - создание математических моделей ЭБР для удаления аммония из кровотока, содержащих разные ферменты (глутаминсинтетазу (GS), аланиндегидрогеназу (ALADH), глутаматдегидрогеназу (GDH), или GDH вместне с аланинаминотрансферазой (AAT)), и использование этих моделей для оценки эффективности ЭБР.

Реакции гликолиза и встроенных ферментов в каждой модели были описаны системой обыкновенных дифференциальных уравнений, решение которой было получено методом Рунге-Кутта 4-5 порядка в программе MATLAB.

Основные результата работы:

Созданы математические модели ЭБР, содержащих отдельные ферменты (GS, ALADH, или GDH). Показано, что ни один из этих ферментов не способен обеспечить длительную работу ЭБР по утилизации аммония из-за отсутствия проницаемости мембраны эритроцита для субстратов этих реакций.

Предложен новый ЭБР, содержащий 2 фермента (GDH и аланинаминотрансферазу (AAT)), в котором ограничения транспорта необходимых субстратов (α-кетоглутарата и глутамата) сняты, т.к. они потребляются и вновь производятся внутри эритроцита в циклическом режиме. Проанализировано влияние на эффективность этого ЭБР соотношения активностей включенных ферментов, а также изменения проницаемости мембраны эритроцита для пирувата и лактата. Показано, что оптимальное отношение активностей AAT/GDH равно 5, увеличение проницаемости для лактата не влияет, а для пирувата увеличивает скорость потребления аммония максимум в 2-2.5 раза. Рассчитано, что при физиологических условиях максимальная скорость удаления аммония новыми ЭБР составляет 4.5-6 ммоль/ч×лэбр.

Аналогов подобных моделей за рубежом не существует. Дальнейшее направление работы — экспериментальная проверка правильности разработанной модели, и разработка условий для получения наиболее эффективных ЭБР, удаляющих из крови аммоний.

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ2
РЕФЕРАТ
СОДЕРЖАНИЕ4
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ5
ВВЕДЕНИЕ
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ7
1 Модели эритроцитов-биореакторов для переработки аммония (аммоцитов),
основанные на включении в эритроциты отдельных ферментов, способных
перерабатывать аммоний9
1.1 Общие принципы построения математических моделей аммоцитов9
1.1.1 Общие требования к эритроцитам-биореакторам9
1.1.2 Основные свойства и предположения модели
1.1.3 Транспорт метаболитов, проникающих через мембрану эритроцита12
1.2 Анализ работы эритроцита-биореактора, содержащего глутаминсинтетазу14
1.3 Эритроциты-биореакторы, содержащие глутаматдегидрогеназу14
1.4 Эритроциты-биореакторы на основе аланиндегидрогеназы
2 НОВЫЙ ЭРИТРОЦИТ-БИОРЕАКТОР ДЛЯ УДАЛЕНИЯ АММОНИЯ,
СОДЕРЖАЩИЙ ГЛУТАМАТДЕГИДРОГЕНАЗУ И
АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗУ17
2.1 Снятие ограничений для транспорта GLU и AKG за счет включения в
эритроциты вместе с GDH фермента аланинаминотрансферазы
2.2 Влияние типа GDH на кинетику потребления аммония биореакторами,
содержащими ААТ и GDH
2.3 Зависимость скорости утилизации аммония от соотношения активностей
включенных ферментов (AAT/GDH)22
2.4 Зависимость скорости утилизации аммония от проницаемости мембраны
эритроцита для лактата и пирувата
ЗАКЛЮЧЕНИЕ25
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ27
ПРИЛОЖЕНИЕ А
Дополнительные сведения

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ADP – аденозиндифосфат

 $AKG - \alpha$ -кетоглутарат

ALA - аланин

ALADH – аланиндегидрогеназа

ALD – альдолаза

АММ – аммоний

Аммоцит – эритроцит-биореактор, утилизирующий аммоний

АМР - аденозинмонофосфат

АТР – аденозинтрифосфат

DAP – дигидроксиацетонфосфат

1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат

2,3-DPG – 2,3-дифосфоглицерат

ENO - енолаза

FDP – фруктозо-1,6-дифосфат

F6P – фруктозо-6-фосфат

GAP – глицеральдегидфосфат

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

GDH – глутаматдегидрогеназа

GLC – глюкоза

GLN - глутамин

CLU - глутамат

GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза

G6P – глюкозо-6-фосфат

GS - глутаминсинтетаза

НК – гексокиназа

Keq – константа равновесия

LAC – лактат

LDH – лактатдегидрогеназа

NAD – никотинамидадениндинуклеотид окисленный

NADH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

NADP – никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

ОДУ – обыкновенные дифференциальные уравнения

РЕР – фосфоенолпируват

PFK - фосфофруктокиназа

2- PG – 2-фосфоглицерат

3-PG – 3-фосфоглицерат

PGK – фосфоглицераткиназа

PGM – фосфоглицератмутаза

РК – пируваткиназа

РО<sub>4</sub> – ион неорганического фосфата

PYR – пируват

ТРІ – триозофосфатизомераза

ЭБР – эритроцит-биореактор

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Целью нашего Проекта является исследование возможности и эффективности метаболического контроля с помощью ферментов, включенных в эритроциты.

В качестве моделируемого метаболического пути на втором этапе работы была выбрана система для удаления из организма избыточного аммония. Ряд острых и хронических болезней печени, а также болезней, связанных с дефицитом определенных ферментов цикла мочевины, сопровождается повышением концентрации аммония в крови (состояние гипераммониемии). Из-за высокой токсичности аммония для центральной нервной системы, у пациентов с повышенным уровнем аммония могут развиваться гепато-энцефалопатия, тремор, конвульсии и сильно повышаться риск комы и даже летального исхода [1], [2]. Эти состояния требуют обязательной быстрой коррекции. Однако в настоящее время такая коррекция, использующая известные существующие медицинские препараты, не всегда достаточно эффективна (снижение концентрации аммония в крови таких пациентов до нормального уровня (≤ 60 мкМ) обычно требует от 2 до 10 дней) [3]-[14]. Одним из перспективных подходов для решения этой проблемы может быть создание эритроцитов-биореакторов (ЭБР), способных перерабатывать аммоний. Это определяет актуальность настоящей работы.

Хорошо известно, что эритроциты могут служить биореакторами, если в них включен ферментный препарат, который может проводить катализируемую им реакцию непосредственно внутри эритроцита (при условии, что субстраты и продукты этой реакции способны проникать через эритроцитарную мембрану) [15]. Включение ферментного препарата в эритроцит защищает его от клеток иммунной системы, снижая нежелательные иммунные ответы и увеличивая время жизни препарата в организме по сравнению с его стандартным внутривенным введением [16]-[20].

Эритроциты-биореакторы для удаления аммония (аммоциты) на базе эритроцитов мыши, овцы или человека были ранее исследованы различными авторами. Все они использовали в качестве включенных только два фермента: глутаминсинтетазу (GS), которая катализирует образование L- глутамина из L- глутаминовой кислоты и аммония в присутствии АТР (реакция (1)) [21], [22] или L-глутаматдегидрогеназу (GDH), которая катализирует образование L- глутаминовой кислоты из α-кетоглутарата и аммония в присутствии NADPH (реакция (2), см. ниже) [23]-[25]. Эти ЭБР сохраняли после процедуры включения фермента ключевые метаболиты гликолиза и имели достаточно хорошую выживаемость в организме. Однако *in vivo* они эффективно удаляли аммоний из

крови мышей в течение только очень короткого времени (0.5-1 ч) [21], [23]. После этого времени концентрация аммония в крови снижалась приблизительно с одинаковой скоростью как у опытных, так и у контрольных животных, которые получали эритроциты, прошедшие всю процедуру обработки, но без включенного фермента. Это позволяет предполагать, что после 0.5-1 ч ферменты внутри эритроцитов перестают вносить вклад в удаление аммония. Причины этого, а также вопрос о максимальной возможной скорости удаления аммония с помощью различных ЭБР, практически не были ранее проанализированы. Помочь в этом вопросе может математическое моделирование. В настоящей работе создали математические модели различных ЭБР МЫ проанализировали с их помощью эффективность ранее предложенных и других ферментных систем, которые могут использовать аммоний. Это позволило нам предложить для включения в эритроцит новую ферментную систему, которая более подходит для создания эффективных ЭБР, способных убирать их крови пациента избыточный аммоний.

В ранних работах мало внимания уделялось транспорту необходимых субстратов и продуктов реакции через мембрану эритроцита. L- глутаминовая кислота (GLU) практически не проходит через эту мембрану, а α-кетоглутарат проходит, но очень медленно [26,27]. В результате GLU и AKG могут быть почти полностью исчерпаны во время реакций внутри ЭБР, загруженных GS или GDH, соответственно. И наоборот, GLU может накапливаться в биореакторах с GDH. Изменения в концентрации участников процесса должны вызывать сдвиги реакционных равновесий согласно принципу Ле-Шателье. Следовательно, биореактор может удалять аммоний из среды только до тех пор, пока равновесие встроенной реакции не сдвинется полностью в сторону не потребления, а производства аммония. Таким образом, время работы биореактора, как клетки удаляющей аммоний, зависит от константы равновесия встроенной ферментной реакции, и от близости при физиологических условиях эффективного отношения действующих масс этой реакции к соответствующей константе равновесия.

Задачей второго этапа настоящей работы было разработать детальные математические модели аммоцитов с различными включенными ферментами, и провести теоретическое исследование причин низкой эффективности ранее предложенных аммоцитов, а также условий, необходимых для их эффективного функционирования. Модели помогли ответить на вопросы о стабильности и направлении работы каждого из типов предложенных аммоцитов и рассчитать скорости удаления аммония *in vitro* в

системах, содержащих такие ЭБР. Такой подход может быть использован для анализа работы любого фермента, включенного в эритроциты.

#### ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1 Модели эритроцитов-биореакторов для переработки аммония (аммоцитов), основанные на включении в эритроциты отдельных ферментов, способных перерабатывать аммоний

#### 1.1 Общие принципы построения математических моделей аммоцитов

#### 1.1.1 Общие требования к эритроцитам-биореакторам

Учитывая, что клеточные биореакторы должны функционировать в организме в характеристические течение многих десятков часов, a времена большинства метаболических процессов в эритроците не превышают десятков минут, надо предполагать, что при физиологических условиях ЭБР будут функционировать в организме в квази-стационарных условиях, т.е. концентрации всех внутриклеточных метаболитов гликолиза, таких как глюкоза, лактат (LAC) и пируват (PYR) будут оставаться постоянными в течение многих часов, несмотря на тот факт, что биореактор производит или потребляет эти вещества. Большинство наших расчетов было проведено в предположении, что рассматриваемый процесс является квази-стационарным. В некоторых расчетах мы моделировали условия, когда концентрации метаболитов снаружи клетки изменялись достаточно быстро. Результаты этих вычислений зависят от объема и состава внешней среды. При описании эти случаи отмечены отдельно. Разработанные математические модели были использованы, чтобы рассчитать кинетику метаболитов встроенных реакций и стационарные скорости удаления аммония из среды  $(V_{AMM})$  в присутствии исследуемых ЭБР. При этом мы предполагали, что в условиях гипераммониемии в организме существует постоянный вток аммония в кровоток.

Самые низкие величины концентраций метаболитов гликолиза из области экспериментально измеренных концентраций были использованы в моделях как начальные условия для расчета стационарного состояния каждого метаболита (таблица 2).

Стационарность работы биореактора зависит от скоростей встроенных ферментативных реакций и от проницаемости мембраны эритроцита для субстратов и продуктов этих реакций. Следовательно, эффективность реактора может определяться не

только активностью включенного в эритроцит фермента, но и проницаемостью клеточной мембраны для всех метаболитов, в первую очередь тех, которые проходят через эту мембрану хуже остальных.

В нашем исследовании были разработаны математические модели ЭБР для удаления из плазмы крови избыточного аммония, основанные на включении в эритроциты человека следующих ферментов:

**ЭБР #1:** глутаминсинтетаза (GS, реакция (1)): 
$$GLU + NH_4^+ + ATP \leftrightarrow GLN + ADP + PO_4^{-3}$$
 (1),

**ЭБР #2:** глутаматдегидрогеназа (GDH, реакция (2)):

$$AKG + NH_4^+ + H^+ + NADPH \text{ (or NADH)} \leftrightarrow GLU + NADP \text{ (or NAD)} + H_2O$$
 (2),

**ЭБР #3:** аланиндегидрогеназа (ALADH, реакция (3)):

$$PYR + NH_4^+ + H^+ + NADH \leftrightarrow ALA + NAD + H_2O$$
 (3),

**ЭБР** #4: ЭБР, основанный на совместном действии GDH (см. реакцию (2)) и аланинаминотрансферазы (ААТ, реакция (4)):

$$GLU + PYR \leftrightarrow AKG + ALA \tag{4},$$

где GLU - L-глутаминовая кислота; GLN - L-глутамин; ATP и ADP - аденозин-5'-три- и аденозин-5'-дифосфат, соответственно;  $NH_4^+$  - катион аммония;  $PO_4^{-3}$  — анион неорганического фосфата; AKG,  $\alpha$ -кетоглутарат; NAD, NADP и NADH, NADPH - окисленные и восстановленные формы, соответственно, никотинамидадениндинуклеотида и никотинамидадениндинуклеотидфосфата, соответственно; PYR - пируват; и ALA - аланин.

#### 1.1.2 Основные свойства и предположения модели

В качестве основы модели эритроцита-биореактора была использована модель гликолиза в эритроците, разработанная в работе [28]. При построении моделей ЭБР, эта модель была несколько модифицирована. Были сделаны следующие предположения:

1) Скорость гексокиназной реакции считали независимой от концентрации глюкозы, т.к. величина константы Михаэлиса (К<sub>м</sub>) гексокиназы для глюкозы практически в 10 раз ниже, чем физиологическая концентрация глюкозы в крови [28], [29].

2) Мембрану эритроцита считали непроницаемой для всех метаболитов кроме лактата, пирувата, α-кетоглутарата, аланина, глутамина и аммония [26], [27], [30]-[33] (Таблица 1).

Таблица 1 — Концентрации и коэффициенты проницаемости через мембрану эритроцита (при физиологических условиях) для проникающих метаболитов гликолиза и метаболитов встроенных реакций [34]<sup>1)</sup>.

Метаболит <sup>2)</sup>	Концентрация в	Концентрация в	Коэффициент	Исходные
	клетке (область	плазме (область	проницаемости,	концентрации
	экспериментально	экспериментально	рассчитанный из	в клетке,
	измеренных	измеренных	данных	взятые для
	значений),	значений),	литературы (Кр),	расчетов,
	ммоль/лэр-тов	ммоль/л	ч <sup>-1</sup>	ммоль/л <sub>эр-тов</sub>
PYR	0.047-0.950	0.317-0.355	51.8	0.07
ALA	0.275-0.435	0.300-0.373	1.95	0.3
GLU	0.212-0.463	0.024-0.050	0	0.45
GLN	0.197-0.922	0.447-0.776	0.65	0.625
AKG	0.005 (model)	0.000-0.093	0.029	0.005
LAC	1.00-2.14	0.9-1.5	7.8	1.2
$(NH_3 + NH_4^+)$	0.010-0.050	0.010-0.050	700000	-

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup> Ссылки на работы, в которых были экспериментально измерены приведенные в таблице значения, см. в работе [34]. Значение концентрации АКС в эритроцитах было рассчитано, используя математическую модель [26].

3) Скорость транспорта лактата и пирувата через мембрану эритроцита полагали прямо пропорциональной градиенту концентрации каждого из этих метаболитов внутри и

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup> Представлена суммарная концентрация (аммиак+аммоний) в нормальной крови. Концентрация аммиака в условиях равновесия составляет примерно 1% от этой суммарной концентрации, поэтому далее под концентрацией аммония мы будем всегда иметь в виду суммарную концентрацию аммиака и аммония. Равновесие между внутриклеточной и плазменной концентрацией аммония достигается очень быстро.

вне клетки, т.к. это обеспечивало хорошее приближение к описанию этого транспорта, рассчитанного по точным кинетическим механизмам [30]. Транспорт аммония считали достаточно быстрым, чтобы его концентрация в плазме и клетках оставалась в равновесии в любой момент времени [31].

- 4) Модель не включала уравнений, описывающих трансмембранный потенциал.
- 5) Пулы аденилатов и никотинамидадениндинуклеотидов считали постоянными, т.к. при нормальных физиологических условиях величины этих пулов изменяются очень медленно по сравнению с временами наблюдения.
- 6) Пентозофосфатный путь (PPP) представлен только одной глюкозо-6фосфатдегидрогеназной реакцией, т.к. именно эта реакция лимитирует работу PPP [35]. Скорость окисления NADPH в окислительном метаболизме считали постоянной.
  - 7) Объем эритроцита считали постоянным.

Все модели состояли из обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) первого порядка. Численные решения уравнений были получены с помощью метода Рунге-Кутта 4-5 порядка в Программе МАТLAB. В результате были рассчитаны кинетики изменения концентрации метаболитов внутри эритроцита, а также скорости переработки аммония в биореакторе. Внешние концентрации пирувата и лактата полагали постоянными, равными их нормальным физиологическим значениям (0,07 и 1,2 мМ для РҮР и LAC, соответственно).

Полные системы дифференциальных уравнений и выражения для скоростей включенных в эритроциты ферментативных реакций приведены в Приложении А (таблицы A1-A8). Использованные при расчетах концентрации метаболитов и кинетические константы приведены в таблицах 1 и 2.

#### 1.1.3 Транспорт метаболитов, проникающих через мембрану эритроцита

Несмотря на существование различных механизмов для транспорта проникающих через эритроцитарную мембрану метаболитов, мы описывали этот транспорт очень упрощенно, используя линейное приближение с помощью уравнения (5):

$$V_{mpahcnopm A} = K_p^A \times ([A]_{\theta hympu} - [A]_{chapy xu})$$
(5),

где  $V_{mpaнcnopm A}$  — скорость транспорта метаболита A,

Таблица 2 – Концентрации метаболитов гликолиза, измеренные в разных работах, а также стационарные концентрации этих метаболитов, полученные в модели (для нормальных физиологических условий)<sup>1)</sup>.

Метаболит	Область внутриклеточных	Стационарные концентрации,
	концентраций, измеренных	рассчитанные в модели,
	экспериментально, ммоль/лэр-тов	ммоль/лэр-тов
G6P	0.02-0.11	0.073
F6P	0.006-0.016	0.024
FDP	0.002-0.03	0.0075
DAP	0.0076-0.035	0.032
GAP	0.0048-0.02	0.014
1,3-DPG	(0.62-4.3)×10 <sup>-4</sup>	7.2×10 <sup>-4</sup>
2,3-DPG	4.17-5.7	4.57
3-PG	0.055-0.069	0.045
2-PG	0.0055-0.012	0.011
PEP	0.012-0.018	0.0098
NAD	0.032-0.092	0.048
NADH	0.001-0.054	0.002
PO <sub>4</sub>	0.5-0.9	1
ATP	1.07-1.8	1.47
ADP	0.085-0.3	0.23
AMP	0.01-0.05	0.04
NADP	0.0003-0.023	0.0003
NADPH	0.035-0.06	0.0498
Ионы Na <sup>+</sup>	9.2-12.6	10

<sup>1)</sup> Ссылки на работы, в которых были измерены экспериментальные концентрации метаболитов в эритроцитах см. в работе [34]. Расшифровку сокращенных названий метаболитов см. в списке сокращений и обозначений.

 $[A]_{\it внутри}$  и  $[A]_{\it снаружи}$  — концентрации данного метаболита внутри и снаружи эритроцита, соответственно,

 $K_p{}^A$  — коэффициент проницаемости мембраны эритроцита для данного метаболита. Величины  $K_p{}^A$  были оценены из данных литературы (таблица 1). Величины внутриклеточных концентраций, использованные как начальные условия для расчета в модели, приведены в таблице 2 (концентрация добавленного аммония указана в каждом случае отдельно). Все внутриклеточные концентрации рассчитаны на 1 л эритроцитов.

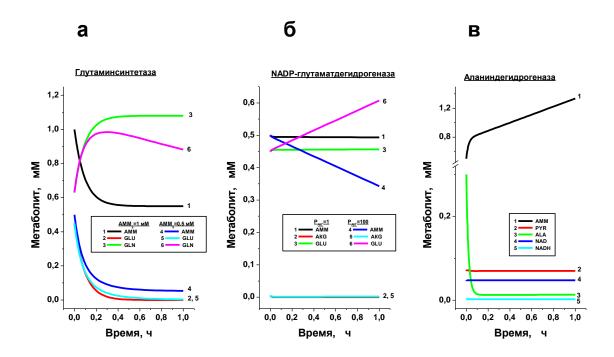
# 1.2 Анализ работы эритроцита-биореактора, содержащего глутаминсинтетазу

При условиях, которые существуют в нормальном эритроците, равновесие GS реакции (1) сдвинуто в сторону потребления аммония (константа равновесия Кед  $\sim 1.2 \times 10^3$ ) [36]. Так как субстрат реакции (GLU) не может проходить через мембрану эритроцита [26] реакция будет протекать до полного истощения GLU внутри клетки, а затем остановится. Это подтверждается расчетами, сделанными для двух различных исходных концентраций  $AMM_0$  в системе (рисунок 1a, кривые (1) и (4)). При этом предполагалось, что нет постоянного притока АММ в плазму, т.е. концентрация аммония изменяется только за счет реакций, протекающих в ЭБР. Хорошо видно, что финальная, достигаемая в системе, концентрация АММ зависит от исходной концентрации аммония. Если концентрация GLU в эритроците равна 0.45 мМ (таблица 1), то уровень финальных концентраций аммония составляет 0.05 и 0.55 мМ при исходных концентрациях АММ<sub>0</sub> равных 0.5 и 1 мМ, соответственно. Таким образом, при отсутствии постоянного втока аммония в систему, достигаемое снижение концентрации АММ определяется не установлением нового стационарного состояния, а полным исчерпанием GLU в клетке. Оно практически эквивалентно исходной концентрации этого метаболита в эритроците. Следовательно, in vivo у пациентов с гипераммониемией, когда вток аммония в циркуляцию существует, эритроциты-биореакторы на основе GS не могут постоянно снижать его уровень до нормы.

#### 1.3 Эритроциты-биореакторы, содержащие глутаматдегидрогеназу

Константа равновесия GDH реакции (в направлении связывания аммония) для NADP-зависимой GDH в физиологических условиях составляет  $5.3 \times 10^{14}$  M $^{-1}$  [37]. В то же время, эффективное отношение действующих масс для этой реакции в физиологических условиях равно:

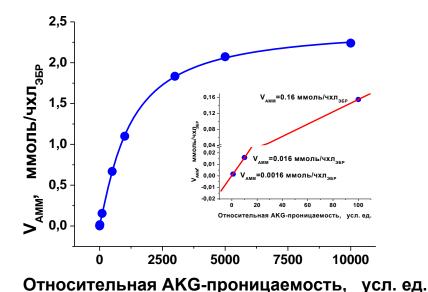
Это отношение примерно в 28 раз меньше, чем константа равновесия. В этих условиях реакция будет протекать в сторону связывания аммония до тех пор, пока эффективное отношение действующих масс не станет равно константе равновесия.



Концентрация АММ может изменяться только за счет реакций, происходящих в аммоцитах. Гематокрит ЭБР во всех случаях принят равным 100%. (а) — Кинетика снижения АММ в плазме в присутствии ЭБР, содержащих GS (1 МЕ/млэбР) при исходной концентрации аммония (АММ $_0$ ) равной 1 мМ (1) или 0.5 мМ (4), а также соответствующие изменения концентрации глутамата (2, 5) и глутамина (3, 6). (б) — Кинетика АММ (1,4), АКС (2,5) и GLU (3,6) при работе аммоцитов, содержащих NADP-зависимую GDH (10 МЕ/млэбР). Расчеты сделаны для нормальной (1,2,3) и в 100 раз увеличенной (4,5,6) относительной проницаемости мембраны для АКС ( $P_{AKG}$ 1 и  $P_{AKG}$ 100, соответственно). АММ $_0$ =0.5 мМ. (в) — Изменение концентраций АММ (1), пирувата (PYR) (2), аланина (ALA) (3), NAD (4) и NADH (5) в аммоцитах, содержащих ALADH. АММ $_0$ =0.5 мМ.

Рисунок 1 - Изменения концентраций аммония (AMM) и некоторых других метаболитов при работе ЭБР, нагруженных различными индивидуальными ферментами.

Неэффективность ЭБР, загруженных только GDH, вызвана недостаточно высокой проницаемостью мембраны эритроцита для АКС. Рисунок 16 представляет кинетику АКС в биореакторе с GDH. В нормальных условиях концентрация АКС в эритроцитах человека очень низка ( $\sim 0.005$  ммоль/ $n_{\rm эр-тов}$ ) и этот метаболит проникает через мембрану эритроцита очень медленно (коэффициент проницаемости  $0.029~{\rm q}^{-1}$  (таблица 1)) [26], [27]. Таким образом, после появления аммония концентрация АКС в эритроците снижается практически до 0 за  $0.1~{\rm q}$ . При этом очень быстро достигается низкая стационарная скорость утилизации аммония, которая лимитируется медленным поступлением АКС в клетку из плазмы. Это подтверждается тем фактом, что увеличение проницаемости клеточной мембраны для АКС в  $100~{\rm pas}$  пропорционально увеличивает скорость потребления аммония такими ЭБР с  $0.0016~{\rm дo}\sim 0.16~{\rm ммоль/q}\times n_{\rm эр}$  (рисунок 2).



Проницаемость мембраны эритроцита для AKG в физиологических условиях была принята за единицу условной проницаемости

Рисунок 2 — Зависимость стационарной скорости переработки аммония от проницаемости мембраны эритроцита для AKG.

Однако такой подход не может существенно улучшить эффективность ЭБР с GDH, учитывая, что на практике мы не можем сильно изменить проницаемость мембраны эритроцита для AKG.

#### 1.4 Эритроциты-биореакторы на основе аланиндегидрогеназы

Для биореактора на основе аланиндегидрогеназы расчеты показали, что при нормальных внутри- и внеклеточных концентрациях всех метаболитов [26], [30], [38], [39] такой биореактор будет не поглощать, а производить аммоний (рисунок 2в). Константа равновесия ALADH реакции (в направлении синтеза аммония) равна  $3.1 \times 10^{-14}$  М [40]. Отсюда следует, что константа равновесия этой реакции в направлении утилизации аммония равна  $3.2 \times 10^{13}$  М $^{-1}$ . Оценка соответствующего отношения действующих масс внутри эритроцита (для нормальных физиологических условий) (таблицы 1 и 2) дает следующую величину:

$$[ALA] \times [NAD] \times [H_2O] / [PYR] \times [NADH] \times [NH_4^+] \times [H^+] \approx 3.6 \times 10^{15} M^{-1}$$
 (7),

которая в 100 раз выше, чем константа равновесия. Следовательно, в этих условиях чтобы достичь равновесия реакция будет протекать в сторону образования аммония, что согласуется с предсказаниями нашей модели. Прямая реакция аммония с пируватом будет происходить только когда концентрация аммония в системе будет выше 4.5 мМ, т.е. примерно в 112.5 раз выше, чем плазменная концентрация аммония в нормальных условиях [41].

Таким образом, исследование работы различных аммоцитов с помощью математических моделей показало, что включение в биореактор только одного индивидуального фермента (GS, GDH или ALADH) не может обеспечить длительную и эффективную работу ЭБР.

2 Новый эритроцит-биореактор для удаления аммония, содержащий глутаматдегидрогеназу и аланинаминотрансферазу

# 2.1 Снятие ограничений для транспорта GLU и AKG за счет включения в эритроциты вместе с GDH фермента аланинаминотрансферазы

Недостатки биореактора на основе GDH связаны с плохой проницаемостью мембраны эритроцита для субстрата (AKG) и продукта (GLU) этой реакции [27], [30]. Однако ситуацию можно улучшить, если включить в эритроциты вместе с GDH фермент аланинаминотрансферазу (AAT). Суммарно процесс работы этих двух ферментов в эритроците (см. выше реакции (2) и (4)) можно описать уравнением (8):

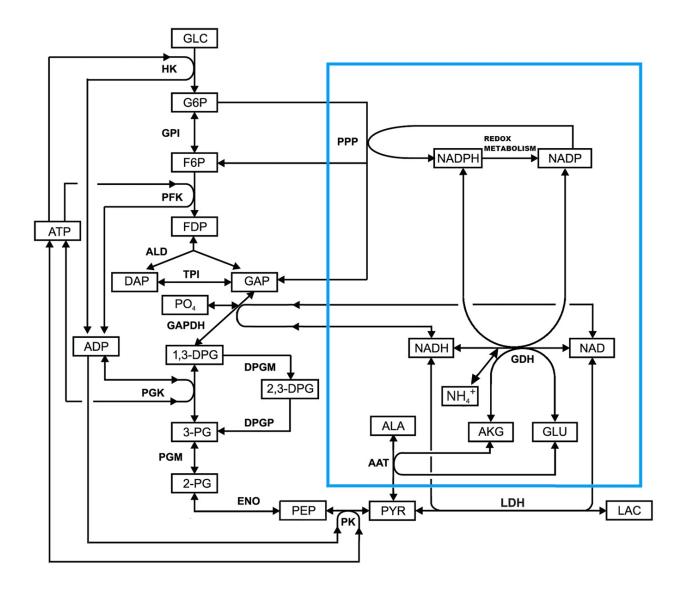
Таким образом, суммарно этот биореактор катализирует образование аланина из аммония и пирувата (в присутствии NADPH или NADH). И аланин, и пируват достаточно хорошо проникают через мембрану эритроцита [30], [31]. Скорость продукции NADPH внутри эритроцита в ходе гликолиза также достаточно высока и достигает 2-4 ммоль/ч×л<sub>эр-тов</sub> [42].

Следовательно, благодаря присутствию ААТ реакции, ограничения, связанные с плохой проницаемостью эритроцитарной мембраны для GLU и AKG, могут быть устранены, т.к. GLU, образующийся в GDH реакции, является субстратом ААТ реакции, а ее продукт (AKG) может снова участвовать в GDH реакции (см. реакции (2) и (4)), т.е. эти метаболиты производятся и потребляются внутри такого ЭБР в циклическом процессе. Общая схема реакций, протекающих в эритроците, в который включены GDH и ААТ, представлена на рисунке 3.

## 2.2 Влияние типа GDH на кинетику потребления аммония биореакторами, содержащими AAT и GDH

Коэффициенты проницаемости мембраны эритроцитов для пирувата (51.8 ч<sup>-1</sup>) [30] и аланина (1.95 ч<sup>-1</sup>) [32] достаточно высоки. Это указывает на то, что ограничения на трансмембранные потоки этих метаболитов могут быть сдвинуты в таком биореакторе в сторону достаточно высоких скоростей потребления аммония. Реакции, катализируемые инкапсулированными ферментами, легко обратимы, таким образом, не только скорость суммарной реакции, но и само ее направление должны зависеть от концентраций субстратов и продуктов этих реакций в эритроците. Расчеты показали, что наиболее важным параметром, который определяет кинетику процесса, является отношение NAD/NADH (или NADP/NADPH). Возможность утилизации аммония биореакторами, включающими два фермента (ААТ и GDH) зависит от свойств включенной в эритроциты GDH. Кинетика различных метаболитов, включенных в реакции, катализируемые двумя ферментами (ААТ и GDH (NAD-, NADP- или одновременно NAD и NADP-зависимой)), представлена на рисунке 4.

Константа равновесия процесса, описываемого уравнением (8) (в направлении потребления аммония) равна произведению соответствующих констант для GDH и AAT реакций ( $K_{eq}$ =5.3×10<sup>14</sup>×0.45 M<sup>-1</sup>=2.4×10<sup>14</sup> M<sup>-1</sup>).



ферментные реакции обозначены голубой рамкой. Использованные Встроенные сокращения:: GLC – глюкоза; G6P – глюкозо-6-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FDP – фруктозо-1,6-дифосфат; DAP - дигидроксиацетонфосфат; GAP - глицеральдегидфосфат; 1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат; 2,3-DPG – 2,3 дифосфоглицерат; 3-PG – 3фосфоглицерат; 2-PG – 2-фосфоглицерат; PEP - фосфоенолпируват; PYR - пируват; LAC лактат; AKG – α-кетоглутарат; ALA - аланин; NAD – никотинамидадениндинуклеотид; NADP – никотинамиддинуклеотидфосфат; GLU – глутаминовая кислота; ATP аденозинтрифосфат; ADP – аденозиндифосфат; AMP – аденозинмонофосфат; PO<sub>4</sub> – неорганический фосфат; НК - гексокиназа; GPI - глюкозо-6-фосфатизомераза; PFK фосфофруктокиназа; ALD - альдолаза; ТРІ – триозофосфаиизомераза; GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; **PGK** фосфоглицераткиназа; **PGM** фосфоглицератмутаза; ENO - энолаза; PK – пируваткиназа; LDH – лактатдегидрогеназа; GDH – глутаматдегидрогеназа; AAT – аланинаминотрансфераза; PPP – пентозофосфатный путь; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - ион аммония.

Рисунок 3 – Схема реакций гликолиза и включенных ферментов в ЭБР, содержащем GDH и AAT.

На рисунке 4a (кривая 1) видно, что для NAD-зависимой GDH реакция протекает в сторону образования аммония. Концентрации PYR, LAC и других метаболитов гликолиза находятся в области нормальных физиологических величин (исходная концентрация аммония равна 0.5 мМ и может изменяться только за счет реакций, протекающих в биореакторе). Такой результат является следствием того, что эффективное отношение действующих масс реакции (8) при условиях, существующих в эритроците, равно:

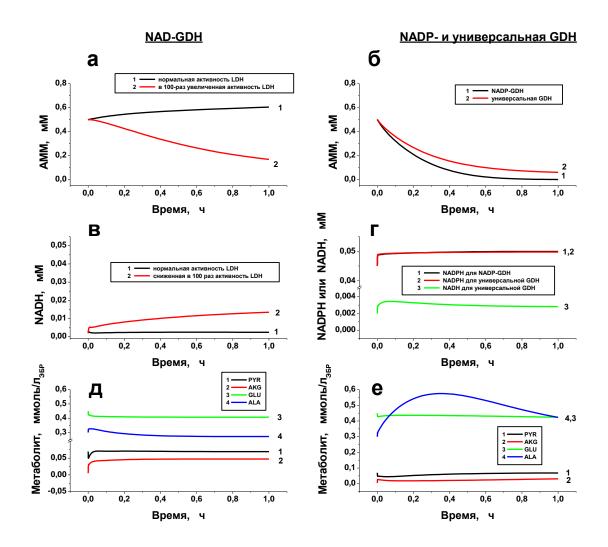
$$[ALA] \times [NAD] \times [H_2O] / [NH_4^+] \times [H^+] \times [NADH] \times [PYR] = 1.5 \times 10^{14} \cdot [NAD] / [NADH] M^{-1}$$
 (9).

Таким образом, реакция может происходить в сторону потребления аммония только когда отношение [NAD]/[NADH] < 1.6. Однако в нативных эритроцитах это отношение значительно выше и, благодаря высокой активности лактатдегидрогеназы (LDH), поддерживается приблизительно на постоянном уровне равном 24 (таблица 2). При физиологических условиях эта реакция близка к равновесию и протекает в направлении производства лактата (10):

LDH: 
$$PYR + NADH + H^+ \leftrightarrow LAC + NAD^+$$
 (10).

Чтобы сдвинуть реакцию (8) в направлении потребления аммония, необходимо увеличить концентрацию NADH. В условиях стационарного метаболизма эритроцитов этого можно достичь только снизив активность LDH. Расчеты показали, что заметного потребления аммония можно достичь только при существенном снижении активности LDH, например, в 100 раз (рисунок 4в (кривая 2) и 4а (кривая 2)). В этом случае отношение [NAD]/[NADH] снижается примерно до 1.

NADP-зависимая GDH оказалась гораздо более перспективной для удаления аммония, т.к. отношение [NADP]/[NADPH] в эритроцитах существенно меньше 1 (таблица 2). В эритроцитах NADP восстанавливается в PPP и может частично окисляться глутатионредуктазой при восстановлении окисленного глутатиона. Поток через PPP обычно составляет 4-5% от общего потока гликолиза, однако он может быть сильно увеличен в условиях повышенного окисления. Отношение [NADPH]/[NADP] в эритроцитах в стационарном состоянии достаточно высоко (~20) [43]. Так как константы равновесия для NAD- и NADP-зависимой GDH близки [44], это отношение позволяет NADP-зависимой GDH стабильно работать в сторону убирания аммоний (рисунок 46, кривая 1). Подобная кинетика была продемонстрирована и для универсальной GDH



Рассчитаны кинетики изменения концентраций аммония (а, б), NADH и NADPH (в, г), а также пируватв (РҮR), α-кетоглутарата (АКG), глутамата (GLU) и аланина (ALA) (д, е). Гематокрит ЭБР считали равным 100%. Расчеты сделаны для ситуации отсутствия постоянного втока аммония в плазму. Исходная концентрация аммония AMM<sub>0</sub>=0.5 мМ и могла изменяться только за счет реакций, протекающих в ЭБР. Исходные концентрации всех метаболитов соответствовали приведенным в таблицах 1 и 2. Универсальная GDH работает одинаково эффективно как с NAD, так и с NADP. Для NAD-зависимой GDH была также рассчитана кинетика аммония и NADH для случая, когда активность лактатдегидрогеназы (LDH) снижена в 100 раз (панель а, кривая 2 и панель в, кривая 2, соответственно). Кинетика РҮR, АКG, GLU и ALA была рассчитана для аммоцитов, содержащих NAD-зависимую и NADP-зависимую GDH (панели д и е, соответственно).

Рисунок 4 — Биореакторы с совместно включенными AAT (50 МЕ/млэбр) и GDH (10 МЕ/млэбр) различных типов: NAD — зависимой (а, в, д) или NADP-зависимой и универсальной (б, г, е).

(рисунок 46, кривая 2). Концентрации кофакторов (NADPH и NADH) достигают стационарного состояния очень быстро (рисунок 4г). Кинетические кривые для РҮR, АКG, GLU и ALA для биореакторов, содержащих вместе с ААТ NAD- или NADP-зависимую GDH, представлены на рисунках 4д и 4е, соответственно. В случае NAD-зависимой GDH, когда удаления АММ не происходит, концентрации всех этих метаболитов во времени практически не изменяются. Для NADP-зависимой GDH, происходит удаление аммония (рисунок 46), АКG, РҮR и GLU очень быстро достигают стационарного состояния и далее не изменяются, а концентрация ALA постепенно возрастает пока весь аммоний не удаляется из системы, а затем постепенно возвращается на свой стационарный физиологический уровень. Расчеты показывают, что концентрация аланина внутри клетки не может заметно увеличиться, даже если присутствует постоянный вток аммония в систему. Стационарный уровень концентрации этого метаболита составляет примерно 0.86 ммоль/л<sub>эр-тов</sub> (рисунок 5г).

Таким образом, полученные результаты подтверждают наше предположение о том, что можно избежать истощения AKG и накопления GLU и ALA в биореакторе при условии, что GDH и AAT будут включены в эритроциты совместно.

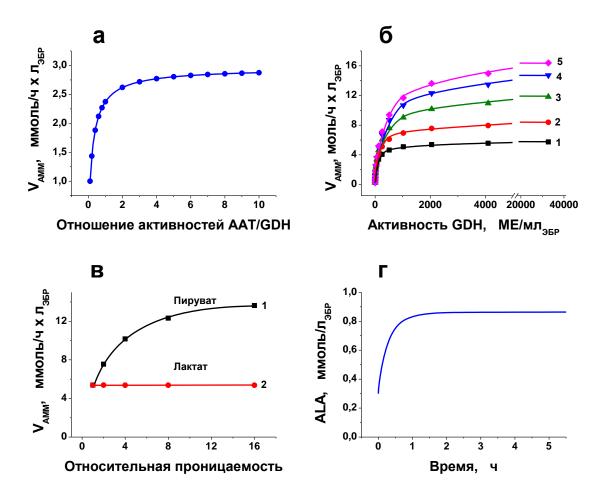
# 2.3 Зависимость скорости утилизации аммония от соотношения активностей включенных ферментов (AAT/GDH)

Расчеты в этом разделе работы были проведены для NADP-зависимой GDH при условии постоянной (стационарной) концентрации аммония в плазме равной 0.5 мМ. При этом условии в системе достигается стационарная скорость потребления аммония. Активность GDH в клетках во всех расчетах была постоянной (0.4 МЕ/млэбр), в то время как активность AAT варьировала от 0.04 до 4 МЕ/млэбр. Гематокрит суспензии ЭБР во всех случаях считали равным 100%. Стационарная скорость потребления аммония возрастала с увеличением отношения активностей AAT/GDH до 4-5 раз, после чего практически переставала изменяться (рисунок 5а). Таким образом, при включении ферментов в эритроциты нет необходимости создавать избыток ААТ относительно GDH более, чем в 5 раз.

# 2.4 Зависимость скорости утилизации аммония от проницаемости мембраны эритроцита для лактата и пирувата

Стационарная скорость потребления аммония может быть достигнута в плазме только если аммоний не только убирается, но и постоянно входит в систему. Поэтому

оценка зависимости стационарной скорости потребления аммония  $(V_{AMM})$  в присутствии аммоцитов, содержащих ААТ и GDH, от проницаемости мембраны эритроцита для



Расчеты были сделаны для постоянной концентрации АММ в плазме, равной 0.5 мМ. (а) — Влияние величины отношения активностей ААТ/GDH на скорость удаления аммония (V<sub>AMM</sub>). Активность GDH везде постоянна и равна 0.4 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>, в то время как активность ААТ изменяется от 0.04 до 4 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>. (б) — Зависимость V<sub>AMM</sub> от концентраций включенных ферментов (при постоянном отношении активностей ААТ/GDH равном 5) и различных проницаемостях мембраны эритроцита для пирувата (проницаемость была увеличена по сравнению с физиологической в 1-, 2-, 4-, 8- и 16 раз для кривых 1, 2, 3, 4 и 5, соответственно). (в) — Зависимость V<sub>AMM</sub> от изменений в проницаемости мембраны биореактора для пирувата (1) или лактата (2) (для каждой кривой все остальные проницаемости соответствовали физиологическим, активность GDH была равна 2048 МЕ/мл<sub>ЭБР</sub>, а отношение активностей ААТ/GDH равно 5). (г) —Увеличение в концентрации аланина (ALA) при квазистационарном режиме работы биореактора, содержащего GDH и ААТ.

Рисунок 5 – Рассчитанные кинетические параметры квазистационарного биореактора, содержащего GDH и AAT.

лактата и пирувата была сделана в предположении, что концентрации АММ в системе постоянна и равна 0.5 мМ. Отношение активностей AAT/GDH также считали постоянным и равным 5. Исходные концентрации всех других метаболитов соответствовали величинам, приведенным в таблицах 1 и 2. Полученные результаты представлены на рисунках 56 и 5в. При физиологических проницаемостях мембраны эритроцита для пирувата и лактата скорость убыли аммония возрастает с ростом активностей ферментов, включенных в эритроциты (рисунок 56, кривая 1). Однако, начиная с активности GDH равной примерно 1000 МЕ/млэбр, кривая достигает насыщения. Чтобы исследовать, что ограничивает максимальную скорость удаления аммония, мы рассчитали ту же саму зависимость, последовательно увеличивая проницаемость мембраны эритроцита для пирувата в 2, 4, 8 и 16 раз относительно физиологического уровня (рисунок 56, кривые 2-5, соответственно). Достигаемая максимальная стационарная скорость удаления аммония возрастает с увеличением этой проницаемость, хотя и не пропорционально этому увеличению (16-кратное увеличение в проницаемости вызывает только менее, чем 3кратное увеличение максимальной стационарной  $V_{AMM}$ ) и, в конечном итоге, достигает насыщения (рисунок 5в, кривая 1). Активность GDH (и соответствующая активность ААТ), при которой достигается насыщение, также возрастает, но не более, чем в 1.5-2 раза. За 1 проницаемости при расчетах относительной проницаемости мембраны эритроцита для пируватв (или лактата) были приняты физиологические величины этих проницаемостей (таблица 1). Подобный анализ показал, что величина проницаемости мембраны эритроцита для лактата не влияет на стационарную скорость потребления аммония (рисунок 5в, кривая 2). Таким образом, даже при очень высоких активностях включенных в эритроциты ферментов, равновесие LDH реакции не сдвигается в сторону производства пирувата. Направление, в котором идет реакция, определяется только отношением концентраций NAD/NADH, которое не изменяется при изменении проницаемости мембраны эритроцита для пируватв и лактата.

Согласно модели, максимальная скорость удаления аммония при физиологических проницаемостях эритроцитарной мембраны для лактата и пирувата составляет примерно 6 ммоль/ч×лэбр, а увеличение проницаемости пирувата в 10-15 раз приводит к увеличению этой скорости приблизительно в 2-2.5 раза (рисунок 5в).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Задачи, поставленные на втором этапе Проекта, были выполнены полностью. В результате работы:

- 1. Созданы математические модели эритроцитов-биореакторов, включающих различные индивидуальные ферменты, которые могут перерабатывать аммоний (глутаминсинтетазу (GS), глутаматдегидрогеназу(GDH) или аланиндегидрогеназу (ALADH)). Все модели включают подробное описание реакций гликолиза в эритроците, а также реакций встроенных ферментов и состоят из обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка. С помощью этих моделей проведен анализ эффективности работы данных ЭБР с точки зрения скоростей убирания аммония из системы. Показано, что ни один из данных ЭБР не способен обеспечить длительную эффективную работу по удалению аммония из среды. Причины этого плохая проницаемость мембраны эритроцита для субстратов этих реакций (для GS и GDH), а также сдвиг в физиологических условиях равновесия реакции в сторону не утилизации, а производства аммония (для ALADH).
- 2. Предложен новый ЭБР для удаления аммония из среды, который предполагает одновременное включение в эритроциты двух ферментов GDH и AAT. Показано, что в данном биореакторе снимаются ограничения эффективности, связанные с транспортом субстратов и продуктов включенных реакций в эритроциты, т.к. эти субстраты и продукты потребляются и вновь производятся внутри ЭБР встроенной ферментной системой в циклическом режиме.
- 3. С помощью разработанной математической модели проведен анализ факторов, влияющих на эффективность работы нового типа ЭБР. Показано, что:
- наиболее подходящей для включения в эритроциты является NADP-зависимая или универсальная (т.е. работающая одинаково эффективно с NAD и NADP) GDH;
- эффективность работы биореактора зависит от соотношения активностей включенных ферментов и достигает максимума при отношении активностей AAT/GDH равном 5;
- увеличение проницаемости мембраны эритроцита для пирувата увеличивает эффективность ЭБР, но не более, чем в 2-2.5 раза, тогда как величина проницаемости этой мембраны для лактата на эффективность аммоцитов не влияет;
- рассчитано, что при физиологических концентрациях и проницаемостях для всех метаболитов, максимальная скорость удаления аммония из плазмы соответствует

примерно 6 ммоль/ч×л<sub>ЭБР</sub>. Таким образом, при переливании 200 мл таких ЭБР пациенту с 5 л крови, скорость убыли аммония составит 1.2 ммоль/ч×5 л крови, или 5.76 ммоль/л<sub>крови</sub>×сутки, что практически на порядок больше, чем для любого, применяемого в настоящее время в клинике лекарственного препарата для снижения концентрации аммония в крови.

Дальнейшее направление работы должно быть связано с экспериментальной проверкой правильности предложенной математической модели для ЭБР, содержащих GDH и AAT, и разработкой условий для получения наиболее эффективных аммоцитов, для создания возможности их применения в клинике.

Аналогов подобных моделей в работах зарубежных ученых не существует.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1. Auron A., Brophy P.D. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment // Pediatr. Nephrol. 2012. V. 27, N. 2. P. 207–222.
- 2. Felipo V., Butterworth RF. Neurobiology of ammonia // Prog. Neurobiol. 2002. V. 67, N. 4. P. 259–279.
- 3. Sharma B.C., Sharma P., Lunia M.K., Srivastava S., Goyal R., Sarin S.K. A randomized, double-blind, controlled trial comparing rifaximin plus lactulose with lactulose alone in treatment of overt hepatic encephalopathy // Am. J. Gastroenterol. 2013. V. 108, N. 9. P. 1458-1463. DOI: 10.1038/ajg.2013.219.
- 4. Mas A., Rodés J., Sunyer L., Rodrigo L., Planas R., Vargas V., Castells L., Rodríguez-Martíne D., Fernández-Rodríguez C., Coll I., Pardo A. Comparison of rifaximin and lactitol in the treatment of acute hepatic encephalopathy: results of a randomized, double-blind, double-dummy, controlled clinical trial // J. Hepatol. 2003. V. 38, N. 1. P. 51-58. DOI: 10.1016/s0168-8278(02)00350-1.
- 5. Tromm A., Griga T., Greving I., Hilden H., Hüppe D., Schwegler U., Micklefield G.H., May B. 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 // Hepatogastroenterology. 2000. V. 47, N. 32. P. 473–477.
- 6. Sushma S., Dasarathy S., Tandon R.K., Jain S., Gupta S., Bhist M.S. Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial // Hepatology. 1992. V. 16, N. 1. P. 138-141.
- 7. Honda S., Yamamoto K., Sekizuka M., Oshima Y., Nagai K., Hashimoto G., Kaneko H., Tomomasa T., Konno Y., Horiuchi R. Successful treatment of severe hyperammonemia using sodium phenylacetate powder prepared in hospital pharmacy // Biol. Pharm. Bull. 2002. V. 25, N. 9. P. 1244–1246.
- 8. Ammonul (sodium phenilacetate and sodium benzoate) 10%/10% for injection. Medical Review of FDA (Center for Drug Evaluation and Research), application number 20-645. Available at: <a href="http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda">http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda</a> docs/nda/2005/020645s000 MedR.pdf (accessed

15.12.2019).

- 9. Ah Mew N., McCarter R., Daikhin Y., Nissim I., Yudkoff M., Tuchman M. N-carbamylglutamate augments ureagenesis and reduces ammonia and glutamine in propionic acidemia // Pediatrics. 2010. V. 126, N. 1. P. e208–e214. DOI: 10.1542/peds.2010-0008.
- 10. Bai M., He C., Yin Z., Niu J., Wang Z., Qi X., Liu L., Yang Z., Guo W., Tie J., Bai W., Xia J., Cai H., Wang J., Wu K., Fan D., Han G. Randomised clinical trial: l-ornithine-l-aspartate reduces significantly the increase of venous ammonia concentration after TIPSS // Aliment. Pharmacol. Therap. 2014. V. 40, N. 1. P. 63-71 (2014). Available at: <a href="https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apt.12795">https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/apt.12795</a> (accessed 15.12.2019).
- 11. Romeiro F.G., da Silva Yamashiro F., Américo M.F., Corá L.A., Silva G.F., Miranda J.R., Caramori C.A. Erythromycin versus neomycin in the treatment of hepatic encephalopathy in cirrhosis: A randomized double-blind study // BMC Gastroenterol. 2013 (Jan. 16). –V. 13. Article N. 13. DOI: 10.1186/1471-230X-13-13. Available at: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/23324408/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/23324408/</a> (accessed 15.12.2019).
- 12. Valayannopoulos V., Baruteau J., Delgado M.B., Cano A., Couce M.L., Del Toro M., Donati M.A., Garcia-Cazorla A., Gil-Ortega D., Gomez-de Quero P., Guffon N., Hofstede F.C., Kalkan-Ucar S., Coker M., Lama-More R., Martinez-Pardo Casanova M., Molina A., Pichard S., Papadia F., Rosello P., Plisson C., Le Mouhaer J., Chakrapani A. Carglumic acid enhances rapid ammonia detoxification in classical organic acidurias with a favourable riskbenefit profile: a retrospective observational study // Orphanet J. Rare Dis. – 2016 (March 31). – V. Article N 11. 32. DOI:10.1186/s13023-016-0406-2. Available at: https://ojrd.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13023-016-0406-2 (accessed 15.12.2019).
- 13. Mizutani N., Kato T., Maehara M., Watanabe K., Ban M. Oral administration of arginine and citrulline in the treatment of lysinuric protein intolerance // Tohoku J. Exp. Med.-1984. V. 142, N. 1. P. 15-24.
- 14. Malaguarnera M., Pistone G., Elvira R., Leotta C., Scarpello L., Liborio R. Effects of L-carnitine in patients with hepatic encephalopathy // World J. Gastroenterol. 2005. V. 11, N. 45. P. 7197-7202.
- 15. Bourgeaux V., Lanao J.M., Bax B.E., Godfrin, Y. Drug-loaded erythrocytes: on the road toward marketing approval // Drug Des. Devel. Ther. **2016 Feb. 11). V. 10.** P. 665–676. DOI: 10.2147/DDDT.S96470. Available at: <a href="https://www.dovepress.com/drug-loaded-erythrocytes-on-the-road-toward-marketing-approval-peer-reviewed-article-DDDT">https://www.dovepress.com/drug-loaded-erythrocytes-on-the-road-toward-marketing-approval-peer-reviewed-article-DDDT</a> (accessed 15.12.2019).

- 16. Godfrin Y, Horand F., Franco R., Dufour E., Kosenko E., Bax B.E., Banz A., Skorokhod O.A., Lanao J.M., Vitvitsky V., Sinauridze E., Bourgeaux V., Gunter K.C. International seminar on the red blood cells as vehicles for drugs // Expert Opin. Biol. Ther. 2012. V. 12, N. 1. P. 127–133. DOI: 10.1517/14712598.2012.631909.
- 17. Sinauridze E.I., Vuimo T.A., Kulikova E.V., Shmyrev I.I., Ataullakhanov F.I. A new drug form of blood coagulation factor IX: red blood cell-entrapped factor IX // Med. Sci. Monit. 2010. V. 16, N. 10. PI 19-26.
- 18. Kwon Y.M., Chung H.S., Moon C., Yockman J., Park Y.J., Gitlin S.D., David A.E., Yang V.C. L-Asparaginase encapsulated intact erythrocytes for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) // J. Control. Release 2009. V. 139, N. 3. P. 182–189.
- 19. Sinauridze E.I., Vitvitsky V.M., Pichugin A.V., Zhabotinsky A.M. Ataullakhanov F.I. A new chemotherapeutic agent: L-asparaginase entrapped in red blood cells // Adv. Exp. Med. Biol. 1992. V. 326. P. 203–206.
- 20. Skorokhod O.A., Kulikova E.V., Galkina N.M., Medvedev P.V., Zybunova E.E., Vitvitsky V.M., Pivnik A.V., Ataullakhanov F.I. Doxorubicin pharmacokinetics in lymphoma patients treated with doxorubicin-loaded eythrocytes // Haematologica. 2007. V. 92, N. 4 P. 570-571. DOI: 10.3324/haematol.10770.
- 21. Kosenko E.A., Venediktova N.I., Kudryavtsev A.A., Ataullakhanov F.I., Kaminsky Y.G., Felipo V., Montoliu C. Encapsulation of glutamine synthetase in mouse erythrocytes: a new procedure for ammonia detoxification // Biochem. Cell Biol. 2008. –V. 86, N. 6. P. 469–476. DOI: 10.1139/O08-134.
- 22. Venediktova N.I., Kosenko E.A., Kaminsky Y.G. Studies on ammocytes: development, metabolic characteristics, and detoxication of ammonium // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. V. 146, N. 6. P. 730–732 (2008).
- 23. Sanz S., Lizano C., Luque J., Pinilla M. In vitro and in vivo study of glutamate dehydrogenase encapsulated into mouse erythrocytes by a hypotonic dialysis procedure // Life Sci. 1999. V. 65, N. 26. –P. 2781–2789.
- 24. Sanz S., Pinilla M., Garin M., Tipton K.F., Luque J. The influence of enzyme concentration on the encapsulation of glutamate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in red blood cells // Biotechnol. Appl. Biochem. 1995. V. 22, N. 2. P. 223–231.
- 25. Sanz S., Lizano C., Garin M. I., Luque J., Pinilla M. Biochemical properties of alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by a hypotonic-dialysis procedure // In: «Erythrocytes as Drug Cariers in Medicine» (Sprandel U., Way J.L. Eds.), Springer Science+Business Media, New York, 1997. P. 101–108.

- 26. Whillier S., Garcia B., Chapman B.E., Kuchel P.W., Raftos J.E. Glutamine and α-ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes // FEBS J. 2011. V. 278, N. 17. P. 3152–3163. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08241.x.
- 27. Sass M.D. Utilization of alpha-ketoglutarate by red blood cells for glutathione synthesis // Nature. 1963, V. 200. N. 4912. P. 1209–1210. DOI: 10.1038/2001209a0.
- 28. Martinov M.V., Plotnikov A.G., Vitvitsky V.M., Ataullakhanov F.I. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2000. V. 1474, N. 1. P. 75–87.
- 29. Gerber G., Preissler H., Heinrich R., Rapoport S.M. Hexokinase of human erythrocytes: purification, kinetic model and its application to the conditions in the cell // Eur. J. Biochem. 1974. V. 45, N. 1. P. 39–52. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03527.x
- 30. Halestrap A.P. Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes. Evidence for the involvement of the chloride carrier and a chloride-independent carrier // Biochem. J. 1976. V. 156, N. 2. P. 193–207.
- 31. Klocke R., Andersson K., Rotman H., Forster R. Permeability of human erythrocytes to ammonia and weak acids // Am. J. Physiol. 1972. V. 222, N. 4. P. -1004–1013. DOI: 10.1152/ajplegacy.1972.222.4.1004.
- 32. Young J.D., Jones S.E., Ellory J.C. Amino acid transport in human and in sheep erythrocytes // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1980. V. 209, N. 1176. P. 355–375.
- 33. Niihara Y., Zerez C.R., Akiyama D.S., Tanaka K.R. Increased red cell glutamine availability in sickle cell anemia: demonstration of increased active transport, affinity, and increased glutamate level in intact red cells // J. Lab. Clin. Med. 1997. V. 130, N. 1. P. 83–90.
- 34. Protasov E.S., Borsakova D.V., Alexandrovich Y.G., Korotkov A.V., Kosenko E.A., Ataullakhanov F.I., Sinauridze E.I. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood // Sci Reports. 2019. V **9,** Article N. 1455 DOI: 10.1038/s41598-018-37828-5. Available at: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365525/pdf/41598">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6365525/pdf/41598</a> 2018 Article 37828.pdf (accessed 15.12.2019).
- 35. Kothe K., Sachsenröder C., Reich J.G. Redox metabolism of glutathione in the red blood cell // Acta Biol. Med. Ger. 1975. V. 34, N. 2. P. 203–228.
- 36. Levintow L., Meister A. Reversibility of the enzymatic synthesis of glutamine // J. Biol. Chem. 1954. V. 209, N. 1. P. 265–280.

- 37. Olson J.A., Anfinsen C.B. Kinetic and equilibrium studies on crystalline L-glutamic acid dehydrogenase // J. Biol. Chem. 1953. V. 202, N. 2. P. 841–856.
- 38. Paik M.J., Cho E.Y., Kim H., Kim K.R. 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 // Biomed. Chromatogr. 2008. V. 22, N. 5. P. 450–453. DOI: 10.1002/bmc.966.
- 39. Hildebrand A., Lormes W., Emmert J., Liu Y., Lehmann M., Steinacker J.M. Lactate concentration in plasma and red blood cells during incremental exercise // Int. J. Sports Med. 2000. V. 21, N. 7. P. 463–468.
- 40. Yoshida A., Freese E. Enzymic properties of alanine dehydrogenase of *Bacillus subtilis* // BBA Nucl. Acids Prot. Synthesis. -1965. V. 96, N. 2 P. 248–262. <a href="https://doi.org/10.1016/0005-2787(65)90588-5">https://doi.org/10.1016/0005-2787(65)90588-5</a>.
- 41. Roth K.S. (Descartes M. Ed.). Genetics of hyperammonemia. MedScape -2016. Available at: https://emedicine.medscape.com/article/944996-overview (accessed 15.12.2019).
- 42. Ataullakhanov F.I., Zhabotinskii A.M., Pichugin A.V., Toloknova N.F. [Dependence of the rate of the pentose cycle reactions on the degree of glutathione reduction in erythrocytes] // Biokhimiia. 1981. V. 46, N. 3. P. 530–541. (in Russian, abstract in Engl.).
- 43. Zerez C.R., Lachant N.A., Lee S.J., Tanaka K.R. Decreased erythrocyte nicotinamide adenine dinucleotide redox potential and abnormal pyridine nucleotide content in sickle cell disease // Blood. 1988. V. 71, N. 2. P. 512–515.
- 44. Engel P.C., Dalziel K. The equilibrium constants of the glutamate dehydrogenase systems // Biochem. J. 1967. V. 105, N. 2 P. 691–695.

#### ПРИЛОЖЕНИЕ А

#### Параметры и уравнения математических моделей

В работе разработано несколько математических моделей для различных включенных в эритроциты ферментных систем, которые, как предполагалось, способны убирать аммоний из кровотока. Системы дифференциальных уравнений для описания этих моделей имеют общую часть, которая включает уравнения для метаболитов гликолиза, которые не изменяются из-за включения в эритроцит дополнительных ферментов. Эти уравнения представлены в таблице A1. Далее, в таблицах A2-A6 представлены оставшиеся части систем дифференциальных уравнений, описывающие метаболиты гликолиза (для каждой модели отдельно), которые изменяются из-за включения в эритроцит дополнительных ферментов. Таблицы A7 и A8 представляют уравнения для ферментов гликолиза, пентозофосфатного пути и энергопотребляющих процессов в эритроцитах, а также уравнения для скоростей работы ферментов, включенных в эритроциты, соответственно. В каждом случае символ Vi представляет скорость реакции, катализируемой ферментом i.

Таблица A1 – Дифференциальные уравнения для метаболитов гликолиза, общие для всех моделей<sup>1)</sup>

Переменная	Дифференциальное уравнение
Глукозо-6-фосфат (G6P)	$\frac{d[G6P]}{dt} = V_{HK} - V_{PGI} - V_{GPDH}$
Фруктозо-6-фосфат (F6P)	$\frac{d[F6P]}{dt} = V_{PGI} - V_{PFK} + \frac{2}{3}V_{GPDH}$
Фруктозо-1,6-дифосфат (FDP)	$\frac{d[FDP]}{dt} = V_{PFK} - V_{ALD}$
Дигидроксиацетонфосфат (DAP)	$\frac{d[DAP]}{dt} = V_{ALD} - V_{TPI}$
Глицеральдегид-3-фосфат (GAP)	$\frac{d[GAP]}{dt} = V_{ALD} + V_{TPI} + \frac{1}{3}V_{GPDH} - V_{GAPDH}$
1,3-Дифосфоглицерат (1,3DPG)	$\frac{d[1,3DPG]}{dt} = V_{GAPDH} - V_{DPGM} - V_{PGK}$
2,3- Дифосфоглицерат (2,3DPG)	$\frac{d[2,3DPG]}{dt} = V_{DPGM} - V_{DPGP}$

3- Фосфоглицерат (3PG)	$\frac{d[3PG]}{dt} = V_{PGK} + V_{DPGP} - V_{PGM}$
2-Фосфоглицерат (2PG)	$\frac{d[2PG]}{dt} = V_{PGM} - V_{ENO}$
Фосфоенолпируват (РЕР)	$\frac{d[PEP]}{dt} = V_{ENO} - V_{PK}$
Лактат (LAC)	$\frac{d[LAC]}{dt} = V_{LDH} - V_{transpLAC}$

 $<sup>^{1)}</sup>$  Ферменты гликолиза: HK — гексокиназа; PGI — глюкозо-6-фосфатизомераза; GPDH — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; PFK — фосфофруктокиназа; ALD — альдолаза; TPI — триозофосфатизомераза; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; DPGM — дифосфоглицератмутаза; PGK — фосфоглицераткиназа; DPGP — дифосфоглицератфосфатаза; PGM - фосфоглицератмутаза; ENO — энолаза; PK — пируваткиназа; LDH — лактатдегидрогеназа.  $V_{transpLAC}$  - скорость транспорта лактата через мембрану эритроцита.

Таблица A2 – Дифференциальные уравнения для метаболитов гликолиза в присутствии совместно включенных в эритроцит NADP-зависимой глутаматдегидрогеназы (NADP-GDH) и аланинаминотрансферазы (AAT)<sup>1)</sup>

Переменная	Дифференциальное уравнение
Пируват (PYR)	$\frac{d[PYR]}{dt} = V_{PK} - V_{LDH} + V_{AAT} - V_{transpPYR}$
Никотинамиддинуклеотид окисленный (NAD)	$\frac{d[NAD]}{dt} = V_{LDH} - V_{GAPDH}$
α-Кетоглутарат (АКG)	$\frac{d[AKG]}{dt} = V_{GDH} - V_{AAT} - V_{transpAKG}$
Глутамат (GLU)	$\frac{d[GLU]}{dt} = V_{AAT} - V_{NADP-GDH}$
Аланин (ALA)	$\frac{d[ALA]}{dt} = -V_{AAT} - V_{transpALA}$
Никотинамидадениндинуклеотид- фосфат окисленный (NADP)	$\frac{d[NADP]}{dt} = V_{ox} - 2V_{GPDH} - V_{NADP-GDH}$
Аммоний (NH <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) (AMM)	$\frac{d[AMM]}{dt} = V_{NaDP-GDH}$

 $V_{NADP\text{-}GDH}$  - скорость NADP-зависимой GDH.  $V_{transpRYP}$ ,  $V_{transpAKG}$ , и  $V_{transpALA}$  представляют скорости транспорта через мембрану эритроцита PYR, AKG и ALA.  $V_{ox}$  - скорость окисления NADPH.

Таблица A3 – Дифференциальные уравнения для окисленных никотинамидадениндинуклеотидных кофакторов гликолиза в присутствии совместно включенных в эритроциты AAT и NAD-зависимой GDH<sup>1)</sup>

Переменная	Дифференциальное уравнение
NAD	$\frac{d[NAD]}{dt} = V_{LDH} - V_{GAPDH} - V_{NAD-GDH}$
NADP	$\frac{d[NADP]}{dt} = V_{ox} - 2V_{GPDH}$

 $V_{NAD\text{-}GDH}$  - скорость NAD-зависимой GDH.

Таблица A4 – Дифференциальные уравнения для метаболитов гликолиза в присутствии совместно включенных в эритроциты AAT и универсальной GDH<sup>1)</sup>

Переменная	Дифференциальное уравнение
PYR	$\frac{d[PYR]}{dt} = V_{PK} - V_{LDH} + V_{AAT} - V_{transpPYR}$
NAD	$\frac{d[NAD]}{dt} = V_{LDH} - V_{GAPDH} - V_{GDH-UNI}^{NAD}$
NADP	$\frac{d[NADP]}{dt} = V_{ox} - 2V_{GPDH} - V_{GDH-UNI}^{NADP}$
GLU	$\frac{d[GLU]}{dt} = V_{AAT} - V_{GDH-UNI}^{NAD} - V_{GDH-UNI}^{NADP}$
ALA	$\frac{d[ALA]}{dt} = -V_{AAT} - V_{transpALA}$
Аденозинтрифосфат (ATP) <sup>2)</sup>	$\frac{d[ATP]}{dt} = V_{PGK} + V_{PK} - V_{HK} - V_{PFK} - V_{ATP} - V_{NaKATP}$
AMM	$\frac{d[AMM]}{dt} = V_{GDH-UNI}^{NAD} + V_{GDH-UNI}^{NADP}$

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup> Универсальная GDH (GDH-UNI) является одновременно NAD- и NADP-зависимой.  $V_{GDH-UNI}^{NAD}$  и  $V_{GDH-UNI}^{NADP}$  - части скорости универсальной GDH, связанные с NAD- и NADP-компонентами системы.

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup> Концентрации аленозиндифосфата (ADP) и аденозинмонофосфата (AMP) были рассчитаны в предположении, чтопул аденилатов сохраняется постоянным, а константа равновесия аденилаткиназной реакции равна:  $K_{eq} = [ADP]^2/[AMP][ATP] = 1$ .  $V_{NaKATP}$  - скорость реакции  $Na^+$ - $K^+$ -ATPазы.

Таблица A5 – Дифференциальные уравнения для метаболитов гликолиза в эритроцитах с инкапсулированной аланиндегидрогеназой (ALADH)

Переменная	Дифференциальное уравнение
PYR	$\frac{d[PYR]}{dt} = V_{PK} - V_{LDH} + V_{ALADH} - V_{transpPYR}$
NAD	$\frac{d[NAD]}{dt} = V_{LDH} - V_{GAPDH} - V_{ALADH}$
Аденозинтрифосфат (АТР)	$\frac{d[ATP]}{dt} = V_{PGK} + V_{PK} - V_{HK} - V_{PFK} - V_{ATP} - V_{NaKATP}$
AMM	$\frac{d[AMM]}{dt} = V_{ALADH}$

# Таблица A6 – Дифференциальные уравнения для метаболитов гликолиза в эритроцитах с включенной глутаминсинтетазой (GS)

Переменная	Дифференциальное уравнение
GLU	$\frac{d[GLU]}{dt} = -V_{GS}$
Глутамин (GLN)	$\frac{d[GLN]}{dt} = V_{GS} - V_{transpGLN}$
ATP	
	$\frac{d[ATP]}{dt} = V_{PGK} + V_{PK} - V_{HK} - V_{PFK} - V_{ATP} - V_{NaKATP} - V_{GS}$
AMM	$\frac{d[AMM]}{dt} = -V_{GS}$

# Таблица A7 – Уравнения для ферментов гликолиза, пентозофосфатного пути и энергопотребляющих процессов в эритроците<sup>1)</sup>

# $$\begin{split} & \underline{\Gamma}$$ ексокиназа $& V_{HK} = a_{HK} \frac{[ATP]/K_{HK}^1}{1 + [ATP]/K_{HK}^1 + [G6P]/K_{HK}^2} \\ & a_{HK} = 12 \text{ мM/ч, } K_{HK}^1 = 1 \text{ мM, } K_{HK}^2 = 5.5 \cdot 10^{-3} \text{ мM} \end{split}$

#### Глюкозо-6-фосфатизомераза

$$\overline{V_{GPI}} = a_{GPI} \frac{([G6P] - [F6P]K_{GPI}^{1}) / K_{GPI}^{2}}{1 + [G6P] / K_{GPI}^{2} + [F6P] / K_{GPI}^{3}}$$

$$a_{GPI} = 360~{\rm MM/4},~K_{GPI}^1 = 3~{\rm MM},~K_{GPI}^2 = 0.3~{\rm MM},~K_{GPI}^3 = 0.2~{\rm MM}$$

#### Фосфофруктокиназа

$$V_{PFK} = a_{PFK} \frac{1.1*[ATP][F6P] \left(\frac{1}{1 + [AMP]/K_{PFK}^3} + \frac{2[AMP]}{K_{PFK}^3 + [AMP]}\right)}{(K_{PFK}^2 + [ATP])(K_{PFK}^1 + [F6P]) \left(1 + 10^8 \frac{(1 + [ATP/K_{PFK}^4])^4}{(1 + [AMP]/K_{PFK}^3)^4 (1 + [F6P]/K_{PFK}^5)^4}\right)}$$

$$a_{PFK} = 380 \text{ MM/4}, K_{PFK}^1 = 0.1 \text{ MM}, K_{PFK}^2 = 2 \text{ MM}, K_{PFK}^3 = 0.01 \text{ MM}, K_{PFK}^4 = 0.195 \text{ MM}, K_{PFK}^5 = 3.7 \cdot 10^{-4} \text{ MM}$$

#### **Альдолаза**

$$V_{ALD} = a_{ALD} \frac{[FDP]/K_{ALD}^{1} - [DAP][GAP]/K_{ALD}^{2}}{1 + \frac{[FDP]}{K_{ALD}^{3}} + \frac{[DAP]}{K_{ALD}^{4}} + \frac{[GAP]}{K_{ALD}^{5}} + \frac{[FDP][DAP]}{K_{ALD}^{3}} + \frac{[DAP]^{2}}{K_{ALD}^{4}K_{ALD}^{6}} + \frac{[DAP][GAP]}{K_{ALD}^{4}K_{ALD}^{7}}$$

$$a_{ALD} = 76 \text{ MM/u}, \ K_{ALD}^1 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ MM}, \ K_{ALD}^2 = 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ MM}^2, \ K_{ALD}^3 = 0.01 \text{ MM}, \ K_{ALD}^4 = 0.032 \text{ MM}, \ K_{ALD}^5 = 2.1 \cdot 10^{-3} \text{ MM}, \ K_{ALD}^6 = 2 \text{ MM}, \ K_{ALD}^7 = 0.065 \text{ MM}$$

#### Триозофосфатизомераза

$$V_{TPI} = a_{TPI} \frac{([DAP] - [GAP] / K_{TPI}^2) / K_{TPI}^1}{1 + [DAP] / K_{TPI}^1 + [GAP] / K_{TPI}^3}$$

$$a_{TPI} = 3000 \ \text{MM/4}, \ K_{TPI}^1 = 0.82 \ \text{MM}, \ K_{TPI}^2 = 0.45 \ \text{MM}, \ K_{TPI}^3 = 0.43 \ \text{MM}$$

#### Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

$$V_{GAPDH} = a_{GAPDH} \frac{([GAP][NAD][P_i] - [1,3DPG][NADH] / K_{GAPDH}^4) / K_{GAPDH}^1 K_{GAPDH}^2 K_{GAPDH}^3}{1.29 \left(1 + \frac{[GAP]}{K_{GAPDH}^1} + \frac{[1,2DPG]}{K_{GAPDH}^5}\right) \left(1 + \frac{[NAD]}{K_{GAPDH}^2} + \frac{[NADH]}{K_{GAPDH}^6}\right)}$$

$$a_{GAPD} = 690 \text{ MM/4}, \ K_{GAPD}^1 = 0.13 \text{ MM}, \ K_{GAPD}^2 = 0.13 \text{ MM}, \ K_{GAPD}^3 = 3.4 \text{ MM}, \ K_{GHAPD}^4 = 0.136 \text{ MM}^{-1}, \ K_{GAPD}^5 = 0.013 \text{ MM}, \ K_{GAPD}^6 = 2 \cdot 10^{-3} \text{ MM}$$

#### Фосфоглицераткиназа

$$V_{PGK} = a_{PGK} \frac{([1,3DPG][ADP] - [3PG][ATP] / K_{PGK}^3) / K_{PGK}^1 K_{PGK}^2}{1 + [ATP] / K_{PGK}^5 + [ADP] / K_{PGK}^2 + A[1,3DPG] / K_{PGK}^1 + B[3PG] / K_{PGK}^6}$$

$$A = (K_{PGK}^4 + [ADP] + K_{PGK}^4 [ATP] / K_{PGK}^5) / K_{PGK}^2,$$

$$B = (K_{PGK}^7 + [ATP] + K_{PGK}^7 [ADP] / K_{PGK}^2) / K_{PGK}^5$$

#### Дифосфоглицератмутаза

$$V_{DPGM} = a_{DPGM} \frac{[1,3DPG]}{K_{DPGM}^1 + K_{DPGM}^2[1,3DPG] + [2,3DPG]}$$

$$a_{DPGM} = 3892 \text{ } MM/4, K_{DPGM}^1 = 0.04 \text{ } MM, K_{DPGM}^2 = 0.013 \text{ } MM$$

#### **Дифосфоглицератфосфатаза**

$$V_{DPGP} = a \frac{[2,3DPG]}{[2,3DPG] + K_{DPGP}^{1}(1 + [2PG] + [3PG]/K_{DPGP}^{2})}$$

$$a_{DPGP} = 0.65 \text{ MM/4}, K_{DPGP}^1 = 0.02 \text{ MM}, K_{DPGD}^2 = 6 \cdot 10^{-3}$$

#### **Фосфоглицератмутаза**

$$V_{PGM} = a_{PGM} \frac{([3PG] - [2PG]/K_{PGM}^2)/K_{PGM}^1}{1 + [3PG]/K_{PGM}^1 + [2PG]/K_{PGM}^3}$$

$$a_{PGM} = 1100 \text{ MM/4}, K_{PGM}^1 = 0.27 \text{ MM}, K_{PGM}^2 = 0.24 \text{ , } K_{PGM}^3 = 0.02 \text{ MM}$$

#### Энолаза

$$V_{ENO} = a_{ENO} \frac{([2PG] - [PEP]/K_{ENO}^2)/K_{ENO}^1}{1 + [2PG]/K_{ENO}^1 + [PEP]/K_{ENO}^3}$$

$$a_{\ensuremath{\mathit{ENO}}} = 83$$
 мМ/ч,  $K_{\ensuremath{\mathit{ENO}}}^1 = 0.056$  мМ,  $K_{\ensuremath{\mathit{ENO}}}^2 = 6.7$  ,  $K_{\ensuremath{\mathit{ENO}}}^3 = 2 \cdot 10^{-3}$  мМ

#### Пируваткиназа

$$V_{PK} = a_{PK} \frac{[PEP][ADP]/K_{PK}^1 K_{PK}^2}{1 + [ATP]/K_{PK}^3 + [ADP]/K_{PK}^2 + [PEP]/K_{PK}^1 + [PEP][ADP]/K_{PK}^1 K_{PK}^2}$$

$$a_{PK} = 120 \text{ MM/4}, \ K_{PK}^1 = 0.05 \text{ MM}, \ K_{PK}^2 = 0.43 \text{ MM}, \ K_{PK}^3 = 0.35 \text{ MM}$$

#### Лактатдегидрогеназа

$$V_{LDH} = a_{LDH} \frac{([PYR][NADH] - [LAC][NAD]/K_{LDH}^3)/K_{LDH}^1K_{LDH}^2}{1 + \frac{[PYR]}{K_{LDH}^1} + \frac{[NADH]K_{LDH}^4 + [PYR][NADH] + [LAC][NADH]K_{LDH}^4/K_{LDH}^5}{K_{LDH}^1K_{LDH}^2} + \frac{C}{K_{LDH}^5K_{LDH}^6}$$

$$C = K_{LDH}^{7}[NAD] + K_{LDH}^{6}[LAC] + [NAD][LAC] + K_{LDH}^{7}[PYR][NAD]/K_{LDH}^{1}$$

$$a_{LDH} = 550 \ \text{MM/u}, \ K_{LDH}^1 = 0.022 \ \text{MM}, \ K_{LDH}^2 = 7 \cdot 10^{-3} \ \text{MM}, \ K_{LDH}^3 = 426 \ , \ K_{LDH}^4 = 0.14 \ \text{MM}, \ K_{LDH}^5 = 380 \ \text{MM}, \ K_{LDH}^6 = 0.1 \ \text{MM}, \ K_{LDH}^7 = 170 \ \text{MM}$$

#### Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

$$V_{GPDH} = a_{GPDH} \frac{\frac{[G6P]}{K_{GPDH}^{1}}}{1 + \frac{[G6P]}{K_{GPDH}^{1}}} \cdot \frac{\frac{[NADP]}{K_{GPDH}^{2}}}{1 + \frac{[NADP]}{K_{GPDH}^{2}}} + \frac{[NADPH]}{K_{GPDH}^{3}}$$

$$A_{GPDH} = 25 \text{ MM/4}, \ K_{GPDH}^1 = 0.04 \text{ MM}, \ K_{GPDH}^2 = 4 \cdot 10^{-3} \text{ MM}, \ K_{GPDH}^3 = 0.02 \text{ MM}$$

#### Na+-K+-ATPa3a

$$V_{NaKATP} = a_{NaKATP}[Na^{+}][ATP]$$
$$a_{NaKATP} = 0.045 \text{ } MM/4$$

## Все другие АТРазы представлены следующим уравнением:

$$egin{aligned} V_{ATP} &= a_{ATP} \, rac{[ATP]}{[ATP] + K_{ATP}} \ a_{ATP} &= 1.6 \, \, \emph{mM/4}, \, \, K_{ATP} = 1 \, \, \emph{mM} \end{aligned}$$

<sup>1)</sup> Данные о гликолизе и энергопотребляющих процессах взяты из работы [A1].

## NADP-зависимая глутаматдегидрогеназа [A2]-[A5]

$$\begin{split} &V_{GDH} = ([NADP][GLU] - [AMM][AKG][NADPH] / K_{GDH}^{eq}) / D_{GDH} \\ &D_{GDH} = K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 + K_{GDH}^3 [NADP] + K_{GDH}^1 [GLU] + [NADP][GLU] + \\ &+ \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 K_{GDH}^7 [AMM]}{K_{GDH}^5 K_{GDH}^6} + \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 [NADPH]}{K_{GDH}^6} + \frac{K_{GDH}^3 K_{GDH}^3 [NADPH]}{K_{GDH}^6} + \\ &+ \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 K_{GDH}^4 K_{GDH}^{10}}{K_{GDH}^5 K_{GDH}^6 K_{GDH}^{10}} + \frac{K_{GDH}^1 [GLU][NADPH]}{K_{GDH}^6} + \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 [NADPH]}{K_{GDH}^8 K_{GDH}^8} + \\ &+ \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 K_{GDH}^5 K_{GDH}^{10}}{K_{GDH}^5 K_{GDH}^6 K_{GDH}^{10}} + \frac{[NADP][GLU][AMM]}{K_{GDH}^8} + \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 [AMM][AKG][NADPH]}{K_{GDH}^5 K_{GDH}^5 K_{GDH}^6 K_{GDH}^{10}} + \\ &+ \frac{K_{GDH}^3 K_{GDH}^9 [NADP][AMM][AKG]}{K_{GDH}^5 K_{GDH}^6 K_{GDH}^6} + \frac{[NADP][GLU][AKG]}{K_{GDH}^8 K_{GDH}^8} + \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 [GLU][AKG][NADPH]}{K_{GDH}^8 K_{GDH}^8 K_{GDH}^{10}} + \\ &+ \frac{[NADP][GLU][AMM][AKG]}{K_{GDH}^6 K_{GDH}^8} + \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^8 [GLU][AMM][AKG][NADPH]}{K_{GDH}^8 K_{GDH}^8 K_{GDH}^{10}} + \frac{K_{GDH}^4 K_{GDH}^8 K_{GDH}^{10}}{K_{GDH}^8 K_{GDH}^8 K_{GDH}^{10}} + \frac{K_{GDH}^4 K_{GDH}^8 K_{GDH}^8 K_{GDH}^{10}}{K_{GDH}^8 K_{GDH}^8 K_{$$

$$\begin{split} &K_{GDH}^{eq}=4\cdot 10^{-3}\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^1=0.028\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^2=0.24\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^3=0.74\ \ \emph{mM}\ ,\ \\ &K_{GDH}^4=6.3\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^5=6.5\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^6=2.9\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^7=2.4\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^8=0.315\ \ \emph{mM}\ ,\ \\ &K_{GDH}^9=0.022\ \ \emph{mM}\ ,\ K_{GDH}^{10}=0.028\ \ \emph{mM}\ . \end{split}$$

## NAD/NADP-зависимая глутаматдегидрогеназа (часть для NADP)<sup>1)</sup>

$$\begin{split} & V_{GDH-UNI}^{NADP} = ([NADP][GLU] - [AMM][AKG][NADPH] / K_{GDH}^{eq}) / D_{GDH} \\ & D_{GDH} = K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 + K_{GDH}^3 ([NADP] + [NAD]) + K_{GDH}^1 [GLU] + ([NADP] + [NAD]) (GLU] + \\ & + \frac{K_{GDH}^2 K_{GDH}^3 K_{GDH}^3 ([NADP] + [NAD]) + K_{GDH}^1 ([NADPH] + [NADH])}{K_{GDH}^5 K_{GDH}^5 K_{GD$$

#### Аланинаминотрансфераза [Аб]

$$\begin{split} &V_{AAT} = v_{AAT}^{F} v_{AAT}^{R} ([ALA][AKG] - [PYR][GLU] / K_{AAT}^{eq}) / D_{AAT} \\ &D_{AAT} = v_{AAT}^{R} K_{AAT}^{1} [AKG] + v_{AAT}^{R} K_{AAT}^{2} [ALA] + v_{AAT}^{R} [AKG][ALA] + \\ &+ \frac{v_{AAT}^{F} K_{AAT}^{5} [GLU]}{K_{AAT}^{eq}} + \frac{v_{AAT}^{F} K_{AAT}^{3} [PYR]}{K_{AAT}^{eq}} + \frac{v_{AAT}^{F} [PYR][GLU]}{K_{AAT}^{eq}} + \\ &+ \frac{v_{AAT}^{R} K_{AAT}^{1} [AKG][GLU]}{K_{AAT}^{4}} + \frac{v_{AAT}^{R} K_{AAT}^{2} [ALA][PYR]}{K_{AAT}^{6}} + \frac{v_{AAT}^{R} K_{AAT}^{2} [ALA]^{2}}{K_{AAT}^{7}} + \\ &+ \frac{v_{AAT}^{F} K_{AAT}^{5} [GLU]^{2}}{K_{AAT}^{eq} K_{AAT}^{8}} + \frac{v_{AAT}^{R} K_{AAT}^{2} [ALA][GLU]}{K_{AAT}^{9}} \end{split}$$

$$\begin{split} v_{AAT}^F &= 2.46 \cdot 10^{-3} \ \text{MM/u}, \ v_{AAT}^R &= 2.1 \cdot 10^{-3} \ \text{MM/u}, \ K_{AAT}^1 &= 10 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^2 &= 0.12 \ \text{MM} \ , \\ K_{AAT}^3 &= 8.1 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^4 &= 2.8 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^5 &= 0.23 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^6 &= 0.23 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^7 &= 470 \ \text{MM}, \\ K_{AAT}^8 &= 96 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^9 &= 57 \ \text{MM} \ , \ K_{AAT}^{eq} &= 2.2 \end{split}$$

#### Аланиндегидрогеназа [А7]

$$V_{ALADH} = a_{ALADH} \times \\ \times \frac{v_{ALADH}^{F}[NAD][ALA]/K_{ALADH}^{2}/K_{ALADH}^{3}/K_{ALADH}^{3}-v_{ALADH}^{R}[AMM][PYR][NADH]/K_{ALADH}^{5}/K_{ALADH}^{8}/K_{ALADH}^{10}/$$

$$\begin{split} & \frac{\Gamma_{\Pi Y T A M U H C U H T C T 3 3 } [A8], [A9]}{V_{GS}} = a_{GS} \frac{v_{GS}^{F}[ATP][GLU][AMM]/K_{GS}^{2}/K_{GS}^{4}/K_{GS}^{5} - v_{GS}^{R}[P][GLN][ADP]/K_{GS}^{7}/K_{GS}^{10}/K_{GS}^{12}}{D_{GS}} \\ & D_{GS} = 1 + \frac{[ATP]}{K_{GS}^{2}} + \frac{K_{GS}^{3}[GLU]}{K_{GS}^{2}} + \frac{K_{GS}^{9}[P]}{K_{GS}^{2}} + \frac{[ADP]}{K_{GS}^{10}} + \frac{[ATP][GLU]}{K_{GS}^{2}} + \frac{K_{GS}^{3}[ATP][AMM]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}} + \frac{[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{4}} + \frac{K_{GS}^{3}[ATP][AMM]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}} + \frac{[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{4}} + \frac{K_{GS}^{3}[ATP][AMM]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}} + \frac{[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{4}} + \frac{K_{GS}^{3}[ATP][ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{12}K_{GS}^{12}} + \frac{K_{GS}^{10}[ADP]}{K_{GS}^{2}K_{GS}^{4}K_{GS}^{5}K_{GS}^{5}K_{GS}^{5}K_{GS}^{5}$$

 $<sup>^{(1)}</sup>$  Скорость работы универсальной NAD- и NADP-зависимой глутаматдегидрогеназы ( $V_{GDH\text{-}UNI})$  может быть представлена уравнением:  $V_{GDH\text{-}UNI} = V_{GDH\text{-}UNI}^{NADP} + V_{GDH\text{-}UNI}^{NAD}$ , где  $V_{GDH\text{-}UNI}^{NAD}$  и  $V_{GDH\text{-}UNI}^{NADP}$  - это скорости, связанные с NAD- или NADP-зависимыми активностями фермента, соответственно. Уравнение для  $V_{GDH\text{-}UNI}^{NAD}$  может быть получено из соответствующего уравнения для  $V_{GDH\text{-}UNI}^{NADP}$  путем использования следующих замещений: NAD  $\leftrightarrow$  NADP, NADH  $\leftrightarrow$  NADPH.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ПРИЛОЖЕНИИ А

- A1. Martinov M.V., Plotnikov A.G., Vitvitsky V.M., Ataullakhanov F.I. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia // Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 2000. V. 1474, N. 1. P. 75–87. Available at: <a href="http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00218-4">http://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00218-4</a> (accessed 15.12.2019).
- A2. Manchester K.L. Glutamate dehydrogenase: A reappraisal // Biochem. Educ. 1985. V. 13, N.3. P. 131-133. DOI: 10.1016/0307-4412(85)90188-8. Available at: <a href="http://sci-hub.se/10.1016/0307-4412(85)90188-8">http://sci-hub.se/10.1016/0307-4412(85)90188-8</a> (accessed 15.12.2019).
- A3. Rife J.E., Cleland W.W. Kinetic mechanism of glutamate dehydrogenase // Biochemistry. 1980. V. 19, N. 11. –P. 2321–2328. DOI: 10.1021/bi00552a007.
- A4. LeJohn H.B., Suzuki I., Wright J.A. Glutamate dehydrogenases of *Thiobacillus novellas*. Kinetic properties and a possible control mechanism // J. Biol. Chem. **1968. V. 243,** N. 1. P. 118-128 (1968). Available at <a href="http://www.jbc.org/content/243/1/118.short">http://www.jbc.org/content/243/1/118.short</a> (accessed 15.12.2019).
- A5. Williamson D.H., Lund P., Krebs H.A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver // Biochem. J. 1967. V. 103, N. 2 P. 514-527. DOI: 10.1042/bj1030514. Available at: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1270436/pdf/biochemj00743-0232.pdf">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1270436/pdf/biochemj00743-0232.pdf</a> (accessed 15.12.2019).
- A6. Bulos B., Handler P. Kinetics of beef heart glutamic-alanine transaminase // J. Biol. Chem. 1965. V. **240,** N. 8. P. 3283–3294. Available at: <a href="http://www.jbc.org/content/240/8/3283.full.pdf">http://www.jbc.org/content/240/8/3283.full.pdf</a> (accessed 15.12.2019).
- A7. Grimshaw, C. E. & Cleland, W. W. Kinetic mechanism of *Bacillus subtilis* Lalanine dehydrogenase. *Biochemistry* **20**, 5650–5655 (1981). DOI: 10.1021/bi00523a002.
- A8. Meek T.D., Villafranca J.J. Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase // Biochemistry. 1980. V. 19, N. 24. P. 5513–5519. DOI: 10.1021/bi00565a008. Available at: <a href="https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00565a008">https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00565a008</a> (accessed 15.12.2019).
- A9. Meek T.D., Johnson K.A., Villafranca J.J. *Escherichia coli* glutamine synthetase. Determination of rate-limiting steps by rapid-quench and isotope partitioning experiments // Biochemistry. 1982. V. **21,** N. 9. P. 2158–2167. DOI: 10.1021/bi00538a027. Available at: <a href="https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00538a027">https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00538a027</a> (accessed 15.12.2019).