

## Математическое моделирование метаболической активности изолированной перфузируемой печени крысы в условиях сниженной оксигенации перфузионной среды

Шадрин К.В.<sup>1,2</sup>, Пахомова В.Г.<sup>1</sup>, Крюкова О.В.<sup>1</sup>, Рупенко А.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

[kvsh\\_buffon@mail.ru](mailto:kvsh_buffon@mail.ru)

Работа посвящена математическому описанию метаболической активности изолированной перфузируемой печени крысы в условиях сниженной оксигенации перфузионной среды с использованием методов потокового моделирования. Входными данными для потоковой модели были удельные скорости поглощения кислорода (через сосудистое русло и через поверхность) и глюкозы, выделения углекислого газа, лактата и мочевины, полученные в результате перфузии *ex vivo* печени крысы. Степень согласованности распределения метаболических потоков оценивали по коэффициенту детерминации прямых рангового распределения Ципфа–Парето и Ципфа–Парето–Мандельброта. Было показано, что процесс поглощения кислорода через поверхность обеспечивается простой диффузией. При этом при нормальной оксигенации перфузионной среды при поглощении кислорода через поверхность печени требуется энергия гидролиза двух молекул АТФ, а при сниженной оксигенации перфузионной среды (состояние гипоксии) – семи молекул. Распределение, поглощенного через поверхность печени кислорода, происходит с затратами энергии, что не противоречит распределению энергетических ресурсов в органе как в нормоксии, так и при гипоксии.

*Ключевые слова:* потоковое моделирование, перфузия печени, кислородный метаболизм, гипоксия, распределение энергии.

## Mathematical modeling of the metabolic activity of an isolated perfused rat liver under reduced oxygenation of the perfusion medium

Shadrin K.V.<sup>1,2</sup>, Pakhomova V.G.<sup>1</sup>, Kryukova O.V.<sup>1</sup>, Rupenko A.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Krasnoyarsk Science Centre of the Siberian Branch of Russian Academy of Science

<sup>2</sup>Prof. V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

The paper is devoted to a mathematical description of the metabolic activity of isolated perfused rat liver under reduced oxygenation of the perfusion medium using stoichiometric modeling methods. The input data for the model were rates of oxygen uptake (through the vascular system and through the surface) and glucose, emissions of carbon dioxide, lactate and urea obtained as a result of *ex vivo* perfusion of rat liver. The degree of consistency in the distribution of metabolic fluxes was assessed by the coefficient of determination of the Zipf–Pareto distribution and Zipf–Pareto–Mandelbrot distribution. It was shown that the process of oxygen absorption through the surface is provided by simple diffusion. At normal oxygenation of the perfusion medium, oxygen absorption through the surface requires the energy of hydrolysis of two ATP molecules, and with reduced oxygenation of the perfusion medium (hypoxia) – seven molecules. The distribution of oxygen absorbed through the liver surface occurs with energy costs. This process does not contradict the distribution of energy resources in the organ both in normoxia and in hypoxia.

*Key words:* stoichiometric modeling, perfusion of the liver, oxygen metabolism, hypoxia, energy distribution.

## 1. Введение

Математическое моделирование метаболических процессов в животных клетках позволяет оценивать активности тех или иных метаболических путей в различных экспериментальных условиях. Особенно актуально использовать математическое моделирование при описании метаболизма изолированных перфузируемых *ex vivo* органов, когда внутриклеточные метаболические потоки сложно определить экспериментально, не нарушая целостной структуры органа. Для описания метаболической активности изолированных органов в основном используют потоковые (или стационарные) модели [1–4]. Для построения таких моделей достаточно знать только стехиометрию биохимических реакций и величины «внешних» метаболических потоков, которые сравнительно несложно измерить в эксперименте. В качестве объектов исследования наиболее часто используют изолированную перфузируемую *ex vivo* печень крысы.

Печень – орган, выполняющий в организме большое количество функций, среди которых регуляция уровня глюкозы в крови, метаболизм аминокислот, метаболизм жирных кислот, детоксикация и др. [5]. В экспериментах с использованием перфузируемой *ex vivo* печени крысы было обнаружено, что печень может поглощать кислород не только через сосудистое русло, но из окружающей орган воздушной среды [6–8]. При этом в литературе существуют данные о том, что между величиной скорости поглощения кислорода через поверхность печени и уровнем АТФ в клетке имеет место статистически значимая отрицательная корреляция [8]. Этот факт свидетельствует о том, что в зависимости от величины скорости поглощения кислорода через поверхность может изменяться распределение энергетических ресурсов в клетке. Особенно явно это может наблюдаться в экстремальном состоянии, таком, например, как нормобарическая гипоксия [9], когда количество доступного кислорода в сосудистой системе органа ниже необходимого для нормального метаболизма клеток органа.

Целью работы явилось математическое моделирование метаболической активности изолированной перфузируемой печени крысы в условиях сниженной оксигенации перфузионной среды.

## 2. Методы

### 2.1. Экспериментальное исследование

В качестве экспериментального метода исследования метаболизма органа использовали метод перфузии изолированных органов.

Эксперименты проводили на крысах-самцах Wistar массой 200–250 г (17 животных). Предварительно животные голодали в течение 24 часов при свободном доступе к воде. Перфузию проводили с использованием Уникальной научной установки «Комплекс оборудования для управляемого культивирования изолированных органов» ФИЦ КНЦ СО РАН.

В качестве перфузионной среды использовали раствор Кребса–Рингера с добавлением лактата ( $C[C_3H_6O_3] = 1.7 \text{ mM}$ ), аспарагиновой кислоты ( $C[Asp] = 0.2 \text{ mM}$ ) и хлористого аммония ( $C[NH_4Cl] = 5 \text{ mM}$ ), чтобы увеличить поток через цикл мочевины.

Все животные были разделены на 2 группы в зависимости от типа оксигенации перфузионной среды: **группа 1** (контроль) – выделенную печень интактных животных перфузировали перфузионным раствором, оксигенированным смесью кислорода (95 %) и углекислого газа (5 %) – («Группа 95 %  $O_2$ »); **группа 2** – выделенную печень интактных животных перфузировали перфузионным раствором, оксигенированным смесью кислорода (14 %), углекислого газа (5 %) и азота (81 %) – («Группа 14 %  $O_2$ »).

Перфузию проводили в нормотермических условиях при 37°C при постоянной скорости потока перфузионной среды  $2.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ .

После помещения печени в камеру установки, ее сосудистую систему через канюли подключали к контуру искусственной циркуляции перфузионной среды. Далее камеру герметизировали крышкой и с помощью насоса в воздушную среду камеры подавали газовую смесь, состоящую из кислорода (95 %) и углекислого газа (5 %).

Отбор проб перфузионной среды осуществляли из «артериальной» и «венозной» магистралей. Отбор проб газовой фазы осуществляли на входе в камеру и из воздушной среды камеры. Далее по «артериовенозной» разнице рассчитывали следующие показатели метаболической активности (в  $\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ ): удельные скорости потребления кислорода и выделения углекислого газа через сосудистое русло; удельные скорости потребления глюкозы и выделения лактата; удельную скорость выделения мочевины; удельную скорость поглощения кислорода через поверхность печени.

### 2.2. Метод потокового моделирования

Для построения потоковой модели использовали метод баланса стационарных метаболических потоков (Flux Balance Analysis) [10, 11]. Схему метаболических процессов строили на основе модифицированных цепочек биохимических реакций в печени, рассмотренных Chalhoub et al. [12, 13]. В модель были включены гликолиз, глюконеогенез, метаболизм гликогена, цикл Кребса, цикл мочевины, цепь переноса электронов. Также

модель учитывала влияние бикарбонатного буфера на выход углекислого газа (см. рис. 1). В модель не были включены метаболизм аминокислот (кроме аспарагиновой кислоты), метаболизм жирных кислот и пентозофосфатный путь, т.к. по данным литературы в клетках млекопитающих величины биосинтетических и катаболических потоков этих процессов значительно ниже, чем потоки гликолиза и реакций цикла Кребса [3, 4].

Потоковая модель представляет собой систему балансовых уравнений, которые строятся исходя из закона сохранения вещества. Предполагается, что все потоки находятся в квазистационарном состоянии и концентрации метаболитов остаются неизменными в течение эксперимента по сравнению с изменением внешних условий. Поэтому в этом случае потоковую модель можно записать в виде:

$$S \cdot v = 0, \quad (1)$$

где  $v$  – вектор скоростей реакций (метаболических потоков),  $S$  – стехиометрическая матрица.

Неизвестными в потоковой модели выступают величины метаболических потоков, т.е. величины  $v$ .

Поскольку обычно в метаболической системе реакций больше, чем метаболитов, то система (1) недоопределена. В таком случае вычислить значения метаболических потоков  $v$  можно с использованием оптимизационных методов. Для этого необходимо доопределить систему, вводя ограничения на величины потоков, используя термодинамические ограничения, данные литературы и собственных экспериментов и целевую функцию, которую формулируют исходя из биохимической функции, которую выполняет печень в условиях эксперимента.

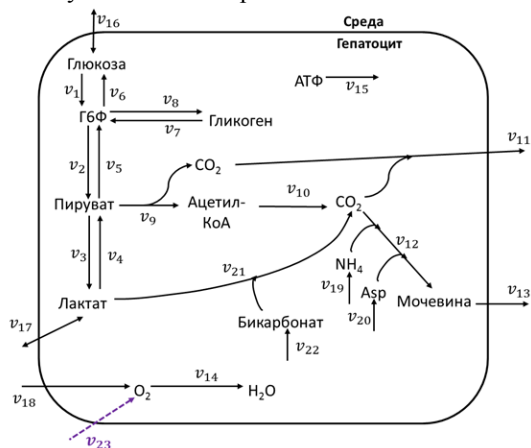


Рис. 1. Схема метаболических путей в клетке печени.

В условиях перфузии *ex vivo* печень выполняет несколько функций: она синтезирует мочевины [13] и обеспечивает свой энергетический метаболизм путем продукции АТФ [16]. Поэтому для определения распределения метаболических потоков в печени необходимо поставить задачу многокритериального программирования с максимизацией продукции мочевины и АТФ.

Входными данными для модели были экспериментально измеренные удельные скорости поглощения кислорода (через сосудистое русло и через поверхность) и глюкозы, выделения углекислого газа, лактата и мочевины.

### 2.3. Определение согласованности распределения величин метаболических потоков

Задачу поддержания функциональной активности изолированной перфузируемой печени можно рассматривать как задачу распределения ресурсов. Количественную оценку согласованности распределения энергетических ресурсов между метаболическими потоками в изолированной перфузируемой печени при нормальном снабжении органа кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды использовали уравнения рангового распределения Ципфа–Парето и Ципфа–Парето–Мандельброта. Степень согласованности распределения метаболических ресурсов определяли по величине коэффициента детерминации  $R^2$  для метаболической системы каждого органа. Чем ближе он к 1, тем более согласованно распределяются энергетические ресурсы.

Правила использования указанных выше законов для метаболической системы клетки можно сформулировать следующим образом: *если в метаболической системе присутствует «свободная конкурентная борьба» между метаболическими потоками за распределение конечного количества какого-либо субстрата (метаболита), то ранговое распределение потребителей может быть описано распределением Ципфа–Парето – это прямая в логарифмических координатах.*

Уравнение рангового распределения Ципфа–Парето [15]:

Математически распределение Ципфа–Парето (используется в случае «свободной конкуренции») для метаболической системы можно записать в следующей форме:

$$\ln v_i = \ln v_{\max} - a \cdot \ln i,$$

где  $i$  – ранг метаболического потока,  $v_i$  – величина метаболического потока,  $\ln v_{\max}$  и  $a$  – константы.

Уравнение Ципфа–Парето–Мандельброта (используется, если на систему воздействуют внешние возмущающие факторы) в его линейной аппроксимации в полулогарифмических координатах записывается в виде

$$\ln v_i = \ln v_{\max} - a \cdot i, \quad i = 1, 2, \dots, n.$$

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Результаты экспериментального исследования

Экспериментальные результаты показывают, что при гипоксии («Группа 14 % O<sub>2</sub>») величина скорости поглощения кислорода через кровяное

русло и через поверхность изолированной печени в среднем меньше, чем в контроле («Группа 95 % O<sub>2</sub>»). При этом доля величины скорости поглощения кислорода через поверхность от суммарной величины при гипоксии наоборот больше (таблица 1). В случае обыкновенной диффузии, если через кровяное русло в орган поступает недостаточное количество кислорода, то диффузионный поток через поверхность должен был бы возрасти, а он уменьшился. Отсюда можно сделать вывод, что процесс поглощения кислорода через поверхность печени может сопровождаться затратами энергии АТФ, что согласуется с фактом статистически значимой отрицательной корреляции между поглощением кислорода через поверхность и количеством АТФ в клетках печени [8].

**Таблица 1.** Удельная скорость поглощения кислорода изолированной перфузируемой печенью (мкмоль·мин<sup>-1</sup>·г<sup>-1</sup>)

	Группа 95% O <sub>2</sub>	Группа 14% O <sub>2</sub>
Через кровяное русло $v$ ( $v_{O_2}$ )	2.64 ± 0.18	0.84 ± 0.09
Через поверхность ( $v_{O_{2,пл}}$ )	2.06 ± 0.24	1.14 ± 0.64
<b>Суммарная</b>	<b>4.70 ± 0.06</b>	<b>1.98 ± 0.1</b>
Доля величины скорости поглощения кислорода через поверхность от суммарной величины	0.44	0.58

### 3.2. Потокное моделирование метаболической активности изолированной перфузируемой печени крысы

При проведении многокритериальной оптимизации в качестве основной целевой функции использовали максимизацию продукции АТФ клетками печени [16], а в качестве дополнительной – максимизацию синтеза мочевины [14]. В печени как при нормоксии («Группа 95 % O<sub>2</sub>»), так и при гипоксии («Группа 14 % O<sub>2</sub>») преобладают процессы гликолиза (потоки  $v_5$ ,  $v_6$  равны 0, а  $v_1$ ,  $v_2$  и  $v_9$  отличны от 0). Процессы распада и синтеза гликогена ( $v_7$ ,  $v_8$ , соответственно) равны 0, что свидетельствует о том, что гликоген не участвует в метаболизме глюкозы. Во всех экспериментальных группах наблюдается выделение лактата ( $v_{17}$ ) в перфузионную среду. В контроле скорость выделения лактата составляет в среднем  $-0.02$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>·г<sup>-1</sup>, что свидетельствует о том, что лактат скорее не выделяется в среду и не поглощается из нее. То же самое наблюдается и для гипоксии, хотя среднее значение потока выделения лактата указывает на то, что он выделяется в перфузионную среду, что согласуется с результатами, полученными Orman et. al. при схожих условиях оксигенации перфузионной среды [1].

Скорости реакций цикла Кребса ( $v_{10}$ ) и окислительного фосфорилирования ( $v_{14}$ )

наибольшие в «Группе 95 % O<sub>2</sub>» больше, чем в «Группе 14 % O<sub>2</sub>». Эти отличия в основном отражают наблюдаемые различия в скорости поглощения кислорода через сосудистое русло и выражаются в схожих различиях в скорости поглощения кислорода через поверхность и в интенсивности потока в цепи переноса электронов ( $v_{14}$ ). Эти наблюдения также согласуются с большей скоростью производства ацетил-КоА из пирувата ( $v_9$ ) в «Группе 95 % O<sub>2</sub>», который является субстратом цикла Кребса.

Наибольшая скорость продукции мочевины ( $v_{13}$ ) наблюдается в «Группе 95 % O<sub>2</sub>». Это согласуется с данными, полученными Orman et. al. [1]. Однако, авторы указывали меньшие величины потока через цикл мочевины. Это вероятно происходило потому, что в отличие от наших экспериментов авторы не добавляли в среду аммоний.

Величина скорости поглощения кислорода через поверхность печени ( $v_{23}$ ) составляет в среднем  $2.3$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>·г<sup>-1</sup> для контрольной группы и около  $0.9$  мкмоль·мин<sup>-1</sup>·г<sup>-1</sup> для гипоксии.

Таким образом, в результате потокового моделирования было получено, что при нормоксии 1 моль поглощенного кислорода связан с гидролизом 2 молей АТФ, при гипоксии – 7 молей АТФ. Этот факт указывает на то, что в клетке должны перераспределяться энергетические ресурсы.

### 3.3. Согласованность распределения величин метаболических потоков

Из всех значений метаболических потоков, полученных путем потокового моделирования выбирали те, для протекания которых необходимо присутствие макроэргических соединений (АТФ, АДФ). Это такие потоки как: глюкокиназная реакция ( $v_1$ ), цепочка реакций превращения глюкозо-6-фосфата в пируват ( $v_2$ ), цепочка реакций превращений пирувата в глюкозо-6-фосфат ( $v_5$ ), синтез гликогена ( $v_8$ ), цикл Кребса ( $v_{10}$ ), орнитинный цикл ( $v_{12}$ ), цепь переноса электронов ( $v_{14}$ ), гидролиз АТФ ( $v_{15}$ ), поглощение кислорода через поверхность печени ( $v_{23}$ ).

Было получено, что экспериментальные данные для «Группы 95 % O<sub>2</sub>» (состояние нормоксии) хорошо описываются уравнением Ципфа–Парето (коэффициент детерминации  $R^2 = 0.96$ ).

Напротив, для «Группы 14 % O<sub>2</sub>» (состояние гипоксии) экспериментальные данные хорошо описываются уравнением Ципфа–Парето–Мандельброта (коэффициент детерминации  $R^2 = 0.94$ ). Это свидетельствует о том, что при гипоксии для поддержания метаболической активности органа необходимо поступление кислорода как через сосудистое русло, так и через поверхность печени.

Высокие значения коэффициента детерминации уравнения Ципфа–Парето для «Группы 95 % O<sub>2</sub>»

свидетельствует о том, что при нормальном снабжении кислородом изолированного органа его метаболическая система работает оптимально и энергетический ресурс распределяется наиболее эффективно и конкуренция идет только за один энергетический ресурс.

При снижении концентрации кислорода в подаваемой в орган перфузионной среде («Группа 14 % O<sub>2</sub>») коэффициент детерминации также высок, однако ранговое распределение метаболических потоков описывается уравнением Ципфа–Парето–Мандельброта, что можно объяснить присутствием внешнего экстремального воздействия – гипоксии.

Таким образом, потоковая модель показала, что процесс поглощения кислорода через поверхность обеспечивается простой диффузией. При этом при нормальной оксигенации перфузионной среды при поглощении кислорода через поверхность требуется энергия гидролиза двух молекул АТФ, а при сниженной оксигенации перфузионной среды (состояние гипоксии) – семи молекул. В состоянии гипоксии снижается активность цикла Кребса и цепи переноса электронов. Это приводит к тому, что продукция АТФ также снижается. В данном случае это означает, что энергия должна экономиться и тратиться на что-то другое, а не на непосредственную транспортировку кислорода в клетку. Дополнительный «потребитель» энергетических ресурсов в изолированной перфузируемой печени – транспорт кислорода в органе – не вносит рассогласования в систему распределения энергетических ресурсов внутри клеток изолированной печени. Т.е. распределение, поглощенного через поверхность печени кислорода, происходит с затратами энергии, что не противоречит распределению энергетических ресурсов в органе как в нормоксии, так и при гипоксии.

#### 4. Список литературы

- Orman M.A., Ierapetritou M.G., Androulakis I.P. et al. Metabolic response of perfused livers to various oxygenation conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. № 12. P. 2947–2957. doi: [10.1002/bit.23261](https://doi.org/10.1002/bit.23261).
- Orman M.A., Berthiaume F., Androulakis I.P. et al. Pathway analysis of liver metabolism under stressed condition. *Journal of Theoretical Biology.* 2011. V. 272. № 1. P. 131–140. doi: [10.1016/j.jtbi.2010.11.042](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.11.042).
- Lee K., Berthiaume F., Stephanopoulos G.N. et al. Metabolic flux analysis of postburn hepatic hypermetabolism. *Metab. Eng.* 2000. V. 2. P. 312–327. doi: [10.1006/mben.2000.0160](https://doi.org/10.1006/mben.2000.0160).
- Lee K., Berthiaume F., Stephanopoulos G.N. et al. Profiling of dynamic changes in hypermetabolic livers. *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 83. P. 400–415. doi: [10.1002/bit.10682](https://doi.org/10.1002/bit.10682).
- Kuntz E., Kuntz H.-D. *Hepatology: Textbook and Atlas.* 3rd Edition. Berlin: Springer, 2008. 937 p.
- Рупенко А.П., Круглик О.В., Моргулис И.И. Снабжение печени кислородом в условиях изолированной перфузии. *Доклады Академии наук.* 2008. Т. 418. № 1. С. 128–130.
- Рупенко А.П., Круглик О.В., Моргулис И.И. Функциональная активность изолированной перфузируемой печени крыс зависит от состава среды. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2008. Т. 146. № 7. С. 117–120.
- Нефедов В.П., Рупенко А.П., Валук В.А. и др. Модификация действия адреналина на метаболизм тканей изолированной печени крыс при перфузии средами различного состава. *Успехи гепатологии.* 1990. Т. XV. С. 335–352.
- Rosmorduc O., Housset C. Hypoxia: A link between fibrogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis in liver disease. *Semin. Liver Dis.* 2010. V. 30. № 3. P. 258–270. doi: [10.1055/s-0030-1255355](https://doi.org/10.1055/s-0030-1255355).
- Varma A., Boesch B.W., Palsson B.O. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 1993. V. 42. № 1. P. 59–73. doi: [10.1002/bit.260420109](https://doi.org/10.1002/bit.260420109).
- Kauffman K.J., Prakash P., Edwards J.S. Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology.* 2003. Vol. 14. № 5. P. 491–496. doi: [10.1016/j.copbio.2003.08.001](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.08.001).
- Chalhoub E., Hanson R.W., Belovich J.M. A computer model of gluconeogenesis and lipid metabolism in the perfused liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. V. 293. P. E1676–E1686. doi: [10.1152/ajpendo.00161.2007](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00161.2007).
- Uygun K., Matthew H.W.T., Huang Y. Investigation of metabolic objectives in cultured hepatocytes. *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 97. P. 622–637. doi: [10.1002/bit.21237](https://doi.org/10.1002/bit.21237).
- Sharma N.S., Ierapetritou M.G., Yarmush M.L. Novel quantitative tools for engineering analysis of hepatocyte cultures in bioartificial liver systems. *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 92. P. 321–335. doi: [10.1002/bit.20586](https://doi.org/10.1002/bit.20586).
- Суховольский В.Г. *Экономика живого: Оптимизационный подход к описанию процессов в экологических сообществах.* Новосибирск: Наука, 2004. 140 с.
- Ramakrishna R., Edwards J.S., McCulloch A. et al. Flux balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001. V. 280. P. R695–R704. doi: [10.1152/ajpregu.2001.280.3.R695](https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.3.R695).