

К.Г. Лябах

Оксид азоту, міоглобін і кисневий режим клітин: дослідження на математичних моделях

За допомогою математичних моделей досліджувався вплив наномолярних концентрацій NO на кисневий режим клітини: внутрішньоклітинний розподіл напруження (pO_2), NO та швидкостей споживання кисню (VO_2) при дифузії NO з поверхні кровоносної судини в клітину з міоглобіном (Mb) і без нього. Згідно з розрахунками, без Mb NO суттєво гальмує дихання у всій клітині. Це призводить до підвищення тканинного pO_2 за допомогою досить грубого регулювання. Дослідження впливу Mb на кисневий режим показали, що він потенційно здатний модулювати його. Відомо, що Mb, допомагаючи транспорту O_2 , може "прибирати зайвий" при нормоксії NO, звільняючи мітохондрії від пригнічування дихання, а за умов гіпоксії деоксигенований Mb стає фактично продуцентом NO, відновлюючи нітрит. Математичне моделювання цих явищ довело, що під впливом Mb концентрація NO, а також pO_2 підвищуються тільки в тій ділянці клітини, де спостерігається гіпоксія. Внаслідок цього пригнічення дихання стає локальним, а гіпоксія послаблюється або зникає. Спільно з NO Mb може здійснювати тонку регуляцію кисневого режиму тканини, підвищуючи клітинне pO_2 і узгоджуючи кисневий запит з його доставкою.

Ключові слова: математичне моделювання, оксид азоту, міоглобін, кисень, кисневий режим, міоцит.

ВСТУП

Відомо, що NO впливає на різні функції організму, зокрема на вазодилатацію й активність дихального ланцюга [1–5]. Висока його концентрація в клітині через надмірне гальмування клітинного дихання може призвести до зменшення скоротливості кардіоміоцитів і пошкодження тканини [1, 11]. Але якщо концентрація NO набуває оптимального для клітини рівня, він відіграє роль цитопротектора [1, 11, 12]. Для з'ясування патогенезу та лікування тканинних пошкоджень при гіпоксії необхідне розуміння принципів формування кисневого режиму клітини під впливом NO. Згідно з даними численних експериментів, ступінь гальмування мітохондрій залежить від pO_2 і концентрації NO, яка у свою чергу пов'язана з концентрацією O_2 . Зворотні зв'язки створюють складну картину впливу

O_2 та NO на кисневий режим клітини. Окрім NO, на кисневий режим впливає міоглобін (Mb). Пряма його дія – це депонування та транспорт O_2 у зони гіпоксії. Опосередкована дія відбувається через зв'язок з NO. Встановлено, що при нормоксії реакція MbO_2 з NO продукує NO_3^- і тим самим зменшує цитозольний NO [8, 9]. Проте при гіпоксії Mb виявляє нітритредуктазну активність і перетворюється зі скевенджера на продуцент NO [8, 16]. У внутрішньоклітинному середовищі наявні і Mb, і MbO_2 . Усе це ще більше ускладнює уяву про формування кисневого режиму клітини та потребує як допоміжного засобу дослідження математичного моделювання взаємодії потоків Mb, O_2 і NO в клітині.

Для вивчення кисневого режиму тканин традиційно застосовується математичне моделювання [4, 5, 14–16, 21]. Залишивши осторонь достатньо вивчену вазодилата-

© К.Г. Лябах

торну дію NO, ми вважаємо доцільним дослідити зв'язок pO_2 і VO_2 з NO в міоциті. Нині відомо багато моделей дифузії NO в судинній стінці, в гладеньких м'язах і кілька, досить приблизних у тканинах [4, 5, 16]. Здебільшого вони віддзеркалюють планарну дифузію газів. Але моделі тримірної дифузії O_2 і NO в клітині нам не зустрічалися, і комплексну дію Mb в моделях транспорту кисню і NO в клітині поки ще не відтворено.

Мета нашої роботи – за допомогою математичного моделювання на базі літературних даних розглянути залежність кисневого режиму клітини від концентрації NO на поверхні судини за наявності Mb і без нього, обчислити розподіл pO_2 , концентрації NO і швидкості поглинання O_2 при взаємодії потоків O_2 , NO в клітинах скелетного м'яза або кардіоміоцита.

МЕТОДИКА

Дослідження впливу NO на кисневий режим тканини проводили на розробленій нами моделі об'ємної дифузії O_2 і NO в міоциті при навантаженнях різної інтенсивності (модель 1). Ця модель створена на базі нашої моделі капілярного кровотоку і тримірної дифузії – споживання O_2 в м'язі [14, 15]. В цю модель введено взаємозв'язок NO з O_2 і дифузію оксиду азоту паралельного з дифузією кисню.

Згідно з Thomas і співавт. [21], експериментально досліджене окислення NO в клітинах відображується формулою (1). NO в свою чергу впливає на концентрацію O_2 в клітині, гальмуючи швидкість його поглинання. Численні експерименти доводять, що в фізіологічних умовах наномольні концентрації NO можуть ефективно діяти на цитохром-оксидазу за допомогою конкурентного гальмування її активності [3, 4, 11, 21]. Формула (2), наведена нижче, описує це оборотне гальмування [21]. Ми використали в моделі формули:

$$-\frac{d[NO]}{dt} = k[O_2][NO] \quad (1)$$

$$VO_2 = \frac{qO_2 \cdot [O_2]}{[O_2] + K_m(1 + \frac{[NO]}{K_{NO}})} \quad (2),$$

де $[O_2]$, $[NO]$ – концентрації O_2 і NO, qO_2 – кисневий запит, $K_m=1$ мм рт. ст. – константа Міхаеліса для O_2 , $K_{NO} = 5,2$ нмоль/л – константа гальмування для NO, $k = 5,3810^7$ моль $^{-1} \cdot$ мл \cdot с $^{-1}$ [3, 21].

Модель 1 дає змогу знаходити внутрішньоклітинний розподіл NO, pO_2 і VO_2 з урахуванням: швидкості м'язового кровотоку (F), qO_2 концентрації оксиду азоту на поверхні судини (NO_c), радіуса дифузії, R, коефіцієнтів дифузії O_2 і NO в тканині (DO_2 і D_{NO} відповідно) кисневої ємності крові (КЄК), вміст кисню в артеріальній крові (C_a). В моделях розглядалося лише одне джерело оксиду азоту NO_c . Для наших розрахунків цей показник передбачався заданим і вибирався з фізіологічного діапазону (20–50 нмоль/л) [3, 21]. У моделі 1 було використано такі значення: $F=40$ мл \cdot хв $^{-1} \cdot 100$ г $^{-1}$, $1 < qO_2 < 12$ мл \cdot хв $^{-1} \cdot 100$ г $^{-1}$, $R=25$ мкм, $КЄК=0,20$, $C_a = 0,195$, $DO_2 = 1,3 \cdot 10^{-5}$ см $^2 \cdot$ с $^{-1}$, $D_{NO} = 1,33 \cdot DO_2$.

Для моделювання участі Mb у транспорті кисню і NO застосовувалася модель площинної радіальної дифузії O_2 , Mb і NO та їх взаємодія в міоциті або в кардіоміоциті (модель 2). У цій моделі вважалися заданими концентрація NO і pO_2 на поверхні судини: $NO_c=50$ нмоль/л і $pO_{2c}=25$ мм рт. ст., концентрація Mb – $2,8 \cdot 10^{-7}$ моль \cdot см $^{-3}$, коефіцієнт дифузії Mb – $1,3 \cdot 10$ см $^2 \cdot$ с $^{-1}$, константа швидкості окиснення Mb $2,4 \cdot 10^{10}$ моль $^{-1} \cdot$ см $^3 \cdot$ с $^{-1}$, константа швидкості розпаду MbO_2 – 65 с $^{-1}$ [16]. В рівнянні дифузії NO, швидкість “прибирання” NO оксиміоглобіном відображали як добуток концентрацій NO і MbO_2 , швидкість появи NO при відновленні нітриту за участю Mb приймали пропорційною його концентрації.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з розрахунками, при $K_m = 1$ мм рт. ст. ми одержали значну залежність клітинного дихання і pO_2 від NO при досить низьких рівнях його концентрації ($NO_c = 20$ нмоль/л). NO, незважаючи на наявність O_2 , розповсюджується по всій клітині та руйнується лише частково, пригнічуючи дихання більшою чи меншою мірою в усьому її об'ємі (рис. 1). За формулою (1) на ступінь гальмування дихання значно впливають значення K_m і K_{NO} .

На рис. 2 показано, що вибраний режим $1 < qO_2 < 12$ мл \cdot хв $^{-1}$ \cdot 100 г $^{-1}$, $F = 40$ мл \cdot хв $^{-1}$ \cdot 100 г $^{-1}$ не забезпечує повної оксигенації клітини. В центрі волокна при концентрації NO=0 існує зона, де pO_2 наближається також до 0 (див. рис. 2, а, б). Клітинне pO_2 , мінімальне і середнє, збільшується пропорційно концентрації NO. Наші результати збігаються з даними Thomas і співавт. [21], отриманими на гепатоцитах у дослідженнях *in vitro* і за допомогою математичної моделі.

Згідно з розрахунками, особливість кисневого режиму клітини – це значна його залежність від NO у всьому міоциті, доки в дію не вступає Mb. Відомо, що у скелетному м'язі та міокарді NO змінює кисневий режим [8–12, 16–21]. Відзначається, що Mb входить в сімейство глобінів, які виявлені

в печінці, мозку та нирках [8, 19].

Роль Mb у регуляції кисневого режиму клітини багатогранна. Він полегшує дифузю кисню, збільшує його потік у тканину. Завдяки великій концентрації, Mb депонує кисень і віддає його мітохондріям в умовах кисневого дефіциту. Все це сприяє підвищенню pO_2 всередині клітини [16]. Сучасні дослідження зв'язку MbO $_2$ з NO, що продукує метміоглобін і нітрат з подальшим його виведенням, показали, що Mb за наявності кисню частково видаляє NO, зменшуючи залежність мітохондріального дихання і скоротливості кардіоміоцитів від нього. Оскільки надлишок NO може гальмувати активність мітохондрій, Mb захищає клітини і регулює їх життєздатність. Роль скевенджера «зайвого» біоактивного NO в клітині прийнято вважати критичною, ключовою в регуляції кисневого режиму клітини [9]. Проте при недостатці кисню Mb може навпаки перетворюватися зі скевенджера NO в його продуцента при відновленні нітриту тканини до NO [17, 18].

Ми спробували математично змодельовувати транспорт і споживання кисню в тканині, дифузю Mb і NO в умовах навантаження при $qO_2 = 12$ мл \cdot хв $^{-1}$ \cdot 100 г $^{-1}$, користуючись моделлю 2. На рис. 3 у відносних одиницях зображені розраховані

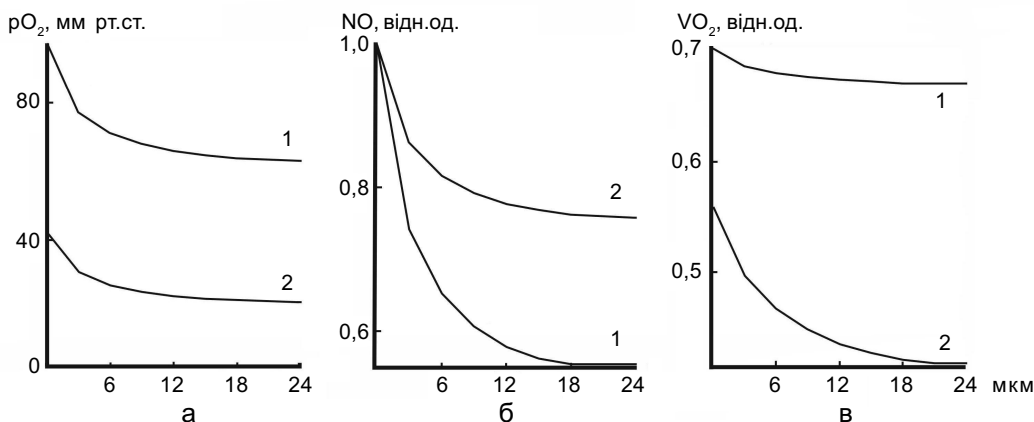


Рис. 1. Радіальні градієнти pO_2 (а), NO (б) і VO_2 (в) навколо артеріальних (1) і венозних (2) кінців судин при навантаженні $qO_2 = 5$ мл \cdot хв $^{-1}$ \cdot 100 г $^{-1}$, $NO_c = 20$ нмоль/л. За віссю абсцис – відстань у мікрометрах від поверхні судини вздовж радіуса міоцита

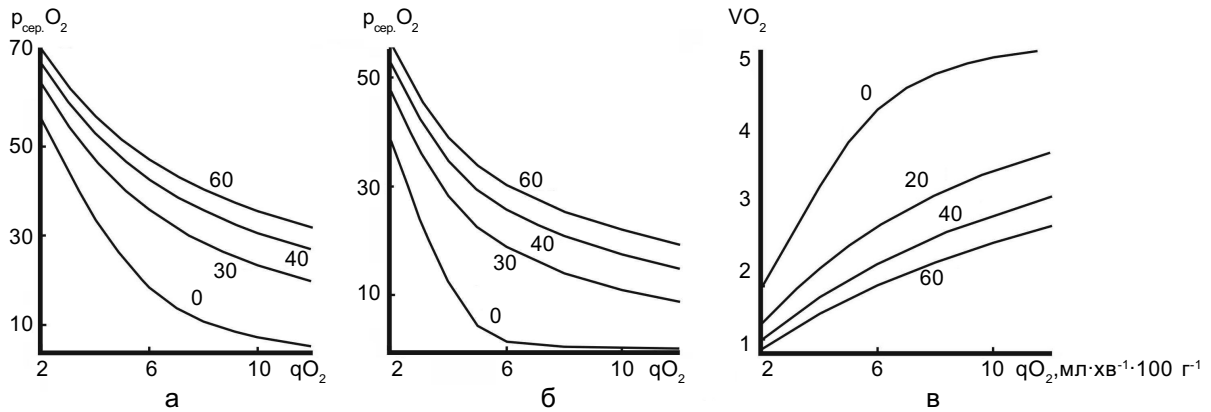


Рис. 2. Вплив NO_c на кисневий режим м'язового волокна залежно від кисневого запиту $q\text{O}_2$: середнє (а), мінімальне (б), напруження кисню та швидкість його поглинання (в) в клітині. Над кривими значення NO_c у наномолях на 1 л при $F = 40 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$

градієнти $p\text{O}_2$, VO_2 , NO і MbO_2 уздовж радіуса дифузії від поверхні судини углиб клітини. Порівнюються три випадки: а) кисневий режим визначає дифузія NO і кисню, Mb відсутній; б) за тих самих умов у моделі додана дія Mb як скевенджера NO , тобто оксидази, якщо кисню достатньо; в) за тих самих умов передбачено, що Mb відіграє роль не тільки його скевенджера, а і його продуцента NO при гіпоксії. У цьому разі Mb діє як нітритредуктаза. При відсутності Mb (рис. 3,а), оксид азоту істотно пригнічує активність мітохондрій у всій клітині. В умовах гіпоксії в “мертвому кутку”, незважаючи на значне пригнічення дихання, $p\text{O}_2$ виявляється нижчим за

критичний рівень і сягає 1,2 мм рт. ст. Середня швидкість споживання кисню становить лише 20 % від кисневого запиту. Надалі Mb “прибирає” NO майже всюди (див. рис. 3,б). Внаслідок цього вплив NO на швидкість споживання кисню значно слабшає. Але при вибраних значеннях $q\text{O}_2$ і $p\text{O}_{2c}$ концентрація кисню в точках найгіршого постачання низька, там $p\text{O}_2$ становить 1,1 мм рт. ст., тому середня швидкість споживання O_2 зменшена до 52 %. Пригнічення дихання відбувається в основному не через NO , а завдяки локальній гіпоксії – гіпоксії навантаження. Ймовірно, в обох розглянутих випадках у зоні гіпоксії проду-

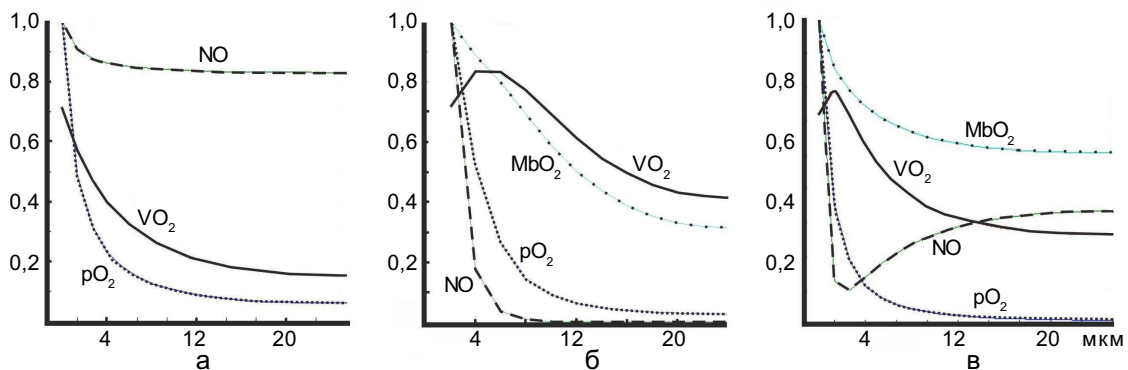


Рис. 3. Градієнти показників у міоциті (кардіоміоциті) вздовж радіуса дифузії (у відносних одиницях): $p\text{O}_2$, оксиду азоту, оксиміоглобіну, а також VO_2 залежно від впливу міоглобіну: а – без міоглобіну, б – дія міоглобіну як скевенджера NO , в) дія міоглобіну як скевенджера або як продуцента залежно від віддаленості джерела кисню. За віссю абсцис – відстань r в мікрометрах від поверхні судини (пояснення в тексті)

куються реактивні форми кисню. Але якщо Mb поводить ся як оксидаза при надлишку кисню і як нітритредуктаза при його недостатці (див. рис. 3,в), кисневий режим змінюється на краще. Особливо відзначимо “доцільність” дії природних регуляторів – Mb і NO. Середня швидкість поглинання кисню становить 40 % від кисневого запиту. Мітохондріальне дихання знижується локально, завдяки збільшенню концентрації NO в зоні гіпоксії, що сприяє зростанню pO_2 . Так, завдяки гальмуванню споживання кисню в місцях найгіршого постачання, pO_2 підвищується до 3 мм рт. ст., внаслідок чого має послабшати надлишкова продукція реактивних форм кисню. Оксигенований Mb “прибирає” зайвий NO навколо судини, деоксигенований Mb всередині клітини діє як джерело NO – «додає» його в гіпоксичних ділянках, знижуючи там VO_2 і підвищуючи тканинне pO_2 . Тобто, якщо ніяким чином не можна доставити потрібну кількість кисню в клітину, Mb зменшує його споживання, щоб уникнути оксидативного стресу [7]. Відбувається узгодження швидкості доставки і споживання O_2 . Отже, при збалансованості концентрацій реагентів-учасників транспорту кисню в тканині Mb потенційно здатний вельми делікатно регулювати клітинний гомеостаз O_2 (VO_2 і pO_2), концентрації реактивних форм кисню і NO. Ми вважаємо, що такі самі результати були б одержані при моделюванні інших джерел NO при продукції оксиду азоту з участю різних NO-синтаз. Залежно від кількісних значень концентрацій реагентів, кінетичних констант, а також місця появи NO в тканині, форма кривої і співвідношення фаз його зниження і зростання (див. рис. 3,в) відрізнятимуться, але суть локального впливу донора NO на кисневий режим при гіпоксії збережеться.

Результати математичного моделювання відповідають ідеям відносно можливої ролі Mb у регуляції тканинного біохімічного гомеостазу. Останнім часом його вплив на

концентрацію оксиду азоту і кисневе постачання тканин інтенсивно вивчається на трансгенних і безпородних мишах. Наші висновки збігаються з літературними даними [6–10, 17–20]. Якщо в експериментах на тваринах розглядаються усереднені показники кисневого режиму тканини, то ми отримали внутрішньоклітинний їх розподіл. Одержані результати слід розглядати лише як орієнтовні, якісні, оскільки багато особливостей взаємодії Mb і NO поки ще не враховано. Наприклад, слід знати розподіл концентрацій нітриту в тканині, а також бажано змоделювати перетворення проміжного з’єднання – метміоглобіну з урахуванням кінетичних констант, щоб мати право з упевненістю перейти до аналізу конкретних фізіологічних ситуацій.

Виконані розрахунки дають змогу зробити припущення, що серед великої кількості регуляторів кисневого режиму дія NO і Mb, яку ми моделювали, може розглядатися як одне з важливих джерел формування належних фізіологічних умов споживання кисню в клітині. Ймовірно, з цим пов’язаний кардіопротекторний вплив NO і нітриту – донора NO при ішемії-реперфузії міокарда [6, 10–13]. Наші розрахунки будуть корисні для розуміння і уточнення механізму їх впливу на енергетику клітин.

ВИСНОВКИ

Аналіз транспорту кисню в тканині з постійним джерелом NO на поверхні судини довів, що останній регулює кисневий режим клітини досить грубо: пригнічування мітохондріального дихання відбувається у всій клітині. Таку ціну клітина сплачує за підвищення pO_2 при гіпоксії. Згідно з розрахунками, Mb потенційно здатний модулювати вплив NO на кисневий режим клітини. Він діє як скевенджер NO у тій частині клітини, де є нормоксія, і як

продуцент NO за умов гіпоксії. Mb впливає на клітинну концентрацію NO локально і спільно з NO може змінювати і швидкість поглинання O_2 , і клітинне pO_2 – здійснювати тонку регуляцію кисневого режиму тканини, підвищуючи її pO_2 і узгоджуючи споживання кисню з його доставкою.

Е.Г. Лябах

ОКСИД АЗОТА, МИОГЛОБИН И КИСЛОРОДНЫЙ РЕЖИМ КЛЕТКИ

Исследовалось влияние наномолярных концентраций оксида азота на кислородный режим мышечной клетки. С помощью математического моделирования диффузии-реакции кислорода, оксида азота и миоглобина (Mb) рассчитывались внутриклеточное распределение скоростей потребления O_2 , pO_2 , концентраций NO и Mb при диффузии NO с поверхности кровеносного сосуда в ткань. Согласно расчетам, в отсутствие Mb NO грубо регулирует кислородный режим клетки, увеличивая ее pO_2 путем ингибирования тканевого дыхания во всем объеме клетки. Присутствие Mb способно модулировать это влияние. Помогая транспорту O_2 в клетке, Mb может действовать еще и как сквенджер NO при нормоксии и как его продуцент при гипоксии. Он локально изменяет концентрацию NO и, соответственно, подавляет клеточное дыхание, повышая тем самым pO_2 . Совместно с NO Mb способен тонко регулировать кислородный режим мышц, увеличивая тканевое pO_2 и устраняя несоответствие между потреблением кислорода его доставкой.

Ключевые слова: математическое моделирование, оксид азота, миоглобин, кислород, кислородный режим, миоцит.

K.G. Lyabakh

NITRIC OXIDE, MYOGLOBIN AND CELL OXYGEN REGIMEN

The influence of nanomolar concentrations of NO on oxygen regimen of muscle cells was investigated. The intracellular distribution of oxygen consumption rates, pO_2 , NO and myoglobin was calculated by mathematical modeling of diffusion reactions of O_2 , NO and myoglobin in the muscle cell. The diffusion of O_2 and NO from blood vessel surface into cell was taken into account. According to calculations, NO roughly regulates the oxygen regimen of cell, because it increases the tissue pO_2 level by inhibition of mitochondria activity in the whole cell space. The presence of myoglobin is capable potentially to modulate the influence of NO on oxygen regimen. Myoglobin not only contributes to tissue O_2 supply, but it can locally affect the NO concentration. Acting as an NO scavenger under normoxia and as an NO producer under hypoxia, myoglobin together with NO can provide fine adjust-

ment of muscle oxygen regimen via an increase in tissue pO_2 and elimination a mismatch between oxygen supply and demand.

Key words: mathematical modeling, nitric oxide, myoglobin, oxygen, oxygen regimen, myocyte.

International Scientific and Training Center for Information Technologies and Systems National Academy of Sciences Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. – К.: Наук. думка, 2008. – 517 с.
2. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. Роль эндотелію та біологічно-активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу та діяльності серця // Фізіол. журн. – 1997. – **43**, №1–2. – С. 3–18.
3. Brown G., Cooper C. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase // FEBS. – 1994. – Lett. 19. – **356**. – P. 295–298.
4. Buerk D. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen // Antioxidants & Redox signaling. – 2007. – **9**. – P. 829–843.
5. Buerk D., Lamkin-Kennard K., Jaron D. Modeling the influence of superoxide dismutase on superoxide and nitric oxide interactions including reversible inhibition of oxygen consumption // Free Radic. Biol. Med. – 2003. – **34**. – P. 1488–1503.
6. Calvert J., Lefer D. Clinical translation of nitrite therapy for cardiovascular diseases // Nitric. Oxide. – 2010. – **22**. – P. 91–97.
7. Clanton T. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle // J. Appl. Physiol. – 2007. – **102**. – P. 2379–2388.
8. Cossins A., Berenbrink M. Myoglobin's new clothes // Nature. – 2008. – **454**. – P. 416–417.
9. Flugel U., Merx M.W., Godecke A., Decking U.K., Schrader J. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO // PNAS. – 2001. – **98**. – P. 735–740.
10. Flugel U., Fago A., Rassaf T. Keeping the heart in balance: the functional interactions of myoglobin with nitrogen oxides // J. Exp. Biol. – 2010. – **213**. – P. 2726–2733.
11. Hendgen-Cotta U., Flugel U., Kelm M., Rassaf T. Unmasking the Janus face of myoglobin in health and disease // *Ibid.* – P. 2734–2740.
12. Hendgen-Cotta B, Kelm M, Rassaf T. A highlight of myoglobin diversity: the nitrite reductase activity during myocardial ischemia-reperfusion // Nitric Oxide. – 2010. – **22**. – P. 75–82.
13. Jensen F. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective // Biochim. Biophys. Acta. –

2009. – **1787**. – P. 841–848.
14. Lyabakh K. Mathematical modeling of oxygen transport in skeletal muscle during exercise: hypoxia and VO₂ max// *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1999. – **471**. – P. 585–593.
 15. Lyabakh K., Mankovskaya I. Oxygen transport to skeletal muscle working at VO₂ max in acute hypoxia: theoretical prediction//*Comparative Biochem. and Physiol. Part A.* – 1999. – **132**. – P. 53–60.
 16. Murray J. On the role of myoglobin in muscle respiration // *J. Theor. Biol.* – 1974. – **47**. – P.115–126.
 17. Pellegrino D., Parisella M. Nitrite as a physiological source of nitric oxide and a signalling molecule in the regulation of the cardiovascular system in both mammalian and non-mammalian vertebrates// *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* – 2010. – **5**, № 2. – P.91–96.
 18. Rassaf T., Flugel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function//*Circulat. Res.* – 2007. – **100**. – P.1749–1754.
 19. Riggs A., Gorr T. A globin in every cell?//*PNAS.* – 2006. – **103**. – P. 2469–2470.
 20. Shiva S., Huang Z., Grubina R., Sun J., Ringwood L.A., MacArthur P.H., Xu X., Murphy E., Darley-Usmar V.M., Gladwin M.T. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration// *Circulat. Res.* – 2007. – **100**. – P.654–661.
 21. Thomas D., Liu X., Kantrow S., Lancaster J. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂//*PNAS.* – 2001. – **98**. – P.355–360.

Міжнар. наук.-навч. центр інформ. технологій і систем, НАН України, Київ
E-mail: katya.e.g@gmail.com

Матеріал надійшов до редакції 18.11.2010