

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ОКСИДА АЗОТА И МИОГЛОБИНА НА КИСЛОРОДНЫЙ РЕЖИМ КЛЕТКИ

Е.Г. Лябах

*Международный научно-учебный центр информационных технологий
и систем НАН Украины и Министерства образования и науки Украины*

Предложена математическая модель трехмерного диффузионного транспорта и утилизации кислорода, оксида азота и модель плоской диффузии кислорода, оксида азота и миоглобина, учитывающая их взаимодействие в клетке. Приведены результаты вычислительных экспериментов по исследованию кислородного режима мышечной клетки.

Запропоновано математичну модель тримірної дифузії та утилізації кисню, оксиду азоту та модель площинної дифузії кисню, оксиду азоту і міоглобіну з урахуванням їхньої взаємодії. Наведено результати обчислювальних експериментів з досліджень кисневого режиму м'язової клітини.

ВВЕДЕНИЕ И ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

Н.М. Амосов рассматривал математическое моделирование физиологических процессов как эффективное средство изучения жизнедеятельности и адаптации организма к различным условиям функционирования. Направление, которое он создал в биологической кибернетике, было нацелено на описание физиологических систем с последующим сведением их в одну большую «модель внутренней сферы организма». В этой интегральной модели среди рассматриваемых систем большое внимание уделялось энергообмену, тканевому дыханию и микроциркуляции в миокарде и скелетных мышцах. Разрабатывая эти вопросы, мы пришли к пониманию большой значимости регулирования кислородного режима клетки.

В энергетическом обеспечении организма главную роль играет митохондриальное дыхание. Соотношение притока и расхода O_2 определяет кислородный режим клетки, основной характеристикой которого служит внутриклеточное распределение напряжения кислорода pO_2 . Если pO_2 выходит за пределы нормальных значений, возникают активные формы кислорода (АФК). Они имеют физиологическое назначение, некоторое количество их необходимо для нормальной работы клетки. Но избыток АФК вызывает окислительный стресс, приводящий к нарушениям функции клетки и деструкциям вплоть до ее гибели. Уже десятки лет перед физиологией стоит задача понять и изучить клеточный кислородный режим и механизмы его регулирования.

Организм и сама клетка располагают регуляторными механизмами поддержания своего кислородного гомеостаза. Оксид азота NO , например, активное соединение, производится в организме несколькими способами,

участвует во многих физиологических процессах: влияет на сосудистый тонус, на ангиогенез, апоптоз, тромбообразование и многое другое. Он может обратимо подавлять клеточное дыхание (уменьшать скорость потребления кислорода) и уменьшать сократительную функцию возбудимых клеток [1–5]. Чтобы предсказать характер и степень воздействия NO на кислородный режим, необходимо определить его концентрацию в зависимости от биохимических условий [3–5].

Кроме NO, на кислородный режим ткани влияет миоглобин Mb, который обладает рядом удивительных свойств. Он не только запасает кислород и транспортирует его в зоны гипоксии [6]. По последним данным, Mb способен разрушать NO, т.е. убирать его избыток при нормоксии и «создавать» его в гипоксических условиях [3, 7–9].

Кислородный режим и, следовательно, биохимический и физиологический статус клетки зависят от влияния NO. Определить результат взаимодействия NO, Mb и O₂ без расчетов пока нельзя. В существующих математических моделях транспорта кислорода с участием NO не рассматривается его влияние на дыхание в трехмерной клетке. Известные математические модели в основном ориентированы на исследование взаимодействия NO и O₂ в системе микроциркуляции, в ткани, содержащей пару артериола-венула. Как правило, это модели двумерного транспорта в сечении ткани или в тканевом цилиндре Крога [1, 4, 10–12]. Известны модели плоской диффузии миоглобина, но без взаимодействия с NO [6]. Новые роли NO в регуляции кислородного режима клетки, обнаруженные недавно, интенсивно изучаются в физиологических экспериментах [1–4], но осмыслить в целом картину сложного взаимодействия диффундирующих реагентов в клетке в исследованиях на микроуровне без математического моделирования вряд ли удастся.

Цель работы — предложить математическое описание диффузии NO, миоглобина и O₂ в миоците, оценить влияние внутриклеточных регуляторов NO и Mb на кислородный режим клетки, определив его главные характеристики: внутриклеточное распределение pO₂ и скорости потребления O₂ — VO₂, концентрации NO и MbO₂ при взаимодействии кислорода с потоками NO и миоглобина, выбранными нами в качестве регуляторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ: ОПИСАНИЕ МОДЕЛЕЙ, РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Нами были разработаны две модели транспорта кислорода кровью и диффузии оксида азота и миоглобина в мышечной клетке.

Список обозначений, принятых в модели 1 и модели 2: Y — процент насыщения миоглобина кислородом, C_t — концентрация кислорода в ткани, C_c — концентрация кислорода в капилляре, C_a — концентрация кислорода в артериальной крови, NO — концентрация NO в ткани, NO_c — концентрация NO на поверхности капилляра, pO_{2t} — напряжение кислорода в ткани, pO_{2c} — напряжение O₂ в капилляре, qO₂ — кислородный запрос ткани, C_{max} — кислородная емкость крови, d —

межкапиллярное расстояние, F — мышечный кровоток, C_{Mb} — концентрация миоглобина, Для расчетов использовались данные, приведенные в табл. 1

Таблица 1

Значения параметров и переменных моделей 1 и 2

D_{O_2}	Коэффициент диффузии O_2	$см^2 \cdot с^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$ [13]
D_{NO}	Коэффициент диффузии NO	$см^2 \cdot с^{-1}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$ [4]
D_{Mb}	Коэффициент диффузии Mb	$см^2 \cdot с^{-1}$	$1,86 \cdot 10^{-6}$ [6]
C_{Mb}	Концентрация Mb	моль \cdot $см^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-7}$ [6]
α	Коэффициент растворимости O_2	моль \cdot $см^{-3} \cdot$ мм рт.ст. $^{-1}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$ [13]
K_m	Константа Михаэлиса для O_2	мм рт. ст.	1 [13]
K_{NO}	Константа ингибирования для NO	моль \cdot $см^{-3}$	$5 \cdot 10^{-12}$ [4]
k	Константа скорости распада MbO_2	$с^{-1}$	65 [6]
k'	Константа скорости окисления Mb	моль $^{-1} \cdot$ $с^{-1} \cdot$ $см^3$	$2,4 \cdot 10^{10}$ [6]
K_1	Параметр скорости окисления NO	моль $^{-1} \cdot$ $с^{-1} \cdot$ $см^3$	$5 \cdot 10^7$ [4]

Модель объемной реакции-диффузии кислорода и оксида азота в клетке, учитывающая перенос кислорода кровью (модель 1). Предлагаемая модель капиллярного транспорта O_2 кровью и объемной диффузии O_2 и NO в клетке базируется на нашей ранее разработанной модели конвективного транспорта кислорода и его реакции-диффузии в мышечной клетке [13]. Рассматривается объемный транспорт в схематизированных миоцитах с питающими кровеносными сосудами. Одна такая микроциркуляторная единица (МЦЕ) среди множества

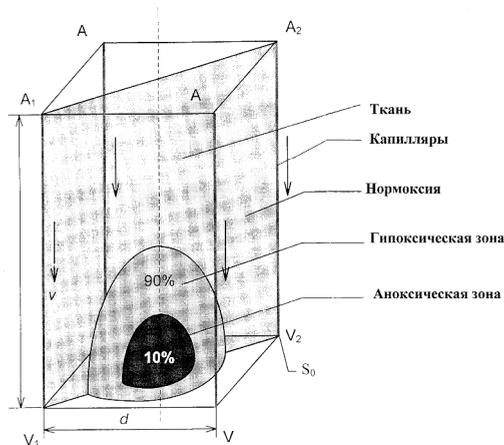


Рис. 1. МЦЕ — микроциркуляторная единица скелетной мышцы с зоной гипоксии и аноксии внутри: A , V — артериальные и венозные концы капилляров, стрелками обозначено направление линейной скорости крови v . В % выражена скорость потребления O_2 как часть кислородного запроса qO_2

соседствующих с ней таких же единиц представлена на рис. 1 как призма (клетка) с капиллярами вдоль ребер.

В сечении призмы $A_1A_2V_2V_1$, проходящем через ее вертикальную ось и капилляры, можно получить расчетный имидж гипоксии, распределения VO_2 , концентраций кислорода (или pO_2) и оксида азота.

В модели 1 приняты следующие допущения и ограничения: все МЦЕ

идентичны, поэтому перетекание реагентов между МЦЕ отсутствует; единственным источником NO является поверхность капилляра, где концентрация NO_c постоянна и известна; ткань и кровь гомогенны; капилляр для O_2 бесконечно проницаем. Миоглобин не участвует в транспорте O_2 .

Уравнения диффузии кислорода и оксида азота в МЦЕ:

$$\frac{\partial^2 C_t}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C_t}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_t}{\partial z^2} = \frac{qO_2 \cdot C_t}{D_{O_2} \left(C_t + K_m \left(1 + \frac{NO}{K_{NO}} \right) \right)}; \quad (1)$$

$$\frac{\partial^2 NO}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 NO}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 NO}{\partial z^2} = \frac{k_{obs} \cdot C_t \cdot NO}{D_{NO}}. \quad (2)$$

В правых частях уравнений (1) и (2), для описания скорости утилизации кислорода VO_2 и скорости взаимодействия оксида азота с кислородом использованы данные [4]. Диссоциацию оксигемоглобина описывает выражение (3).

$$pO_{2capillary} = \frac{-\ln \left(1 - \sqrt{\frac{C_{capillary}}{C_{max}}} \right)}{\left(0,4492 \cdot pH - 0,10093 \cdot pH^2 + 0,0066815 \cdot pH^3 - 0,454 \right)}, \quad (3)$$

$$C = \alpha \cdot pO_2.$$

Уравнение баланса O_2 в капилляре

$$\frac{\partial C_{Ci}}{\partial z} = \frac{AVD \cdot \left(\frac{\partial pO_2}{\partial x} + \frac{\partial pO_2}{\partial y} \right)}{\sum \int_0^L \left(\frac{\partial pO_2}{\partial x} + \frac{\partial pO_2}{\partial y} \right) \partial z}; \quad (4)$$

$$AVD = \frac{qO_2}{F} \cdot \int_R \left(\frac{C_t}{C_t + K_m \left(1 + \frac{NO}{K_{NO}} \right)} \right) dR. \quad (5)$$

Граничные условия: $C_c(0, 0, 0) = C_a(6)$; $NO(0, 0, z) = NO_c(7)$; $\frac{\partial C_t}{\partial e} = 0(8)$; $\frac{\partial NO}{\partial e} = 0(9)$, где e — нормаль к поверхности МЦЕ; R — объем МЦЕ.

Уравнения (1)–(5) с граничными условиями (6)–(9) описывают трехмерный транспорт и утилизацию кислорода и оксида азота в клетке. Потоки кислорода и NO взаимодействуют между собой: кислород в клетке окисляет NO до нитрита и нитрата, а NO воздействует на утилизацию кислорода, обратимо ингибируя цитохром с оксидазу [2, 3–5]. Модель позволяет рассчитывать распределение pO_2 в крови и в ткани, а также распределение NO в ткани в зависимости от заданного NO_c на поверхности сосуда. Перейдя к разностной схеме, получаем численные решения системы уравнений (1)–(9) — характеристики кислородного режима клетки в разных

условиях функционирования, усредненные значения скорости потребления кислорода и степень подавления дыхания. Разработанная технология расчетов концентраций NO , pO_2 и MbO_2 позволяет вывести в виде графиков pO_2 , NO и VO_2 в любом сечении МЦЕ.

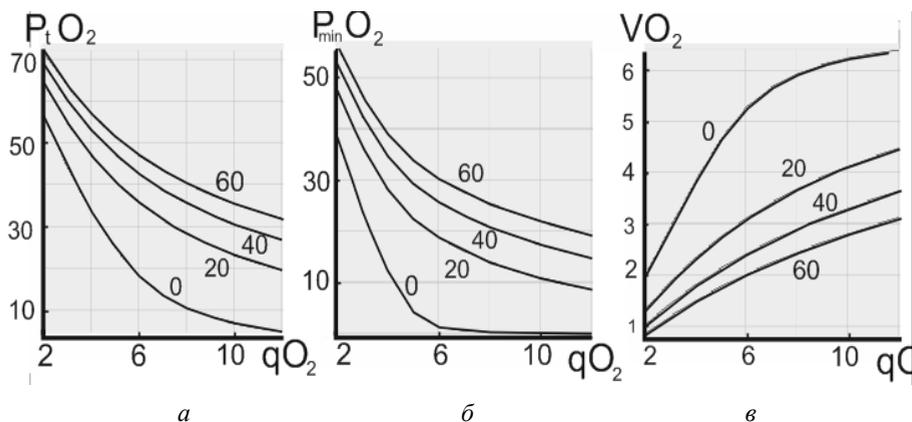


Рис. 2. Влияние оксида азота на кислородный режим мышечной клетки в зависимости от величины кислородного запроса $q\text{O}_2$: а — среднее; б — минимальное pO_2 в клетке; в — средняя скорость потребления O_2 клеткой. Над кривыми указано значение NO в наномолях при кровотоке 40 мл/мин/100г

На рис. 2 приведен пример расчетов с помощью модели 1. Как видно, чем больше концентрация NO , тем выше напряжения кислорода в ткани, следовательно, при необходимости NO может оказывать защитное действие на клетку, например при ишемии-реперфузии, за счет снижения VO_2 . Однако при чрезмерной нагрузке оксидом азота дыхание клетки подавляется слишком сильно во всем ее объеме. Именно это явление иллюстрирует рис. 2, в — результат действия NO . В этом случае, интенсивно подавляя клеточное дыхание, NO может нарушить энергетический гомеостаз клетки.

Модель плоской радиальной диффузии миоглобина, кислорода и оксида азота в клетке (модель 2). Многогранное влияние миоглобина на оксид азота описывает модель 2.

Ограничения и допущения:

1. С помощью модели 2 рассматривается установившийся режим радиальной диффузии реагентов: кислорода, оксида азота и миоглобина вдоль координаты r внутри сечения ткани — круга радиуса $R1$ с капилляром радиуса r_0 в центре 0.

2. Потоки O_2 , NO и MbO_2 через границу круга равны 0.

3. Известны кислородный запрос клетки $q\text{O}_2$, концентрация кислорода C_c , оксида азота NO_c и Y ($Y = \text{MbO}_2/C_{\text{Mb}}$; $0 \leq Y \leq 1$) на поверхности капилляра, а также максимальная концентрация миоглобина C_{Mb} в ткани.

4. Не рассматривая распределение нитрита Ntr в клетке, который может быть восстановлен до NO , полагаем согласно [7], что скорость продукции NO при нитритредуктазной активности миоглобина пропорциональна концентрации деоксигенированного миоглобина.

Диффузия O_2 , Mb и NO в пространстве клетки (миоцита или кардиоцита) описывается уравнениями (10)–(12) с граничными условиями(13)–(18).

$$D_{O_2} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial C_{O_2}}{\partial r} \right) - \frac{q_{O_2} \cdot C_{O_2}}{C_{O_2} + K m_{O_2} \left(1 + \frac{NO}{K_{NO}} \right)} - k' \cdot (1 - Y) \cdot C_{O_2} + k \cdot Y = 0; \quad (10)$$

$$D_{NO} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial NO}{\partial r} \right) + K_1 \cdot NO \cdot C_{O_2} + C_{Mb} \cdot Y \cdot NO \cdot a_1 - C_{Mb} (1 - Y) \cdot Ntr \cdot a_2 = 0; \quad (11)$$

$$D_{Mb} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial Y}{\partial r} \right) + k' \cdot (1 - Y) \cdot C_{O_2} - k \cdot Y = 0. \quad (12)$$

Граничные условия: $\frac{\partial C_{NO}}{\partial r_{r=R_1}} = 0$ (13); $\frac{\partial Y}{\partial r_{r=R_1}} = 0$ (14); $C_{O_2}(r_0) = C_0$ (15);

$Y(r_0) = 1$ (16); $NO(r_0) = NO_{SURF.}$ (17); $NO(r_0) = NO_c$ (18).

Примеры расчетов с помощью модели 2 приведены на рис. 3. Диффузия O_2 идет внутрь клетки с поверхности кровеносного сосуда при нагрузке $q_{O_2} = 8$ мл/мин/100 г на фоне гипоксемии: p_{O_2} в капилляре равно 18 мм рт. ст. Сравниваются результаты моделирования в трех случаях, показанных на рис. 3: *a* — миоглобин отсутствует, благодаря влиянию NO клеточное дыхание повсеместно угнетается, вследствие недостатка кислорода в крови, *б* — миоглобин присутствует и частично проявляет свое влияние ($a_1 = 3,7 \cdot 10^{10} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^3$, $a_2 = 0$). Он убирает NO и облегчает диффузию O_2 , благодаря этому VO_2 ткани увеличивается. В третьем случае *в* ($a_1 = 3,7 \cdot 10^{10} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^3$, $a_2 = 10^{10} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^3$) — в условиях гипоксии в глубине клетки, вдали от капилляра (начало координат точка 0), на расстоянии, большем 10 мкм, концентрация NO увеличивается. В случае, представленном на рис. 3, *б* учитывается действие оксигенированного миоглобина и как переносчика кислорода, и как уборщика «лишнего» NO.

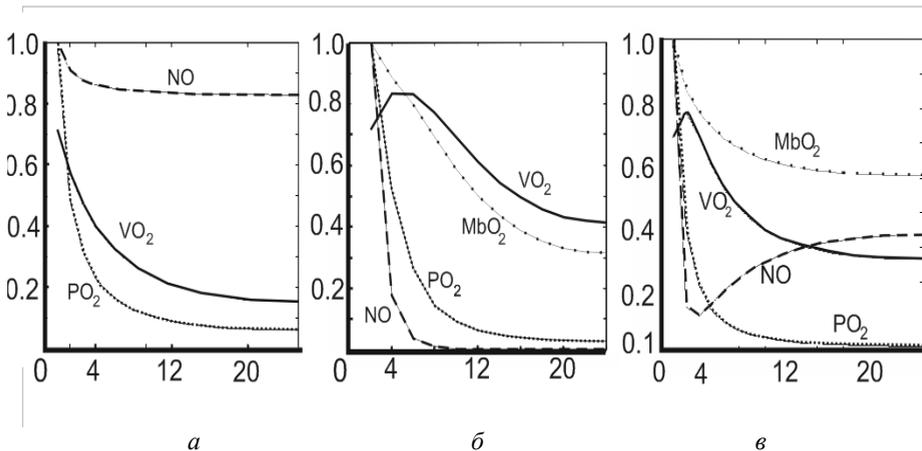


Рис. 3. Градиенты концентраций (в относительных единицах) оксида азота, оксимиоглобина: p_{O_2} и VO_2 в зависимости от характера влияния миоглобина при $p_{O_{2c}} = 18$ мм рт. ст.; $NO_c = 20$ нМ; по абсциссе — расстояние в микрометрах от поверхности сосуда вдоль радиуса диффузии [7, 8, 14]

Рис. 3 иллюстрирует действие миоглобина в разных районах клетки: с нормальным кислородным обеспечением около кровеносного сосуда и с недостаточным — в центре клетки вдали от капилляра. Гипоксия на периферии в зоне недостаточной доставки O_2 ярко выражена. В результате локального действия деоксигенированного миоглобина в местах, где не хватает кислорода, появляется оксид азота. Он местно снижает скорость дыхания и тем самым в той же области клетки увеличивает pO_2 (показано на рис. 3, в): pO_{2min} растет с 0,7 до 3 мм рт. ст.

Поскольку гипоксия уменьшена, ее повреждающее действие в клетке будет ослаблено. С помощью модели на последнем примере мы пронаблюдали комбинированное действие миоглобина в ткани и показали, как в местах возникновения гипоксии с помощью миоглобина происходит генерация дополнительного количества оксида азота, который локально уменьшает дыхательную активность митохондрий и увеличивает pO_2 . Таким способом достигается согласование доставки кислорода с его потреблением и регулируется клеточный гомеостаз.

РАЗВИТИЕ МОДЕЛЕЙ

При разработке моделей предполагалось на первых порах промоделировать принципиальные особенности участия оксида азота в формировании кислородного режима клетки: продукцию и уборку оксида азота и подавление клеточного дыхания. Все остальные генераторы и уборщики NO, а их, как известно, много, можно впоследствии описать подобным образом. Включение их в описание транспорта кислорода NO может стать следующим шагом в развитии предложенных моделей. Необходимо подробно отразить баланс нитрита в клетке. Такое уточнение модели позволит приблизить ее к насущным проблемам медицины — углублению понимания процессов при ишемии-реперфузии и исследованию многих других особенностей работы клетки [1, 5, 14, 15].

В заключение нельзя не отметить, что полученные нами результаты следует рассматривать как качественные, поскольку большинство констант были взяты из экспериментов *in vitro* и затем перенесены на организм.

Выводы

Разработанная модель объемного транспорта кислорода и оксида азота в ткани, описывающая их взаимодействие и влияние на клеточное дыхание, показала, что сам по себе оксид азота даже в незначительных концентрациях оказывает сильное подавляющее действие на дыхание клетки во всем ее объеме.

Наши исследования с помощью модели плоской диффузии показали, что при участии миоглобина возможна более тонкая регуляция кислородного режима. Миоглобин влияет на внутриклеточную концентрацию O_2 и NO, согласовывает потребление кислорода с его доставкой и тем самым обеспечивает нормализацию кислородного режима клетки. По-видимому,

вещества, подобные миоглобину, должны присутствовать в любых реальных клетках организма.

1. Buerk D. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, no. 7, pp. 829–884.
2. Brown G., Cooper C. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.*, 1994, 356, pp. 295–298.
3. Hendgen-Cotta U., Flögel U., Kelm M., Rassaf T. Unmasking the Janus face of myoglobin in health and disease. *J. Exp. Biol.*, 2010, no. 213, pp. 2734–2740.
4. 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, no. 98, pp.355–360.
5. Bryan N., Loscalzo J. eds. *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*, 2011, Springer, 390 p.
6. Murray J. On the role of myoglobin in muscle respiration. *J.Theor. Biol.*, 1974, no. 47, pp.115–126.
7. Flögel U., Merx M., Godecke A. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. *PNAS*, 2001, no. 98, pp. 735–740.
8. Shiva Z., Huang R., Grubina, et al. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Cir. Res.*, 2007, no.100, pp. 654–661.
9. Rassaf T., Flögel U., Drexhage C., Hendgen-Cotta U., Kelm M., Schrader J. Nitrite Reductase Function of Deoxymyoglobin. *Circ. Res.*, 2007, no. 100, pp. 1749–1754.
10. Chen K., Popel A. Theoretical analysis of biochemical pathways of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2006, no. 41, pp. 668–680.
11. Lamkin-Kennard K., Buerk D., Jaron D. Interaction between NO and O₂ in the microcirculation: a mathematical analysis. *Microvasc. Res.*, 2004, no. 68, pp.38–50
12. Chen X, Buerk D, Barbee K, Jaron D. A model of NO/O₂ transport in capillary-perfused tissue containing an arteriole and venule pair. *Ann Biomed Eng*, 2007, no.35, pp. 517–529.
13. Lyabakh K. Mathematical modeling of oxygen transport in skeletal muscle during exercise: hypoxia and V_{O₂} max. *Adv. Exper. Med. Biol.*, 1999, no. 471, pp. 585–593.
14. Flögel U., Fago A., Rassaf T. Keeping the heart in balance: the functional interactions of myoglobin with nitrogen oxides. *J. Exp. Biol.*, 2010, no. 213, pp. 2726–2733.
15. Jensen F. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: a comparative perspective. *Biochim Biophys Acta*, 2009, no. 1787, pp. 841–848.

Получено 15.04.2013