

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ЦТП ФХФ РАН)

УДК 577.3.01 577.38 577.3:51-76

Рег. № НИОКТР АААА-А19-119111690006-9

Рег. № ИКРБС



УТВЕРЖДАЮ

ВРИО директора ЦТП ФХФ РАН

д-р физ.-мат. наук, член-корр. РАН, проф. РАН

М.А. Пантелеев М.А. Пантелеев

«10» сентября 2020 г.

М.П.

Отчет
о научно-исследовательской работе
В рамках Программы фундаментальных научных исследований
государственных академий наук на 2013-2020 годы

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ И
БИОРЕАКТОРОВ НА БАЗЕ ЭРИТРОЦИТОВ

Руководитель НИР,
Заведующая лабораторией физиологии и
биофизики клетки
д-р. биол. наук

Е.И. Синауридзе
подпись, дата

Е.И. Синауридзе

Москва 2019

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР,
Заведующая лабораторией
физиологии и биофизики клетки
д-р. биол. наук


подпись, дата 21.01.20

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

Исполнители:

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


подпись, дата 21.01.20

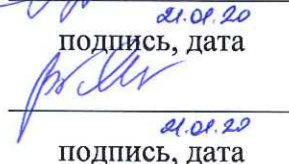
Ф. И. Атауллаханов
(раздел 1)

Науч. сотр.


подпись, дата 21.01.20

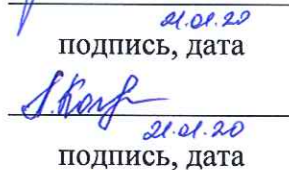
Е.А. Бовт
(раздел 1)

Ст. науч. сотр., докт. биол. наук


подпись, дата 21.01.20

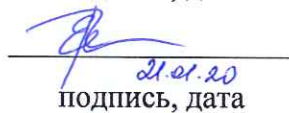
Д.В. Борсакова
(раздел 1)

Аспирант


подпись, дата 21.01.20

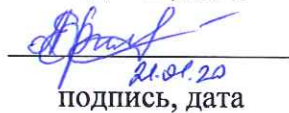
В.М. Витвицкий
(раздел 1)

Стажер-исследователь


подпись, дата 21.01.20

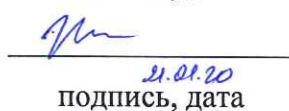
Л.Д. Колева
(раздел 1)

Стажер-исследователь


подпись, дата 21.01.20

Е.С. Протасов
(раздел 1)

Науч. сотр.


подпись, дата 21.01.20

А.Е. Филиппова
(раздел 1)

С.С. Шахиджанов
(раздел 1)

РЕФЕРАТ

Отчёт 20 стр., 8 рис., 8 источн.

ЭРИТРОЦИТ, БИОРЕАКТОР, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА, АЦЕТАЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗА

Объект исследования – сложные динамические диссипативные биологические саморегулирующиеся системы (система свертывания крови, веретено деления, клеточный метаболизм)

Цель работы – разработка методов создания новых лекарственных форм и биореакторов на базе эритроцитов. Первый этап исследования был посвящен созданию теоретической модели эритроцитов-биореакторов (ЭБР), способных удалять из крови этанол и ацетальдегид.

Для удаления из кровотока этанола и ацетальдегида в эритроцит встраивают два фермента - алкогольдегидрогеназу (ADH) и ацетальдегиддегидрогеназу (ALDH).

Созданная математическая модель такого биореактора представляет собой систему 17 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка, описывающих подробно реакции гликолиза в эритроците, реакции обоих встроенных ферментов, а также транспорт проникающих через мембрану эритроцита метаболитов.

Решение полной системы уравнений, полученное с помощью программы MATLAB, показало, что такая система способна утилизировать этанол. Единственные метаболиты, общие для гликолиза и этанол-потребляющей системы – это NAD и NADH. Было рассчитано, что при равных активностях включенных ферментов, не превышающих 60 ммоль/ч×л эр-тов, в гликолизе еще сохраняется стационарное состояние, тогда как при превышении этих активностей отношение концентраций $NAD/(NAD+NADH)$ падает ниже 0.8, что приводит к потере этой стационарности. При этом концентрации таких промежуточных метаболитов как фруктозо-1,6-дифосфат (FDP), диоксиацетонфосфат (DAP) и глицеральдегидфосфат (GAP) начинают расти, а концентрация аденозинтрифосфата (ATP) в клетке сильно падает.

Потеря стационарного состояния гликолиза является фактором, приводящим к гибели эритроцита-биореактора. Таким образом, чтобы успешно использовать предложенные биореакторы, необходимо соблюдать ограничения на активность ферментов встраиваемой системы. Сделанный вывод справедлив для всех встраиваемых ферментных систем, работающих с кофакторами NAD/NADH.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	7
1. Создание теоретической модели эритроцитов-биореакторов (ЭБР), способных удалять из крови этанол и ацетальдегид	7
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	19
Список использованных источников.....	20

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ACALD - ацетальдегид

ACT – ацетат

ADH - алкогольдегидрогеназа

ALDH - ацетальдегиддегидрогеназа

AMP - аденозинмонофосфат

ATP - аденозинтрифосфат

DAP - дигидроксиацетонфосфат

1,3-DPG - 1,3-дифосфоглицерат

ETH - этанол

FDP - фруктозо-1,6-дифосфат

GAPDH - глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

NAD/NADH - окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида

ОДУ - обыкновенные дифференциальные уравнения

ЭБР - эритроциты-биореакторы

ВВЕДЕНИЕ

Одним из возможных путей доставки лекарств у пациентов является создание клеток-биореакторов. В клетки пациента, в первую очередь, в эритроциты, можно вводить разные вещества, а затем возвращать их пациенту с новой функцией. Особенно интересным является использование эритроцитарных биореакторов с включенными в них ферментами. Фермент внутри клеток способен работать при условии, что необходимые для этого субстраты реакции легко проникают через мембрану эритроцита.

То же касается и продуктов реакции, которые не должны накапливаться внутри клеток. Находясь внутри эритроцита, фермент защищен от иммунной системы хозяина, а также от протеаз плазмы, которые способны его разрушить. Концентрация свободного фермента в плазме мала, поэтому он не вызывает сильных токсических воздействий на организм. Таким образом, время жизни препарата в крови увеличивается, а его токсичность и иммуногенность сильно уменьшаются.

Подобные биореакторы были предложены в качестве новой формы лекарственных препаратов уже в 70-х годах прошлого века, однако, несмотря на их очевидную привлекательность, в настоящее время существует только один такой препарат, который уже применяется в клинике – это фермент L-аспарагиназа. Основные проблемы, препятствующие этой концепции воплощаться в клинике – это недостаточный количественный анализ работы биореакторов в условиях *in vivo* (оценка эффективности работы встроенных в эритроцит реакций в зависимости от активности ферментов, влияние на собственный метаболизм эритроцита, оценка скорости транспорта субстратов и продуктов реакции и другие), а также сложность и нетривиальность технологии создания эритроцитов-биореакторов, её воспроизводимость и возможность осуществления в стерильных клинических условиях.

В настоящем исследовании мы планируем математическое моделирование и проведение трансляционных исследований в области создания эритроцитов-биореакторов, осуществляющих доставку необходимых ферментов в организм пациента.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Создание теоретической модели эритроцитов-биореакторов (ЭБР), способных удалять из крови этанол и ацетальдегид

Целью данной работы являлось создание теоретической модели эритроцитов-биореакторов (ЭБР), способных удалять из крови этанол и ацетальдегид (алкоциты), представляющих собой эритроциты, в которые включены два фермента – алкогольдегидрогеназа (ADH) и ацетальдегиддегидрогеназа (ALDH) (реакции (1) и (2), соответственно), и исследование с ее помощью факторов, ограничивающих эффективность таких ЭБР.



где *ETH* – этанол, *ACALD* – ацетальдегид, *ACT* – ацетат, а *NAD* и *NADH* – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида, соответственно.

Реакции гликолиза и встроенных ферментов пересекаются на уровне *NAD*, поэтому для исследования влияния встраиваемой системы на метаболизм эритроцита в модели необходимо рассматривать все эти реакции совместно. Общая схема метаболизма алкоцита, включающая реакции гликолиза и реакции встроенных ферментов, представлена на Рисунке 1.

Созданная в работе математическая модель представляла собой систему из 17 обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) первого порядка, описывающих динамику внутриклеточных концентраций этанола, ацетальдегида, ацетата и метаболитов гликолиза. Уравнения, описывающие гликолиз, были взяты из работы [Martinov M.V. et al., 2000]; а уравнения, описывающие встраиваемую систему - из работы [Alexandrovich Y.G. et al., 2017]. Основные допущения модели, касающиеся гликолиза, совпадали с допущениями, принятыми в работт [Martinov M.V. et al., 2000]. Они были дополнены условиями, касающимися этанола, ацетальдегида и ацетата. Коротко, эти допущения были следующие:

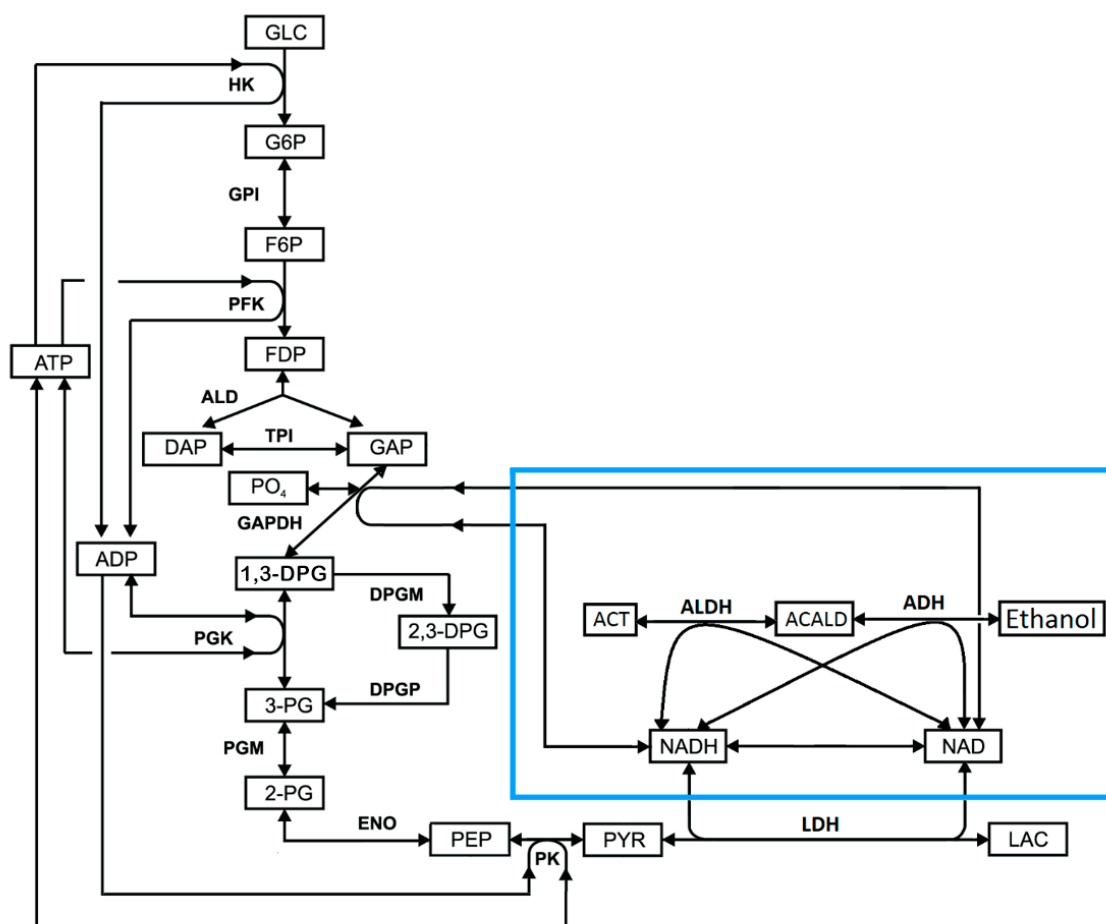


Рисунок 1. Схема реакций, входящих в модель алкоцита. Часть, соответствующая встраиваемой системе ферментов обведена синей рамкой. Использованы следующие обозначения: GLC – глюкоза; G6P – глюкозо-6-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FDP – фруктозо-1,6-дифосфат; DAP - дигидроксиацетонфосфат; GAP - глицеральдегидфосфат; 1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат; 2,3-DPG – 2,3-дифосфоглицерат; 3-PG – 3-фосфоглицерат; 2-PG – 2-фосфоглицерат; PEP - фосфоенолпируват; PYR - пируват; LAC - лактат; NAD и NADH – окисленная и восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида, соответственно; GLU – глутаминовая кислота; AKG – α -кетоглутарат; ALA - аланин; ATP - аденозинтрифосфат; ADP – аденозиндифосфат; DAP – аденозинмонофосфат; PO₄ – ион неорганического фосфата; Ethanol – этанол; ACALD – ацетальдегид; ACT – ацетат; HK - гексокиназа; GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза; PFK – фосфофруктокиназа; ALD - альдолаза; TPI – триозофосфатизомераза; GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; PGK – фосфоглицераткиназа; PGM – фосфоглицератмутаза; ENO - Энолаза; PK – пируваткиназа; LDH – лактатдегидрогеназа; ADH – алкогольдегидрогеназа; ALDH – ацетальдегиддегидрогеназа.

1. Скорость гексокиназной реакции не зависит от концентрации глюкозы, т.к. физиологическая концентрация глюкозы в десятки раз выше константы Михаэлиса гексокиназы по отношению к глюкозе [Gerber G., et al., 1974].
2. Мембрана эритроцита непроницаема для всех метаболитов гликолиза кроме лактата и пирувата. При этом скорость транспорта лактата и пирувата пропорциональна градиентам концентраций этих метаболитов внутри и снаружи клетки [Whillier S., et al., 2011; Halestrap A.P., 1976]. Транспорт метаболитов встраиваемых реакций - этанола, ацетальдегида и ацетата, достаточно быстр (проницаемость мембраны эритроцита для этих веществ очень велика), поэтому концентрации этих метаболитов внутри и снаружи эритроцита находятся в равновесии в любой момент времени [Naccache P., et al., 1973; Ren S., et al., 1996].
3. Объем эритроцитов, а также пулы аденилатов и никотинамидадениндинуклеотидов считали постоянными [Martinov M.V., et al., 2000].
4. Влияние трансмембранных потенциалов на транспорт метаболитов не учитывали.

В качестве начальных условий для решения системы ОДУ (методом Рунге-Кутты 4-5 порядка в программе MATLAB), были использованы концентрации метаболитов гликолиза, соответствующие стационарному состоянию гликолиза в физиологических условиях.

Транспорт лактата и пирувата сквозь мембрану описывали линейным соотношением (3):

$$V_{diffA} = K_d^A ([A]_{int} - [A]_{ext}) \quad (3),$$

где V_{diffA} - скорость транспорта метаболита А сквозь мембрану; $[A]_{int}$ – концентрация метаболита А в клетке; $[A]_{ext}$ – концентрация метаболита А во внешней среде (плазме крови); K_d^A – проницаемость мембраны для метаболита А.

Концентрации лактата и пирувата во внешней среде считали постоянными ($[PYR]_{ext}=0.07$ мМ, $[LAC]_{ext}=1.2$ мМ). Проницаемости для лактата и пирувата составляли $K_d^{PYR}=60$ ч⁻¹, $K_d^{LAC}=12$ ч⁻¹ (оценено из [Halestrap A.P., 1976]). Система для расчета кинетики концентраций метаболитов в гликолизе при фиксированной стационарной концентрации NAD была получена из исходной путем приравнивания правой части ОДУ для NAD (т.е. разности скоростей его производства и потребления) к 0. Решение полной системы уравнений показало, что такая система способна утилизировать этанол (Рисунок 2).

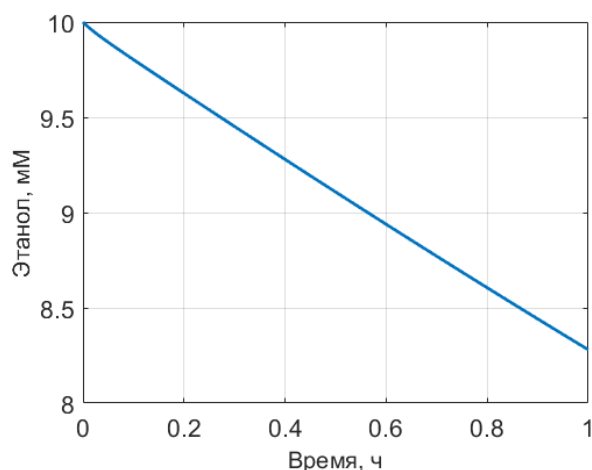


Рисунок 2. Рассчитанная с помощью модели кинетика убывания этанола в присутствии эритроцитов-биореакторов, включающих ADH и ALDH. Активности ADH и ALDH, использованные при расчете, были одинаковы и составляли $60 \text{ ммоль/ч} \times \text{Л}_{\text{эр-тов}}$, что соответствует $1 \text{ МЕ/мл}_{\text{Л}_{\text{эр-тов}}}$. Начальные концентрации всех метаболитов гликолиза в расчете соответствовали стационарным концентрациям этих метаболитов в гликолизе при физиологических условиях. Исходная концентрация этанола составляла 10 мМ .

Для исследования долгосрочного поведения системы, мы предположили, что все реакции системы на длительных временах должны проходить в стационарном режиме, поэтому входящие в модель уравнения для изменения концентраций метаболитов гликолиза были модифицированы путем приравнивания их правых частей к нулю. Это соответствует ситуации при постоянной концентрации этанола в системе. При этом исключается влияние концентрации этанола на скорости целевых реакций, что позволяет оценить эффекты, связанные со свойствами самой метаболической системы. Было показано, что при равных активностях ADH и ALDH не превышающих $60 \text{ ммоль/ч} \times \text{Л}_{\text{эр-тов}}$ система сохраняет стационарное состояние гликолиза. При повышении активности включенных в эритроцит ферментов отношение $\text{NAD}/(\text{NAD}+\text{NADH})$ падает тем больше, чем выше активности включенных в эритроциты ферментов (Рисунок 3а). При активностях, превышающих $60 \text{ ммоль/ч} \times \text{Л}_{\text{эр-тов}}$, отношение $\text{NAD}/(\text{NAD}+\text{NADH})$ падает ниже 0.8. При этом стационарное состояние в гликолизе исчезает, начинается накопление таких метаболитов, как фруктозо-1,6-дифосфата (FDP) (Рисунок 3б), диоксиацетонфосфата (DAP) и глицеральдегидфосфата (GAP), а также резкое падение уровня АТФ (Рисунок 3в).

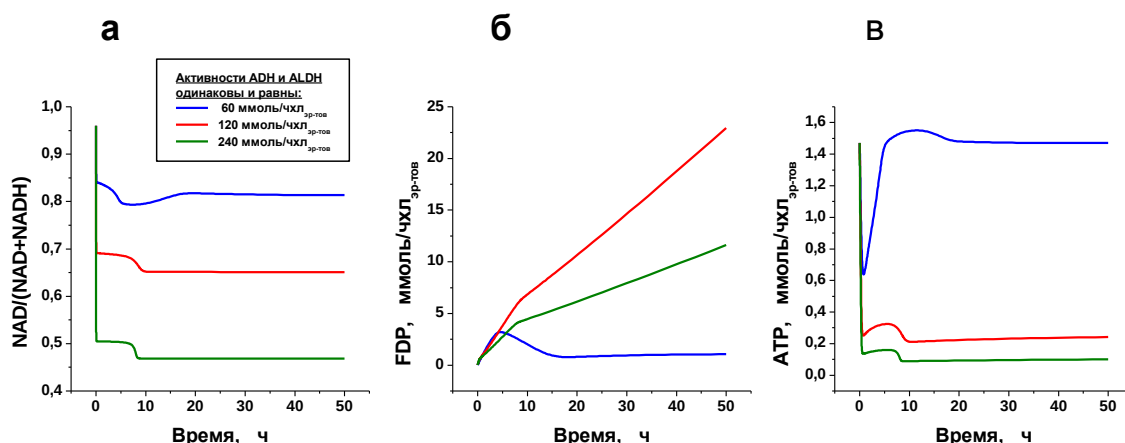


Рисунок 3. Изменение отношения $\text{NAD}/(\text{NAD}+\text{NADH})$ (а), а также кинетика FDP (б) и АТР (в) при различных активностях включенных в эритроциты ферментов, утилизирующих этанол. Активности АДН и АЛДН были одинаковы и равны 60 $\text{mmol}/\text{ч} \times \text{L}_{\text{эритроц}}/\text{ч}$ (синие кривые), 120 $\text{mmol}/\text{ч} \times \text{L}_{\text{эритроц}}/\text{ч}$ (красные кривые) и 240 $\text{mmol}/\text{ч} \times \text{L}_{\text{эритроц}}/\text{ч}$ (зеленые кривые). Концентрации всех метаболитов гликолиза соответствовали физиологическим условиям. Концентрацию этанола считали постоянной и равной 10 мМ.

Поскольку единственные метаболиты, общие для гликолиза и этанол-потребляющей системы – это NAD и NADH, вероятной причиной потери стационара является снижение стационарной концентрации NAD, наблюдаемое при повышении активностей ферментов встроенной системы (Рисунки 3а и 4). Расчеты показали, что потеря стационарного состояния в гликолизе происходит при снижении величины отношения $\text{NAD}/(\text{NAD}+\text{NADH})$ ниже 0.8. В случае АДН и АЛДН такое снижение достигается при активностях включенных ферментов выше 60 $\text{mmol}/\text{ч} \times \text{L}_{\text{эритроц}}/\text{ч}$.

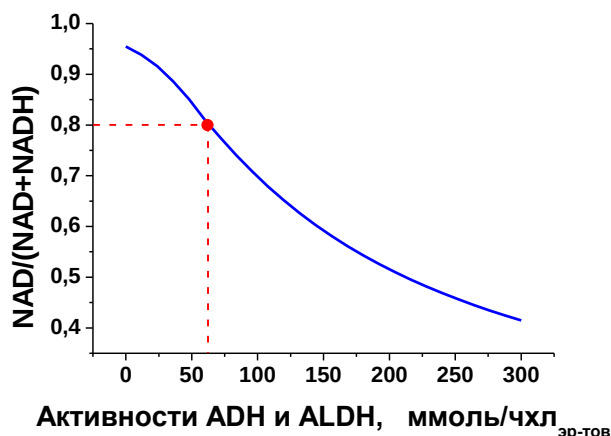


Рисунок 4. Зависимость отношения стационарной концентрации NAD к общему пулу концентраций ($\text{NAD} + \text{NADH}$) в системе от активности ферментов встраиваемой системы. Расчеты сделаны для различных стационарных концентраций NAD, соответствующих определенным отношениям $\text{NAD}/(\text{NAD} + \text{NADH})$. Активности обоих ферментов при расчете полагали равными. Концентрация этанола постоянна и равна 10 мМ.

Если рассчитать зависимость концентрации FDP в клетке через 15 часов работы системы от активности встроенных ферментов (для случая алкоцитов с равными, но разными по величине активностями ADH и ALDH) (Рисунок 5а), а также соответствующую зависимость (через 15 часов работы) для концентрации FDP в эритроците без встроенных ферментов, но с различными искусственно заданными стационарными отношениями $\text{NAD}/(\text{NAD} + \text{NADH})$ (такие зависимости были получены из решения системы уравнений, описывающей гликолиз, в которой правая часть уравнения для NAD приравнена к нулю при различных начальных концентрациях NAD) (Рисунок 5б), то хорошо видно, что быстрое увеличение FDP в обоих случаях до максимума, которое соответствует потере стационарного состояния в гликолизе, происходит при активностях встроенных ферментов $>60 \text{ ммоль/ч} \times \text{Лэр-тов}$ или при отношении $\text{NAD}/(\text{NAD} + \text{NADH})$ около 0.8. Аналогичная картина наблюдалась и для других метаболитов гликолиза, которые накапливаются в системе после потери стационарного состояния, таких как DAP или GAD. Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что причиной потери стационарности в гликолизе является снижение концентрации NAD ниже определенного уровня (0.04 мМ).

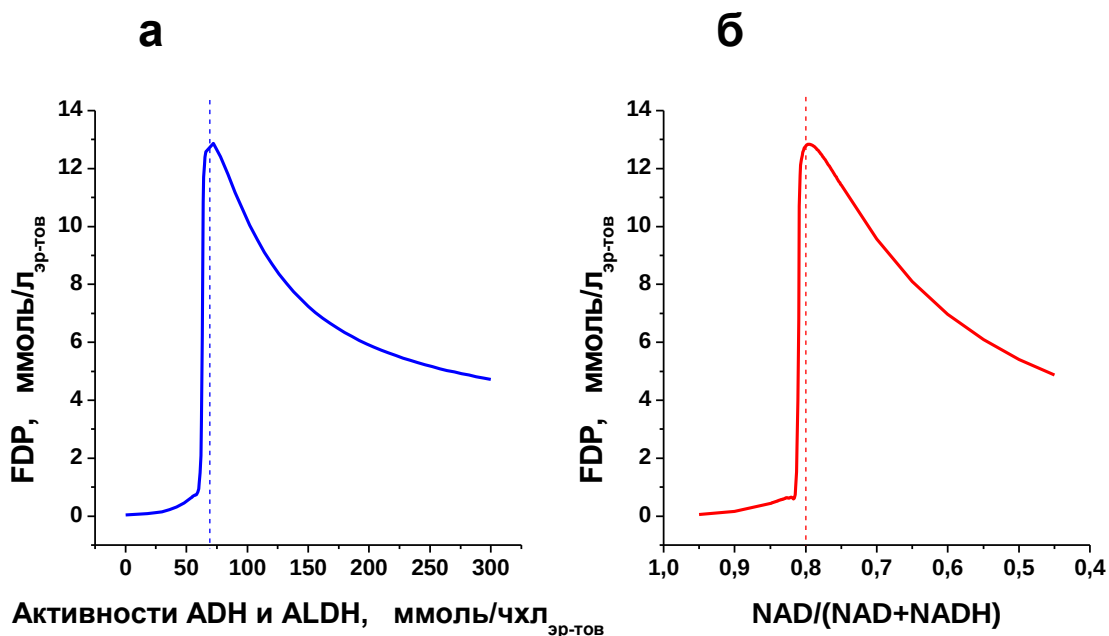
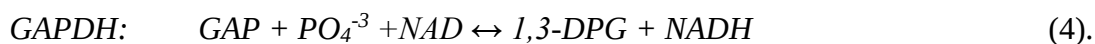


Рисунок 5. Концентрации FDP в клетках в зависимости от активностей встроенных ферментов или доли стационарной концентрации NAD в общем пуле никотинамидадениндинуклеотидов. (а) - Зависимость концентрации FDP в алкоците через 15 часов работы системы от активностей встроенных ферментов (ADH и ALDH); (б) - зависимость концентрации FDP (после 15 часов инкубации) в эритроците без этанол-потребляющей системы от искусственно заданного в модели стационарного отношения NAD/(NAD+NADH).

Единственное звено гликолиза, на которое концентрация NAD может влиять прямо это реакция превращения GAP в 1,3-DPG, катализируемая глицеральдегидфосфатдегидрогеназой (GAPDH) (4):



При снижении концентрации NAD скорость этой реакции снижается, что может стать вероятной предпосылкой потери стационара, поскольку скорость реакций верхней части гликолиза лимитируется скоростью фофсфруктокиназной реакции, которая не зависит от NAD, а регулируется другими параметрами (в частности, концентрациями ATP и AMP).

Для лучшего понимания условий потери стационара в реакции, катализируемой GAPDH, рассмотрим упрощенную метаболическую систему, состоящую из одной этой реакции. Поскольку скорость реакций, обеспечивающих поступление глицеральдегида (GAP) в систему регулируется факторами, не связанными с NAD, положим, что он производится с постоянной скоростью (V_{GAP}). Поскольку концентрация 1,3-DPG в условиях близких к физиологическим низка и составляет примерно 0.6-0.45 мкмоль/л_{эритроцитов}, зависимость скорости его потребления от его концентрации в клетке далека от насыщения и может считаться в этой области концентраций линейной, т.е.

$$-V_{1,3-DPG} = \alpha[1,3-DPG] \quad (5).$$

На Рисунке 6 представлена выделенная часть системы гликолиза, описывающая GAPDH реакцию.

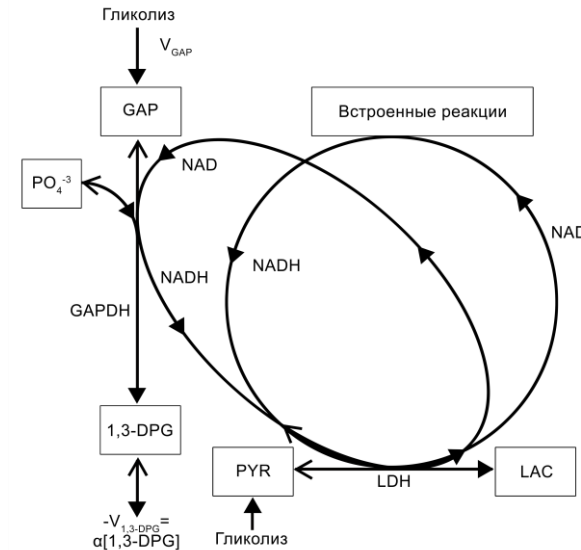


Рисунок 6. Редуцированная схема процесса для анализа поведения стационарного состояния в гликолизе при изменении концентрации NAD.

Заполненные стрелки указывают преимущественное направление процесса при физиологических условиях

Редуцированная система включает в себя одну реакцию GAPDH и описывается системой из двух ОДУ:

$$d[GAP]/dt = V_{GAP} - V_{GAPDH} \quad (6),$$

$$d[1,3-DPG]/dt = V_{GAPDH} - \alpha[1,3-DPG] \quad (7),$$

где V_{GAP} – это скорость поступления GAP в систему, а V_{GAPDH} – скорость глицеральдегиддегидрогеназной реакции.

Скорость GAPDH реакции описывается следующим уравнением (8):

$$V_{GAPDH} = A \frac{([GAP][NAD][Pi] - \frac{[1,3DPG][NADH]}{K_{GAPDH}^4}) / K_{GAPDH}^1 K_{GAPDH}^2 K_{GAPDH}^3}{1.29 \left(1 + \frac{[GAP]}{K_{GAPDH}^1} + \frac{[1,3DPG]}{K_{GAPDH}^5} \right) \left(1 + \frac{[NAD]}{K_{GAPDH}^2} + \frac{[NADH]}{K_{GAPDH}^6} \right)} \quad (8),$$

где $A=690$ мМ/ч; $K_{GAPDH}^1=0.13$ мМ; $K_{GAPDH}^2=0.13$ мМ; $K_{GAPDH}^3=3.4$ мМ; $K_{GAPDH}^4=0.136$ мМ¹; $K_{GAPDH}^5=0.013$ мМ; $K_{GAPDH}^6=0.002$ мМ; Pi (неограниченный фосфат)=0.5 мМ.

Для дальнейшего анализа преобразуем уравнение (8), вводя следующие обозначения:

$$m = 1.29; \quad a_1 = \frac{AP_i}{K_{GAPDH}^1 K_{GAPDH}^2 K_{GAPDH}^3}; \quad a_2 = \frac{A}{K_{GAPDH}^1 K_{GAPDH}^2 K_{GAPDH}^3 K_{GAPDH}^4}; \quad a_3 = \frac{m}{K_{GAPDH}^1};$$

$$a_4 = \frac{m}{K_{GAPDH}^5}; \quad a_5 = \frac{1}{K_{GAPDH}^2}; \quad a_6 = \frac{1}{K_{GAPDH}^6}; \quad \gamma = \frac{[NAD]}{[NAD] + [NADH]}; \quad c_0 = [NAD] + [NADH]; \quad [GAP] = y; \quad [1,3 - DPG] = x; \quad \text{отсюда также: } [NAD] = c_0 \gamma; \quad [NADH] = c_0 (1 - \gamma).$$

Тогда уравнение скорости приобретает вид:

$$V_{GAPDH} = \frac{a_1 c_0 \gamma y - a_2 c_0 (1 - \gamma) x}{(m + a_3 y + a_4 x)(1 + a_5 c_0 \gamma + a_6 c_0 (1 - \gamma))} \quad (9).$$

Для сокращения некоторых дальнейших расчетов введем также обозначение:

$$1 + a_5 c_0 \gamma + a_6 c_0 (1 - \gamma) = C \quad (10),$$

и исследуем поведение стационарного состояния системы в зависимости от значения параметра γ . Тогда координаты особой точки, могут быть найдены из системы уравнений (11) и (12):

$$V_{GAP} - V_{GAPDH} = 0 \quad (11),$$

$$V_{GAPDH} - \alpha x = 0 \quad (12).$$

Эти координаты выражаются следующими формулами:

$$x_0 = \frac{V_{GAP}}{\alpha}, y_0 = \frac{CmV_{GAP} + a_2c_0(1-\gamma)x_0 + Ca_4V_{GAP}x_0}{a_1c_0\gamma - Ca_3V_{GAP}} \quad (13),$$

где x_0 и y_0 – стационарные концентрации 1,3-DPG и GAP, соответственно.

Анализ типа особой точки показывает, что она остается всюду устойчивой. Поведение особых точек для x_0 и y_0 представлено на Рисунке 7.

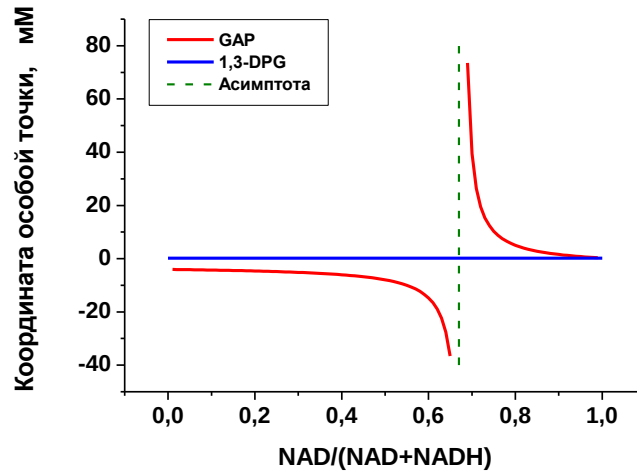


Рисунок 7. Зависимость положения особой точки y_0 (стационарной концентрации GAP или 1,3-DPG) от значения параметра $\gamma = \text{NAD}/(\text{NAD}+\text{NADH})$.

Из формул (13) видно, что стационарная концентрация [1,3-DPG] не зависит от отношения $\gamma = \text{NAD}/(\text{NAD}+\text{NADH})$ (Рисунок 7, синяя кривая). Иначе ведет себя стационарная концентрация GAP (Рисунок 7, красная кривая), которая при снижении отношения γ и приближении к его асимптотическому значению, возрастает до бесконечности, а при дальнейшем снижении γ уходит в отрицательную область. Асимптота существует при любом V_{GAP} , имеющем физический смысл. Положение асимптоты описывается уравнением (14):

$$\gamma = \frac{V_{GAP}a_3 + V_{GAP}a_3a_6c_0}{c_0(a_1 + V_{GAP}a_3a_6 - V_{GAP}a_3a_5)} \quad (14).$$

Из приведенного анализа видно, что существует область значений параметра γ , в которой в редуцированной системе с GAPDH реакцией отсутствует стационарное состояние. Решая уравнение (14) относительно V_{GAP} , можно получить значение, которое имеет смысл предельно допустимой скорости притока GAP при данном γ , при котором еще

возможен стационар в GAPDH системе. Реальный приток GAP определяется скоростью верхней части гликолиза, которая лимитирована фосфофруктокиназной реакцией. Очевидно, что стационарное состояние в гликолизе будет наблюдаться, если реальная скорость втока GAP не превышает предельно допустимую. В случае же превышения, увеличиваются скорости накопления FDP, DAP и GAP, которые будут пропорциональны разности предельно допустимой и реальной скоростей накопления каждого из данных метаболитов. Эти явления иллюстрирует Рисунок 8.

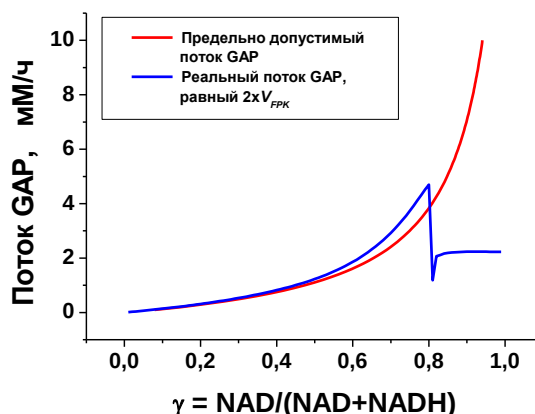


Рисунок 8. Сравнение величин реального и предельно допустимого потоков GAP в верхней части гликолиза при различных величинах γ . Реальный поток GAP (синяя кривая) получен при подстановке в уравнение V_{PFK} стационарных концентраций F6P, АТФ и АМФ, рассчитанных для полной модели гликолиза при определенных фиксированных концентрациях NAD. Скорость реального втока GAP рассчитана как удвоенная скорость PFK реакции, т.к. из одной молекулы FDP образуется 2 молекулы GAP. Предельно допустимый поток GAP (красная кривая) получен в результате решения уравнения (14) относительно V_{GAP} .

Потеря стационарного состояния гликолиза, сопровождающаяся накоплением ряда метаболитов, является фактором, приводящим к гибели ЭБР из-за осмотического стресса, возникающего, с одной стороны, при накоплении в клетке этих метаболитов, а с другой, из-за снижения скорости мембранных насосов при снижении концентрации АТФ. Исследования, проведенные с учетом регуляции объема эритроцита, показывают, что повышение концентрации метаболита во внутренней среде клетки на величину порядка 30-60 мМ приводит к увеличению его объема в 1.5-2.0 раза и, как следствие, к лизису эритроцита [Martinov M.V. et al., 2000; Protasov E.S. et al., 2019]. Из Рисунков 3а и 5 видно, что, если учесть, что накапливающийся метаболит в клетке не единственный, суммарно такие концентрации достигаются в исследуемой системе при потере стационарного

состояния за десятки часов. Соответственно, использование метаболической системы такой конфигурации в медицинских целях заведомо неприемлемо. Чтобы успешно использовать такие биореакторы, необходимо соблюдать ограничения на активность ферментов встраиваемой системы, чтобы не допускать потери стационарного состояния в гликолизе.

Сделанный вывод справедлив не только для этанол-утилизирующей системе, но и для любых встраиваемых ферментов, способных изменять стационарную концентрацию NAD (а, следовательно, соотношение $NAD/(NAD+NADH)$) в системе, вне зависимости от причин, вызывающих такое изменение. Этот вывод не мог быть сделан на основании ранее опубликованных моделей алкоцитов, которые не учитывали подробно связь встраиваемых реакций с реакциями эритроцитарного гликолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе работы была создана математическая модель эритроцита-биореактора, которая представляет собой систему 17 обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка, описывающих подробно реакции гликолиза в эритроците, реакции обоих встроенных ферментов, а также транспорт проникающих через мембрану эритроцита метаболитов.

Потеря стационарного состояния гликолиза является фактором, приводящим к гибели эритроцита-биореактора. Таким образом, чтобы успешно использовать предложенные биореакторы, необходимо соблюдать ограничения на активность ферментов встраиваемой системы. Сделанный вывод справедлив для всех встраиваемых ферментных систем, работающих с кофакторами NAD/NADH.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Alexandrovich Y.G et al. Rapid elimination of blood alcohol using erythrocytes: mathematical modeling and in vitro study. // BioMed Res International. 2017. P. 5849593
2. Gerber G. et al. Hexokinase of human erythrocytes: purification, kinetic model and its application to the conditions in the cell. // Eur. J. Biochem. 1974. Vol. 45. P. 39–52
3. 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. 1975. Vol. 156. P. 193–207
4. Martinov M.V. et al. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. // Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 2000. Vol. 1474. P. 75–87.
5. Naccache P & Sha'afi RI. Patterns of nonelectrolyte permeability in human red blood cell membrane. // J Gen Physiol. 1973. Vol. 62, № 6. P. 714-36.
6. Protasov E.S. et al. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood. // Sci Reports. 2019. Vol. 9. P. 1455
7. Ren S. et al. QSAR analysis of membrane permeability to organic compounds. // J Drug Target. 1996. Vol. 4, № 2. P. 103-7
8. Whillier S. et al. Glutamine and α -ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. // FEBS J. 2011. Vol. 278. P. 3152–63