

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
Per. N НИОКТР АААА-А17-117112420087-0
Per N ИКРБС



ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ УВЕЛИЧЕНИЯ АДАПТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ
ОРГАНИЗМА ПУТЕМ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ,
СОЗДАВАЕМЫХ В КЛЕТКАХ НАШЕГО ОРГАНИЗМА
(промежуточный, этап 1)

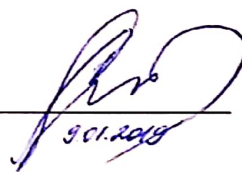
Руководитель НИР,
гл. научн. сотр., чл.-корр. РАН,
проф., д.б.н.

Ф.И. Атауллаханов

Москва 2019

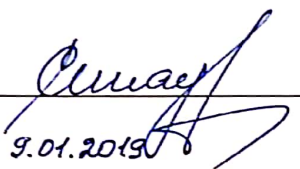
СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель НИР, гл. научн. сотр.,
чл.-корр. РАН, доктор биол. наук



Ф.И. Атауллаханов
(введение)

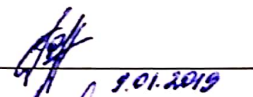
Отв. исполнитель, зав. лабораторией
доктор биол. наук



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


Исполнители:

Ст. научн. сотр., канд. биол. наук



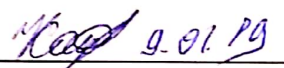
Н.А. Подошпелова
(раздел 1)

Научн. сотр.



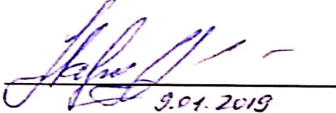
Д.В. Борсакова
(раздел 1)

Мл. научн. сотр.



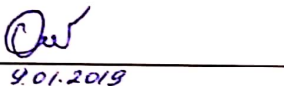
В.Н. Канева
(раздел 1)

Мл. научн. сотр.



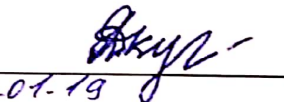
А.А. Мартгьянов
(раздел 2)

Мл. научн. сотр.



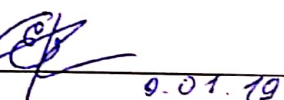
С.И. Обыденный
(раздел 2)

Мл. научн. сотр.



А.А. Якушева
(раздел 2)

Стажер-исслед.



Е.С. Протасов
(раздел 1, 2)

Аспирант



Е.А. Бовт
(раздел 2)

Аспирант



Л.Д. Колева
(раздел 1)

РЕФЕРАТ

Отчет 25 с., 1 кн., 6 рис., 3 табл., 15 источн.

ЭРИТРОЦИТ-БИОРЕАКТОР ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ЭТИЛОВОГО СПИРТА, МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА, АЦЕТАЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗА, ЭТАНОЛ, АЦЕТАЛЬДЕГИД, АЦЕТАТ, ГЛИКОЛИЗ, NAD, ПИРУВАТ

Объектом исследования было включение в эритроцит двух ферментов (алкогольдегидрогеназы (ADH) и ацетальдегиддегидрогеназы (ALDH)).

Цель работы - создание математической модели эритроцита-биореактора (ЭБР) для удаления этанола, и анализ с ее помощью лимитирующих факторов этого процесса.

Реакции гликолиза и встроенных ферментов описаны системой из 17 обыкновенных дифференциальных уравнений, решения которой были получены методом Рунге-Кутты 4-5 порядка в программе MATLAB.

В ходе работы получены следующие основные результаты:

- 1) Создана математическая модель ЭБР, содержащего ADH и ALDH.
- 2) Показано, что данная система ферментов способна удалять из среды этанол.
- 3) Показано, что при повышении активности включенных ферментов выше 60 ммоль/ч[×]Л_{эр}-тов происходит потеря стационарности в гликолизе: концентрации АТФ и NAD снижаются, тогда как концентрации таких промежуточных метаболитов гликолиза как FDP, DAP или GAP, наоборот, непрерывно повышаются.

- 4) Показано, что причиной потери стационарности в гликолизе является снижение уровня NAD ниже 0,04 мМ. Сделан вывод о том, что активность встраиваемых ферментов внутри эритроцита невозможно увеличивать выше определенного предела. При этом важную роль может играть приток в систему пирувата, который обеспечивает поддержание концентрации NAD на необходимом уровне.

Сделанный вывод о роли активностей встраиваемых ферментов в снижении стационарной концентрации NAD является общим для всех ферментов, работающих с кофакторами NAD/NADH. Подобный вывод не мог быть сделан в ранее опубликованной модели ЭБР, которая не содержала детального описания реакций гликолиза. Аналогов подобных моделей в работах зарубежных ученых не существует.

Дальнейшее направление работы – экспериментальная проверка правильности предложенной модели и разработка условий для получения наиболее эффективных ЭБР, удаляющих из крови этанол.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ	2
РЕФЕРАТ	3
СОДЕРЖАНИЕ	4
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
МОДЕЛЬ ЭРИТРОЦИТА-БИОРЕАКТОРА ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЭТИЛОВОГО СПИРТА, ВКЛЮЧАЮЩАЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗУ И АЦЕТАЛЬДЕГИЛДЕГИДРОГЕНАЗУ	9
1 Разработка математической модели эритроцита-биореактора, перерабатывающего этанол (алкоцита)	9
1.1 Основные свойства и предположения модели	9
1.2 Транспорт проникающих метаболитов через эритроцитарную мембрану	16
2 Анализ работы эритроцита-биореактора, содержащего и алкогольдегидрогеназу и ацетальдегиддегидрогеназу, с помощью созданной математической модели.....	18
2.1 Скорость утилизации этанола	18
2.2 Исследование лимитирующих факторов процесса работы биореактора	18
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	24

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящем отчете о НИР применяют следующие сокращения и обозначения:

ACALD – ацетальдегид

ALDH – ацетальдегиддегидрогеназа

АСТ – ацетат

ADH – алкогольдегидрогеназа

ADP – аденозиндифосфат

ALD – альдолаза

Алкоцит – эритроцит-биореактор, утилизирующий этанол

AMP - аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

DAP – дигидроксиацетонфосфат

1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат

2,3-DPG – 2,3 дифосфоглицерат

ENO - енолаза

ETH – этанол

FDP – фруктозо-1,6-дифосфат

F6P – фруктозо-6-фосфат

GAP – глицеральдегидфосфат

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

GLC – глюкоза

GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза

G6P – глюкозо-6-фосфат

HK – гексокиназа

LAC – лактат

LDH – лактатдегидрогеназа

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

ОДУ – обыкновенные дифференциальные уравнения

PEP – фосфоенолпируват

PFK - фосфофруктокиназа

2- PG – 2-фосфоглицерат

3-PG – 3-фосфоглицерат

PGK – фосфоглицераткиназа

PGM – фосфоглицератмутаза

PK – пируваткиназа

PO₄ – ион неорганического фосфата

PYR – пируват

TP1 – триозофосфатизомераза

ЭБР – эритроцит-биореактор

ВВЕДЕНИЕ

При многих патологических состояниях в организме происходит нарушение метаболического контроля. Адаптивных способностей организма может не хватить, чтобы справиться с таким состоянием. Одним из способов помочь организму может быть введение недостающих метаболитов или целых метаболических систем, способных вернуть метаболизм в нормальное состояние. Однако прямое введение необходимых ферментов в кровотоки не может полностью решить проблему, т.к. введенные ферменты (чужеродные белки), с одной стороны, быстро выводятся из организма, а с другой, часто вызывают сильный иммунологический ответ и аллергические реакции (вплоть до шока, комы и летального исхода). Одним из возможных путей борьбы с такими нежелательными последствиями является введение необходимых ферментов в организм внутри эритроцитов-носителей [1]-[3]. Это позволяет защитить их от воздействия иммунной системы организма, а также протеаз плазмы. В результате продолжительность жизни фермента в кровотоке должна сильно увеличиться, а иммунологические реакции организма на его введение сильно снижаются, т.к. фермент спрятан внутри собственных клеток организма [4].

Несмотря на привлекательность такой стратегии, успешное ее применение ограничено многими факторами. Субстраты (и продукты) ферментативной реакции должны проходить через эритроцитарную мембрану, а его активность внутри клеток должна быть достаточной для обеспечения нужной физиологической функции. Однако систематические исследования лимитирующих факторов работы таких эритроцитов-биореакторов (ЭБР) до настоящего времени практически не проводились. Помочь в этом могут математические модели ЭБР, которые правильно описывают не только реакции встроенных в эритроцит ферментов, но и функционирование основной энергопроизводящей системы эритроцита – гликолиза, в присутствии данных ферментов в клетке.

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

В качестве моделируемого метаболического пути на первом этапе работы была выбрана система для удаления из организма этилового спирта и продукта его окисления, являющегося основным токсичным метаболитом при переработке спирта в организме, – ацетальдегида [5].

Актуальность такой задачи определяется тем, что алкоголизм является настоящим бичом современного общества. По данным Всемирной Организации Здравоохранения

суммарное потребление алкоголя на 7.1 миллиарда человек (включая младенцев) составляет около 40.5 миллиарда литров в год, или в среднем около 15.6 мл на человека в день [6]. Однако способы борьбы с высокой алкогольной интоксикацией до сих пор до конца не отработаны.

К настоящему времени опубликованы результаты небольшого количества работ, в которых в эритроциты вводили фермент перерабатывающий этанол (алкогольдегидрогеназу, ADH) и фермент для переработки продукта окисления этанола – ацетальдегида (ацетальдегиддегидрогеназу, ALDH) [7]-[9]. В этих исследованиях не было получено высокоэффективных ЭБР, несмотря на то, что активности включенных в эритроциты ферментов были достаточно высоки. В работе нашей группы [10] также было проведено совместное включение в эритроциты ADH и ALDH. В этом исследовании впервые была сделана попытка проанализировать работу данной системы ферментов в эритроците теоретически с помощью математической модели, и выявить лимитирующие стадии процесса. Недостатком данной математической модели было то, что в ней реакции гликолиза в эритроците не были представлены детально. Связь включенной системы ферментов с эритроцитарным гликолизом была представлена только одной реакцией – реакцией постоянного втока пирувата (продукта гликолиза) в общую систему. При этом, поскольку скорость втока пирувата полагали всегда постоянной, невозможно было определить, как активность встроенной системы ферментов влияет на протекание гликолиза в данных ЭБР. Несмотря на это, в работе было показано экспериментально, что одним из лимитирующих метаболитов в данных ЭБР, по-видимому, является концентрация NAD.

Таким образом, задачей первого этапа настоящей работы было разработать детальную математическую модель ЭБР с включенными ферментами ADH и ALDH для убираия из крови пациентов спирта и ацетальдегида, и провести теоретическое исследование условий, необходимых для эффективного функционирования такого биореактора (определить лимитирующие стадии процесса).

МОДЕЛЬ ЭРИТРОЦИТА-БИОРЕАКТОРА ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ ЭТИЛОВОГО СПИРТА, ВКЛЮЧАЮЩАЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗУ И АЦЕТАЛЬДЕГИЛДЕГИДРОГЕНАЗУ

1 Разработка математической модели эритроцита-биореактора, перерабатывающего этанол (алкоцита)

1.1 Основные свойства и предположения модели

В качестве основы модели эритроцита-биореактора была использована модель гликолиза в эритроците, разработанная в работе [11]. Для переработки этанола в крови в эритроциты предполагается встроить систему из двух ферментов - алкогольдегидрогеназы (ADH, реакция (1)) и ацетальдегиддегидрогеназы (ALDH, реакция (2)):



где ETH – этанол,

ACALD – ацетальдегид,

ACT – ацетат,

NAD и NADH – окисленная и восстановленная форма, соответственно, никотинамиладениндинуклеотида.

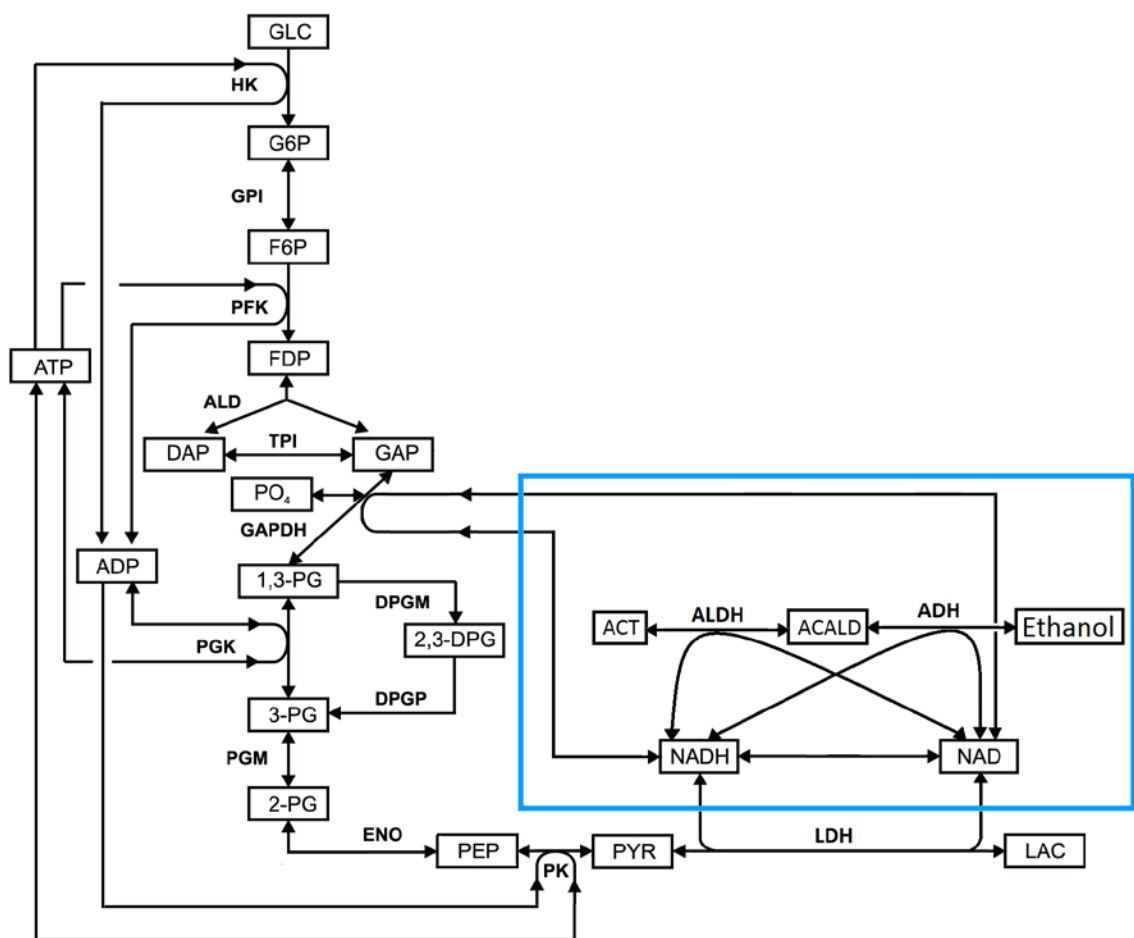
Полная схемы реакций, участвующих в описании гликолиза и системы встроенных ферментов представлена на рисунке 1 (в голубой рамке приведены встроенные в эритроцит реакции ADH и ALDH).

При построении модели ЭБР, исходная модель гликолиза из работы [11] была несколько модифицирована. Были сделаны следующие предположения:

1) Скорость гексокиназной реакции считали независимой от концентрации глюкозы, т.к. величина константы Михаэлиса (K_M) гексокиназы для глюкозы практически в 10 раз ниже, чем физиологическая концентрация глюкозы в крови [11],[12].

2) Мембрану эритроцита считали непроницаемой для всех метаболитов кроме лактата, пирувата, этанола, ацетальдегида и ацетата [13]-[15].

3) Скорость транспорта лактата и пирувата через мембрану эритроцита полагали прямо пропорциональной градиенту концентрации каждого из этих метаболитов, т.к. это



Использованы следующие сокращения: GLC – глюкоза; G6P – глюкозо-6-фосфат; F6P – фруктозо-6-фосфат; FDP – фруктозо-1,6-дифосфат; DAP - дигидроксиацетонфосфат; GAP - глицеральдегидфосфат; 1,3-DPG – 1,3-дифосфоглицерат; 2,3-DPG – 2,3-дифосфоглицерат; 3-PG – 3-фосфоглицерат; 2-PG – 2-фосфоглицерат; PEP - фосфоенолпируват; PYR - пируват; LAC - лактат; NAD – никотинамидадениндинуклеотид; GLU – глутаминовая кислота; ATP - аденозинтрифосфат; ADP – аденозиндифосфат; PO₄ – анион неорганического фосфата; ACT – ацетат; ACALD - ацетальдегид; HK - гексокиназа; GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза; PFK – фосфофруктокиназа; ALD - альдолаза; TPI – триозофосфатизомераза; GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; PGK – фосфоглицераткиназа; PGM – фосфоглицератмутаса; ENO - энোлаза; PK – пируваткиназа; LDH – лактатдегидрогеназа; ADH - алкогольдегидрогеназа; ALDH – ацетальдегиддегидрогеназа.

Рисунок 1 - Реакции гликолиза и встроенных ферментов (ADH + ALDH) в эритроците

обеспечивало хорошее приближение к описанию этого транспорта, рассчитанного по точным кинетическим механизмам [13]. Транспорт этанола, ацетальдегида и ацетата

считали достаточно быстрым, чтобы их концентрации в плазме и клетках оставались в равновесии в любой момент времени [14],[15].

4) Модель не включала уравнений, описывающих трансмембранный потенциал.

5) Пулы аденилатов и никотинамидадениндинуклеотидов считали постоянными, т.к. при нормальных физиологических условиях величины этих пулов изменяются очень медленно по сравнению с временами наблюдения.

6) Объем эритроцита считали постоянным.

Модель состояла из 17 обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) первого порядка. Численные решения были получены с помощью метода Рунге-Кутты 4-5 порядка в Программе MATLAB. Были рассчитаны кинетики изменения концентрации метаболитов внутри эритроцита, а также скорости переработки этанола в биореакторе. Внешние концентрации пирувата и лактата полагали постоянными, равными их нормальным физиологическим значениям (0,07 и 1,2 мМ для PYR и LAC, соответственно).

Полная система дифференциальных уравнений приведена в таблице 1. Уравнения для скоростей реакций, а также соответствующие кинетические константы приведены в таблице 2.

Таблица 1 - Система дифференциальных уравнений модели для отдельных метаболитов

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

Продолжение таблицы 1

2,3- дифосфоглицерат (2,3DPG)	$\frac{d[2,3DPG]}{dt} = V_{DPGM} - V_{DPGP}$
3- фосфоглицерат (3PG)	$\frac{d[3PG]}{dt} = V_{PGK} + V_{DPGP} - V_{PGM}$
2-фосфоглицерат (2PG)	$\frac{d[2PG]}{dt} = V_{PGM} - V_{ENO}$
Фосфоенолпируват (PEP)	$\frac{d[PEP]}{dt} = V_{ENO} - V_{PK}$
Пируват (PYR)	$\frac{d[PYR]}{dt} = V_{PK} - V_{LDH}$
Лактат (LAC)	$\frac{d[LAC]}{dt} = V_{LDH} - V_{diffLAC}$
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD)	$\frac{d[NAD]}{dt} = V_{LDH} - V_{GAPDH} - V_{ADH} - V_{ALDH}$
Этанол (ETH)	$\frac{d[ETH]}{dt} = -V_{ADH}$
Ацетальдегид (ACALD)	$\frac{d[ACALD]}{dt} = V_{ADH} - V_{ALDH}$
Ацетат (ACT)	$\frac{d[ACT]}{dt} = V_{ALDH}$

Таблица 2 - Уравнения скоростей и константы ферментативных реакций

<p><u>Гексокиназа</u></p> $V_{HK} = a_{HK} \frac{[ATP]/K_{HK}^1}{1 + [ATP]/K_{HK}^1 + [G6P]/K_{HK}^2}$ $a_{HK} = 12 \frac{mM}{h}, K_{HK}^1 = 1mM, K_{HK}^2 = 5.5 \cdot 10^{-3} mM$
<p><u>Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа</u></p> $V_{GPI} = a_{GPI} \frac{([G6P] - [F6P]K_{GPI}^1)/K_{GPI}^2}{1 + [G6P]/K_{GPI}^2 + [F6P]/K_{GPI}^3}$ $a_{GPI} = 360 \frac{mM}{h}, K_{GPI}^1 = 3mM, K_{GPI}^2 = 0.3mM, K_{GPI}^3 = 0.2mM$

Продолжение таблицы 2

Фософофруктокиназа

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

$$a_{PFK} = 380 \frac{mM}{h}, K_{PFK}^1 = 0.1mM, K_{PFK}^2 = 2mM, K_{PFK}^3 = 0.01mM, K_{PFK}^4 = 0.195mM, K_{PFK}^5 = 3.7 \cdot 10^{-4} mM$$

Альдолаза

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

$$a_{ALD} = 76 \frac{mM}{h}, K_{ALD}^1 = 2 \cdot 10^{-4} mM, K_{ALD}^2 = 1.2 \cdot 10^{-5} mM^2, K_{ALD}^3 = 0.01mM, K_{ALD}^4 = 0.032mM, K_{ALD}^5 = 2.1 \cdot 10^{-3} mM, K_{ALD}^6 = 2mM, K_{ALD}^7 = 0.065mM$$

Триозофосфатизомераза

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

$$a_{TPI} = 3000 \frac{mM}{h}, K_{TPI}^1 = 0.82mM, K_{TPI}^2 = 0.45mM, K_{TPI}^3 = 0.43mM$$

Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

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

$$a_{GAPDH} = 690 \frac{mM}{h}, K_{GAPDH}^1 = 0.13mM, K_{GAPDH}^2 = 0.13mM, K_{GAPDH}^3 = 3.4mM, K_{GAPDH}^4 = 0.136mM, K_{GAPDH}^5 = 0.013mM, K_{GAPDH}^6 = 2 \cdot 10^{-3} mM$$

Продолжение таблицы 2

Фосфоглицераткиназа

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

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

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

$$a_{PGK} = 7330 \frac{mM}{h}, K_{PGK}^1 = 2.2 \cdot 10^{-3} mM, K_{PGK}^2 = 0.14 mM, K_{PGK}^3 = 380 mM,$$

$$K_{PGK}^4 = 0.3 mM, K_{PGK}^5 = 0.27 mM, K_{PGK}^6 = 1.4 mM, K_{PGK}^7 = 0.4 mM$$

Дифосфоглицератмутаза

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

$$a_{DPGM} = 3892 \frac{mM}{h}, K_{DPGM}^1 = 0.04 mM, K_{DPGM}^2 = 0.013 mM$$

Дифосфоглицератфосфатаза

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

$$a_{DPGP} = 0.65 \frac{mM}{h}, K_{DPGP}^1 = 0.02 mM, K_{DPGP}^2 = 6 \cdot 10^{-3} mM$$

Фосфоглицератмутаза

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

$$a_{PGM} = 1100 \frac{mM}{h}, K_{PGM}^1 = 0.27 mM, K_{PGM}^2 = 0.24 mM, K_{PGM}^3 = 0.02 mM$$

Енолаза

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

$$a_{ENO} = 83 \frac{mM}{h}, K_{ENO}^1 = 0.056 mM, K_{ENO}^2 = 6.7 mM, K_{ENO}^3 = 2 \cdot 10^{-3} mM$$

Продолжение таблицы 2

Пируваткиназа

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

$$a_{PK} = 120 \frac{mM}{h}, K_{PK}^1 = 0.05mM, K_{PK}^2 = 0.43mM, K_{PK}^3 = 0.35mM$$

Лактатдегидрогеназа

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

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

$$a_{LDH} = 550 \frac{mM}{h}, K_{LDH}^1 = 0.022mM, K_{LDH}^2 = 7 \cdot 10^{-3}, mM, K_{LDH}^3 = 426mM,$$

$$K_{LDH}^4 = 0.14mM, K_{LDH}^5 = 380mM, K_{LDH}^6 = 0.1mM, K_{LDH}^7 = 170mM$$

Na-K-ATФаза

$$V_{NaKATP} = a_{NaKATP} [Na^+][ATP]$$

$$a_{NaKATP} = 0.045 \frac{mM}{h}$$

Приближение всех остальных энергопотребляющих процессов

$$V_{ATP} = a_{ATP} \frac{[ATP]}{[ATP] + K_{ATP}}$$

$$a_{ATP} = 1.6 \frac{mM}{h}, K_{ATP} = 1mM$$

Ацетальдегиддегидрогеназа

$$V_{ALDH} = \frac{[NAD][ACALD]}{([NAD][ACALD] + K_{ALDH}^3 [NAD] + K_{ALDH}^1 [ACALD] + K_{ALDH}^2 K_{ALDH}^3) \left(1 + \frac{[NADH]}{K_{ALDH}^4}\right)}$$

$$K_{ALDH}^1 = 0.02 mM, K_{ALDH}^2 = 0.07 mM, K_{ALDH}^3 = 0.009 mM, K_{ALDH}^4 = 0.1 mM$$

Продолжение таблицы 2

Алкогольдегидрогеназа

$$V_{ADH} = \frac{[NAD][ETH] - \frac{[ACALD][NADH]}{K_{ADH}^{#9}}}{D_{ADH}}$$

$$D_{ADH} = K_{ADH}^2 K_{ADH}^3 + K_{ADH}^3 [NAD] + K_{ADH}^1 [ETH] + [NAD][ETH] + \frac{K_{ADH}^2 K_{ADH}^3}{K_{ADH}^8} [NADH] + \frac{K_{ADH}^2 K_{ADH}^3 K_{ADH}^7}{K_{ADH}^5 K_{ADH}^8} [ACALD] + \frac{K_{ADH}^2 K_{ADH}^3}{K_{ADH}^5 K_{ADH}^8} [ACALD][NADH] + \frac{K_{ADH}^3 K_{ADH}^7}{K_{ADH}^5 K_{ADH}^8} [ACALD][NAD] + \frac{K_{ADH}^1}{K_{ADH}^8} [ETH][NADH] + \frac{[ACALD][ETH][NAD]}{K_{ADH}^6} + \frac{K_{ADH}^2 K_{ADH}^3}{K_{ADH}^4 K_{ADH}^5 K_{ADH}^8} [ACALD][ETH][NADH]$$

$$K_{ADH}^1 = 0.074 \text{ mM}, K_{ADH}^2 = 0.61 \text{ mM}, K_{ADH}^3 = 13 \text{ mM}, K_{ADH}^4 = 0.43 \text{ mM},$$

$$K_{ADH}^5 = 0.78 \text{ mM}, K_{ADH}^6 = 0.67 \text{ mM}, K_{ADH}^7 = 0.11 \text{ mM}, K_{ADH}^8 = 0.018 \text{ mM}$$

*) Данные, касающиеся гликолиза и процессов энергопотребления взяты из работы [11]

1.2 Транспорт проникающих метаболитов через эритроцитарную мембрану

Транспорт лактата и пирувата был описан упрощенно с помощью линейных уравнений вида (3):

$$V_{\text{транспорт } A} = K_p^A \times ([A]_{\text{внутри}} - [A]_{\text{снаружи}}) \quad (3),$$

где $V_{\text{транспорт } A}$ – скорость транспорта метаболита А,

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

K_p^A – коэффициент проницаемости мембраны эритроцита для данного метаболита. Величины K_p^A были оценены из данных литературы [13] и были приняты равными 51.8 и 7.8 ч⁻¹ для PYR и LAC, соответственно. Величины внутриклеточных концентраций, использованные как начальные условия для расчета в модели, приведены в таблице 3 (концентрация добавленного этанола в расчетах принималась равной 10 мМ). Все внутриклеточные концентрации рассчитаны на 1 л эритроцитов.

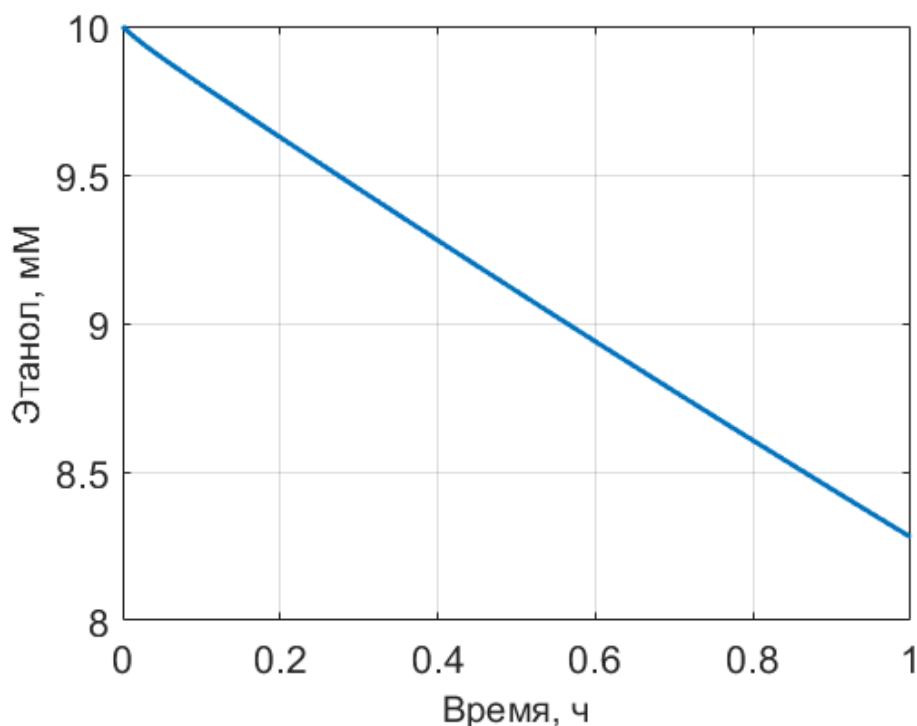
Таблица 3 – Внутриклеточные концентрации метаболитов, использованные как начальные условия для решения системы ОДУ в модели

Метаболит	Концентрация, мМ/Лэр-тов	Метаболит	Концентрация, мМ/Лэр-тов
G6P	0.073	LAC	1.2
F6P	0.024	NAD	0.048
FDP	0.0075	NADH	0.002
DAP	0.032	PO ₄ ⁻³	1.0
GAP	0.14	ATP	1.47
1,3-DPG	7.34×10 ⁻⁴	ADP	0.23
2,3-DPG	4.57	AMP	0.04
3PG	0.045	ETH	10
2PG	0.011	ACALD	0
PEP	0.0098	ACT	0
PYR	0.07		

2 Анализ работы эритроцита-биореактора, содержащего алкогольдегидрогеназу и ацетальдегиддегидрогеназу, с помощью созданной математической модели

2.1 Скорость утилизации этанола

Расчеты с использованием предложенной модели алкоцита показали, что данные ЭБР способны утилизировать этанол. Скорость, такой утилизации, рассчитанная при одинаковых активностях АДН и АЛДН равных $60 \text{ мМ/ч} \times \text{Л}_{\text{эр-тов}}$ (что соответствует активностям этих ферментов внутри клетки равным $1 \text{ МЕ/мл}_{\text{эр-тов}}$) и исходной концентрации этанола в крови 10 мМ была равна примерно $1.7 \text{ мМ/ч} \times \text{Л}_{\text{эр-тов}}$ (рисунок 2).



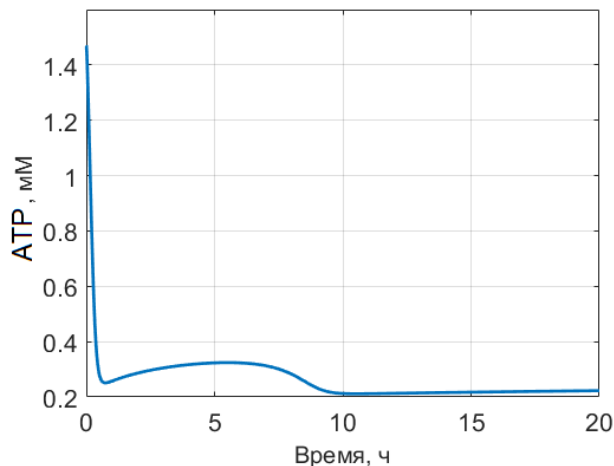
Активности АДН и АЛДН, использованные при расчете, были одинаковы и составляли $60 \text{ ммоль/ч} \times \text{л}_{\text{эр-тов}}$, что соответствует $1 \text{ МЕ/мл}_{\text{эр-тов}}$.

Рисунок 2 - Рассчитанная с помощью математической модели кинетика убыли этанола в эритроцитах-биореакторах, включающих АДН и АЛДН

2.2 Исследование лимитирующих факторов процесса работы биореактора

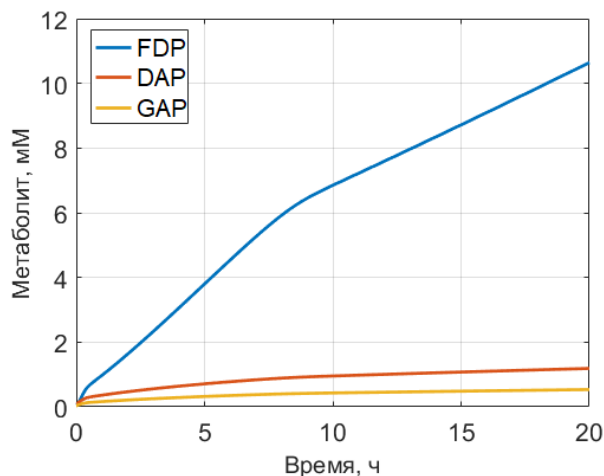
Исследование с помощью созданной математической модели факторов, лимитирующих работу ЭБР, показало, что увеличение активностей встраиваемых ферментов выше $60 \text{ ммоль/ч} \times \text{л}_{\text{эр-тов}}$ приводит к замедлению работы гликолиза из-за

слишком сильного снижения концентрации NAD, что, в свою очередь, приводит к падению уровня АТФ (рисунок 3) и постоянному накоплению в клетке ряда промежуточных метаболитов гликолиза (фруктозо-1,6-дифосфата (FDP), дигидроксиацетонфосфата (DAP), глицеральдегидфосфата (GAP)) (рисунок 4).



Активности ADH и ALDH, использованные при расчете, были одинаковы и составляли 2 МЕ/(млЭр-тов) (т.е. 120 ммоль/ч×Лэр-тов).

Рисунок 3 - Падение концентрации АТФ в клетке при высокой активности ферментов системы, утилизирующей этанол

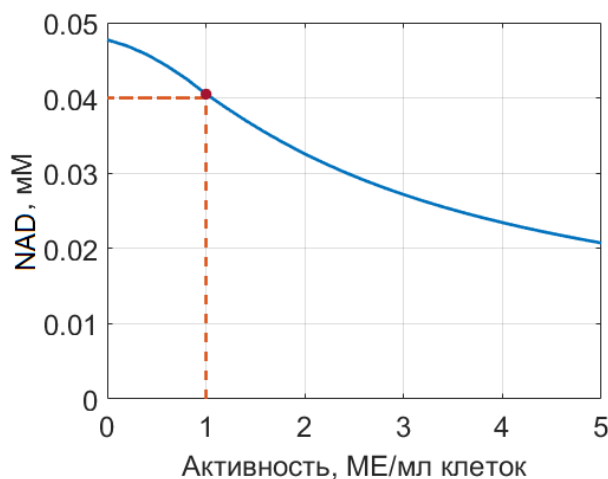


Активности ADH и ALDH были одинаковы и составляли 2 МЕ/млЭр-тов (т.е. 120 ммоль/ч×Лэр-тов). FDP – фруктозо-1,6-дифосфат, DAP - дигидроксиацетонфосфат, GAP – глицеральдегидфосфат.

Рисунок 4 - Постоянное накопление промежуточных метаболитов гликолиза при высокой активности системы, утилизирующей этанол

Таким образом, при увеличении активностей встроенных ферментов выше некоторого предела гликолиз теряет стационарность. Поскольку единственный метаболит, используемый одновременно в гликолизе и встроенных реакциях утилизации этанола – это NAD, сделано предположение, что именно снижение уровня NAD приводит к потере стационарного состояния в гликолизе.

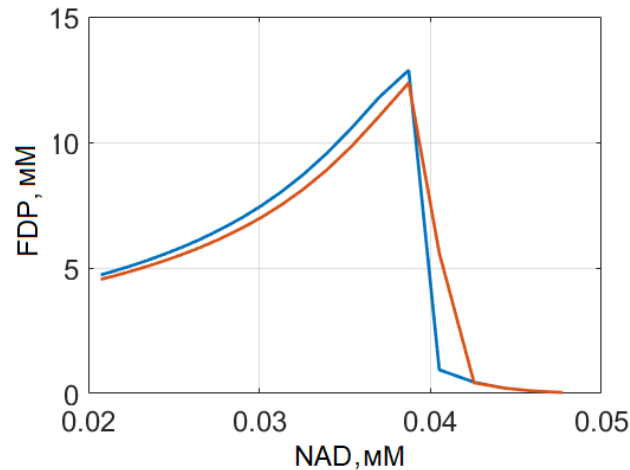
Это предположение было подтверждено путем расчета стационарных концентраций NAD в исследуемой системе при повышении активностей встраиваемых ферментов, и определения уровня стационарной концентрации NAD, выше которого теряется стационарность гликолиза (начинают непрерывно накапливаться или падать концентрации различных участников системы). Величина этой концентрации NAD в наших условиях оказалась равна 0,04 мМ (рисунок 5).



Активности обоих встроенных ферментов принимали равными. Пунктиром отмечена активность и соответствующая стационарная концентрация NAD, выше которой гликолиз теряет стационарность.

Рисунок 5 - Рассчитанная зависимость стационарной концентрации NAD в клетке от активностей включенных ферментов, утилизирующих этанол

Показано также (на примере FDP), что модель в принципе правильно описывает изменения концентраций промежуточных метаболитов гликолиза при изменении активностей встроенных ферментов. Зависимости концентрации FDP через 15 часов после начала работы системы от стационарной концентрации NAD, рассчитанные для искусственно задаваемых в модели стационарных концентрациях NAD (синяя кривая), и стационарных концентраций NAD, достигаемых в модели при одинаковых начальных условиях, но различных активностях встроенных ферментов (красная кривая), хорошо совпадали (рисунок 6).



Синяя кривая соответствует зависимости, полученной, когда выбранная стационарная концентрация NAD задавалась вручную и считалась постоянной, после чего было рассчитано какого значения достигала концентрация FDP в системе после 15 часов работы; красная кривая – концентрация FDP, достигаемая после 15 часов работы системы, при стационарных концентрациях NAD, рассчитанных с помощью модели, исходя из одинаковых начальных условий, для разных активностей встраиваемых ферментов (ADH и ALDH)

Рисунок 6 - Концентрации FDP, достигаемые в эритроците через 15 часов после начала работы системы, от стационарной концентрации NAD в клетке

Вывод о том, что стационарная концентрация NAD является еще одним лимитирующим звеном работы биореакторов, включающих ферменты, работающие с участием кофакторов NAD/NADH, является общим и очень важным. Он показывает, что активности встроенных ферментов невозможно увеличивать выше определенного предела (пока не достигается стационарная концентрация NAD ~0.04 мМ, когда гликолиз перестает быть стационарным). Подобный вывод не мог быть сделан в ранее опубликованной модели биореактора, утилизирующего этанол [10], т.к., как было сказано выше, в ней отсутствовало подробное описание гликолиза, а вток в систему пирувата принудительно полагали постоянным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1. Создана математическая модель биореактора, предназначенного для удаления из кровотока этилового спирта и токсичного продукта его окисления – ацетальдегида, на основе двух включенных в эритроцит ферментов – ADH и ALDH. Модель включает детальное описание реакций эритроцитарного гликолиза, а также реакций встроенной ферментной системы (всего 17 ОДУ).

2. Проведенный с помощью этой модели анализ работы данного ЭБР показал:

- предложенная система способна утилизировать этанол в физиологических условиях;

- при повышении активности включенных в эритроцит ферментов происходит потеря стационарности гликолиза: концентрации ATP и NAD падают, в то время как концентрации некоторых других метаболитов, таких как FDP, DAP и GAP постепенно и неуклонно возрастают;

- причиной срыва стационарности в гликолизе при повышении активностей встроенных в эритроцит ферментов является снижение концентрации NAD в эритроците ниже 0.04 мМ, т.к. именно этот метаболит связывает гликолиз и встроенную ферментную систему.

3. На основании анализа, проведенного с помощью математической модели алкоцита можно полагать, что лимитирующими факторами работы этого биореактора являются, с одной стороны, активность включенных ферментов и связанная с этой активностью стационарная концентрация NAD в системе, а с другой - скорость, с которой в систему поступает пируват (как из гликолиза, так и из других источников в организме). Пируват в процессе восстановления окисляет NADH до NAD, обеспечивая тем самым поддержание уровня этого метаболита, необходимого для стационарного протекания гликолиза. Поскольку, как было показано, стационарная концентрация NAD в ЭБР зависит от активностей встроенных ферментов, можно полагать, что для каждого из ферментов, работающих с кофакторами NAD/NADH должны существовать оптимальные области активностей для включения в эритроцит.

Принцип анализа работы ЭБР с помощью математических моделей и полученные выводы важны для исследования не только эритроцитов-биореакторов, утилизирующих этанол. Они справедливы для всех встроенных ферментов, работающих с кофакторами NAD/NADH. Данные выводы не могли быть получены на основании ранее опубликованной модели, которая не включала детального описания гликолиза в эритроците. Дальнейшее направление работы должно быть связано с экспериментальной проверкой правильности предложенной математической модели и разработкой условий для получения наиболее эффективных алкоцитов.

Аналогов подобных моделей в работах зарубежных ученых не существует.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Magnani M., Rossi L. Approaches to erythrocyte-mediated drug delivery // *Expert Opin. Drug Deliv.* -2014. -V. 11 –N 5. – p. 677–687.
2. Zarrin A., Foroozesh M., Hamidi M. Carrier erythrocytes: recent advances, present status, current trends and future horizons // *Expert Opin. Drug Deliv.* -2014. –V 11. – N 3. - p. 433–447.
3. Godfrin, Y, Horand F., Franco, R., Dufour E., Kosenko E., Bax B.E., Banz A., Skorokhod O.A., Lanao J.M., Vitvitsky V., Sinauridze E., Bourgeaux V., Gunter K.C. Meeting highlights: international seminar on the red blood cells as vehicles for drugs // *Expert Opin. Biol. Ther.* -2012. – V 12. - N 1.– p. 127–133.
4. Bourgeaux V., Lanao J.M., Bax B.E., Godfrin Y. Drug-loaded erythrocytes: on the road toward marketing approval // *Drug Des. Devel. Ther.* -2016 (11 February). – V 10. – p. 665–676.
5. Edenberg H.J. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants // *Alcohol Res Health* -2007. – V 30. – N 1. – p. 5–13.
6. World Health Organization, Global status report on alcohol and health. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, ISBN 978 92 4 069276 3, 100 pp., Luxembourg, 2014. URL: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msb_gsr_2014_1.pdf?ua=1 (дата обращения 10.01.2019).
7. Lizano C., Sanz S., J. Luque J., M. Pinilla M. In vitro study of alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase encapsulated into human erythrocytes by an electroporation procedure // *Biochim. Biophys. Acta.* -1998. -V 1425. – N 2. p. 328–336.
8. C. Lizano, M. T. Perez, and M. Pinilla, “Mouse erythrocytes as carriers for coencapsulated alcohol and aldehyde dehydrogenase obtained by electroporation *in vivo* survival rate in circulation, organ distribution and ethanol degradation // *Life Sci.*-2001. – V 68. – N 17. - p. 2001–2016.
9. Kaminsky Y.G., Kosenko E.A., Alexandrovich Y.G., Ataulakhanov F.I. Experiments on alcocytes containing enzyme nanoparticles for reducing toxic blood concentration of ethanol // *Bull. Exper. Biol. Med.* - 2012. - V 153. – N 1. - p. 170–172.
10. Alexandrovich Y.G., Kosenko E.A., Sinauridze E.I., Obydennyi S.I., Kireev I.I., Ataulakhanov F.I., Kaminsky Y.G. Rapid elimination of blood alcohol using erythrocytes:

mathematical modeling and in vitro study. BioMed Res International 2017, 5849593, 14 pages.
URL: <https://doi.org/10.1155/2017/5849593> (дата обращения 10.01.2019).

11. Martinov M.V., Plotnikov A.G., Vitvitsky V.M., Ataullakhanov F.I. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. – 2000. – V 1474. – N 1. - p. 75–87.

12. Gerber G., Preissler H., Heinrich R., Rapoport S.M. Hexokinase of human erythrocytes: purification, kinetic model and its application to the conditions in the cell. Eur. J. Biochem. -1974. – V 45. –N 1. - p. 39–52.

13. Halestrap A.P. Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes. Evidence for the involvement of the chloride carrier and a chloride-independent carrier. Biochem. J. – 1976. – V 156. – N 2. –p 193–207.

14. Naccache P., Sha'afi R.I. Patterns of Nonelectrolyte Permeability in Human Red Blood Cell Membrane. J. Gen. Physiol. -1973. - V 62. – N 6. – p. 714-736.

15. Ren S., Das A., Lien E.J. QSAR analysis of membrane permeability to organic compounds. J. Drug Target. – 1996. – V 4. – N 2. – p. 103-107.

Дополнительные сведения

В работе принимали участие всего 11 сотрудников, из них:

член-корреспондентов РАН	- 1
докторов наук	- 2
кандидатов наук	- 1
молодых ученых (до 29 лет включительно)	- 7

Результаты работы были опубликованы в следующих статьях:

1. Борсакова Д.В., Плахотник М.Е., Колева Л.Д., Бовт Е.А., Александрович Ю.Г., Синауридзе Е.И., Атауллаханов Ф.И.. Сравнительные методологические исследования включения L-аспарагиназы в эритроциты. Онкогематология, 2018; 13(3):91-101.
2. Protasov E.S., Vorsakova D.V., Alexandrovich Y.G., Korotkov A.V., Kosenko E.A., Butylin A.A., Ataullakhanov F.I., Sinauridze E.I. Erythrocytes as bioreactors to decrease excess ammonium concentration in blood. Sci Reports, 2019 (принято в печать). DOI: 10.1038/s41598-018-37828-5.
3. Кабанкин А.С., Синауридзе Е.И., Липец Е.Н., Атауллаханов Ф.И. Компьютерный дизайн низкомолекулярных ингибиторов факторов системы свертывания крови. Биохимия (Москва), 2019 (принято в печать). DOI: 10.1134/S0320972519020039.