

УДК: 577

Стехиометрическое моделирование транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы

Шадрин К.В.^{*1,2}, Пахомова В.Г.^{1}, Рупенко А.П.¹, Крюкова О.В.¹,
Хлебопрос Р.Г.^{1,3,4}**

¹*Красноярский научный центр СО РАН, Красноярск, Россия*

²*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения Российской Федерации, Красноярск, Россия*

³*Сибирский федеральный университет (СФУ), Красноярск, Россия*

⁴*Институт биофизики СО РАН, Красноярск, Россия*

Аннотация. Использование методов стехиометрического моделирования для описания метаболических процессов позволяет анализировать особенности обмена веществ, как клеточных популяций, так и целостных изолированных органов. В данной работе метод стехиометрического моделирования Flux Balance Analysis использован для того, чтобы выявить особенности транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы в условиях нормального и недостаточного снабжения кислородом. Показано, что потребление кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени связано с затратами энергии.

Ключевые слова: *стехиометрическое моделирование транспорт кислорода, перфузия, гипоксия.*

ВВЕДЕНИЕ

Для математического описания метаболических процессов используют методы стехиометрического моделирования (Metabolic Flux Analysis (MFA), Flux Balance Analysis (FBA), Metabolic Pathway Analysis (MPA)) [6, 12–14, 20, 22–25, 30, 33, 36]. Модели, построенные с использованием этих методов, применяют для анализа метаболизма как отдельных клеток млекопитающих (эритроцитов [29], эмбриональных [32] и опухолевых клеток [21]), так и изолированных органов [23–25]. Такие модели позволяют выявлять особенности протекания метаболических процессов, опираясь только на стехиометрию биохимических реакций в исследуемых живых объектах.

Большой интерес представляет исследование метаболизма печени с помощью стехиометрических моделей. Так, например, Orman et al. с использованием MFA и MPA исследовали особенности метаболизма печени крысы после обширных ожогов кожи спины, полученных животным [24], а также оценивали степень влияния ожогов на субстратные циклы в печени [22]. Кроме того, Orman et al., используя MPA, определяли влияние оксигенации перфузионной среды и наличия в ней переносчиков кислорода (эритроцитов) на скорость потребления кислорода изолированной перфузируемой печенью [25].

*kvsh_buffon@mail.ru

**vgpakhomova@mail.ru

Метод перфузии изолированных органов позволяет проводить исследования метаболизма в условиях отсутствия интегрирующего влияния организма, что делает возможным создание адекватных экспериментальных и математических моделей органного обмена веществ [3, 9].

Изолированная перфузируемая печень в условиях искусственного гомеостаза обладает особенностью: помимо транспорта кислорода в клетки из сосудистого русла, также он поступает в печень непосредственно через поверхность органа из окружающей печень воздушной среды. В работах Нефедова и Рупенко [7, 10] было показано, что диффузия растворенного в перфузионной среде кислорода из капилляров кровяного русла в клетки печени является не единственным способом его доставки в изолированный перфузируемый орган. Сходный процесс, связанный с транспортом глюкозы, был обнаружен в энтероцитах. Так, для них транспорт глюкозы внутрь клеток зависел от степени оксигенации не только базолатеральной, но и апикальной поверхности клеток [11]. Однако в этих работах не уделено достаточного внимания закономерностям транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени. Математическое моделирование может способствовать выявлению особенностей такого транспорта.

Целью работы было выявить закономерности транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени с использованием стехиометрического моделирования.

МЕТОДЫ

Перфузия изолированной печени

Перфузию изолированной печени проводили на крысах-самцах Wistar массой 200–250 г. В качестве перфузионной среды использовали раствор Кребса-Хенселейта с добавлением лактата (1.7 мМ), аспарагиновой кислоты (0.2 мМ) и хлористого аммония (5 мМ).

Поскольку механизм транспорта кислорода через поверхность печени может зависеть от оксигенации среды, протекающей через кровяное русло, печень крысы, перфузируемую в условиях искусственного гомеостаза, вводили в состояние гипоксии, после чего величины полученных в эксперименте биохимических параметров использовали для определения величины субстратных потоков в печени.

Экспериментальные животные были разделены на 3 группы:

а) группа 1 (контроль) – перфузионную среду оксигенировали смесью O_2-CO_2 (95:5);

б) группа 2 – перфузионную среду оксигенировали смесью $O_2-CO_2-N_2$ (14:5:81) (нормобарическая гипоксия);

в) группа 3 – в перфузионную среду, оксигенированную смесью O_2-CO_2 (95:5), вводили хлорид кобальта в концентрации 10^{-4} М со скоростью 0.25 мл/мин с 30-й по 40-ю минуты перфузии (гистотоксическая гипоксия).

Камеру с органом оксигенировали газовой смесью O_2-CO_2 (95:5).

Перфузию проводили в нормотермических условиях при скорости объемного тока среды 23 мл/мин на установке «Гомеостат 3М».

В ходе экспериментов измеряли концентрации глюкозы (мМ), молочной кислоты (мМ), мочевины (мМ) в перфузионной среде, напряжение углекислого газа (mmHg), напряжение кислорода (mmHg) в перфузионной среде и в атмосфере замкнутой камеры на ABL 800 FLEX. На основе полученных данных рассчитывали удельные скорости потребления кислорода и выделения углекислого газа, скорости продукции глюкозы, молочной кислоты и мочевины ($мкмоль \cdot мин^{-1} \cdot г^{-1}$).

Стехиометрическая модель метаболизма изолированной перфузируемой печени

Распределение субстратных потоков в изолированной перфузируемой печени вычисляли с целью выявить особенности транспорта кислорода через поверхность печени.

Построение стехиометрической модели

Стехиометрическая модель субстратных потоков печени была построена на основе биохимических реакций, протекающих в печени [15–17]. В модель были включены цикл Кребса, цикл мочевины, гликолиз, глюконеогенез, синтез гликогена, распад гликогена. Также модель учитывала влияние бикарбонатного буфера на выход углекислого газа (рис. 1). Поскольку в перфузионную среду не добавляли жирные кислоты и аминокислоты (кроме аспарагиновой кислоты), то липидный обмен и обмен аминокислот не учитывали в модели.

Стехиометрия реакций, включенных в модель, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Стехиометрия биохимических реакций в изолированной перфузируемой печени крысы

№	Название фермента или цепь связанных реакций	Стехиометрия
v_1	Глюкокиназа	Глюкоза + АТФ → Глюкозо–6–фосфат + АДФ + Рi
v_2	8 ступеней (гликолиз)	Глюкозо–6–фосфат + 3 АДФ + 3 Рi + 2 НАД ⁺ → → 2 Пируват + 3 АТФ + 2 НАДН + Н ⁺
v_3	Лактатдегидрогеназа (прямая реакция)	Пируват + НАДН + Н ⁺ → Лактат + НАД ⁺
v_4	Лактатдегидрогеназа (обратная реакция)	Лактат + НАД ⁺ → Пируват + НАДН + Н ⁺
v_5	9 ступеней (глюконеогенез)	2 Пируват + 2 НАДН + Н ⁺ + 6 АТФ → Глюкозо–6– фосфат + 2 НАД ⁺ + 6 АДФ + 6 Рi
v_6	Глюкозо–6–фосфатаза	Глюкозо–6–фосфат → Глюкоза + Рi
v_7	Гликогенолиз	Гликоген + Рi → Глюкозо–6–фосфат
v_8	Гликогенез	Глюкозо–6–фосфат + АТФ → Гликоген + АДФ + Рi
v_9	Пируватдегидрогеназный комплекс	Пируват + НАД ⁺ → Ацетил–КоА + НАДН + Н ⁺ + СО ₂
v_{10}	Цикл Кребса*	Ацетил–КоА + 11/3 НАД ⁺ + АДФ + Рi → 11/3 НАДН + Н ⁺ + АТФ + 2 СО ₂
v_{11}	Выделение СО ₂	СО ₂ →
v_{12}	Цикл мочевины	СО ₂ + NH ₄ ⁺ + Аспарагиновая кислота + 3 АТФ → Мочевина + 3 АДФ + 3 Рi
v_{13}	Выделение мочевины	Мочевина →
v_{14}	Цепь переноса электронов	О ₂ + 2 НАДН + Н ⁺ + 6 АДФ + 6 Рi → 2 НАД ⁺ + 6 АТФ + 2 Н ₂ О
v_{15}	Гидролиз АТФ	АТФ → АДФ + Рi
v_{16}	Транспорт глюкозы в клетку	↔ Глюкоза
v_{17}	Транспорт лактата в клетку	↔ Лактат
v_{18}	Транспорт О ₂ из сосудистого русла	→ О ₂
v_{19}	Транспорт аммония в клетку	→ NH ₄ ⁺
v_{20}	Транспорт аспарагиновой кислоты в клетку	→ Аспарагиновая кислота
v_{21}	Влияние лактата на выход СО ₂ из бикарбонатных солей	Лактат + HCO ₃ ⁻ → СО ₂
v_{22}	Поддержание внутриклеточного бикарбонатного буфера	→ HCO ₃ ⁻
v_{23}	Транспорт О ₂ через поверхность	n АТФ + О ₂ → n АДФ + n Рi

* Для того, чтобы сократить число используемых метаболитов, а значит и число уравнений, было принято, что каждый моль ФАДН₂ эквивалентен $\frac{2}{3}$ моля НАДН [28].

Вычисление внутриклеточных потоков производили по алгоритму, описанному в [19, 27], на основе которого совокупность стехиометрических коэффициентов реакций из таблицы 1 была записаны в виде матрицы **S**, где каждый элемент s_{ij} является

коэффициентом метаболита i в реакции j . Метаболиты, для которых построена стехиометрическая модель, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Метаболиты

№	Метаболит
1	Глюкоза
2	Глюкозо-6-фосфат
3	Пируват
4	Лактат
5	Ацетил-КоА
6	Гликогена
7	Углекислый газ (CO ₂)
8	Мочевины
9	Кислород (O ₂)
10	НАДН
11	NH ₄ ⁺
12	Аспарагиновая кислота
13	Бикарбонат (HCO ₃)
14	АТФ

Уравнения баланса для каждого метаболита записаны в матричной форме:

$$\frac{dx}{dt} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{v}, \quad (1)$$

где каждый элемент x_i вектора \mathbf{x} является внутриклеточной концентрацией метаболита i , а элемент v_j вектора \mathbf{v} является скоростью реакции j . Предполагая, что все потоки находятся в квазистационарном состоянии (изменение концентрации метаболитов является более быстрым процессом по сравнению с изменениями внешних условий [1, 20, 34]). Уравнения баланса массы для каждого метаболита в матричной форме можно записать как

$$\mathbf{S} \cdot \mathbf{v} = \mathbf{0}. \quad (2)$$

В построенной метаболической сети субстратных потоков больше, чем метаболитов (23 потока и 14 метаболитов), поэтому для определения значений неизвестных субстратных потоков использовали методы линейного программирования. Применение данных методов позволяет получить оптимальное распределение субстратных потоков при максимизации некоторой целевой функции Z , которая может быть записана:

$$Z = \mathbf{c}^T \cdot \mathbf{v}, \quad (3)$$

где Z является целевой функцией, \mathbf{c} – вектор, каждый элемент которого c_j определяет коэффициент или вес для каждого потока v_j из \mathbf{v} . Кроме того, для оптимизации необходимо ввести границы изменения субстратных потоков $v_j^{\min} \leq v_j \leq v_j^{\max}$, которые определяются исходя из термодинамики процесса или из экспериментальных данных. В данной работе мы использовали в качестве ограничений наибольшие и наименьшие значения удельных скоростей потребления кислорода и выделения углекислого газа, скоростей продукции глюкозы, молочной кислоты и мочевины на интервале с 40-й по 120-ю минуты. Данный интервал был выбран из-за того, что к 40-й минуте перфузии заканчивается адаптация органа к условиям искусственного гомеостаза [20] и закончены все воздействия на орган (прекращено введение хлорида кобальта).

Распределение субстратных потоков в изолированной перфузируемой печени определяли, максимизируя соответствующие целевые функции Z .

Выбор целевой функции

Распределение субстратных потоков находили для трех целевых функций (табл. 3).

Для поддержания гомеостаза изолированной перфузируемой печени требуется достаточный запас энергии. В экстремальных состояниях адаптивно-приспособительные механизмы клеток направлены на то, чтобы в первую очередь максимально поддерживать активность процессов, направленных на синтез АТФ, поэтому максимальная скорость ее продукции клеткой была выбрана в качестве первой целевой функции [26].

Известно, что одной из основных функций печени является синтез мочевины [33]. Поэтому максимальная скорость синтеза мочевины была выбрана в качестве второй целевой функции.

В условиях искусственного гомеостаза печень выполняет несколько функций. Она синтезирует мочевину и обеспечивает свой энергетический метаболизм путем продукции АТФ. Поэтому для определения распределения субстратных потоков в печени необходимо поставить задачу многокритериального программирования с максимизацией синтеза мочевины и АТФ. Для решения данной задачи в работе использовали метод ϵ -ограничений [30], который максимизирует основную целевую функцию при ограничениях, накладываемых на дополнительную целевую функцию. Здесь в качестве основной целевой функции использовали скорость продукции АТФ, а в качестве дополнительной – синтез мочевины. Значение параметра ϵ получали исходя из результатов оптимизации для целевой функции № 2 (табл. 3).

Таблица 3. Целевые функции, использованные для анализа метаболической сети изолированной перфузируемой печени крысы

№	Название целевой функции	Уравнение целевой функции
1	Ограниченная продукция АТФ	$Z = -\text{АТФ}$ (ограничено сверху)
2	Синтез мочевины	$Z = \text{мочевина}$ (v_{13})
3	Максимальная продукция АТФ и синтез мочевины	$Z = -\text{АТФ}$ (не ограничено сверху) при ограничении ($v_{13} < v_{\max}$)

Учет влияния макроэргических соединений на транспорт кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени в стехиометрической модели

Для того чтобы учесть зависимость транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени от присутствия макроэргических соединений, мы добавили к известной метаболической цепочке дополнительный поток, который обозначает скорость потребления кислорода через поверхность органа (рис. 1). Стехиометрический коэффициент принимается равным 1 для кислорода, поступающего в камеру, и равным $-n$ для уравнения скорости АТФ, где n обозначает количество молекул АТФ, идущих на транспорт кислорода через поверхность органа (табл. 1), где n – число молекул АТФ, необходимых для осуществления транспорта кислорода через поверхность изолированной печени.

Чтобы определить количество молекул АТФ, необходимых для транспорта кислорода через поверхность, мы ограничили все субстратные потоки экспериментальными наблюдениями, кроме реакции, где происходит транспорт кислорода через поверхность органа. Далее увеличивали количество молекул АТФ ($n = 0, 1, 2, \dots, 16$), при гидролизе которых высвобождается энергия, затрачиваемая при осуществлении этого процесса.

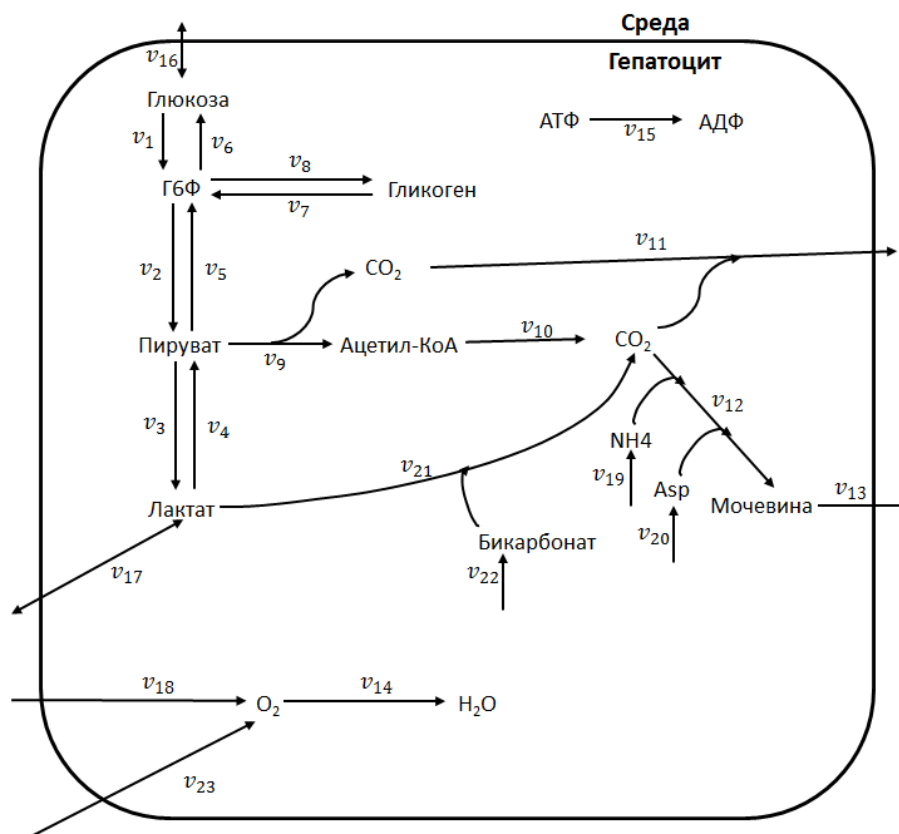


Рис. 1. Схема метаболических путей в клетке печени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Перфузия изолированной печени

Скорость потребления кислорода через сосудистое русло (рис. 2) печенью контрольной группы на протяжении всей перфузии была стабильна и составляла в среднем $2.5\text{--}3.0$ $\mu\text{моль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$, что согласуется с данными [7, 10, 25]. Из рисунка видно, что при снижении парциального давления кислорода в перфузионной среде до 14%, скорость потребления кислорода органом по-прежнему остается стабильной, но сниженной в 2.5 раза относительно контрольных значений. При введении хлорида кобальта в концентрации 10^{-4} М в орган через одну минуту наблюдается резкое снижение скорости потребления кислорода. После прекращения введения хлорида кобальта в группе 3 скорость потребления кислорода с 40 по 120 минуты стабилизируется на уровне $1.5\text{--}1.7$ $\mu\text{моль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$.

Удельная скорость потребления кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени (рис. 3) в контрольной группе стабильна на протяжении всей перфузии и составляет в среднем 2.0 $\mu\text{моль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$. В группе, где печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода, скорость потребления кислорода на 20-й минуте неотличима от контроля. Однако с 35 минуты и до конца перфузии скорость потребления кислорода снижается более чем в 2 раза. В группе с добавлением в перфузионную среду хлорида кобальта наблюдается сходная динамика. Но скорость потребления кислорода снижается не так быстро и стабилизируется на значении в 1 $\mu\text{моль}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$, сохраняясь таковой до конца перфузии.

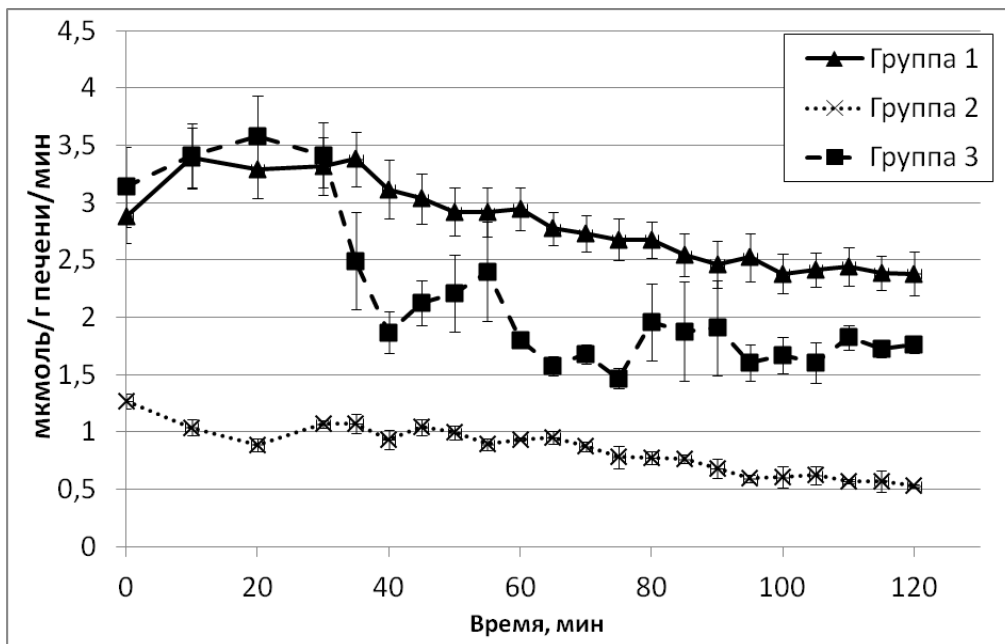


Рис. 2. Удельная скорость потребления кислорода через сосудистое русло изолированной перфузируемой печени крысы.

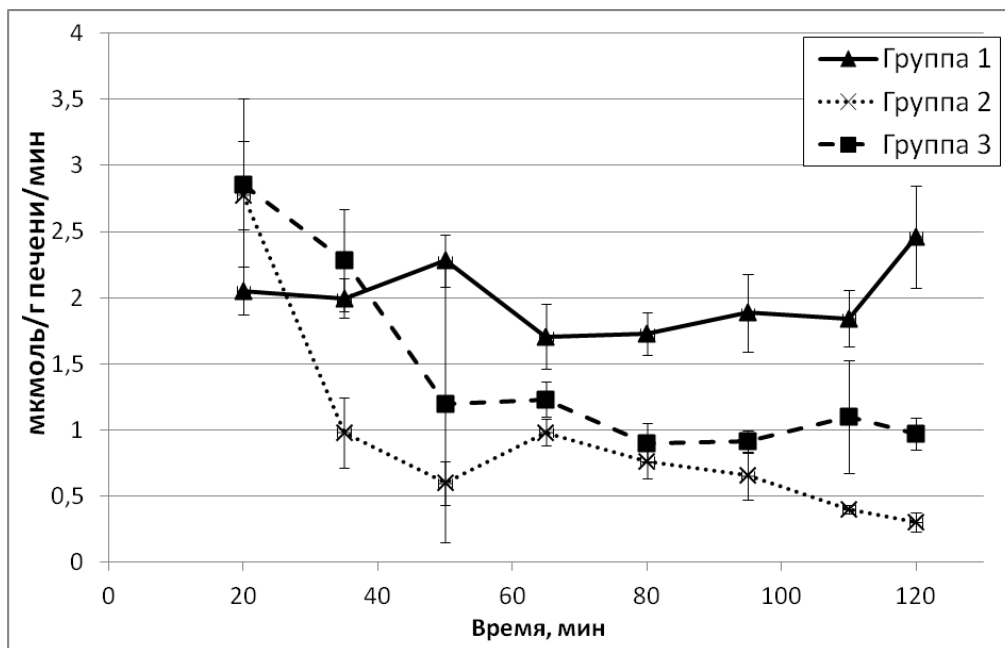


Рис. 3. Удельная скорость потребления кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени.

Интересно, что скорость потребления кислорода через поверхность в контроле была гораздо выше, чем в состоянии гипоксии.

Стехиометрическое моделирование метаболизма изолированной перфузируемой печени крысы

Ограниченная максимизация гидролиза АТФ

Для того, чтобы определить количество молекул АТФ, необходимое для обеспечения транспорта кислорода через поверхность печени, мы ограничим субстратные потоки v_{13} , v_{15} , v_{16} , v_{17} , v_{18} , v_{22} экспериментальными наблюдениями и литературными данными. Поток, описывающий скорость потребления кислорода через

поверхность органа, оставим без ограничений. Далее будем решать оптимизационную задачу для каждого n . Увеличение количества молекул АТФ, при гидролизе которых высвобождается энергия, предполагаемо необходимая для осуществления переноса кислорода в гепатоцит, будет происходить до тех пор, пока величина субстратного потока v_{23} не достигнет наилучшего соответствия экспериментальным данным. После численных экспериментов были подобраны значения количества молекул АТФ для транспорта кислорода через поверхность.

Результаты оптимизации для различного количества молекул АТФ каждой экспериментальной группы представлены в таблицах 4–6.

Таблица 4. Распределение субстратных потоков в изолированной перфузируемой печени крысы при различном количестве АТФ, используемых для осуществления транспорта через поверхность для группы 1

$\frac{n}{v}$	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	16
v_1	5,5507	5,4781	5,3827	5,2703	5,1550	5,0504	4,9611	4,8913	4,8382	4,7985	4,7690	4,7302	4,6672
v_2	5,7684	5,5220	5,2106	4,8615	4,5242	4,2402	4,0217	3,8623	3,7479	3,6659	3,6067	3,5294	3,3905
v_3	4,9992	4,9931	4,9869	4,9818	4,9788	4,9783	4,9799	4,9830	4,9870	4,9913	4,9955	5,0027	5,0112
v_4	5,0008	5,0069	5,0131	5,0182	5,0212	5,0217	5,0201	5,0170	5,0130	5,0087	5,0045	4,9973	4,9888
v_5	4,8736	4,6082	4,2799	3,9180	3,5731	3,2863	3,0693	2,9132	2,8029	2,7255	2,6710	2,6024	2,4812
v_6	4,6559	4,5642	4,4520	4,3269	4,2040	4,0965	4,0088	3,9422	3,8932	3,8581	3,8333	3,8032	3,7579
v_7	0,0248	0,0258	0,0275	0,0299	0,0329	0,0359	0,0359	0,0359	0,0359	0,0359	0,0359	0,0358	0,0358
v_8	0,0248	0,0258	0,0275	0,0299	0,0329	0,0359	0,0359	0,0359	0,0359	0,0359	0,0359	0,0358	0,0358
v_9	1,7912	1,8415	1,8877	1,9233	1,9445	1,9511	1,9450	1,9321	1,9158	1,8981	1,8805	1,8484	1,7962
v_{10}	1,7912	1,8415	1,8877	1,9233	1,9445	1,9511	1,9450	1,9321	1,9158	1,8981	1,8805	1,8484	1,7962
v_{11}	2,7811	2,9289	3,0712	3,1902	3,2750	3,3241	3,3396	3,3339	3,3146	3,2874	3,2567	3,1945	3,0854
v_{12}	2,6230	2,6266	2,6237	2,6127	2,5929	2,5656	2,5322	2,4998	2,4702	2,4442	2,4220	2,3874	2,3378
v_{13}	2,6230	2,6266	2,6237	2,6127	2,5929	2,5656	2,5322	2,4998	2,4702	2,4442	2,4220	2,3874	2,3378
v_{14}	5,0750	5,2177	5,3486	5,4495	5,5093	5,5281	5,5107	5,4744	5,4281	5,3780	5,3281	5,2372	5,0891
v_{15}	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600
v_{16}	0,8948	0,9139	0,9307	0,9434	0,9510	0,9539	0,9524	0,9491	0,9449	0,9404	0,9358	0,9269	0,9093
v_{17}	0,0322	0,0448	0,0579	0,0694	0,0770	0,0797	0,0772	0,0712	0,0633	0,0547	0,0462	0,0312	0,0122
v_{18}	4,5885	4,5880	4,5887	4,5916	4,5967	4,6036	4,6120	4,6215	4,6314	4,6410	4,6497	4,6640	4,6747
v_{19}	2,6230	2,6266	2,6237	2,6127	2,5929	2,5656	2,5322	2,4998	2,4702	2,4442	2,4220	2,3874	2,3378
v_{20}	2,6230	2,6266	2,6237	2,6127	2,5929	2,5656	2,5322	2,4998	2,4702	2,4442	2,4220	2,3874	2,3378
v_{21}	0,0306	0,0310	0,0317	0,0329	0,0346	0,0364	0,0369	0,0373	0,0374	0,0374	0,0372	0,0367	0,0346
v_{22}	0,0306	0,0310	0,0317	0,0329	0,0346	0,0364	0,0369	0,0373	0,0374	0,0374	0,0372	0,0367	0,0346
v_{23}	1,6994	1,8210	1,8953	1,8893	1,8269	1,6959	1,5341	1,3714	1,2207	1,0871	0,9713	0,7880	0,5649

Таблица 5. Распределение субстратных потоков в изолированной перфузируемой печени крысы при различном количестве АТФ, используемых для осуществления транспорта через поверхность для группы 2

$\frac{n}{v}$	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	16
v_1	4,5243	3,8691	3,3247	2,7381	2,2420	1,5481	0,7761	0,5071	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
v_2	3,3262	2,3468	1,7653	1,4039	1,0255	0,7468	0,5284	0,4860	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
v_3	4,7636	4,7787	4,7843	4,7789	4,7689	4,7810	4,7957	5,2410	5,2706	5,2706	5,2706	5,2706	5,2706
v_4	5,2364	5,2213	5,2157	5,2211	5,2311	5,2190	5,2043	4,7590	4,7294	4,7294	4,7294	4,7294	4,7294
v_5	2,8389	1,8824	1,2977	0,9324	0,5472	0,2683	0,0522	0,0061	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_6	4,0370	3,4047	2,8570	2,2666	1,7637	1,0697	0,2999	0,0271	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_7	0,0216	0,0285	0,0352	0,0243	0,0250	0,0225	0,0230	0,0186	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_8	0,0216	0,0285	0,0352	0,0243	0,0250	0,0225	0,0230	0,0186	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_9	1,4475	1,3713	1,3666	1,3853	1,4188	1,3950	1,3610	0,4780	0,4588	0,4588	0,4588	0,4588	0,4588
v_{10}	1,4475	1,3713	1,3666	1,3853	1,4188	1,3950	1,3610	0,4780	0,4588	0,4588	0,4588	0,4588	0,4588
v_{11}	1,8365	2,0248	2,3060	2,6573	3,0881	3,5404	3,8804	1,4430	1,4277	1,4306	1,4323	1,4305	1,4275
v_{12}	2,5314	2,1229	1,8359	1,5358	1,1916	0,6711	0,2210	0,0295	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_{13}	2,5314	2,1229	1,8359	1,5358	1,1916	0,6711	0,2210	0,0295	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_{14}	4,1012	3,8854	3,8721	3,9249	4,0200	3,9524	3,8560	1,3543	1,3000	1,3000	1,3000	1,3000	1,3000
v_{15}	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8588	6,5588	6,2588	5,6588	4,4588
v_{16}	0,4873	0,4644	0,4676	0,4715	0,4783	0,4785	0,4762	0,4800	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
v_{17}	0,4984	0,4763	0,4734	0,4796	0,4855	0,4646	0,4271	-0,4434	-0,4900	-0,4870	-0,4854	-0,4871	-0,4902
v_{18}	0,8777	0,8653	0,8876	0,8862	0,8958	0,9252	0,9631	0,9941	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
v_{19}	2,5314	2,1229	1,8359	1,5358	1,1916	0,6711	0,2210	0,0295	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_{20}	3,9789	3,4942	3,2025	2,9211	2,6104	2,0661	1,5819	0,5075	0,4588	0,4588	0,4588	0,4588	0,4588
v_{21}	0,0255	0,0337	0,0421	0,0373	0,0232	0,0265	0,0185	0,0385	0,0512	0,0542	0,0558	0,0541	0,0510
v_{22}	0,0255	0,0337	0,0421	0,0373	0,0232	0,0265	0,0185	0,0385	0,0512	0,0542	0,0558	0,0541	0,0510
v_{23}	3,4995	3,3034	3,1907	3,1074	3,1576	3,0592	2,9078	0,3645	0,3000	0,3000	0,3000	0,3000	0,3000

Таблица 6. Распределение субстратных потоков в изолированной перфузируемой печени крысы при различном количестве АТФ, используемых для осуществления транспорта через поверхность для группы 3

$\frac{n}{v}$	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	16
v_1	4,2799	3,8396	3,3785	2,8157	2,3523	1,7322	1,1882	0,4692	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
v_2	2,9103	2,2125	1,7658	1,4789	1,1773	0,8526	0,6431	0,4714	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
v_3	4,77	4,7789	4,7828	4,7812	4,7770	4,7769	4,8015	4,8647	5,0004	5,0004	5,0004	5,0004	5,0004
v_4	5,23	5,2211	5,2172	5,2188	5,2230	5,2231	5,1985	5,1353	4,9996	4,9996	4,9996	4,9996	4,9996
v_5	2,4355	1,7426	1,2888	1,0028	0,6987	0,3761	0,1780	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_6	3,8051	3,3697	2,9015	2,3396	1,8737	1,2557	0,7231	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_7	0,0222	0,0359	0,0359	0,0270	0,0247	0,0246	0,0229	0,0207	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_8	0,0222	0,0359	0,0359	0,0270	0,0247	0,0246	0,0229	0,0207	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v_9	1,4095	1,3819	1,3885	1,3897	1,4032	1,3991	1,3273	1,2078	0,9992	0,9992	0,9992	0,9992	0,9992
v_{10}	1,4095	1,3819	1,3885	1,3897	1,4032	1,3991	1,3273	1,2078	0,9992	0,9992	0,9992	0,9992	0,9992
v_{11}	1,4793	1,5695	1,6748	1,7950	1,9444	2,0603	2,1059	1,7788	1,2300	1,2300	1,2300	1,2300	1,2300
v_{12}	2,7757	2,6118	2,5328	2,4169	2,3046	2,1682	1,8975	1,8783	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300
v_{13}	2,7757	2,6118	2,5328	2,4169	2,3046	2,1682	1,8975	1,8783	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300
v_{14}	3,9936	3,9154	3,9340	3,9374	3,9758	3,9642	3,7606	3,4221	2,8310	2,8310	2,8310	2,8310	2,8310
v_{15}	6,86	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8600	6,8472	6,0162	5,1853	3,5233	0,1994
v_{16}	0,4748	0,4698	0,4770	0,4760	0,4786	0,4765	0,4651	0,4686	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000	0,5000
v_{17}	0,4864	0,4778	0,4767	0,4806	0,4854	0,4772	0,4187	0,3043	0,0617	0,0617	0,0617	0,0617	0,0617
v_{18}	1,8676	1,8551	1,8719	1,8961	1,9065	1,9250	1,9521	1,9840	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
v_{19}	2,7757	2,6118	2,5328	2,4169	2,3046	2,1682	1,8975	1,8783	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300
v_{20}	2,7757	2,6118	2,5328	2,4169	2,3046	2,1682	1,8975	1,8783	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300	1,8300
v_{21}	0,0264	0,0356	0,0423	0,0430	0,0394	0,0310	0,0216	0,0336	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
v_{22}	0,0264	0,0356	0,0423	0,0430	0,0394	0,0310	0,0216	0,0336	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
v_{23}	2,6793	2,4852	2,3420	2,1600	2,1116	2,0729	1,8314	1,4505	0,8310	0,8310	0,8310	0,8310	0,8310

Из таблиц можно видеть, что для транспорта кислорода через поверхность в контрольной группе (группа 1) необходимо две молекулы АТФ, в группе, где орган перфузировали средой с низким содержанием кислорода (группа 2) – семь, а в группе, где в циркуляцию вводили хлорид кобальта (группа 3) – восемь.

На рисунке 4 представлено распределение субстратных потоков для всех экспериментальных групп при учете транспорта кислорода через поверхность печени.

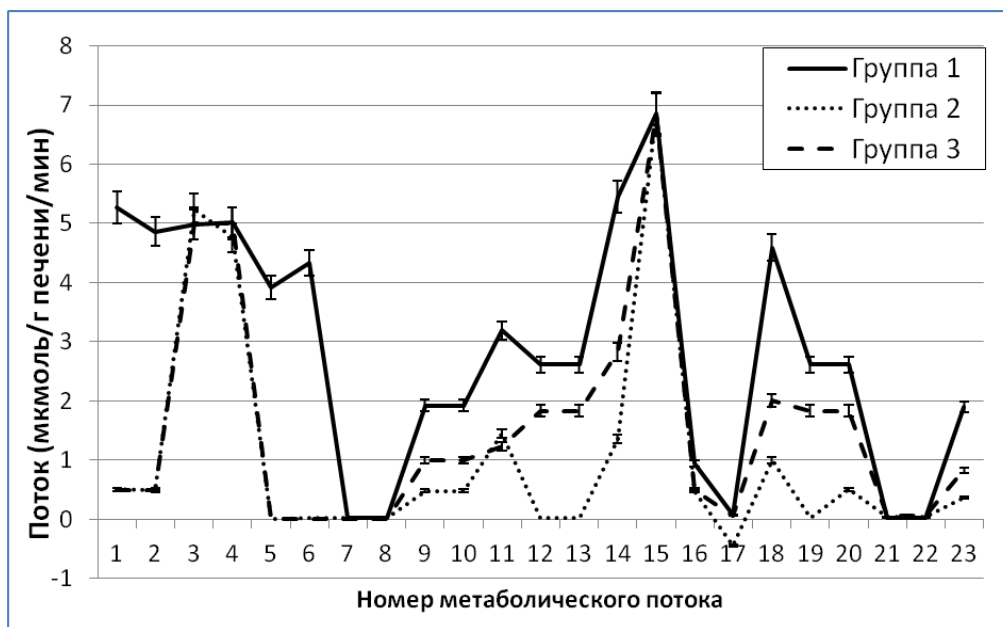


Рис. 4. Вычисленные потоки для контрольной группы (группа 1), для группы, в которой печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода (группа 2), для группы, когда в циркуляцию вводили хлорид кобальта (группа 3) для случая, когда на транспорт кислорода через поверхность расходуется энергия АТФ, для целевой функции № 1.

Если сравнить полученные распределения субстратных потоков с результатами экспериментов, где не принимали во внимание транспорт кислорода через поверхность

органа, то при его учете в контрольной группе глюкоза потребляется, а не выделяется из клеток в перфузат. Это не подтверждено экспериментальными наблюдениями Lee и Yamaguchi [20, 35]. Однако это можно объяснить тем, что в указанных экспериментах использовали среду Eagle's minimal essential medium (ЕМЕМ), в которой концентрация глюкозы составляет 5 ммоль/л, тогда как в перфузионной среде, использованной в данной работе составляла 10 ммоль/л. Согласно [8], при увеличении концентрации глюкозы в среде до указанных значений происходит потребление глюкозы клетками печени.

Интенсивность реакций окислительного фосфорилирования увеличилась с 4 до 5.2 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹. Предполагая, что транспорт кислорода через поверхность является процессом, связанным с затратами энергии, эти результаты можно объяснить тем, что, наиболее эффективным способом получения энергии является окисление глюкозы, исходя из чего потреблять глюкозу более выгодно, чем, например, лактат, поскольку известно, что превращение лактата в пируват не сопровождается синтезом АТФ.

Интенсивность реакций цикла Кребса в группе, где в циркуляцию вводили хлорид кобальта, выше при учете потребления кислорода через поверхность, а при перфузии средой с низким содержанием кислорода остается на постоянном уровне. Скорость выделения углекислого газа в группе, где в циркуляцию вводили хлорид кобальта, выше, чем когда потребление кислорода через поверхность не учитывается.

Скорость производства мочевины в контроле на 0.8 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ ниже, чем в случае, когда потребление через поверхность не учитывается. При введении в циркуляцию хлорида кобальта скорость синтеза мочевины, наоборот, увеличивается на 1.2 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ с учетом потребления кислорода через поверхность. При низком содержании кислорода в среде скорость синтеза мочевины находится на том же уровне.

Выдвинутое предположение об участии в транспорте кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы макроэргических соединений подтверждается тем, что в этом случае скорость потребления кислорода через поверхность лучше соответствует экспериментальным данным.

Максимальная скорость синтеза мочевины

Результат решения оптимизационной задачи, учитывающей транспорт кислорода через поверхность печени, для целевой функции № 2 (максимальная скорость синтеза мочевины) представлен на рисунке 6.

Из рисунка видно, что при учете зависимости транспорта кислорода от присутствия макроэргических соединений наибольшая скорость продукции мочевины (v_{13}) в контрольной группе. При этом наименьшая скорость в группе с низким содержанием кислорода в перфузионной среде (группа 2). Такое же соотношение величин наблюдается для скорости утилизации АТФ (v_{15}). Также видно, что во всех экспериментальных группах преобладают процессы гликолиза, т. е. потоки v_1 – v_2 больше, чем v_5 – v_6 . Глюконеогенез практически не наблюдается. Единственное, что может свидетельствовать о возможности синтеза глюкозы, – это существование субстратного цикла v_1 – v_6 , однако реакция, катализируемая глюкокиназой, быстрее, чем реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфатазой, поэтому в данном случае преобладает процесс гликолиза.

Величина скорости потребления кислорода через поверхность печени (v_{23}) составляет в среднем 2.5 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ для контрольной группы и около 1 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ для групп, где печень находится в состоянии гипоксии.

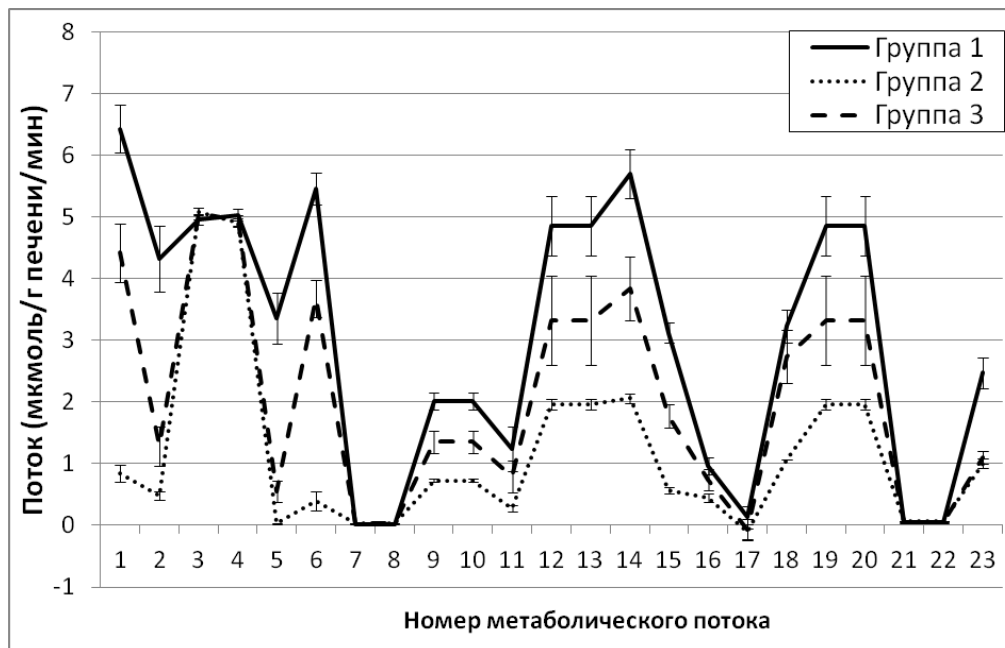


Рис. 6. Вычисленные потоки для контрольной группы (группа 1), для группы, в которой печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода (группа 2), для группы, когда в циркуляцию вводили хлорид кобальта (группа 3) для случая, когда на транспорт кислорода через поверхность расходуется энергия АТФ, для целевой функции № 2.

Максимальные скорости продукции АТФ и синтеза мочевины

При многокритериальной оптимизации учитываются особенности нахождения печени в условиях искусственного гомеостаза, что выражается в производстве АТФ для поддержания нормального протекания клеточных процессов, а также производстве мочевины. Также особенностью функционирования печени в условиях изолированной перфузии является существование транспорта кислорода через поверхность печени [7, 10].

Результат решения многокритериальной оптимизационной задачи, учитывающей транспорт кислорода через поверхность печени, для целевой функции № 3 (максимальные скорости продукции АТФ и синтеза мочевины), представлен на рисунке 7.

Из рисунка можно видеть, что в печени преобладают процессы гликолиза (потоки v_5 , v_6 равны 0, а v_1 , v_2 отличны от 0). Процессы распада и синтеза гликогена (v_7 , v_8 , соответственно) равны 0, что свидетельствует о том, что гликоген не участвует в метаболизме глюкозы. Это соответствует экспериментальным данным [8], где обсуждается вопрос об отсутствии синтеза гликогена в печени крыс уже после 12 часов голодания.

Во всех экспериментальных группах наблюдается выделение лактата в перфузионную среду. В контроле скорость выделения лактата составляет в среднем -0.02 ± 0.19 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹, что очень близко к отсутствию выделения лактата в перфузионную среду вообще. То же самое наблюдается и для группы 2, где печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода. Наибольшая скорость выделения лактата наблюдается при перфузии средой, содержащей хлорид кобальта (группа 3) и составляет в среднем -0.23 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹.

Наибольшая скорость продукции мочевины (v_{13}) наблюдается в контрольной группе. При этом наименьшая скорость синтеза характерна для группы, где печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода (группа 2).

Скорости реакций цикла Кребса (v_{10}) и окислительного фосфорилирования (v_{14}) наибольшие в контрольной группе и наименьшие в группе 2.

Величина скорости потребления кислорода через поверхность печени (v_{23}) составляет в среднем $2.3 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для контрольной группы и около $0.9 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для групп, где печень находилась в состоянии гипоксии.

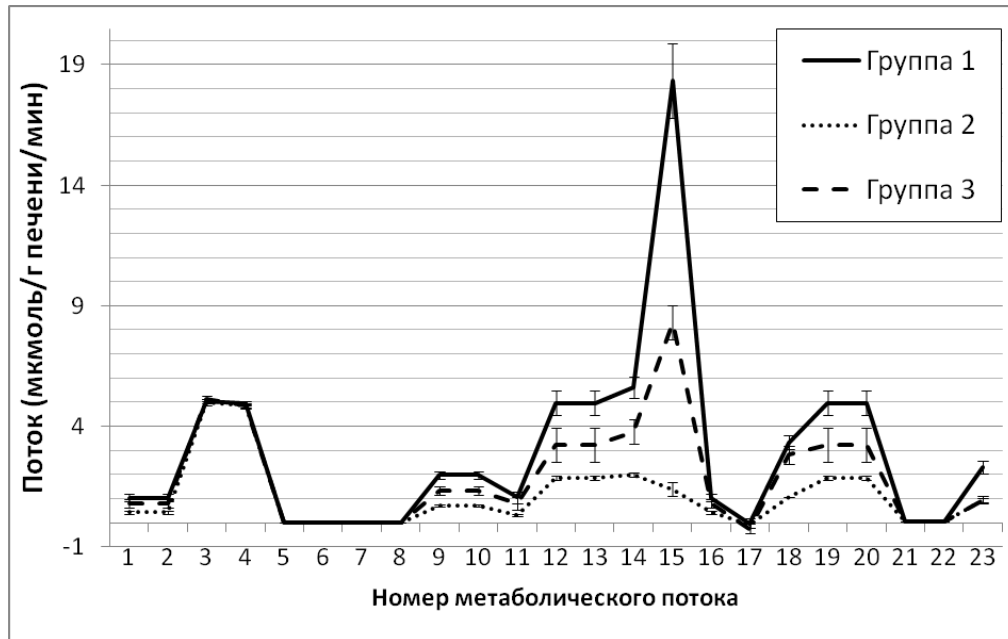


Рис. 7. Вычисленные потоки для контрольной группы (группа 1), для группы, в которой печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода (группа 2), для группы, когда в циркуляцию вводили хлорид кобальта (группа 3) для случая, когда на транспорт кислорода через поверхность расходуется энергия АТФ, для целевой функции № 3.

Таким образом, в данной работе использовали стехиометрическую модель для выявления закономерностей транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени, находящейся в условиях нормального снабжения кислородом и в состоянии гипоксии.

Экспериментальные результаты показали, что при помещении печени в состояние гипоксии (как нормобарической, так и гистотоксической) скорость потребления кислорода через поверхность относительно контроля уменьшается, а ее доля от суммарной скорости (и через поверхность, и через сосудистое русло) увеличивается. Это означает, что уменьшился коэффициент диффузии кислорода через поверхность, что привело к уменьшению потока кислорода через поверхность. Существуют данные, согласно которым транспорт кислорода в клетку является регулируемым процессом [5]. При гипоксии клетки синтезируют АТФ в меньшем количестве, поэтому и диффузионный поток кислорода через поверхность должен бы был возрасти, а он уменьшился, что навело на мысль о том, что транспорт кислорода через поверхность и производство АТФ связаны между собой.

Используя данные литературы и с учетом особенностей эксперимента, была построена стехиометрическая модель метаболизма печени с добавлением дополнительной реакции, которая описывает транспорт кислорода через ее поверхность. Стехиометрическая модель показала, что для лучшего соответствия экспериментальным данным необходимо ввести в уравнения модели поток, который связан с затратами энергии гидролиза АТФ. Это поток, описывающий транспорт кислорода через поверхность печени. Но процесс транспорта кислорода через поверхность не является простой диффузией. Диффузия кислорода к клетке определяется, потребностями кислород-зависимых метаболических систем [5]. В отличие от простой диффузии, для которой ее скорость пропорциональна градиенту концентрации, для облегченной диффузии характерным признаком является

насыщение системы переноса, когда дальнейшее увеличение концентрации не приводит к изменению скорости диффузии [5].

Стехиометрическое моделирование показало, что в контрольной группе на транспорт кислорода через поверхность требуется энергия гидролиза только двух молекул АТФ, а в состоянии гипоксии 7–8 молекул. Данное наблюдение довольно неожиданно. В состоянии гипоксии снижается активность цикла Кребса и цепи переноса электронов. Это приводит к тому, что продукция АТФ также снижается. В данном случае это означает, что энергия должна экономиться и тратиться на что-то другое, а не на непосредственную транспортировку кислорода в клетку. Также существуют мнения о том, что убедительных данных относительно предположения о возможности активного транспорта кислорода через биологические мембраны нет [5].

Однако, в литературе обнаружена информация о роли межклеточной жидкости в транспорте растворенных в ней веществ к клеткам, а также о роли движения гиалоплазмы, ускоряющей не менее, чем на порядок поступление кислорода к удаленным от клеточной мембраны частям клетки с низким pO_2 по сравнению с простой диффузией. Такие потоки показаны как для крупных растительных клеток [2, 18], так и для клеток млекопитающих [4, 31]. Межклеточная жидкость циркулирует между клетками при помощи ресничек, находящихся на их поверхности. Для создания необходимой интенсивности потока жидкости, обеспечивающей адекватную доставку кислорода как в нормальном, так и в экстремальном состоянии, необходима энергия, которая расходуется непосредственно на движение ресничек. Поскольку в состоянии гипоксии органу необходимо больше кислорода, то и поток межклеточной жидкости больше, что выражается в увеличении количества используемого АТФ.

Таким образом можно заключить, что транспорт кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы является процессом, связанным с затратами энергии на создание потоков межклеточной жидкости, и вероятнее всего является вторично-активным транспортом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дроздов-Тихомиров Л.Н., Серганова В.В., Скурида Г.И. Внутренние стационарные метаболические потоки в мультиферментных системах: Синтез лизина из ацетата продуцентом *Corynebacterium glutamicum*. *Биотехнология*. 1986. Т. 2. № 8. С. 28–37.
2. Иванов К.П., Кисляков Ю.Я. *Энергетические потребности и кислородное обеспечение головного мозга*. Л.: Наука, 1979. 212 с.
3. Инжеваткин Е.В., Нефедов В.П., Савченко А.А. Нейросетевая предикция потребления кислорода перфузируемой печенью крыс по активности оксидоредуктаз в динамике восстановительного периода после гипертермического воздействия. *Вестник новых медицинских технологий*. 2000. № 1. С. 25–28.
4. Камия Н. *Движение протоплазмы*. М.: ИЛ, 1962. 306 с.
5. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. *Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние*. М.: Наука, 1981.
6. Назипова Н.Н., Елькин Ю.Е., Панюков В.В., Дроздов-Тихомиров Л.Н. Расчет скоростей метаболических реакций в живой клетке методом баланса стационарных метаболических потоков (метод БСМП). *Математическая биология и биоинформатика*. 2007. Т. 2. С. 98–119.
7. Нефедов В.П., Рупенко А.П., Валук В.А., Панов А.В., Вавилин В.А. Модификация действия адреналина на метаболизм тканей изолированной печени крыс при перфузии средами различного состава. *Успехи гепатологии XV*. 1991. С. 335–352.
8. Ньюсхолм Э., Старт К. *Регуляция метаболизма*. М.: Мир, 1977. 407 с.

9. Реммель Н.Н., Кратасюк В.А., Мазняк О.М., Инжеваткин Е.В., Нефедов В.П. Билюминесцентный контроль интенсивности патологических окислительных процессов в клетках перфузируемой печени крыс после гипертермического воздействия. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2003. Т. 135. № 1. С. 52–54.
10. Рупенко А.П., Круглик О.В., Моргулис И.И. Снабжение печени кислородом в условиях изолированной перфузии. *Доклады Академии наук*. 2008. Т. 418. № 1. С. 128–130.
11. Уголев А.М. *Эволюция пищеварения и принципы эволюции функции. Элементы современного функционализма*. Л.: Наука, 1985.
12. Arai K., Lee K., Berthiaume F., Tompkins R.G., Yarmush M.L. Intrahepatic amino acid and glucose metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model. *Hepatology*. 2001. V. 34. P. 360–371.
13. Banta S., Vemula M., Yokoyama T., Jayaraman A., Berthiaume F., Yarmush M.L. Contribution of gene expression to metabolic fluxes in hypermetabolic livers induced through burn injury and cecal ligation and puncture in rats. *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 97. P. 118–137.
14. Banta S., Yokoyama T., Berthiaume F., Yarmush M.L. Effects of dehydroepiandrosterone administration on rat hepatic metabolism following thermal injury. *J. Surg. Res.* 2005. V. 127. C. 93–105.
15. Calvetti D., Kuceyeski A., Somersalo E. Sampling-based analysis of a spatially distributed model for liver metabolism at steady state. *Multiscale Modeling & Simulation*. 2008. V. 7. No. 1. P. 407–431.
16. Chalhoub E., Hanson R.W., Belovich J.M. A computer model of gluconeogenesis and lipid metabolism in the perfused liver. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007. V. 293. P. E1676–E1686.
17. Chalhoub E., Xie L., Balasubramanian V., Kim J., Belovich J. A distributed model of carbohydrate transport and metabolism in the liver during rest and high-intensity exercise. *Ann. Biomed. Eng.* 2007. V. 35. P. 474–491.
18. Coulter N.A. Filtration coefficient of capillaries of the brain. *American Journal of Physiology*. 1958. V. 195. P. 459–464.
19. Kauffman K.J., Prakash P., Edwards J.S. Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2003. V. 14. No. 5. P. 491–496.
20. Lee K., Berthiaume F., Stephanopoulos G.N., Yarmush D.M., Yarmush M.L. Metabolic flux analysis of postburn hepatic hypermetabolism. *Metab. Eng.* 2000. V. 2. P. 312–327.
21. Metallo C.M., Walther J.L., Stephanopoulos G. Evaluation of ¹³C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. *J. Biotechnol.* 2009. V. 144. No. 3. P. 167–174.
22. Orman M.A., Androulakis I.P., Berthiaume F., Ierapetritou M.G. Metabolic network analysis of perfused livers under fed and fasted states: Incorporating thermodynamic and futile-cycle associated regulatory constraints. *Journal of Theoretical Biology*. 2012. V. 293. P. 101–110.
23. Orman M.A., Arai K., Yarmush M.L., Androulakis I.P., Berthiaume F., Ierapetritou M.G. Metabolic flux determination in perfused livers by mass balance analysis: Effect of fasting. *Biotechnol. Bioeng.* 2010. V. 107. P. 825–835.
24. Orman M.A., Berthiaume F., Androulakis I.P., Ierapetritou M.G. Pathway analysis of liver metabolism under stressed condition. *Journal of Theoretical Biology*. 2011. V. 272. No. 1. P. 131–140.
25. Orman M.A., Ierapetritou M.G., Androulakis I.P., Berthiaume F. Metabolic response of perfused livers to various oxygenation conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. P. 2947–2957.

26. Ramakrishna R., Edwards J.S., McCulloch A., Palsson B.O. Flux balance analysis of mitochondrial energy metabolism: consequences of systemic stoichiometric constraints. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2001. V. 280. P. R695–R704.
27. Raman K., Chandra N. Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Briefings in Bioinformatics*. 2009. V. 10. No. 4. P. 435–449.
28. Salem J.E., Saidel G.M., Stanley W.C., Cabrera M.E. Mechanistic Model of Myocardial Energy Metabolism under Normal and Ischemic Conditions. *Annals of Biomedical Engineering*. 2002. V. 30. No. 2. P. 202–216.
29. Sengupta N., Rose S.T., Morgan J.A. Metabolic flux analysis of CHO cell metabolism in the late non-growth phase. *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. No. 1. P. 82–92.
30. Sharma N.S., Ierapetritou M.G., Yarmush M.L. Novel quantitative tools for engineering analysis of hepatocyte cultures in bioartificial liver systems. *Biotechnol. Bioeng.* 2005. V. 92. P. 321–335.
31. Stokes A.N. Rapid oxygen entry into unperfused tissue slices: an experimental artefact? *Journal of Theoretical Biology*. 1976. V. 60. No. 2. P. 473–475.
32. Tekir S.D., Cakir T., Ulgen K.O. Analysis of enzymopathies in the human red blood cells by constraint-based stoichiometric modeling approaches. *Comp. Biol. Chem.* 2006. V. 30. No. 5. P. 327–338.
33. Uygun K., Matthew H.W.T., Huang Y. Investigation of metabolic objectives in cultured hepatocytes. *Biotechnol. Bioeng.* 2007. V. 97. P. 622–637.
34. Varma A., Boesch B.W., Palsson B.O. Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993. V. 42. No. 1. P. 59–73.
35. Yamaguchi Y., Yu Y. M., Zupke C., Yarmush D. M., Berthiaume F., Tompkins R. G., and Yarmush M. L. Effect of burn injury on glucose and nitrogen metabolism in the liver: Preliminary studies in a perfused liver system. *Surgery*. 1997. V. 121. P. 295–303.
36. Yokoyama T., Banta S., Berthiaume F., Nagrath D., Tompkins R.G., Yarmush M.L. Evolution of intrahepatic carbon, nitrogen, and energy metabolism in a D-galactosamine-induced rat liver failure model. *Metab. Eng.* 2005. V. 7. P. 88–103.

Рукопись поступила в редакцию 13.09.2016.

Дата опубликования 14.11.2016.