

На правах рукописи



Шадрин Константин Викторович

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА ПЕЧЕНЬЮ В
УСЛОВИЯХ *EX VIVO* ПЕРФУЗИИ ПРИ НОРМОКСИИ И ГИПОКСИИ**

03.03.01 – Физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Томск – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Савченко Андрей Анатольевич

Официальные оппоненты:

Ризниченко Галина Юрьевна, доктор физико-математических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биофизики, профессор

Позднякова Светлана Васильевна, доктор биологических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, профессор

Даренская Марина Александровна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», лаборатория патофизиологии, ведущий научный сотрудник

Защита состоится 12 ноября 2021 года в 12 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета НИ ТГУ.1.5.03, созданного на базе Института биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства (Биологического института) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36 (учебный корпус № 4 ТГУ, аудитория 022).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на официальном сайте федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» www.tsu.ru

Материалы по защите диссертации размещены на официальном сайте ТГУ: <https://dissertations.tsu.ru/PublicApplications/Details/2ec2e578-4153-48e5-8dcf-9a26e05dc87a>

Автореферат разослан « ____ » сентября 2021 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

Каб

Кабачкова Анастасия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время из-за нехватки донорской печени большое количество пациентов умирает в ожидании трансплантации, поэтому трансплантологи вынуждены имплантировать органы доноров с расширенными критериями [Shi et al., 2016; Ahmed et al., 2017; Núñez et al., 2018]. Для таких органов имеется высокий риск возникновения послеоперационных осложнений. Использование широко распространенной методики – хранение в холоде [Saeian, 2017; Jia et al., 2018] – для сохранения таких органов может привести к ранней дисфункции трансплантата [Demetris et al., 2016; Schlegel et al., 2018; Chamuleau et al., 2019], поэтому в качестве альтернативы предлагают использовать метод *ex vivo* перфузии (или машинной перфузии) [Nasralla et al., 2018; Jia et al., 2019; Dengu et al., 2020]. Использование такого способа поддержания функциональной активности трансплантата позволяет следить за динамикой физиологических и биохимических показателей печени в режиме реального времени [Averkiou et al., 2018; Scheuermann et al., 2019], оценивать текущее состояние органа и прогнозировать потенциальные риски послеоперационных осложнений [Nasralla et al., 2018]. Одним из наиболее важных факторов, определяющих длительность сохранения органа в условиях *ex vivo*, является обеспечение клеток печени необходимым количеством кислорода. Достаточный уровень оксигенации нужен, главным образом, для поддержания достаточного уровня АТФ в клетках [Eshmuminov et al., 2018; Minor et al., 2018; Van Erp et al., 2018]. Особенно это становится важным, если орган до этого длительное время находился в состоянии гипоксии [Shonaka et al., 2018; Gassner et al., 2019]. Адекватная доставка кислорода также важна и для корректной оценки метаболического состояния печени. При *ex vivo* перфузии в клетках печени расходуется большое количество энергии, которое необходимо для восстановления тканей после системных повреждений полученных, например, из-за болезней донора или опять же при гипоксии [Kakizaki et al., 2018]. Неадекватная оксигенация может приводить к серьезным нарушениям метаболизма перфузируемого органа и активации катаболических процессов [Barbas et al., 2016; Darius et al., 2020].

Проблема доставки кислорода к клеткам печени также остро стоит и при создании биоискусственной печени [Kashte et al., 2018; Starokozhko et al., 2018; Chen et al., 2019]. Одним из ключевых показателей метаболизма, по которым оценивают качество разработанной биоискусственной печени, является потребление кислорода гепатоцитами [Pizarro et al., 2018; Matsumoto et al., 2019]. Не последнюю роль при разработке дизайна и структуры биоискусственной печени, а также в оценке качества ее работы играет математическое моделирование. С его помощью можно предсказать наилучшую геометрическую структуру органа [Davidson et al., 2010, 2012; Knecht et al., 2018], оценить степень доставки кислорода к гепатоцитам [Orman et al., 2011; Chen et al., 2019] и качество функционирования субклеточных структур [Adam et al., 2018].

Особенно перспективным представляется использование математического моделирования при изучении метаболизма изолированной печени при *ex vivo* перфузии, т.к. экспериментально изучать протекание внутриклеточных процессов в условиях, в принципе отличающихся от условий *in vivo*, на целостных органах, не нарушая структуры их клеток, часто бывает затруднительно. Использование математических моделей позволяет анализировать протекание внутриклеточных метаболических процессов, основываясь на измерении внеклеточных показателей метаболизма [Cvitanovic et al., 2017; Tomaš et al., 2018; Rawls et al., 2019].

Современные методы поддержания функциональной активности печени в условиях *ex vivo* основаны на адекватной доставке питательных веществ и, главное, кислорода к клеткам лишь через сосудистую систему. В настоящее время показано, что печень в условиях *ex vivo* может поглощать до 42% кислорода через свою поверхность [Нефедов и др., 1990; Рупенко и др., 2008]. Учитывая, что до настоящего момента не решены проблемы, связанные как с недостаточной оксигенацией гепатоцитов при создании биоискусственной печени, так и с созданием подходящих условий перфузии с точки зрения доставки кислорода клеткам целостной печени [Morito et al., 2018; Scheuermann et al., 2019], стоит предположить, что для улучшения функциональной активности гепатоцитов при *ex vivo* перфузии следует дополнительно оксигенировать не только перфузионную среду, но и воздушную среду вокруг печени, чего на данный момент не осуществляют.

Степень разработанности темы исследования

В ряде современных исследований описаны особенности транспорта крупных молекул через поверхность печени. Была показана принципиальная возможность проникновения крупных молекул через поверхность печени [Kodama et al., 2012; Mine et al., 2014; Shimokawa et al., 2016], описано влияние объема [Nishida et al., 1997], вязкости [Nishida et al., 2000] и режима введения [Nishida et al., 2001] наносимого вещества и др. на скорость их абсорбции печенью. Также было показано влияние молекулярной массы вещества [Nishida et al., 1996] и наличия заболеваний органа [Nishida et al., 2003] на поглощающую способность поверхности печени.

Изучению поглощения печенью нейтральных молекул, в особенности кислорода, посвящено мало работ. В экспериментах на изолированной перфузируемой *ex vivo* печени крысы показали, что скорость поглощения кислорода через поверхность зависит от состава перфузионной среды, в частности от наличия переносчиков кислорода и вязкостных компонентов в перфузионной среде [Нефедов и др., 1990; Рупенко и др., 2008]. Также с использованием манометрического способа измерения скорости поглощения кислорода, выявлено, что скорость поглощения кислорода через поверхность может достигать до 42% от суммарной [Рупенко и др., 2008].

Указанные наблюдения свидетельствуют о том, что вещества проникают через поверхность печени в значительных количествах, и, как следствие, могут влиять на протекание внутриклеточных процессов (по крайней мере при *in situ* и *ex vivo* перфузии). Поэтому изучение

закономерностей поглощения органами и дальнейшего транспорта такого интенсивно метаболизируемого вещества, как кислород, в зависимости от компонентов перфузионной среды, вызывают большой интерес [Barbas et al., 2016; Adam et al., 2018; Matsumoto et al., 2019; Sorrell et al., 2019]. Использование же математических моделей при изучении кислородного метаболизма в основном направлено на определение динамики концентраций внутриклеточных метаболитов [Kelly et al., 2017; Bracken et al., 2019] и на получение распределения внутриклеточных метаболических потоков как в норме, так и при различных заболеваниях [Cvitanovic et al., 2017; Dunphy et al., 2018; Benfeitas et al., 2019; Rozendaal et al., 2019], однако особенности именно метаболизма печени в условиях, когда кислород может поглощаться через поверхность печени, изучены слабо.

Цель исследования: изучение закономерностей поглощения кислорода печенью в условиях *ex vivo* перфузии при нормальной и сниженной оксигенации перфузионной среды с учетом доставки кислорода через поверхность печени.

Задачи исследования:

1. Провести сравнение скорости поглощения кислорода через поверхность печени при нормальном снабжении органа кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды в условиях *ex vivo*.
2. Сравнить динамику показателей, отражающих метаболическую активность печени в условиях *ex vivo* при нормальном снабжении органа кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды с учетом процесса поглощения кислорода через поверхность печени.
3. Выявить взаимосвязь процесса поглощения кислорода через поверхность печени со значениями показателей, отражающих метаболическую активность печени в условиях *ex vivo* при нормальном снабжении органа кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды.
4. Оценить распределение внутриклеточных энергетических ресурсов между метаболическими потоками при нормальном снабжении органа кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды с учетом процесса поглощения кислорода через поверхность печени в условиях *ex vivo*.

Научная новизна

1. Впервые показано, что поглощение кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени как при нормальном снабжении кислородом, так и при гипоксии представляет собой энергосопряженный процесс.
2. Впервые построена потоковая модель метаболизма изолированной перфузируемой печени крысы, учитывающая поглощение кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени.
3. Впервые биохимические процессы, протекающие в клетках изолированной перфузируемой печени при нормальном снабжении

кислородом и при гипоксии, описаны законами Ципфа-Парето и Ципфа-Парето-Мандельброта.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты раскрывают важные аспекты функционирования печени в условиях *ex vivo*. Полученные знания фундаментального характера подчеркивают важность процесса поглощения кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени для метаболизма органа и для оценки его состояния. Полученные данные имеют большое значение при анализе влияния гипоксии на кислородный метаболизм изолированной перфузируемой печени.

Результаты могут быть использованы в трансплантологии для управления искусственным гомеостазом изолированной печени, а также при решении токсикологических и фармакологических задач с применением изолированной перфузируемой печени в качестве тест-системы. Полученные результаты могут послужить основой для разработки препаратов, усиливающих приспособительную функцию печени и ее регенеративный потенциал в условиях *ex vivo*.

Методология и методы исследования

В качестве экспериментального подхода в исследовании использовали метод управляемого культивирования изолированных органов методом перфузии, позволяющий поддерживать гомеостаз органа, выделенного из организма, длительное время. В качестве основного теоретического метода исследования использовали методы потокового моделирования, в частности, метод анализа баланса стационарных метаболических потоков (Flux Balance Analysis). Для определения согласованности распределения ресурсов в печени использовали методологию Парето об оптимальном распределении ресурсов (уравнения рангового распределения Ципфа-Парето и Ципфа-Парето-Мандельброта (его линейная аппроксимация)).

Положения, выносимые на защиту

1. При исследовании метаболизма и функциональной активности изолированной перфузируемой печени необходимо использовать данные о поглощении кислорода через поверхность органа.
2. Величина скорости поглощения кислорода через поверхность печени при нормальном снабжении кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды различна и связана с энергосопряженными процессами.
3. Распределение энергии в клетках печени в процессе *ex vivo* перфузии как при нормальной, так и при сниженной оксигенации перфузионной среды осуществляется оптимально.

Степень достоверности результатов исследования

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных теоретических и экспериментальных методов и методологических подходов, высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на 8 научных конференциях: на всероссийском симпозиуме с международным участием «Сложные системы в экстремальных условиях», Красноярск, 2014 г., 2016 г., 2018 г.; на российской конференции с международным участием «Экспериментальная и компьютерная биомедицина», г. Екатеринбург, 2016 г.; на 20-й Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2016 г.; на 22-й международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», г. Пущино, 2018 г.; на Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика», г. Пущино, 2018 г.; на «European Biotechnology Congress 2019», г. Валенсия, 2019 г.

По теме диссертации опубликованы 19 работ, в том числе 4 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (из них 1 статья в российском научном журнале, переводная версия которого входит в Web of Science, 1 статья в российском научном журнале, входящем в Scopus, и 2 статьи в российских научных журналах, переводные версии которых входят в Scopus), 1 публикация в сборнике материалов конференции, представленном в издании, входящем в Web of Science, 1 статья в прочем научном журнале, 12 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских (в том числе с международным участием) научных и научно-практических конференций, симпозиумов и совещаний; получено 1 свидетельство о регистрации программы для ЭВМ.

Личный вклад автора. Постановке цели и задач, решаемых в диссертационной работе, осуществлена автором совместно с научным руководителем. Получение экспериментальных результатов по изучению особенностей поглощения кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы, построение потоковой модели метаболизма печени, анализ распределения метаболических потоков, систематизация, обработка, интерпретация полученных данных и формулирование выводов по работе проводились автором лично.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованных источников, включающего 305 наименования. Работа изложена на 150 страницах, содержит 22 рисунка и 20 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы диссертации рассмотрены особенности функциональной морфологии печени, а также механизмы поглощения печенью кислорода и методы оценки ее физиологической активности в условиях *ex vivo*. Особое внимание уделено методам изучения метаболической активности печени с использованием математических моделей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Исследования проводили на изолированной перфузируемой печени крыс-самцов Wistar массой 200-250 г (24 животных и 12 животных для оценки жизнеспособности клеток печени до перфузии). Предварительно животные голодали в течение 24 часов при свободном доступе к воде. В качестве перфузионной среды использовали раствор Кребса-Рингера с добавлением аспарагиновой кислоты ($C[Asp]=0,2$ мМ) и хлористого аммония ($C[NH_4Cl]=5$ мМ).

Все животные были разделены на 2 группы:

- группа 1 (контроль) (12 животных) – выделенную печень интактных животных перфузировали средой, оксигенированной смесью кислорода (95%) и углекислого газа (5%) – (*Группа 95% O₂*);
- группа 2 (12 животных) – выделенную печень интактных животных перфузировали средой, оксигенированной смесью кислорода (14%), углекислого газа (5%) и азота (81%) – (*Группа 14% O₂*).

Перед началом экспериментов у всех экспериментальных животных из хвостовой вены были взяты образцы крови, в которых спектрофотометрически определяли активности ферментов АСТ (Vital, РФ) и АЛТ (Vital, РФ) для того, чтобы исключить наличие у экспериментальных животных некроза клеток печени или повреждения гепатоцитов.

Схема экспериментального исследования

Управляемое культивирование изолированной печени осуществляли с использованием установки «Гомеостат 3М», входящей в состав уникальной научной установки «Комплекс оборудования для управляемого культивирования изолированных органов», разработанной в МНЦИЭСО при КНЦ СО РАН (Регистрационный номер УНУ на портале <http://ckp-rf.ru/usu/413921> – 413921) [<http://ckp-rf.ru/usu/413921/>]. «Гомеостат 3М» относится к установкам с так называемым «незамкнутым» типом культивирования, когда перфузионная среда после прохождения через орган не поступает в него вторично [Гительзон и др., 1977]. Перфузируемый орган находился в камере для органа, воздушное пространство которой изолировано от внешней среды.

Выделенную печень помещали на подложку камеры для органа, в которой на протяжении перфузии поддерживали 100% влажность. Сосуды печени через канюли подключали к системе циркуляции перфузионной среды. В качестве «артерии» (вход перфузионной жидкости в орган) использовали воротную вену (v. portae), в качестве «вены» (выход перфузионной жидкости из органа) использовали нижнюю полую вену (v. cava inferior).

Для изучения процесса доставки кислорода через поверхность, в камеру для органа насосом с постоянной скоростью 15 мл/мин в течение всей перфузии осуществляли подачу газовой смеси кислорода (95%) и углекислого газа (5%).

Перфузию проводили в нормотермических условиях при 37°C при постоянной скорости потока перфузионной среды $2,5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$.

Длительность перфузии составляла 120 мин. В ходе экспериментов, начиная с 20-й мин перфузии, каждые 15 мин отбирали пробы перфузионной среды в «артериальной» и «венозной» магистралах.

Рассчитывали следующие показатели метаболической активности:

- удельные скорости потребления кислорода и выделения углекислого газа через сосудистое русло ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$);
- удельную скорость поглощения кислорода через поверхность печени ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$);
- удельные скорости поглощения глюкозы и выделения лактата ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$);
- удельную скорость выделения мочевины ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$).

Определение жизнеспособности клеток печени при *ex vivo* перфузии методом проточной цитометрии

Выделение гепатоцитов проводили методом ферментативного диспергирования печени с использованием коллагеназы II (Thermo Fisher, США) для разрушения межклеточных контактов. После получения суспензии клеток гепатоцитов, ее разводили DPBS до концентрации 1×10^6 клеток в мл. Для окраски брали 100 мкл суспензии и добавляли 10 мкл SYTO16 Green (Thermo Fisher, США). После чего инкубировали 15-20 минут. Далее в полученный раствор добавляли 2 мл DPBS для отмывки и центрифугировали 5 минут 1500 об/мин. Образовавшийся супернатант сливали, после чего к оставшейся суспензии добавляли 100 мкл DPBS, 10 мкл PO-Pro (Beckman Coulter, США) и 5 мкл DRAQ7 (Beckman Coulter, США) и инкубировали в течение 15-20 мин. В полученной суспензии с использованием проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) производили определение процента живых клеток, клеток, находящихся в стадии раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 клеток гепатоцитов. Для получения показателя исходного процента живых клеток до перфузии, описанные выше процедуры проводили для клинически здоровых животных (12 особей – «Фон») без предварительной перфузии печени.

Определение удельной скорости поглощения кислорода печенью при *ex vivo* перфузии

Парциальное давление кислорода в перфузионной жидкости и в воздушной среде камеры определяли амперометрическим методом с использованием электрода Кларка на приборе ABL800Flex (Radiometer, Дания).

Вычисление удельной скорости поглощения кислорода органом производили по формулам:

- для перфузионной среды

$$V_{O_2}^{\text{перфузат}} = \frac{v_{\text{перср}} \cdot (P_{\text{арт}} - P_{\text{вена}}) \cdot K_{\text{раст}}}{M \cdot P_{\text{атм}} \cdot t}, \quad (1)$$

где $v_{\text{перср}}$ — скорость тока перфузионной среды, мл/мин, $P_{\text{арт}}$ — парциальное давление кислорода в воротной вене, мм рт. ст., $P_{\text{вена}}$ — парциальное давление кислорода в вытекающей из органа перфузионной жидкости (в нижней полой вене), мм рт. ст., $K_{\text{раст}}$ — коэффициент растворимости кислорода в воде при температуре 37°C, (0,1118 г/л), M — молярная масса кислорода, г/моль, $P_{\text{атм}}$ — атмосферное давление, мм рт. ст., t — масса печени, г;

- для воздушной среды камеры

$$V_{O_2}^{\text{камера}} = \frac{v_{\text{возд}} \cdot (P_{\text{вход}} - P_{\text{камера}})}{V \cdot P_{\text{атм}} \cdot t}, \quad (2)$$

где $v_{\text{возд}}$ — скорость подачи газовой смеси в камеру, мл/мин, $P_{\text{вход}}$ — парциальное давление кислорода на входе камеры, мм рт. ст., $P_{\text{камера}}$ — парциальное давление кислорода в камере, мм рт. ст., $P_{\text{атм}}$ — атмосферное давление, мм рт. ст., t — масса печени, г, V — молярный объем (22,4 л/моль);

Суммарную скорость поглощения кислорода печенью определяли по формуле:

$$v_{O_2}^{\text{сумм}} = v_{O_2}^{\text{перфузат}} + v_{O_2}^{\text{камера}}. \quad (3)$$

Определение удельной скорости выделения углекислого газа

Парциальное давление углекислого газа в образцах перфузионной жидкости измеряли потенциометрически с использованием ABL800Flex (Radiometer, Дания). Скорость выделения углекислого газа определяли по формуле:

$$V_{CO_2}^{\text{перфузат}} = \frac{v_{\text{перср}} \cdot (P_{\text{вена}} - P_{\text{арт}}) \cdot K_{\text{раст}}}{M \cdot P_{\text{атм}} \cdot t}, \quad (4)$$

где $v_{\text{перср}}$ — скорость тока перфузионной среды, мл/мин, $P_{\text{арт}}$ — парциальное давление углекислого газа в воротной вене, мм рт. ст., $P_{\text{вена}}$ — парциальное давление углекислого газа в вытекающей из органа перфузионной жидкости (в нижней полой вене), мм рт. ст., $K_{\text{раст}}$ — коэффициент растворимости углекислого газа в воде при температуре 37°C, (0,57 г/л), M — молярная масса углекислого газа, г/моль, $P_{\text{атм}}$ — атмосферное давление, мм рт. ст., t — масса печени, г.

Определение удельной скорости поглощения глюкозы, выделения лактата и мочевины

Концентрации глюкозы и лактата в пробах перфузионной жидкости определяли амперометрическим методом с использованием прибора ABL800Flex (Radiometer, Дания).

Определение концентрации мочевины в пробах перфузионной жидкости осуществляли уреазным методом с использованием спектрофотометра.

Скорости поглощения глюкозы, выделения лактата и мочевины ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$) определяли по формуле:

$$v = \frac{v_{\text{пер ср}} \cdot (C_{\text{арт}} - C_{\text{вена}})}{m}, \quad (5)$$

где $v_{\text{пер ср}}$ — скорость тока перфузионной среды, л/мин, $C_{\text{арт}}$ — концентрация соответствующего метаболита в воротной вене, ммоль/л, $C_{\text{вена}}$ — концентрация соответствующего метаболита в нижней полой вене), ммоль/л, m — масса печени, г.

Потоковая модель метаболизма изолированной перфузируемой печени

Построение потоковой модели метаболизма изолированной перфузируемой печени проводили с использованием метода баланса стационарных метаболических потоков [Дроздов-Тихомиров и др., 1986; Varma et al., 1993]. Неизвестными в уравнениях модели выступали потоки (скорости реакций образования или расходования метаболитов). Для однозначного определения величин неизвестных метаболических потоков использовали метод линейного программирования.

Определение степени согласованности распределения энергетических ресурсов при управляемом культивировании печени

Использовали уравнение Ципфа-Парето и линейную аппроксимацию уравнения Ципфа-Парето-Мандельброта [Суховольский, 2004].

В качестве входных данных для модели использовали величины метаболических потоков, полученные в результате потокового моделирования.

Для каждого органа каждой экспериментальной группы на координатную плоскость наносили ранжированные от большего к меньшему значения величины метаболического потока в зависимости от его ранга:

- для закона Ципфа-Парето – зависимость логарифма величины метаболического потока от логарифма ранга;
- для закона Ципфа-Парето-Мандельброта – зависимость логарифма величины метаболического потока от ранга.

Далее, нанесенные на координатную плоскость точки аппроксимировали уравнениями Ципфа-Парето или линейной аппроксимацией уравнения Ципфа-Парето-Мандельброта. Соответствие распределения метаболических потоков конкретному закону и степень согласованности распределения энергетических ресурсов определяли по величине коэффициента детерминации R^2 аппроксимирующей прямой.

Методы статистической обработки данных

Статистический анализ данных проводили на персональном компьютере с использованием пакетов MS Office, MS Excel, пакета программ Statistica 10.0 for Windows компании Statsoft. Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Шапиро-Уилка. Данные считали распределенными по нормальному закону при доверительной вероятности $p > 0,05$. Данные, соответствующие закону нормального распределения представлены в виде среднего арифметического ($\bar{x}$) и стандартного отклонения (σ), как $\bar{x} \pm \sigma$. Данные, не подчиняющиеся

закону нормального распределения представлены в виде медианы (Me). первого (Q1) и третьего (Q3) квартилей, как $Me [Q1; Q3]$.

На динамических кривых значения представлены в виде $\bar{x} \pm t_{f,a} \cdot SE$, где $\bar{x}$ – среднее арифметическое, SE – стандартная ошибка, $t_{f,a}$ – табличное значения коэффициента Стьюдента при числе степеней свободы $f = n - 1$ и уровне значимости $\alpha=95\%$. Одновыборочный t-критерий Стьюдента использовали для выявления тех интервалов времени, где скорость поглощения кислорода печенью через кровяное русло оставалась постоянной в течение перфузии. Сравнение экспериментальных групп проводили с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок и F-критерия Фишера.

Для оценки связи между рядами динамических данных использовали методы автокорреляционного и корреляционного анализа.

Оценку связи между ранговыми данными осуществляли с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка динамики показателей метаболической активности печени в условиях *ex vivo*

Оценка функционального состояния органов. Значения активностей АЛТ и АСТ, отобранные у экспериментальных животных соответствовали значениям для здоровых крыс Wistar, что свидетельствовало об отсутствии у экспериментальных животных заболеваний печени (табл. 1).

Таблица 1 – Активности ферментов АЛТ и АСТ у экспериментальных животных (всего 36 особей) и диапазон нормы, согласно референсным значениям (результаты представлены в виде $Me [Q1; Q3]$)

Фермент	Измеренные значения, Ед/л	Норма, Ед/л
АЛТ	35,1 [28,5; 42,0]	19–53
АСТ	92,0 [68,3; 137,0]	63–157

Оценка жизнеспособности гепатоцитов для каждой экспериментальной группы показала, что статистически значимых различий между процентами живых клеток до и после перфузии для обеих групп не обнаружено (табл. 2 и 3).

Таблица 2 – Сравнение процента живых клеток печени до и после перфузии для «Группы 95% O_2 » (результаты представлены в виде $\bar{x} \pm \sigma$)

Группы	Процент живых клеток	p-value
«Фон»	74,41±5,26 p-value=0,313	0,632
«Группа 95% O_2 »	73,37±5,20 p-value=0,849	

Таблица 3 – Сравнение процента живых клеток печени до и после перфузии для «Группы 14% O₂» (результаты представлены в виде $\bar{x} \pm \sigma$)

Группы	Измеренные значения	p-value
«Фон»	74,41±5,26 p-value=0,313	0,255
«Группа 14% O ₂ »	70,96±8,77 p-value=0,051	

Можно заключить, что все экспериментальные животные были здоровы, повреждения гепатоцитов отсутствовали, жизнеспособность клеток печени не отличалась от исходного уровня на протяжении всей перфузии.

Определение общего количества поглощенного печенью кислорода в условиях *ex vivo*. Скорость поглощения кислорода через сосудистое русло печенью животных для «Группы 95% O₂» на протяжении всей перфузии составляла в среднем 2,64 мкмоль·мин⁻¹·г⁻¹ (рис. 1а). Было выявлено, что всю динамическую кривую можно разделить на три временных интервала: с 20 по 35 мину, с 50 по 95 мину и с 110 по 120 мину. В пределах указанных временных интервалов скорость поглощения кислорода остается постоянной. Такие же временные интервалы можно выделить для «Группы 14% O₂». Скорость поглощения кислорода органом в этой группе в среднем меньше в 3 раза по сравнению со скоростью поглощения кислорода в «Группе 95% O₂». В каждый момент времени между группами существуют статистически значимые различия.

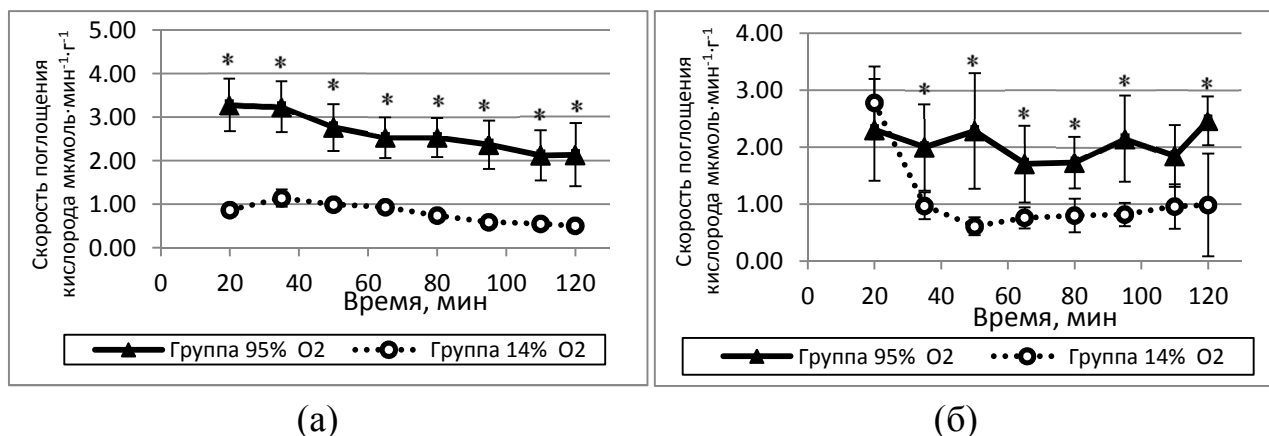


Рисунок 1 – Удельная скорость поглощения кислорода изолированной перфузируемой печенью крысы при различных условиях оксигенации перфузионной среды: (а) – через сосудистое русло, (б) – через поверхность. Сплошная линия – нормальное снабжение кислородом, оксигенация смесью O₂/CO₂ (95%/5%), n=12; пунктирная линия – нормобарическая гипоксия, оксигенация смесью N₂/O₂/CO₂ (81%/14%/5%), n=12; * – указывает на статистически значимые (p<0,05) различия между группами

Удельная скорость поглощения кислорода через поверхность печени в «Группе 95% O₂» остается неизменной на протяжении всей перфузии и

составляет в среднем $2,06 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ (рис. 1б). При перфузии печени средой со сниженным содержанием кислорода («Группа 14% O_2 »), на 20-й мин скорость неотличима от скорости для «Группы 95% O_2 », но к 35-й мин и до конца перфузии снижается в 2 раза. При этом с 35-й минуты и до конца перфузии скорость поглощения кислорода через поверхность не изменяется.

При сравнении экспериментальных групп получено, что в интервале времени 50-95 минуты наблюдаются статистически значимые различия скорости поглощения кислорода через поверхность ($p < 0,05$).

Скорость поглощения кислорода изолированным органом через поверхность составляет в среднем $2,06 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для «Группы 95% O_2 ». Эта величина составляет около 40 % от общей скорости поглощения кислорода в этой группе. Эти значения согласуются с данными Нефедова и Рупенко, полученными с использованием манометрического метода измерения скорости поглощения кислорода [Нефедов и др, 1990; Рупенко и др., 2008].

Суммарная величина скорости поглощения кислорода при нормоксии («Группа 95% O_2 ») составляет в среднем $4,70 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$, а при гипоксии («Группа 14% O_2 ») это величина в 2,5 раза меньше. При этом доля величины скорости поглощения кислорода через поверхность от суммарной величины при гипоксии наоборот больше (табл. 4).

Таблица 4 – Удельная скорость поглощения кислорода изолированной перфузируемой печенью

	Группа 95% O_2	Группа 14% O_2
Через сосудистое русло ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$)	$2,64 \pm 0,18$	$0,84 \pm 0,09$
Через поверхность ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$)	$2,06 \pm 0,24$	$1,08 \pm 0,62$
Суммарная ($\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$)	$4,70 \pm 0,30$	$1,88 \pm 0,65$
Доля величины скорости поглощения кислорода через поверхность от суммарной величины	0,44	0,57

Значения доли величины скорости поглощения кислорода через поверхность от суммарной величины свидетельствуют о важности процесса поглощения кислорода через поверхность для оксигенации печени как при нормоксии, так и при гипоксии.

Описание динамики показателей, отражающих метаболическую активность печени в условиях *ex vivo*. Органы обеих групп выделяют углекислый газ на протяжении всей перфузии (рис. 2а). Между значениями внутри каждой группы статистически значимых различий не выявлено. При сравнении групп статистически значимые различия наблюдали только на 35 минуте. Можно заключить, что скорость выделения углекислого газа неизменна в течение всей перфузии и составляет в среднем $2,70 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для «Группы 95% O_2 » и $1,24 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ для «Группы 14% O_2 ».

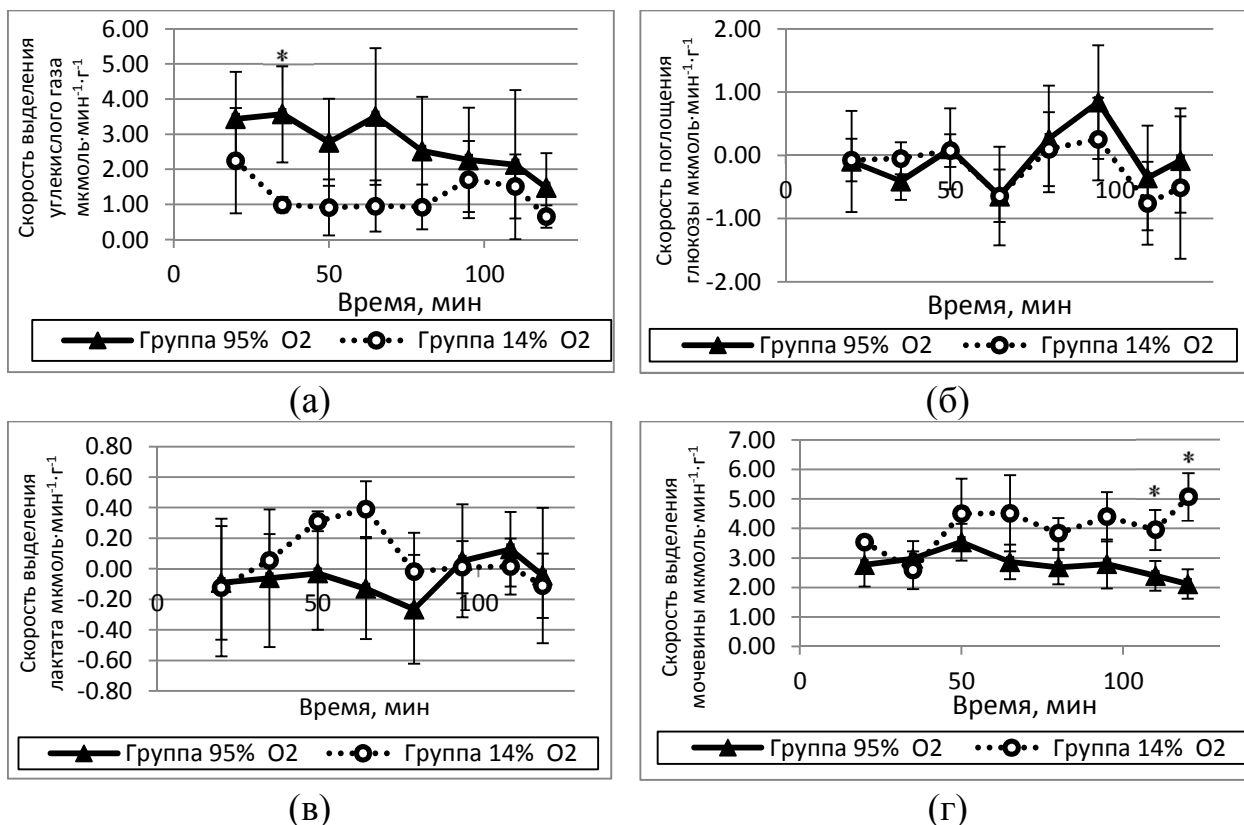


Рисунок 2 – Удельные скорости (а) – выделения углекислого газа, (б) – поглощения глюкозы, (в) – выделения лактата, (г) – выделения мочевины изолированной перфузируемой печенью крысы при различных условиях оксигенации перфузионной среды. Сплошная линия – нормальное снабжение кислородом, оксигенация смесью O₂/CO₂ (95%/5%), $n=12$; пунктирная линия – нормобарическая гипоксия, оксигенация смесью N₂/O₂/CO₂ (81%/14%/5%), $n=12$; * – указывает на статистически значимые ($p<0,05$) различия между группами

В среднем величина скорости поглощения глюкозы составляет -0,05 для «Группы 95% O₂» и -0,20 для «Группы 14% O₂», что свидетельствует о том, что скорее в процессе перфузии происходило выделение глюкозы в перфузионную среду (рис. 2б).

Величина скорости выделения лактата в перфузионную среду в среднем составляет -0,06 для «Группы 95% O₂» и 0,06 для «Группы 14% O₂», что свидетельствует о том, что при сниженном содержании кислорода в подаваемой перфузионной среде происходит выделение лактата, чего не наблюдается при нормальной ее оксигенации (рис. 2в).

Органы животных обеих экспериментальных групп выделяют мочевину на протяжении всей перфузии (рис. 2г). Статистически значимых колебаний уровня выделяемой мочевины не наблюдается (различия присутствуют только на 110-й и 120-й минутах). Однако, начиная с 50-й минуты и до конца перфузии, скорость выделения мочевины в «Группы 14% O₂», т.е. при гипоксии, в целом выше, чем при нормальном снабжении кислородом.

Таким образом, величины скоростей поглощения глюкозы и выделения лактата изолированной перфузируемой печенью в каждой

экспериментальной группе не имеют статистически значимых различий. Также не различаются и группы между собой. В период времени с 35-й по 95-ю минуты печень находится в стационарном состоянии.

Взаимосвязь процесса поглощения кислорода через поверхность печени со значениями показателей, отражающих метаболическую активность печени в условиях *ex vivo*. Было получено, что для обеих экспериментальных групп в динамическом ряду для скорости поглощения кислорода через сосудистое русло присутствует основная тенденция (тренд), т.к. выявлена статистически значимая средняя заметная связь на лаге 1: «Группа 95% O_2 » – $r=0,629$ ($p<0,05$); «Группа 14% O_2 » – $r=0,660$ ($p<0,05$) (табл. 5).

Таблица 5 – Значения коэффициентов автокорреляции рядов динамики для удельной скорости поглощения кислорода через сосудистое русло (жирным выделены статистически значимые коэффициенты)

Группа	Лаг	Коэффициент автокорреляции	Стандартная ошибка	p -value
Группы 95% O_2	1	0,629	0,296	0,034
	2	0,155	0,274	0,089
	3	-0,044	0,250	0,182
Группы 14% O_2	1	0,660	0,296	0,026
	2	0,258	0,273	0,053
	3	-0,183	0,250	0,093

Для остальных показателей значения коэффициентов автокорреляции статистически не значимы.

Для оценки связи между рядами динамики скорости поглощения кислорода через поверхность и остальными показателями синтетической активности вычислены коэффициенты корреляции между этими рядами. Известно, что если в одном из сравниваемых рядов присутствует основная тенденция, то это занижает оценку взаимосвязи при статистически значимых значениях коэффициента корреляции. В данном случае это имеет место при сравнении показателей удельные скорости поглощения кислорода через поверхность и через сосудистое русло, поскольку у последнего показателя наблюдали тенденцию для обеих групп. Однако, как для «Группы 95% O_2 », так и для «Группы 14% O_2 », статистически значимой корреляции не выявлено.

В итоге можно заключить, что между удельной скоростью поглощения кислорода через поверхность и удельными скоростями поглощения кислорода через сосудистое русло, выделения углекислого газа, поглощения глюкозы, выделения лактата и мочевины как при нормальном снабжении печени кислородом, так и при сниженной оксигенации перфузионной среды отсутствует статистически значимая связь. Это может свидетельствовать о возможной взаимосвязи процесса поглощения кислорода через поверхность и внутриклеточных процессов в изолированной печени.

Влияние процесса поглощения кислорода через поверхность печени в условиях *ex vivo* на распределение внутриклеточных энергетических ресурсов

Определение структуры метаболической системы изолированной перфузируемой печени. В модель были включены следующие метаболические процессы: гликолиз и глюконеогенез, метаболизм гликогена, цикл Кребса, цикл мочевины, цепь переноса электронов, влияние бикарбонатного буфера на выход углекислого газа [Chalhoub et al., 2007; Lee et al., 2000; Lee et al., 2003; Goudar et al., 2010].

Для связи потока, описывающего поток кислорода через поверхность, с количеством затрачиваемых молекул АТФ (в молях), принимая во внимание отрицательную корреляцию между уровнем АТФ в клетках печени и скоростью поглощения кислорода [Нефедов и др., 1990], стехиометрический коэффициент определили равным 1 для кислорода, поглощаемого печенью через поверхность, и равным $-n$ для АТФ; n обозначает количество молекул АТФ, расходуемых печенью одновременно с поглощением кислорода через поверхность.

Модель состояла из 14 уравнений и 23 неизвестных (соответствует числу метаболических потоков). Для нахождения величин неизвестных метаболических потоков имеющуюся систему уравнений модели дополнили ограничениями на величины известных метаболических потоков, полученными на основе экспериментальных данных и знания о термодинамике реакций, а также сформулировали целевую функцию, определяемую исходя из физиологических функций печени.

Выбор целевой функции и ограничений на метаболические потоки.

Распределение величин метаболических потоков в изолированной перфузируемой печени крысы вычисляли для трех целевых функций:

- целевая функция №1 – Максимальная продукция АТФ [Ramakrishna, 2001] (использовали для определения числа n – количества молекул АТФ, расходуемых печенью одновременно с поглощением кислорода через поверхность);
- целевая функция №2 – Максимальная скорость выделения мочевины (дополнительная) [Uygun, 2007] (использовали для определения максимальной величины потока, описывающего выделение мочевины);
- целевая функция №3 – Максимальные продукция АТФ (основная) и выделение мочевины [Sharma, 2005] (использовали для определения итогового распределения метаболических потоков и анализа направления метаболических процессов).

В качестве ограничений использовали наибольшие и наименьшие значения, формируемые доверительным интервалом, удельных скоростей потребления кислорода и выделения углекислого газа, скоростей продукции глюкозы, лактата и мочевины на интервале с 35-й по 95-ю минуты, полученные в результате статистического анализа экспериментальных данных.

Результаты потокового моделирования. В результате решения оптимизационной задачи для целевой функции №1 было получено, что в контрольной группе (*Группа 95% O₂*) поглощение одного моля кислорода сопровождается гидролизом 2 молекул АТФ, в группе, где орган перфузировали средой с низким содержанием кислорода (*Группа 14% O₂*) – 7 молекул. Эти величины использовали в стехиометрической матрице вместо числа n при решении оптимизационных задач для целевых функций №2 и №3. Важно отметить, что энергия гидролиза АТФ не обязательно будет расходоваться на сам процесс переноса кислорода через поверхность печени. В литературе имеются данные о том, что межклеточная жидкость может принимать активное участие в транспорте растворенных в ней веществ [Gonzalez et al., 2018; Jena et al., 2018; Krüger et al., 2018]. АТФ может расходоваться, например, на поддержание потоков межклеточной жидкости [Лукьянова и др., 1981; Benias et al., 2018], открытие каналов аквапоринов [Hoogewijs et al., 2016; Gena et al., 2017; Rodriguez-Grande et al., 2018], что может быть связано с поглощением кислорода печенью через поверхность.

При проведении многокритериальной оптимизации при решении оптимизационной задачи для целевой функции №3 в качестве основной целевой функции использовали максимизацию продукции АТФ клетками печени, а в качестве дополнительной – максимизацию выделения мочевины (максимальной значение величины потока, описывающего выделение мочевины, получено при решении оптимизационной задачи для целевой функции №2). Результат представлен на рисунке 3.

Из рисунка можно видеть, что в печени как при нормоксии (*Группа 95% O₂*), так и при гипоксии (*Группа 14% O₂*) преобладают процессы гликолиза (потоки v_5 , v_6 равны 0, а v_1 , v_2 и v_9 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 [Ньюсхолм, 1977], где обсуждается вопрос об отсутствии синтеза гликогена в печени крыс уже после 12 часов голодания.

Во всех экспериментальных группах наблюдается выделение лактата (v_{17}) в перфузионную среду. В контроле скорость выделения лактата составляет в среднем $-0.02 \text{ мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$, что свидетельствует о том, что лактат скорее не выделяется в среду и не поглощается из нее.

Скорости реакций цикла Кребса (v_{10}) и окислительного фосфорилирования (v_{14}) наибольшие в *Группе 95% O₂* больше, чем в *Группе 14% O₂*. Эти отличия в основном отражают наблюдаемые различия в скорости поглощения кислорода через сосудистое русло и выражаются в схожих различиях в скорости поглощения кислорода через поверхность и в интенсивности потока в цепи переноса электронов (v_{14}).

Наибольшая скорость продукции мочевины (v_{13}) наблюдается в *Группе 95% O₂*. Это согласуется с данными, полученными Orman et al. [Orman, 2011]. Однако, авторы указывали меньшие величины потока через цикл

мочевины. Это вероятно происходило потому, что в отличие от наших экспериментов авторы не добавляли в среду аммоний.

Величина скорости поглощения 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 гипоксии.

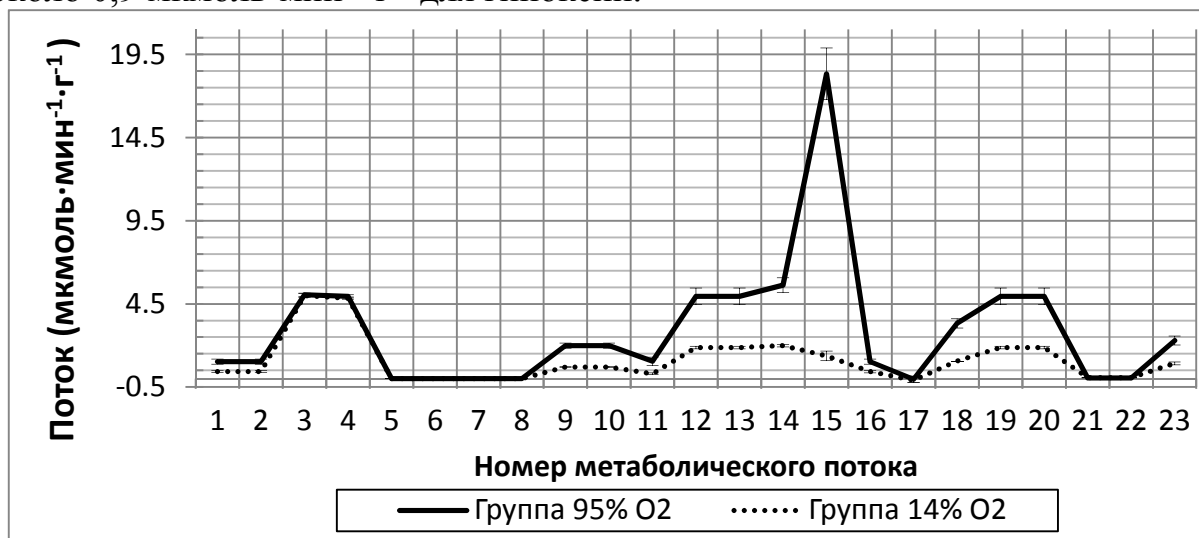


Рисунок 3 – Вычисленные величины метаболических потоков для контрольной группы (Группа 95% O₂), для группы, в которой печень перфузировали средой с низким содержанием кислорода (Группа 14% O₂) для целевой функции №3

Распределение энергетических ресурсов в изолированной перфузируемой печени. Для количественной оценки согласованности распределения энергетических ресурсов между метаболическими потоками в качестве уравнений модели распределения энергетических ресурсов использовали уравнения Ципфа-Парето и линейную аппроксимацию уравнения Ципфа-Парето-Мандельброта. Для построения модели использовали величины метаболических потоков, полученные в результате решения задачи многокритериальной оптимизации для потоковой модели.

Модель распределения энергетических ресурсов строили отдельно для каждого органа всех экспериментальных групп. Из всех значений метаболических потоков, полученных в результате решения задачи многокритериальной оптимизации, выбрали те, для протекания которых необходимо присутствие макроэнергетических соединений (АТФ, АДФ).

Для описания распределения энергетических ресурсов при нормоксии использовали распределение Ципфа-Парето. При снижении содержания кислорода в перфузионной среде, т.е. в случае, когда печень подвержена воздействию внешних факторов, использовать это уравнение нельзя [Суховольский, 2004]. В этом случае для описания распределения энергетических ресурсов использовали уравнение Ципфа-Парето-Мандельброта в его линейном приближении. (Далее под уравнением Ципфа-Парето-Мандельброта понимали именно его линейное приближение.) Определяя величину коэффициента детерминации (R^2) делали вывод о степени согласованности распределения энергетических ресурсов в печени.

В таблице 6 представлены статистические характеристики коэффициента детерминации R^2 прямых, описываемых уравнениями Ципфа-Парето и Ципфа-Парето-Мандельброта, для каждой экспериментальной группы.

Таблица 6 – Статистические характеристики коэффициента детерминации (R^2) для каждой экспериментальной группы

Статистическая характеристика	Название группы и используемое распределение	
	<i>Группа 95% O₂</i>	<i>Группа 14% O₂</i>
	Ципфа-Парето	Ципфа-Парето-Мандельброта
Среднее арифметическое	0,96	0,94
Медиана	0,96	0,94
Стандартная ошибка	0,01	0,03
Доверительный интервал, при $p < 0.05$	0,02	0,06
Коэффициент вариации, %	1,7	5,7

Из таблицы видно, что ранговое распределение энергозависимых метаболических потоков хорошо аппроксимируется линейной функцией. Состояние гипоксии (*Группа 14% O₂*) лучше описывается уравнением Ципфа-Парето-Мандельброта. Среднее значение коэффициента детерминации для *Группы 14% O₂* составляет 0,94. Для *Группы 95% O₂* – 0,96. Высокие значения коэффициента детерминации уравнения Ципфа-Парето для *Группы 95% O₂* свидетельствует о том, что при нормальном снабжении кислородом изолированного органа его метаболическая система работает оптимально и энергетический ресурс распределяется наиболее эффективно и конкуренция идет только за один энергетический ресурс.

При снижении концентрации кислорода в подаваемой в орган перфузионной среде (*Группа 14% O₂*) коэффициент детерминации также высок, однако ранговое распределение метаболических потоков описывается уравнением Ципфа-Парето-Мандельброта, что можно объяснить присутствием внешнего экстремального воздействия – гипоксии.

Высокие значения коэффициентов детерминации свидетельствуют о том, что распределение внутри органа кислорода, поглощенного через поверхность печени, происходит с затратами энергии, что не противоречит оптимальному распределению энергетических ресурсов в органе как в нормоксии, так и при гипоксии.

Существуют мнения о том, что убедительных данных относительно предположения о возможности активного транспорта кислорода через биологические мембраны нет. 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 [Coulter, 1958; Stokes, 1976], так и для клеток млекопитающих [Иванов, 1993; Stokes, 1976].

Для создания необходимой интенсивности потока жидкости, обеспечивающей адекватную доставку кислорода как при нормоксии, так и при гипоксии, необходима энергия, которая расходуется на создание потоков межклеточной жидкости необходимой интенсивности. В состоянии гипоксии для восполнения дефицита кислорода в органе необходимо больше энергии, которая расходуется на создание потоков межклеточной жидкости, чтобы распределить имеющийся кислород между клетками.

Таким образом, можно отметить исключительную важность процесса поглощения кислорода через поверхность печени в поддержании ее функциональной активности в условиях *ex vivo* как при нормоксии, так и при гипоксии через дополнительную доставку кислорода для оксигенации клеток. Поэтому при проведении *ex vivo* перфузии для улучшения функциональной активности гепатоцитов следует дополнительно оксигенировать не только перфузионную среду, но и воздушную среду вокруг печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет сформулировать следующие выводы:

1. Недостаток кислорода в перфузионной среде приводит к снижению скорости поглощения кислорода через поверхность печени и к увеличению ее доли относительно скорости поглощения через кровяное русло по сравнению с нормальным снабжением органа кислородом.

2. Перфузируемая *ex vivo* печень находилась в стационарном состоянии как при нормальной, так и при сниженной оксигенации перфузионной среды с 35-й по 95-ю минуты перфузии, что являются свидетельством адекватности проведения *ex vivo* перфузии и адаптации печени к условиям гипоксии. В течение указанного времени между группами отсутствуют статистически значимые различия по таким внеклеточным показателям метаболической активности печени как поглощение глюкозы и выделение углекислого газа, лактата и мочевины. Статистически значимые различия между группами присутствуют только по показателям скорости поглощения кислорода через сосудистое русло и через поверхность печени.

3. Между скоростью поглощения кислорода через поверхность и основными внеклеточными показателями метаболической активности печени (скорости поглощения кислорода через сосудистое русло, выделения углекислого газа, поглощения глюкозы, выделения и лактата и мочевины) как при нормальном снабжении печени кислородом, так и при сниженной оксигенации перфузионной среды отсутствует статистически значимая связь. Это объясняется связью процесса поглощения кислорода через поверхность печени с внутриклеточными обменными процессами.

4. Распределение энергии в клетках печени в процессе *ex vivo* перфузии при нормоксии и при гипоксии осуществляется оптимально. Величина скорости поглощения кислорода через поверхность печени при нормальном снабжении кислородом и при сниженной оксигенации перфузионной среды различна и связана с энергосопреженными процессами, которые отражают интенсивность межклеточных обменных процессов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук:

1. **Шадрин К. В.** Устройство и способ определения скорости потребления кислорода изолированной перфузируемой печенью крысы / К. В. Шадрин, В. Г. Пахомова, О. В. Крюкова, А. П. Рупенко // Медицинская техника. – 2017. – № 1(301). – С. 38–40.

в переводной версии журнала, входящей в Scopus:

Shadrin K. V. A device and a method for determining the rate of oxygen consumption by an isolated perfused rat liver / K. V. Shadrin, V. G. Pakhomova, O. V. Kryukova, A. P. Rupenko // Biomedical Engineering. – 2017. – Vol. 51, is. 1. – P. 52–55. – DOI: 10.1007/s10527-017-9683-x.

2. Пахомова В. Г. Реакция печени крысы на нормобарическую гипоксию, моделированную in vivo и in vitro / В. Г. Пахомова, **К. В. Шадрин**, А. П. Рупенко, О. В. Крюкова, И. И. Моргулис // Биофизика. – 2017. – Т. 62, № 4. – С. 777–783.

в переводной версии журнала, входящей в Scopus:

Pakhomova V. G. The response of the rat liver to normobaric hypoxia stimulated in vivo and in vitro / V. G. Pakhomova, **K. V. Shadrin**, A. P. Rupenko, O. V. Krukova, I. I. Morgulis // Biophysics. – 2017. – Vol. 62, is. 4. – P. 636–640. – DOI: 10.1134/S0006350917040169.

3. **Шадрин К. В.** Стехиометрическое моделирование безэритроцитного транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы / К. В. Шадрин, В. Г. Пахомова, А. П. Рупенко, О. В. Крюкова, Р. Г. Хлебопрос // Математическая биология и биоинформатика. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 263–277. – DOI: 10.17537/2016.11.263.

Scopus: **Shadrin K. V.** Stoichiometric modeling of oxygen transportation through the surface of isolated perfused rat liver / K. V. Shadrin, V. G. Pakhomova, A. P. Rupenko, O. V. Kryukova, R. G. Khlebopros // Mathematical Biology and Bioinformatics. – 2016. – Vol. 11, № 2. – P. 263–277.

4. **Шадрин К. В.** Особенности транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы / К. В. Шадрин, И. И. Моргулис, В. Г. Пахомова, А. П. Рупенко, Р. Г. Хлебопрос // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 464, № 3. – С. 369–372. – DOI: 10.7868/S0869565215270250.

в переводной версии журнала, входящей в Web of Science:

Shadrin K. V. Characteristics of oxygen transport through the surface of the isolated perfused rat liver / K. V. Shadrin, I. I. Morgulis, V. G. Pakhomova, A. P. Rupenko, R. G. Khlebopros // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2015. – Vol. 464, is. 1. – P. 298–300.

Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ:

5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2020613157. Pareto Flux / **Шадрин К. В.** (RU), Пахомова В. Г. (RU), Рупенко А. П. (RU); правообладатель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (RU). Заявка № 2020612041; дата поступления – 26.02.2020; дата государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ – 11.03.2020.

Публикация в сборнике материалов конференции, представленном в издании, входящем в Web of Science:

6. Shadrin K. V. Mathematical modelling of metabolic activity of an isolated perfused rat liver under different oxygenation of the perfusion medium / K. V. Shadrin, V. G. Pakhomova, O. V. Kryukova, A. P. Rupenko // Journal of Biotechnology. – 2019. – Vol. 305 : European Biotechnology Congress. Valencia, Spain, April 11–13, 2019 – P. S17. – DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.05.072.

Публикации в прочих научных изданиях:

7. **Шадрин К. В.** Математическое моделирование метаболической активности изолированной перфузируемой печени крысы в условиях сниженной оксигенации перфузионной среды / К. В. Шадрин, В. Г. Пахомова, О. В. Крюкова, А. П. Рупенко // Математическая биология и биоинформатика : доклады VII Международной конференции. Пущино, 14–19 октября 2018 г. – Москва, 2018. – С. e19.1–e19.5. – DOI: 10.17537/icmbb18.36.

8. **Шадрин К. В.** Способ определения удельной скорости поглощения кислорода печенью при управляемом культивировании / К. В. Шадрин // Сложные системы в экстремальных условиях : материалы XIX Всероссийского симпозиума с международным участием. Красноярск, 20–23 августа 2018 г. – Красноярск, 2018. – С. 248–250.

9. **Шадрин К. В.** Оценка состояния энергетического метаболизма изолированного перфузируемого органа при гипоксии с использованием математического моделирования / К. В. Шадрин // Биология – наука XXI века : тезисы 22-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. Пущино, 23–27 апреля 2018 г. – 2018. – С. 441–442.

10. **Шадрин К. В.** Выявление универсального параметра для оценки особенностей энергетического метаболизма изолированного перфузируемого органа при гипоксии / К. В. Шадрин, В. Г. Пахомова, О. В. Крюкова, А. П. Рупенко // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – Т. 3 (70). – С. 99–102. – DOI: 10.5281/zenodo.817851.

11. **Шадрин К. В.** Модель распределения энергетических ресурсов в метаболической сети изолированной перфузируемой печени крысы / К. В. Шадрин // Сложные системы в экстремальных условиях : тезисы докладов XVIII Всероссийского симпозиума с международным участием. Красноярск, 08–14 августа 2016 г. – Красноярск, 2016. – С. 93.

12. **Шадрин К. В.** Экспериментальное исследование и математическое моделирование транспорта кислорода через поверхность изолированное

перфузируемой печени крысы / К. В. Шадрин // Биология – наука XXI века : тезисы 20-ой Международной школы-конференции молодых ученых. Пущино, 18–22 апреля 2016 г. – 2016. – С. 95.

13. **Shadrin K.** Stoichiometric modeling of oxygen transport through the surface of the isolated perfused rat liver at various oxygenation condition [Electronic resource] / K. Shadrin, V. Pakhomova, A. Rupenko // Experimental and computational biomedicine : Russian Conference with International Participation in memory of Professor Vladimir S. Markhasin. – Ekaterinburg, April 10–12, 2016. – Ekaterinburg, 2016. – P. 57. – URL: https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/38013/3/978-5-7996-1739-4_2016.pdf (access date: 23.02.2021).

14. **Шадрин К. В.** Математическое моделирование транспорта кислорода через поверхность печени в условиях изолированной перфузии / К. В. Шадрин // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины : материалы VI Международной научно-практической конференции. Ростов-на-Дону, 01–03 октября 2015 г. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 62–63.

15. Пахомова В. Г. Влияние гипоксической и гистотоксической гипоксии in vitro на параметры жизнедеятельности печени крысы в условиях управляемой перфузии изолированного органа / В. Г. Пахомова, **К. В. Шадрин**, А. П. Рупенко, И. И. Моргулис // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины : материалы VI Международной научно-практической конференции. Ростов-на-Дону, 01–03 октября 2015 г. – Ростов-на-Дону, 2015. – С. 270.

16. **Шадрин К. В.** Транспорт кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени: стехиометрическая модель / К. В. Шадрин // ВНКСФ-21 : материалы Двадцать первой Всероссийской научной конференции студентов-физиков и молодых ученых. Омск, 26 марта – 02 апреля 2015 г. – Омск, 2015. – С. 373–374.

17. **Шадрин К. В.** Использование Flux Balance Analysis для моделирования транспорта кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы / К. В. Шадрин, И. И. Моргулис, В. Г. Пахомова, А. П. Рупенко, Р. Г. Хлебопрос // Математическая биология и биоинформатика : доклады V Международной конференции. Пущино, 19–24 октября 2014 г. – Москва, 2014. – С. 130–131.

18. **Шадрин К. В.** Транспорт кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы энергозависим / К. В. Шадрин // Сложные системы в экстремальных условиях : тезисы докладов XVII Всероссийского симпозиума с международным участием. Красноярск, 27 июля – 02 августа 2014 г. – Красноярск, 2014. – С. 47.

19. **Шадрин К. В.** Управление транспортом кислорода через поверхность изолированной перфузируемой печени крысы / К. В. Шадрин, Р. Г. Хлебопрос, А. П. Рупенко, И. И. Моргулис, В. Г. Пахомова // Труды XII Всероссийского совещания по проблемам управления ВСПУ-2014. Москва, 16–19 июня 2014 г. – Москва, 2014. – С. 6811–6819.

Отпечатано ИП Ананина Ирина Сергеевна
Тираж 100экз.
г. Красноярск ул. Ладос Кецохели 67, корп.2
тел. (391) 295-35-04