

УДК 616.831-005.4-008.9

А.Н. Мошкова¹, Т.Ф. Сергеева², Е.М. Хვაцова²

МЕТОД ЭМПИРИЧЕСКИХ ЗАВИСИМОСТЕЙ В ОЦЕНКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОЛИГОМЕРНЫХ ФОРМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ КРЕАТИНКИНАЗЫ ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА

Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева¹,
Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России²

Цель: использование метода эмпирических зависимостей для возможного прогнозирования динамики изменения активности олигомерных форм митохондриальной креатинкиназы при ишемии мозга.

Методология: в работе использован математический метод эмпирических зависимостей для оценки и прогнозирования функционального состояния мозга по изменению активности олигомерных форм митохондриальной креатинкиназы, коррелирующей со степенью тяжести ишемического повреждения.

Результаты и область их применения: построена модель множественной регрессии, позволяющая расчетным способом выявить динамику изменения активности изоферментов креатинкиназы при развитии ишемии мозга. Применение математического моделирования в биологических задачах позволяет разрабатывать расчетные способы получения информации об энергетическом состоянии головного мозга в условиях нарушения кислородного режима, которые могут быть использованы в экспериментальных лабораториях, изучающих влияние гипоксии на жизнедеятельность организма.

Выводы: в результате проведенных исследований получена модель множественной регрессии, хорошо аппроксимирующая зависимость активности мембраносвязанной митохондриальной креатинкиназы от активности ее димерной формы в разных условиях нарушения гемодинамики мозга животных.

Ключевые слова: креатинкиназа, ишемия, модель множественной регрессии.

Введение

Гипоксия и ишемия оказывают существенное повреждающее воздействие на состояние головного мозга. Для разработки способов защиты от гипоксии и ее последствий требуется создание алгоритма оценки и прогнозирования энергетического состояния нервной ткани в экстремальных условиях, а также прогнозирование эффективных режимов тренировки, формирующих устойчивую адаптацию мозга к повреждающим воздействиям дефицита кислорода. Применение методов математического моделирования в решении биологических задач дает возможность получать информацию о состоянии изучаемых процессов и систем, сокращая время экспериментальной работы, экономя дорогостоящие реактивы и сохраняя жизнь животных. При этом возможно установление количественных отношений между отдельными элементами систем, что позволяет описать поведение исследуемых систем как единого целого [1].

Работа посвящена подходам к прогнозированию динамики развития процессов и биологических систем под влиянием воздействия окружающей среды. Одним из таких подходов может быть метод Монте-Карло статистического моделирования, основанный на идее «черного ящика», когда поведение системы изучается по входным и выходным параметрам без происходящих в ней процессов.

В случае сложноорганизованных систем, какой является мозг, такой формальный подход в начале исследования может оказаться единственным средством получить информацию о существующих в системе взаимодействиях и сделать первый шаг к проникновению в механизмы изучаемого явления.

Использование моделей множественной регрессии, объединяющих различные характеристики метаболических процессов мозга при гипоксических и ишемических повреждени-

ях, позволяет получать информацию об энергетическом балансе мозга и прогнозировать функциональное состояние мозга в экстремальных условиях жизнедеятельности и адаптации к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Целью настоящего исследования является оценка показателей олигомерных форм митохондриальной креатинкиназы (МКК) при ишемии разной продолжительности и использование метода эмпирических зависимостей для возможного прогнозирования динамики изменения ее активности.

На практике оценка состояния энергетического метаболизма мозга является ключевым моментом при ведении пациентов с острой и хронической ишемией.

Выяснение молекулярных механизмов действия ишемии на интегральные системы энергетического обмена нервной ткани имеет большое значение для разработки эффективных методов прогнозирования и оценки изменений, вызванных нарушением мозгового кровообращения.

Обсуждение результатов

Проведенные исследования показали, что МКК мозга присутствует в форме димера и октамера (71% и 29 % соответственно). Ишемия головного мозга приводит к изменению активности олигомерных форм МКК (табл. 1).

При острой ишемии головного мозга (30 минут) происходит снижение активности мембраносвязанной МКК на 27% по сравнению с интактными животными, при этом активность димерной формы фермента уменьшается на 16% относительно исходного уровня и доля димера увеличивается с 71 до 81%, что указывает на диссоциацию части октамеров на димеры. При увеличении продолжительности ишемии до 3 суток активность димера МКК растет до исходного уровня. Дальнейшее увеличение продолжительности ишемического воздействия до 7 и 30 суток приводит к росту активности фермента как относительно острой ишемии, так и относительно интактных животных, при этом при 30-дневной ишемии активность димера составляет 93% от общей активности мембраносвязанной МКК.

Таблица 1

Распределение активности олигомерных форм митохондриальной креатинкиназы при ишемии головного мозга (Е/мг белка)

Условия эксперимента	Мембраносвязанная митохондриальная креатинкиназа (y)	Димерная форма митохондриальной креатинкиназы (x)
Интактные животные	0,540±0,031 n = 35	0,384±0,026 n = 35
Ишемия мозга, 30 минут	0,396±0,029* n = 26	0,322±0,023 n = 26
Ишемия мозга, 3 суток	0,500±0,028** n = 14	0,377±0,033 n = 14
Ишемия мозга, 7 суток	0,576±0,030** n = 12	0,459±0,040** n = 12
Ишемия мозга, 30 суток	0,583±0,079** n = 9	0,544±0,061*/** n = 9

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с интактными животными, $p < 0,05$ (по критерию Стьюдента);

** - статистически значимые различия по сравнению с 30-минутной ишемией, $p < 0,05$ (по критерию Стьюдента).

По данным литературы, октамерная форма МКК способствует образованию и укреплению контактных сайтов, тем самым повышая эффективность энергообразования в митохондриях мозга, укрепляя структуру мембран и формируя их резистентность к повреждаю-

щему действию гипоксии [10]. Диссоциация октамеров МКК на димеры при нарушении гемодинамики мозга может указывать на нарушение структуры мембраны митохондрий и энергетического метаболизма мозга.

Исследование функционального состояния организма, изучение его нейрогуморальных механизмов регуляторных процессов адаптации расширяют арсенал используемых методов математического моделирования. В последнее время большое внимание уделяется изучению сущности процессов регуляции, заключающихся в непрерывном обмене информацией, заложенной в ритмической активности мозга и сердца с использованием аппарата нелинейной динамики [6]. Проводится исследование возможностей методов церебральной оксиметрии для оценки кислородного обеспечения головного мозга при патологиях, связанных с гипоксическими состояниями и локальными циркуляторными нарушениями [7, 8].

Для прогнозирования активности олигомерных форм МКК при церебральной ишемии в нашей работе применялся метод эмпирических зависимостей.

Специфика работы биосистем не позволяет строго в математическом смысле выделить однозначные и многозначные функциональные зависимости. В этом случае имеет место биологическая многозначность, не соответствующая понятию многозначной функции. Почти всегда при исследовании биосистем имеется однозначная функциональная зависимость между аргументом (входным параметром системы) и усредненным значением исследуемого показателя (выходным параметром системы). Для биосистем обычно аргумент не является абстрактным, ему приписывается тот или иной смысл (химический, физический, геометрический, биологический). В этом случае область определения функции связывается с биологически допустимыми границами аргумента.

В данной работе для решения задачи прогнозирования динамики изменения функционирования креатинкиназной системы мозга животных под влиянием ишемического воздействия использовалось статистическое моделирование по методу Монте-Карло, средством которого являлась функциональная зависимость между аргументом « x » – активностью димерной формы МКК, выраженной в Е/мг белка и « y » – активностью мембраносвязанной МКК, выраженной в Е/мг белка, которая для интактных животных принимала вид полинома третьей степени $y = a_0x^3 + a_1x^2 + a_2x + a_3$. Коэффициенты a_0, a_1, a_2, a_3 находились методом наименьших квадратов, и функция, аппроксимирующая зависимость между активностью мембранной МКК (y) и димерной ее формой (x), принимала вид:

$$y = -5,1252x^3 + 7,946x^2 - 2,2509x + 0,496. \quad (1)$$

Таблица 2

Некоторые расчетные значения активности мембраносвязанной митохондриальной креатинкиназы (y) по теоретически заданной активности ее димерной формы (x) в мозге интактных животных

Экспериментальная активность димерной формы МКК (x)	Экспериментальная активность мембраносвязанной МКК (y)	Теоретически заданные активности « x »	Рассчитанная активность « y »
0,316	0,420	0,315	0,415516
0,320	0,420	0,320	0,421740
0,345	0,586	0,325	0,428115
		0,330	0,434638
		0,335	0,441305
		0,340	0,448111
0,448	0,528	0,448	0,621856
0,457	0,604	0,457	0,637383
0,487	0,646	0,466	0,654259
0,487	0,640	0,475	0,670661
		0,484	0,687168
	Среднее 0,549		Среднее 0,533

Областью определения этой функции является интервал $0,36 \leq x \leq 0,41$, при этом область изменения функции принадлежит интервалу $0,51 \leq y \leq 0,6$ (табл. 1). По модели (1) можно производить расчет активности мембраносвязанной МКК (y) по активности димерной ее формы (x), соответствующих интервалу активности этого фермента в мозге интактных животных.

Относительная ошибка расчета среднего значения «у» по сравнению со средним экспериментальным составляет 2,96%.

Представляем некоторые результаты расчета активности мембраносвязанной МКК по формуле (1) в табл. 2.

Расчетные значения «у» в этом случае укладываются в интервал экспериментальных активностей этого фермента, и функция (1) хорошо объединяет зависимые показатели креатинкиназной системы в группе интактных животных.

Многочлен $y = a_0x^3 + a_1x^2 + a_2x + a_3$ хорошо объединял экспериментальные показатели (x_k, y_k) ($k=1,2,\dots,n$) и в каждом опыте, связанном с ишемическим воздействием разной продолжительности (30 мин, 18 ч, 3, 7, 14, 30 суток). Коэффициенты a_0, a_1, a_2, a_3 находились методом наименьших квадратов. Анализируя числовые значения a_0, a_1, a_2, a_3 аппроксимирующего многочлена, удалось установить, что они меняются от продолжительности ишемического воздействия. Следовательно, a_0, a_1, a_2, a_3 могут рассматриваться, в свою очередь, как функции нового аргумента « t », характеризующего время нарушения гемодинамики мозга, т.е. $a_i = \varphi_i(t)$ ($i=0,1,2,3$).

На следующем этапе исследования требовалось подобрать вид зависимости $a_i = \varphi_i(t)$ ($i=0,1,2,3$) и входящие в нее параметры так, чтобы модель двухфакторных переменных « x » и « t » $y(x,t) = \varphi_0(t)x^3 + \varphi_1(t)x^2 + \varphi_2(t)x + \varphi_3(t)$ наилучшим образом связывала входные и выходные параметры (x, y) креатинкиназной системы в любой экспериментальной ситуации, зависящей от « t ».

Геометрическая интерпретация зависимостей $a_i = \varphi_i(t)$ ($i=0,1,2,3$) дала серию кривых в декартовой системе координат, каждую из которых можно описать следующими аналитическими выражениями: $\varphi_i(t) = (A2)_i + (A0)_i \cdot \cos \frac{(A1)_i}{t}$ ($i = 0,1,2,3$), коэффициенты $(A0)_i, (A1)_i, (A2)_i$ которых находили из решения системы трансцендентных уравнений методом последовательных приближений.

Таким образом, функция, аппроксимирующая зависимость между активностями мембраносвязанной МКК (y) и димерной ее формой (x), принимала вид:

$$\begin{aligned}
 y(x,t) = & (1,0827799 + 16,1959389 \cdot \cos \frac{23223,8318500}{t})x^3 + \\
 & + (-5,9020531 - 20,5440987 \cdot \cos \frac{23356,4667000}{t})x^2 + \\
 & + (-7,6557397 + 18,2582667 \cdot \cos \frac{22257,5391500}{t})x + \\
 & + (0,1016078 - 1,0884691 \cdot \cos \frac{4386,602800}{t}),
 \end{aligned} \tag{2}$$

где x – первая факторная переменная – активность димерной формы МКК, выраженная в Е/мг белка; t – вторая факторная переменная – время ишемического воздействия, выраженное в часах; $y(x,t)$ – зависимая переменная – активность мембраносвязанной МКК, выраженная в Е/мг белка, соотнесенная к часам.

Таблица 3

**Активность мембраносвязанной митохондриальной креатинкиназы
экспериментально установленная и рассчитанная по формулам
в разных условиях ишемии**

Условия эксперимента	Экспериментальная активность мембраносвязанной МКК (y_3)	Экспериментальная активность димерной формы МКК (x_3)	Теоретически заданные активности «х»	Рассчитанная активность «у»	Относительная ошибка расчета
Интактные животные	0,540±0,031	0,384±0,026	0,384	0,513435	Ср. 4,92%
Ишемия 30 мин (0,5 ч)	0,356	0,161	0,200	0,467874	Ср. 18,5%
	0,412	0,277	0,211	0,508634	
	0,584	0,277	0,222	0,554164	
	0,450	0,298	0,233	0,604571	
	Ср. 0,4505	Ср. 0,253	Ср. 0,21665	Ср. 0,5338	
Ишемия 3-7 суток (72-168 ч)	0,511	0,513	0,519	0,369724	Ср. 1,38%
	0,468	0,465	0,530	0,451411	
	0,514	0,408	0,541	0,534720	
	0,561	0,542	0,552	0,619612	
	0,659	0,539	0,563	0,706055	
	0,550	0,509			
	Ср. 0,5438	Ср. 0,496	Ср. 0,541	Ср. 0,536304	
Ишемия 12-14 суток (220,5-300,5 ч)	0,4778	0,3247	0,200	0,222188	Ср. 13,3%
	0,491	0,2349	0,211	0,217526	
	0,644	0,116	0,222	0,214253	
	0,244		0,233	0,212335	
	Ср. 0,4642	Ср. 0,2252	0,244	0,211743	
			0,310	(Ср. 0,215609)	
			0,321	0,629692	
			0,332	0,606456	
			0,343	0,579200	
			0,354	0,547941	
			0,365	0,512699	
			Ср. 0,2628	0,473492	
				(Ср. 0,558280)	
			Общ. ср. 0,4025		
Ишемия 25-30 суток (600,5-720 ч)	0,679	0,341	0,343	0,784604	Ср. 16,9%
	0,639	0,544	0,387	0,843157	
	0,611	0,647	0,398	0,856627	
	1,178	0,769	0,585	1,105427	
	1,071	0,812	0,596	1,125866	
			0,607	1,147465	
	Ср. 0,5626	Ср. 0,8356	Ср. 0,486	Ср. 0,977191	

Адекватность модели (2) поставленной задаче доказывалась расчетом коэффициента детерминации R^2 , величина которого соответствовала интервалу 0,91-0,98. Значения R^2 , близкие к 1, свидетельствовали о наличии тесной корреляционной связи между выбранными показателями и о соответствии представленной функции (2) экспериментальным показателям. Прогностическая способность построенной модели проверялась расчетом активности мембраносвязанной МКК по экспериментально установленной активности димерной ее формы с

последующей проверкой дополнительно поставленным экспериментом (ишемия 14 суток) либо литературными данными. Близкое значение активности мембраносвязанной МКК мозга (0,600 Е/мг белка) было получено J. Schlegel с сотр. (1988) [9]. Критерием соответствия служила относительная ошибка расчета, которая не должна была превышать 20% [2].

Аналитические значения активности мембраносвязанной МКК в этом случае были сопоставимы с экспериментальными. Относительная ошибка расчета колебалась в пределах 1-18,5%, что соответствовало критерию «работающая модель». Экспериментальные значения выбранных показателей и рассчитанные активности димерной формы МКК представлены в табл. 3.

Таким образом, модель $y(x, t) = \varphi_0(t)x^3 + \varphi_1(t)x^2 + \varphi_2(t)x + \varphi_3(t)$,

где $\varphi_i(t) = (A2)_i + (A0)_i \cdot \cos \frac{(A1)_i}{t}$, представленная функцией (2), хорошо аппроксимирует ко-

личественную зависимость активности мембраносвязанной МКК от димерной ее формы в мозге животных при ишемии разной продолжительности. Она показывает тесную корреляционную связь между выбранными показателями и имеет хорошую прогностическую способность для оценки тяжести ишемического воздействия.

Ранее метод эмпирических зависимостей был использован нами для анализа и прогнозирования активности ферментов дыхательной цепи, начального и конечного его участков, для оценки и прогнозирования концентрации АТР по функции митохондриальных ферментных комплексов, для прогнозирования содержания АМР в системе адениновых нуклеотидов и т.д. [3, 4, 5].

В этих исследованиях было установлено, что существующую причинно-следственную связь между перечисленными показателями энергетического состояния мозга можно аппроксимировать суперпозицией элементарных гладких функций вида

$$y(x, z) = \varphi_0(z)x^3 + \varphi_1(z)x^2 + \varphi_2(z)x + \varphi_3(z),$$

где z – переменная, характеризующая степень тяжести гипоксического воздействия; (x, y) – показатели энергетического метаболизма мозга; $\varphi_i(z) = (A2)_i + (A0)_i \cdot \cos \frac{(A1)_i}{z}$ ($i = 0,1,2,3$) – функции переменной « z », обозначающей показатель экстремального воздействия окружающей среды.

Рассчитанные методом последовательных приближений коэффициенты $(A0)_i$, $(A1)_i$, $(A2)_i$ ($i = 0,1,2,3$) формулы (2) отличались от значений коэффициентов, представленных в моделях аппроксимации зависимости других показателей энергетического состояния мозга при нарушении кислородного режима [3,4,5]. Это дает возможность предположить, что $(A0)_i$, $(A1)_i$, $(A2)_i$ ($i = 0,1,2,3$) являются функциями вида экстремального воздействия и модель

$y(x, z) = \varphi_0(z)x^3 + \varphi_1(z)x^2 + \varphi_2(z)x + \varphi_3(z)$, где $\varphi_i(z) = (A2)_i + (A0)_i \cdot \cos \frac{(A1)_i}{z}$ ($i = 0,1,2,3$),

можно усовершенствовать и использовать для прогнозирования и оценки тяжести повреждающего действия окружающей среды на жизнедеятельность организма. Это составляет следующий этап нашей работы.

Библиографический список

1. Дромашко, С.Е. Информатика в естествознании: методологические аспекты моделирования // Проблемы создания информационных технологий. 1999. Вып. 3. С. 29-35.
2. Мари, Дж. Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии – лекции о моделях / Дж. Мари. – М.: Мир, 1983. – 400 с.
3. Мошкова, А.Н. Использование эмпирических зависимостей в системе адениновых нуклеотидов для прогнозирования содержания АМФ в мозге при гипоксии / А.Н. Мошкова, Е.М. Хватова // Вопр. мед. химии. 2001. Т. 47. № 6. С. 605–608.

4. **Мошкова, А.Н.** Прогнозирование активности ферментов в экстремальных условиях жизнедеятельности организма: применение математических методов анализа / А.Н. Мошкова, Е.М. Хватова, И.А. Русакова // *Нейрохимия*. 2002. Т. 19. № 4. С. 293–296.
5. **Мошкова, А.Н.** Исследование зависимости цитохромоксидазной активности от NADH-дегидрогеназной активности в дыхательной цепи митохондрий мозга кролика в экстремальных условиях жизнедеятельности организма / А.Н. Мошкова, Е.М. Хватова, И.А. Русакова // *Нейрохимия*. 2004. Т. 21. № 2. С. 121–124.
6. **Муха, Ю.П.** Синтез категорной модели информационных потоков управления сердечным ритмом для оценки адаптационных возможностей организма на основе RR-интервалов / Ю.П. Муха, А.П. Бугров // *Биомедицинская технология и радиоэлектроника*. 2006. № 4. С. 40–46.
7. **Сафонова, Л.П.** Церебральная оксиметрия в оценке гипоксических состояний и нарушений мозгового кровообращения // *Биомедицинская технология и радиотехника*. 2006. № 10. С. 56–57.
8. **Стулин, И.Д.** Современная комплексная неинвазивная диагностика смерти мозга / И.Д. Стулин, Р.С. Мухин, А.Д. Шибалев [и др.] // *Нейродиагностика и высокие биомедицинские технологии*. 2006. № 1. С. 18–26.
9. **Schlegel, J.** Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships / J. Schlegel, B. Zurbriggen, G. Wegmann [et al.] // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. N 32. P. 16942–16953.
10. **Speer, O.** Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane / O. Speer, T. Buerklen, D. Brdiczka [et al.] // *Biochem. J.* 2005. Vol. 385. P. 445–450.

*Дата поступления
в редакцию 05.06.2013*

A.N. Moshkova¹, T.F. Sergeeva², E.M. Khvatova²

**THE METHOD OF EMPIRICAL DEPENDENCES IN ESTIMATION
AND PREDICTION OF DYNAMICS OF THE ACTIVITY CHANGE
OF OLIGOMERIC FORMS OF MITOCHONDRIAL CREATINE KINASE
IN CEREBRAL ISCHEMIA**

Nizhny Novgorod state technical university n.a. R.E. Alexeev¹,
Nizhny Novgorod state medical academy²

Purpose: Use of the method of empirical dependences for the possible prediction of dynamics of the activity change of oligomeric forms of mitochondrial creatine kinase in cerebral ischemia.

Methodology: The mathematical method of empirical dependences for estimation and prediction of the functional state of the brain by the activity change of oligomeric forms of mitochondrial creatine kinase correlated with the severity of ischemia has been used in the research.

The results and their application area: There has been made the model of multiple regression permitting to reveal the dynamics of the change of activity of creatine kinase isoenzymes in cerebral ischemia using a calculating method. The mathematical modeling in the biological problems makes it possible to devise the calculating methods for obtaining information about the energy state of the brain in the disturbance of oxygen conditions. These methods can be used by the laboratories studied the effect of hypoxia on vital functions of an organism.

Conclusions: The present study suggested the model of multiple regression approximating the dependence of membrane-associated creatine kinase activity by the activity of its dimer isoform in the different conditions of cerebral ischemia.

Key words: creatine kinase, ischemia, model of multiple regression.