

## МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ЕСТЕСТВЕННЫХ, ТЕХНИЧЕСКИХ И СОЦИАЛЬНЫХ НАУКАХ

---

УДК 616.831-005.4-008.9

А.Н. Мошкова<sup>1</sup>, Т.Ф. Сергеева<sup>2</sup>, Е.М. Хватова<sup>3</sup>, Н.П. Тежикова<sup>1</sup>

### ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ИШЕМИИ ПО АКТИВНОСТИ ИЗОФЕРМЕНТОВ КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ МОЗГА МЕТОДОМ ЭМПИРИЧЕСКИХ ЗАВИСИМОСТЕЙ

Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева<sup>1</sup>,  
Department of Biomedical Science, School of Medicine and Dentistry,  
College of Health and Allied Sciences, The University of Dodoma<sup>2</sup>,  
Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России<sup>3</sup>

**Цель:** Анализ и оценка влияния ишемии на активность изоферментов креатинфосфокиназы нервной ткани и использование метода эмпирических зависимостей для прогнозирования расчетным способом возникающих изменений при длительном нарушении гемодинамики мозга.

**Методология:** В работе использован математический метод эмпирических зависимостей для оценки степени тяжести ишемии по активности изоферментов креатинфосфокиназы мозга.

**Результаты и область их применения:** Показана возможность прогнозирования расчетным способом активности цитоплазматической креатинфосфокиназы по активности ее митохондриальной изоформы, а также оценки изменения активности изоферментов при нарушении гемодинамики мозга разной продолжительности. Предлагаемые модели дают возможность прогнозировать пределы устойчивости мозга к гипоксии по динамике изменения активности изоферментов креатинфосфокиназы при нарушении мозгового кровообращения и контролировать развитие ишемического процесса.

**Выводы:** В результате проведенных исследований получена модель множественной регрессии, хорошо аппроксимирующая зависимость активности цитоплазматической креатинфосфокиназы от ее митохондриальной изоформы в разных условиях нарушения мозгового кровообращения.

*Ключевые слова:* креатинфосфокиназа, ишемия, регрессионная модель.

### Введение

Повышение устойчивости мозга к повреждающим факторам является крайне актуальной задачей и привлекает специалистов различных профилей клинической и экспериментальной биологии и медицины [3, 9]. Метаболизм мозга имеет выраженный аэробный тип развития. Базисной для мозга является энергетическая функция митохондрий с высоким потреблением кислорода и окислительным синтезом АТФ [6].

Центральное место в процессах транспорта внутриклеточной энергии занимает креатинфосфокиназная система [4, 7, 8, 10]. В мозге креатинфосфокиназа (КФК) представлена двумя изоферментами: цитоплазматическим (цтКФК) и митохондриальным (миКФК).

Расстройство мозгового кровообращения приводит к нарушению структуры и функций мозга. Выяснение молекулярных механизмов действия ишемии на интегральные системы энергетического обмена имеет большое значение для разработки эффективных методов прогнозирования и оценки изменений, вызванных нарушением гемодинамики мозга.

Использование моделей множественной регрессии, объединяющих различные характеристики метаболических процессов мозга при гипоксических и ишемических повреждениях, позволяет получать достоверную информацию об энергетическом балансе мозга в экстремальных условиях жизнедеятельности и прогнозировать функциональное состояние нервной ткани при адаптации к повреждающим воздействиям окружающей среды.

**Целью исследования** является анализ и оценка влияния ишемии на активность изоферментов КФК нервной ткани и использование метода эмпирических зависимостей для прогнозирования расчетным способом возникающих изменений при длительном нарушении мозгового кровообращения.

### Обсуждение результатов

Проведенные исследования показали, что активность изоферментов КФК меняется в зависимости от продолжительности ишемического воздействия (табл. 1).

Таблица 1

Распределение активности изоферментов креатинфосфокиназы при ишемии головного мозга (Е/мг белка)

| Условия эксперимента   | Общая митохондриальная фракция | Цитоплазматическая фракция |
|------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Интактные животные     | 0,526±0,031<br>n = 35          | 0,589±0,049<br>n = 35      |
| Ишемия мозга, 30 минут | 0,418±0,023*<br>n = 26         | 0,620±0,037<br>n = 26      |
| Ишемия мозга, 3 суток  | 0,544±0,043**<br>n = 14        | 0,591±0,044<br>n = 14      |
| Ишемия мозга, 7 суток  | 0,528±0,046**<br>n = 12        | 0,804±0,090*<br>n = 12     |
| Ишемия мозга, 30 суток | 0,582±0,066**<br>n = 9         | 0,720±0,055<br>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).

Установлено достоверное снижение активности миКФК в общей митохондриальной фракции на 21% в условиях острой ишемии (30 мин) по сравнению с интактными животными, активность цтКФК при этом значительно не изменяется, но растет относительно миКФК в 1,5 раза.

При увеличении продолжительности ишемии мозга (3, 7 и 30 суток) выявлен рост активности миКФК относительно 30-минутной ишемии, и ее величина соответствует активности интактных животных.

Активность цтКФК значительно не отличается от интактных животных при трехдневном нарушении гемодинамики головного мозга, однако, при 7-дневной ишемии активность цитоплазматического изофермента растет на 27% относительно нормы и в 1,52 раза превышает активность миКФК, что соответствует 30-минутной ишемии.

Дальнейшее увеличение продолжительности ишемии до 30 суток вызывает некоторое снижение активности цтКФК, но она остается повышенной относительно интактных животных, при этом наблюдается снижение отношения цтКФК к миКФК.

Таким образом, проведенные исследования показали, что изменение активности изоферментов КФК коррелирует с продолжительностью ишемического воздействия. Увеличение активности цтКФК в условиях нарушения мозгового кровообращения может быть связа-

но с выходом миКФК в цитоплазму за счет нарушения структуры наружной мембраны митохондрий в результате окислительного стресса [11].

Постоянная билатеральная перевязка общих сонных артерий индуцирует эффект подобно прекондиционированию. Это приводит к росту активности митохондриального изофермента при увеличении ишемического воздействия (3, 7 и 30 суток). Согласно исследованиям Л.Д. Лукьяновой (2011), формирование отсроченных механизмов адаптации к гипоксии является периодом экспрессии генов адаптации и генерации, что формирует новый спектр ферментов [1].

Применение методов математического анализа для исследования зависимости активности цитоплазматической КФК от митохондриальной позволило аппроксимировать эту зависимость в группе интактных животных и в группе экспериментальных особей функциями следующего вида:

$$y = 6,498x^3 - 7,4353x^2 + 3,5669x - 0,2232, \quad (1)$$

$$y(x, t) = (-0,000004t^3 + 0,0038t^2 - 0,6407t + 19,729)x^3 + (0,000005t^3 - 0,0044t^2 + 0,6909t - 16,436)x^2 + (-0,000002t^3 + 0,0017t^2 - 0,25t + 4,8121)x + (0,0000002t^3 - 0,0002t^2 + 0,025t - 0,0209), \quad (2)$$

где  $x$  – активность миКФК (Е/ мг белка);  $y$  – активность цтКФК (Е/ мг белка);  $t$  – время пребывания животных в состоянии ишемии, выраженное в часах.

Соответствие аппроксимирующих функций поставленной задаче доказывалось расчетом коэффициента детерминации  $R^2$ , который соответствовал величине 0,84–0,96. Величина  $R^2$ , близкая к 1, свидетельствовала о наличии тесной корреляционной связи между выбранными показателями, и представленные функции достаточно точно характеризовали зависимость между активностями выбранных показателей.

Прогностическая способность моделей (1) и (2) проверялась расчетом активности цтКФК по экспериментально установленной активности миКФК и сравнением полученного результата с дополнительно поставленными экспериментами (ишемия 18 ч и 14 дней) либо литературными данными. Близкое значение активности миКФК мозга (0,600 Е/мг белка) было получено J. Schlegel с сотрудниками (1988) [5].

Экспериментальные активности изоферментов КФК и результаты расчета представлены в табл. 2.

**Таблица 2**

**Активность креатинфосфокиназы цитоплазматической фракции экспериментально установленная и рассчитанная по формулам в разных условиях ишемии**

| Условия эксперимента  | Экспериментальная активность миКФК ( $x$ ) | Экспериментальная активность цтКФК ( $y$ ) | Теоретически заданные активности миКФК ( $x$ ) | Рассчитанная активность цтКФК ( $y$ ) | Относительная ошибка расчета |
|-----------------------|--|--|--|---------------------------------------|------------------------------|
| 1                     | 2  | 3  | 4  | 5                                     | 6                            |
| Интактные животные    | 0,526±0,031                                | 0,589±0,049                                | 0,526  | 0,526894                              | <b>10,54%</b>                |
|                       | 0,600*                                     |  |  | 0,604812                              | <b>2,68%</b>                 |
| Ишемия 0,5 ч (30 мин) | 0,418±0,023                                | 0,620±0,037                                | 0,418  | 0,556911                              | <b>Ср. 5,83%</b>             |
|                       |  |  | 0,429  | 0,5734324                             |                              |
|                       |  |  | 0,440  | 0,5921049                             |                              |
|                       |  |  | 0,451  | 0,6130834                             |                              |

Окончание табл. 2

| 1                                       | 2                 | 3                    | 4                      | 5                     | 6                |
|---|-------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| Ишемия<br>18-20,5 ч                     | 0,379             | 0,573                | 0,418                  | 0,4530371             | <b>Ср. 0,72%</b> |
|   | 0,388             | 0,625                | 0,429                  | 0,467546              |                  |
|   | 0,615             | 0,669                | 0,517                  | 0,6450175             |                  |
|   | 0,631             | 0,758                | 0,528                  | 0,6758536             |                  |
|   | 0,641             | 0,549                | 0,539                  | 0,7088295             |                  |
|   | <b>Ср. 0,4666</b> | <b>Ср. 0,6348</b>    | 0,55                   | 0,7440105             |                  |
|   |                   |                      | 0,561                  | 0,7814615             |                  |
|   |                   | <b>Ср. 0,5058571</b> | <b>Ср. 0,639393671</b> |                       |                  |
| Ишемия<br>350-360 ч<br>(14-15 суток)    | 0,4778            | 0,677                | 0,605                  | 0,3808293             | <b>Ср. 6,52%</b> |
|   | 0,491             | 0,686                |                        | 0,4023672             |                  |
|   | 0,644             | 0,600                | 0,616                  | 0,5872239             |                  |
|   | <b>Ср. 0,5376</b> | <b>Ср. 0,6543</b>    |                        | 0,6255015             |                  |
|   |                   |                      | 0,625                  | 0,8096758             |                  |
|   |                   |                      |                        | 0,8648441             |                  |
|   |                   | <b>Ср. 0,616</b>     | <b>Ср. 0,611659</b>    |                       |                  |
| Ишемия 600,<br>5-720 ч<br>(24-30 суток) | 0,582±0,066       | 0,720±0,055          | 0,627                  | 0,8128206             | <b>Ср. 5,6%</b>  |
|   |                   |                      | 0,638                  | 0,7085351             |                  |
|   |                   |                      | <b>Ср. 0,6325</b>      | <b>Ср. 0,76067785</b> |                  |

Примечание: \* - Schlegel J. et al. (1988) [5].

Из табл. 2 видно, что максимальная относительная ошибка расчета активности цтКФК по сравнению с дополнительно поставленным экспериментом была меньше 20% (составляла 10,5%). Это соответствовало критерию «работающая модель» [2]. Следовательно, представленные математические модели могут быть использованы для прогнозирования активности цтКФК в мозге животных в разных условиях жизнедеятельности организма.

Таким образом, применение метода аппроксимации зависимостей между выбранными показателями позволило построить модели в виде функций (1) и (2), хорошо объединяющие активности изоферментов КФК в группе интактных животных и в условиях ишемии разной продолжительности. Предлагаемые модели дают возможность прогнозировать пределы устойчивости мозга к гипоксии по динамике изменения активности изоферментов КФК при развитии ишемической болезни и контролировать развитие ишемического процесса.

Применение математического моделирования в решении биологических задач позволяет получать информацию об энергетическом состоянии нервной ткани при неблагоприятных воздействиях окружающей среды, экономя экспериментальное время, дорогостоящие реактивы, сохраняя жизнь животным.

#### Библиографический список

1. Лукьянова, Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2011. № 1. С. 2–18.
2. Мари, Дж. Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии – лекции о моделях. – М.: Мир, 1983. – 400 с.
3. Erlykina, E. Role of Creatine Kinase – Hexokinase Complex in the Migration of Adenine Nucleotides in Mitochondrial Dysfunction / E. Erlykina, T. Sergeeva // Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke, Edited by Maurizio Balestrino. Published by InTech, Croatia. 2012. Chapter 10. P. 193–214.
4. Koufen, P. Free radical-induced inactivation of creatine kinase: influence on the octameric and dimeric states of the mitochondrial enzyme (Mi<sub>b</sub>-CK) / P. Koufen, A. Ruck, D. Brdiczka [et al.] // Biochem. J. 1999. Vol. 344. P. 413–417.

5. **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. Zurbruggen, G. Wegmann [et al.] // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263/ N 32. P. 16942–16953.
6. **Schurr, A.** Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain / A. Schurr // Int. J. Mol. Med. 2002. Vol. 10. N 2. P. 131–136.
7. **Tuon, L.** Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in mdx mouse brain / L. Tuon, C.M. Comim, D.B. Fraga [et al.] // Muscle Nerve. 2010. Vol. 41. N 2. P. 257–260.
8. **Vernoux, N.** Interfacial behavior of cytoplasmic and mitochondrial creatine kinase oligomeric state / N. Vernoux, T. Granjon, O. Marcillat [et al.] // Biopolymers. 2006. Vol. 81/ N 4. P. 270–281.
9. **Vlasov, T.D.** Ischemic preconditioning of the rat brain as a method of endothelial protection from ischemic/reperfusion injury / T.D. Vlasov, D.E. Korzhevskii, E.A. Polyakova // Neurosci Behav. Physiol. 2005. Vol. 35. N 6. P. 567–572.
10. **Wallimann, T.** Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis / T. Wallimann, M. Wyss, D. Brdiczka [et al.] // // Biochem. J. 1992. Vol. 281. P. 21–40.
11. **Yerlykina, E.I., Sergeeva, T.F.** Enzymatic characteristic of creatine kinase system under conditions cerebral circulatory disorders / E.I. Yerlykina, T.F. Sergeeva // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2010. Vol. 149/ N 1. P. 14–17.

*Дата поступления  
в редакцию 12.11.2013*

**A.N. Moshkova<sup>1</sup>, T.F. Sergeeva<sup>2</sup>, E.M. Khvatova<sup>3</sup>, N.P. Tezhikova<sup>1</sup>**

**ESTIMATION OF SEVERITY DEGREE OF ISCHEMIA  
BY THE ACTIVITY OF THE BRAIN CREATINE PHOSPHOKINASE ISOENZYMES  
USING THE METHOD OF EMPIRICAL DEPENDENCES**

Nizhny Novgorod State Technical University n.a. R.E. Alexeev<sup>1</sup>,  
Department of Biomedical Science, School of Medicine and Dentistry,  
College of Health and Allied Sciences, The University of Dodoma<sup>2</sup>,  
Nizhny Novgorod State Medical Academy<sup>3</sup>

**Purpose:** Analysis and estimation of the influence of ischemia on the activity of the brain creatine phosphokinases isoenzymes and use of the method of empirical dependences for the prediction of the emerging changes in a long-term disorder of cerebral hemodynamics using a calculating method.

**Methodology:** The mathematical method of empirical dependences for estimation of severity degree of ischemia by the activity of the brain creatine phosphokinases isoenzymes has been used in the research.

**The results and their application area:** It has been demonstrated that there is a possibility of prediction of cytoplasmic creatine phosphokinase activity by the activity of its mitochondrial isoform using a calculating method. Estimation of the change of the isoenzymes activity due to cerebral ischemia of different duration has also been shown. There has been suggested the models of multiple regression permitting to predict stability limits of the brain to hypoxia by the dynamics of the change of activity of creatine phosphokinase isoenzymes in the disorder of cerebral circulation using a calculating method. These models make it possible to control the development of cerebral ischemia.

**Conclusions:** The present study suggested the model of multiple regression approximating the dependence of cytoplasmic creatine phosphokinase activity by the activity of its mitochondrial isoform in the different conditions of cerebral ischemia.

*Key words:* creatine phosphokinase, ischemia, regression model.