

УДК 576.311:577.158:612.82.001.8

А.Н. Мошкова¹, Е.И. Ерлыкина², Е.М. Хватова², Н.П. Тежикова¹**ВЫБОР ЭМПИРИЧЕСКИХ ЗАВИСИМОСТЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ**Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева¹,
Нижегородская государственная медицинская академия Минздрава России²

Цель работы: Изучение функции митохондриальных ферментных комплексов I, II, IV в разных условиях разрежения атмосферного давления. Анализ зависимых отношений активностей ферментов дыхательной цепи методом эмпирических зависимостей, выявление закономерности в характере их изменения для прогнозирования энергетического состояния мозга при гипобарической гипоксии.

Методология: В работе использован метод эмпирических зависимостей для оценки и прогнозирования дисфункции митохондриальных ферментных комплексов I, II, IV дыхательной цепи, коррелирующей со степенью тяжести гипоксического воздействия.

Результаты и область их применения: Построена модель множественной регрессии, позволяющая провести оценку влияния гипоксии на устойчивость зависимых отношений МФК I, II, IV ДЦ, прогнозировать активность цитохромоксидазы при митохондриальной дисфункции I и II комплексов ДЦ в разных условиях гипоксии, проводить оценку активностей МФК I, II по активности МФК IV в экстремальных гипоксических состояниях мозга.

Выводы: В результате проведенных исследований построена модель множественной регрессии, аппроксимирующая количественную зависимость митохондриальных ферментных комплексов ДЦ от степени тяжести гипоксического воздействия.

Ключевые слова: митохондриальные ферментные комплексы, дыхательная цепь, гипоксия, модель множественной регрессии.

Введение

Изучение повреждений организма, вызванных гипоксическими воздействиями, разработка методов их профилактики и коррекции составляют важнейшую проблему биологии и медицины. Головной мозг в первую очередь и в большей степени претерпевает изменения при кислородном голодании. Повышенная чувствительность ткани мозга к дефициту кислорода зависит от постоянного и большого расхода энергии на осуществление его функций. Основным источником энергии для мозга является АТФ – аденозинтрифосфат. Большое количество АТФ мозг получает в ходе окислительного фосфорилирования, которое катализируется полиферментативной системой, представляющей собой дыхательную цепь – ДЦ.

Сведения о функциональном состоянии дыхательной цепи в зависимости от глубины и продолжительности кислородного голодания характеризуют большие ее резервные возможности, поддерживающие энергетические потребности клеток мозга в условиях гипоксии.

Многочисленные исследования биоэнергетических механизмов гипоксии нашли свое отражение в целом ряде публикаций [4–10].

Установлено, что митохондриальная дыхательная цепь в условиях снижения доставки кислорода к клеткам вовлекается в энергетический процесс как единая функционально-метаболическая система, выполняя тем самым роль регулятора и модулятора потребления кислорода и скорости его поступления из внеклеточной среды к митохондриям.

Несмотря на то, что функциональные последствия нарушений в мозге, связанные с дефицитом кислорода, достаточно хорошо изучены, многие биоэнергетические аспекты этого явления продолжают требовать своего решения. Например, не существует четких и объек-

тивных критериев, позволяющих дифференцировать степень тяжести кислородного голодания, прогнозировать изменение энергетического потенциала мозга при дисфункции МФК ДЦ, проводить оценку направленности обменных процессов мозга в экстремальных гипоксических состояниях.

Целью настоящего исследования является анализ зависимых отношений активностей МФК ДЦ с учетом их корреляции со степенью тяжести гипоксического воздействия, оценка закономерности в характере их изменений и построение модели множественной регрессии, позволяющей прогнозировать расчетным способом энергетическое состояние мозга при дисфункции МФК ДЦ.

Результаты

Экспериментально установлено, что с нарастанием тяжести гипоксического воздействия просматривается однонаправленный характер изменения активности МФК I, II, IV по отношению к уровню интактных животных: при умеренной форме гипоксии – возрастающий, при острой – убывающий. В динамике развития гипоксии сравнивался характер изменения окислительных ферментов по отношению друг к другу.

Для этого изучались значения коэффициентов отношения активностей

$$C_1 = \frac{\text{ЦО}}{\text{НАДН-дг}}, C_2 = \frac{\text{ЦО}}{\text{СДГ}}, C_3 = \frac{\text{ЦО}}{\text{НАДН-дг} + \text{СДГ}}$$

в разных условиях гипоксии, представленных в табл. 1.

Таблица 1

Коэффициенты отношений активности ЦО к активностям ферментов начального участка дыхательной цепи

Атмосферное давление, мм рт. ст.	СДГ	НАДН-дг	ЦО	C ₁	C ₂	C ₃
	мкМоль цит.	С/мг белка в минуту				
760	24,8±1,28 (25)	35,0±1,81 (25)	73,7±5,98 (25)	2,1	2,97	1,23
310	*32,9±3,77 (6)	*48,0±3,14 (6)	*109,4±5,87 (6)	2,28	3,33	1,35
270	*19,1±2,03 (6)	*18,7±3,03 (6)	*40,9±5,87 (6)	2,18	2,14	1,08
230	*19,3±1,86 (6)	*16,6±1,67 (6)	*33,6±2,53 (6)	2,03	1,7	0,9

Примечание: * – статистически значимые изменения по сравнению с интактными животными $p < 0,05$.

Из табл. 1 видно, что величины коэффициентов C₁, C₂, C₃ меняются с изменением атмосферного давления, показывая характер изменения активности МФК IV от функции МФК I при экстремальных гипоксических состояниях мозга. Так, C₁ → 2 при всех величинах атмосферного давления 760–230 мм рт. ст. Следовательно, активность ЦО всегда больше активности НАДН-дг приблизительно в 2 раза независимо от тяжести гипоксического воздействия. Коэффициент C₂ → 3 при атмосферном давлении 760–310 мм рт. ст. и C₂ → 2 при атмосферном давлении 270–230 мм рт. ст. Это означает, что активность ЦО больше активности СДГ при умеренной форме гипоксии ≈ в 3 раза. При острых нарушениях кислородного режима активность ЦО уменьшается в сравнении с предыдущим воздействием, но остается больше сукцинатдегидрогеназной активности ≈ в 2 раза, аналогичной характеру ее изменения по отношению к активности НАДН-дг в этих условиях ($C_1 = \frac{\text{ЦО}}{\text{НАДН-дг}} \rightarrow 2$).

Активность ЦО по отношению к суммарной активности НАДН-дг + СДГ незначительно больше при умеренной форме гипоксии (атм. давл. 760–310 мм рт. ст.) и

$C_3 = \frac{\text{ЦО}}{\text{НАДН-дг} + \text{СДГ}}$ равен 1,23, 1,35 соответственно, в то время как при экстремальных гипоксических состояниях мозга (атм. давл. 270–230 мм рт. ст.) $C_3 \rightarrow 1$, и активность ЦО сопоставима с суммарной активностью НАДН-дг + СДГ.

Таким образом, анализ экспериментальных активностей МФК I, II, IV в разных условиях гипоксии показывает, что в характере их изменения просматривается некоторая закономерность.

Задачей следующего этапа исследования являлось определение точного вида зависимости между ферментными комплексами ДЦ, установление степени тесноты взаимодействия выбранных показателей при дисфункции МФК и возможности прогнозирования активности МФК в условиях, опасных для жизнедеятельности организма.

При решении этой задачи использованы эмпирические зависимости для оценки регуляторной роли митохондриальных ферментных комплексов I и II на активность МФК IV в условиях гипоксического воздействия. Подбирались корреляционные тренды с помощью процессора Excel, которые давали возможность выбрать регрессионную модель, наилучшим образом объединяющую экспериментальные показатели x_i и y_i ($i = 1, 2, \dots, n$). В качестве зависимой переменной «у» рассматривалась активность цитохромоксидазы (ЦО(y)), независимой (объясняющей или факторной) переменной «х» служила активность окислительных ферментов начального участка ДЦ или сумма их активностей. Таким образом, аппроксимировались зависимости НАДН-дг(x) \rightarrow ЦО(y); СДГ(x) \rightarrow ЦО(y); (НАДН-дг + СДГ)(x) \rightarrow ЦО(y).

В работу были введены разные функции: полиномиальная $y = a_0x^m + a_1x^{m-1} + a_2x^{m-2} + \dots + a_m$, где $m = 1, 2, 3, 4, 5, 6$; логарифмическая $y = a_0 \ln(x) + a_1$, степенная $y = a_0x^n$, экспоненциальная $y = a_0e^{a_1x}$. Оценкой адекватности регрессионной модели эмпирическим показателям являлся коэффициент детерминации R^2 , а для линейной регрессии – коэффициент корреляции r , который характеризовал тесноту связи между выбранными показателями.

После анализа результатов оказалось, что линейная функция $y = a_0x + a_1$ наилучшим образом объединяла эмпирические показатели митохондриальных ферментных комплексов начального и конечного участков дыхательной цепи в разных условиях гипоксического воздействия.

Равенство коэффициента детерминации и квадрата коэффициента корреляции ($R^2 = r^2$) подтверждало это положение. Вероятностная значимость R^2 и r по F -критерию Фишера-Снедекора и t -критерию Стьюдента составляла 95–99%.

Величина коэффициента корреляции определяла тесноту корреляционной связи между выбранными показателями.

Установлено, что независимо от степени разрежения атмосферного давления очень тесная линейная зависимость остается устойчивой между суммарной активностью МФК I, II и МФК IV (НАДН-дг + СДГ)(x) \rightarrow ЦО(y). можно предположить, что эта жесткая очень тесная линейная зависимость регулирует дисфункцию МФК IV в мозге животных при критическом нарушении кислородного режима, и активность ЦО в этом случае незначительно отличается от суммарной активности НАДН-дг + СДГ.

Значения линейной аппроксимации $y = a_0x + a_1$ зависимых отношений активностей НАДН-дг, СДГ, ЦО, коэффициенты R^2 , r и теснота корреляционной связи представлены в табл. 2.

Принимая во внимание тот факт, что коэффициенты a_0 , a_1 меняются от условий гипобарической гипоксии (табл. 2), проведена попытка усовершенствовать регрессионную модель $y = a_0x + a_1$, вводя в нее вторую факторную переменную «h» – величину атмосферного давления, считая $a_i = \varphi_i(h)$, ($i = 0, 1$). Графическая иллюстрация зависимостей $a_i = \varphi_i(h)$ дала возможность использовать функцию $\varphi_i(h) = (A2)_j + (A0)_j \cdot \cos((A1)_j/h)$ ($j = 0, 1$), вид которой основывался на данных, полученных в эксперименте. Коэффициенты $(A0)_j$, $(A1)_j$, $(A2)_j$ рассчитывались методом последовательных приближений.

Таблица 2

Значимость линейной аппроксимации $y = a_0x + a_1$ зависимости между активностью окислительных ферментов дыхательной цепи, форма тесноты связи между ними в разных условиях гипоксии

Атмосферное давление, мм рт. ст.	СДГ(x) → ЦО(y)	НАДН-дг(x) → ЦО(y)	(НАДН-дг + СДГ)(x) → ЦО(y).	Теснота связи
760	$y = 1,059x + 42,113$ $r = 0,9766068$ $R^2 = 0,9537311$ $r^2 = 0,9537609$	$y = 1,436x + 27,991$ $r = 0,9914368$ $R^2 = 0,9829638$ $r^2 = 0,9829468$	$y = 0,6133x + 35,8886$ $r = 0,986419$ $R^2 = 0,9730359$ $r^2 = 0,9730225$	очень тесная
310	$y = 1,3336x + 64,95$ $r = 0,9559005$ $R^2 = 0,9138064$ $r^2 = 0,9137458$	$y = 1,7002x + 31,088$ $r = 0,9453744$ $R^2 = 0,893772$ $r^2 = 0,8937325$	$y = 0,767x + 48,4923$ $r = 0,96368388$ $R^2 = 0,9287878$ $r^2 = 0,92868661$	очень тесная
270	$y = 0,852x + 23,514$ $r = 0,9798173$ $R^2 = 0,9582231$ $r^2 = 0,9600419$	$y = 0,5689x + 29,353$ $r = 0,8452864$ $R^2 = 0,71457867$ $r^2 = 0,71450275$	$y = 1,4519x + 11,9286$ $r = 0,92009848$ $R^2 = 0,84664003$ $r^2 = 0,84658121$	очень тесная
230	$y = 1,9222x - 2,7722$ $r = 0,9151334$ $R^2 = 0,8374363$ $r^2 = 0,8374693$	$y = 1,7995x + 4,682$ $r = 0,9524489$ $R^2 = 0,9071831$ $r^2 = 0,9071589$	$y = 0,9468x + 0,45$ $r = 0,9433086$ $R^2 = 0,8891068$ $r^2 = 0,8896449$	очень тесная

Таким образом, математическая модель, аппроксимирующая зависимость активности МФК IV от суммарной активности МФК I, II при любой допустимой для жизнедеятельности организма степени тяжести гипоксии принимала вид функции двух переменных $y(x, h) = \varphi_0(h)x + \varphi_1(h)$. Подставляя рассчитанные значения $A0_j, (A1)_j, (A2)_j$ в функции $\varphi_i(h)$ ($i = 0, 1$), ($j = 0, 1$), имеем:

$$y(x, h) = (0,709659 + 0,214781 \cdot \cos(1544,619/h)) \cdot x + (32,28878 - 36,9624 \cdot \cos(1266,172/h)),$$

где x – суммарная активность НАДН-дегидрогеназы (НАДН-дг) и сукуинатдегидрогеназы (СДГ), выраженная в мкМолях цит. С/мг белка в минуту; h – атмосферное давление, выраженное в мм рт. ст.; $y(x, h)$ – активность цитохромоксидазы (ЦО), выраженная в мкМолях цит. С/мг белка в минуту, соотношенная к мм рт. ст.

Проведены расчеты активности ЦО по суммарной экспериментальной активности НАДН-дг + СДГ и их сравнение с дополнительно поставленным экспериментом или литературными данными. Некоторые результаты расчета представлены в табл. 3.

Таблица 3

Рассчитанные по суммарной активности (НАДН-дг + СДГ)(x) и экспериментально установленные активности ЦО(y) в разных условиях гипоксии

Атмосферное давление, мм рт. ст.	Эксперимент. НАДН-дг	Эксперимент. СДГ	Эксперимент. ЦО	Рассчитанная ЦО	Относительная ошибка расчета
	мкМоль цит. С/мг белка в минуту				
760	$35,0 \pm 1,81$	$24,8 \pm 1,28$	$73,7 \pm 5,98$	75,52040514	1,68%
310	$32,9 \pm 3,77$	$48,0 \pm 3,14$	$109,4 \pm 5,87$	110,5423592	1,04%
270	$19,1 \pm 20,3$	$18,7 \pm 3,03$	$40,9 \pm 5,87$	40,29617	1,48%
230	$19,3 \pm 1,86$	$16,6 \pm 1,67$	$33,6 \pm 2,53$	34,44012	2,5%
196	0,51 0,50	0,23 0,31	6,10 6,55	ср. 6,139595	2,93%

Анализ аналитических значений активности ЦО показал, что построенная модель

$y(x, h) = \varphi_0(h)x + \varphi_1(h)$ хорошо объединяет эмпирические показатели активностей окислительных ферментов ДЦ в условиях гипоксии. Аналитические активности МФК IV в интервале атмосферного давления 760–230 мм рт. ст. сопоставимы с экспериментальными. Относительная ошибка расчета по среднему значению ЦО меньше 20% (табл. 3). Это соответствовало критерию допустимой погрешности работающей модели [1], и функция $y(x, h) = \varphi_0(h)x + \varphi_1(h)$ отвечала требованиям поставленной задачи исследования.

После некоторой модификации представленную модель можно использовать для оценки активности МФК I и II по функции МФК IV при нарушении кислородного режима.

Таким образом, использование методов математического анализа дало возможность построить модель множественной регрессии, которая достаточно точно объединяет экспериментальные показатели активностей МФК. Предлагаемая функция позволяет:

- 1) оценить вид зависимостей и тесноту связи между активностью окислительных ферментов ДЦ митохондрий мозга в условиях гипоксии разной степени тяжести;
- 2) проследить влияние гипоксии на устойчивость зависимых отношений МФК I, II, IV ДЦ;
- 3) расчетным способом прогнозировать активность ЦО у интактных животных и при митохондриальной дисфункции I и II комплексов ДЦ в условиях гипоксии, опасных для жизнедеятельности организма;
- 4) расчетным способом проводить оценку активности МФК I и II по функции МФК IV в экстремальных гипоксических состояниях мозга.

Список сокращений

ДЦ – дыхательная цепь

МФК – митохондриальные ферментные комплексы

НАДН-дг – НАДН-дегидрогеназа

СДГ – сукуинатдегидрогеназа

ЦО – цитохромоксидаза

Библиографический список

1. **Марри, Дж.** Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии – лекции о моделях / Дж. Марри. // Москва: Мир, 1983. С. 383–390.
2. **Самарский, А.А.** Математическое моделирование в информационную эпоху. / А.А. Самарский, А.П. Михайлов // Вестник РАН. 2004. Т. 74. № 12. С. 781–784.
3. **Сиднев, Н.И.** Теория планирования эксперимента и анализ статистических данных // Москва, Юрайт. 2011. С. 31–139.
4. **Лукьянова, Л.Д.** Регуляторная роль митохондрий при гипоксии и их взаимодействие с транскрипционной активностью / Л.Д. Лукьянова, А.М. Дудченко, Т.А. Цибина // Вести РАМН. 2007. № 2. С. 3–13.
5. **Лукьянова, Л.Д.** Действие интегральной нормобарической гипоксии на кинетические свойства митохондриальных ферментов / Л.Д. Лукьянова, А.М. Дудченко, Т.А. Цибина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. № 12. С. 644–651.
6. **Лукьянова Л.Д.** Сигнальная функция митохондрий при гипоксии и адаптации // Патогенез. 2008. Т. 6. № 3. С. 4–12.
7. **Лукьянова, Л.Д.** Новое о сигнальных механизмах адаптации к гипоксии и их роли в системной регуляции / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова, Г.В. Сукоян // Патогенез. 2011. Т. 9. № 3. С. 4–14.
8. **Moshkova A.N., Khvatova E.M. and Rusakova I.A.** Mathematical Analysis of Kinetic Characteristics of Oxidative Phosphorylation in the Animal Brain under Hypoxic Conditions ISSN 1819–7124 // Neurochemical Journal. 2007. V. 3. No 3. P. 240–243.
9. **Moshkova A.N., Khvatova E.M., Rusakova I.A.** Analysis and predictions of ATP Concentration in the Animal Brain under Hypoxic Conditions ISSN 1819–7124 // Neurochemical Journal. 2009. V. 3. No 1. P. 44–48.

10. **Moshkova A.N., Erlykina E.I., Sergeeva T.F. and Khvatova E.M.** Approach to Prediction of Adaptive State of Brain Energetic System under Conditions of Hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2010. V. 149. No. 3. P. 91–92.
11. **Ye J. Keller J.N.** Regulation of energy metabolist by inflammation: A feedback response in obesity and calonic restriction // Cytokine. 2010. V. 85. P. 56–60.
12. **Zinkernagel A.S., Johnson R.S., Nizet V.** Hypoxia unducible. 2007. V. 85. P. 1339–1346.

*Дата поступления
в редакцию 07.02.2014*

A.N. Moshkova¹, E.I. Erlykina², E.M. Khvatova², N.P. Tezhikova¹

**THE OPTION OF EMPIRICAL DEPENDENCES FOR THE ASSESSMENT
AND PROGNOSTICATION OF ENZYMATIC COMPLEXES
FUNCTIONAL STATE IN HYPOXIA**

Nizhny Novgorod state technical university n.a. R.E. Alexeev¹,
Nizhny Novgorod State Medical Academy²

Aim of the study: investigation of mitochondria enzymatic complexes I, II, IV function in various conditions of atmospheric absolute pressure vacuum, as well as the analysis of respiratory chain enzyme activities dependent ratios by empirical dependencies method and identification of regularities in their changes for prognostication of brain energetic state in hypobaric hypoxia.

Methodology: empirical dependencies method was used in this study to evaluate and predict respiratory chain mitochondria enzymatic complexes I, II, IV dysfunction in a correlation with a degree of hypoxia influence.

Results and area of their application: a multiregression model was made to assess hypoxia influence on the respiratory chain mitochondria enzymatic complexes I, II, IV dependent ratios stability, predict cytochrome oxidase activity in mitochondria dysfunction of respiratory chain complexes I, II in various conditions, evaluate mitochondria enzymatic complexes activities by mitochondria enzymatic complex IV function in brain extreme hypoxic conditions.

Conclusions: the multiregression model was built as a result of this study to approximate a quantitative dependence of respiratory chain mitochondria enzymatic complexes on degree of hypoxia influence.

Key words: mitochondria enzymatic complexes, respiratory chain, hypoxia, multiregression model.