

УДК 576.2: 618.8.001.6 – 005.4:51
©Коллектив авторов

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ АКТИВНОСТЬЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ КРЕАТИНКИНАЗЫ И УРОВНЕМ АТР ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА

А.Н. Мошкова^{1}, Е.И. Ерлыкина², Е.М. Хватова²*

¹Нижегородский государственный технический университет, 603950,
Н. Новгород, ул. Минина, д.24; (8314)436-63-93; эл. почта: ria_nn@mail.ru
²Нижегородская государственная медицинская академия, 603005, Н. Новгород,
пл. Минина и Пожарского, 10/1, эл. почта: e_erlyk@hotmail.ru

Нарушение мозгового кровообращения приводит к изменениям в метаболических процессах и реакциях энергетического обмена. Использован метод математического анализа для изучения зависимости активности митохондриальной креатинкиназы (миКК) от содержания АТР в ткани мозга крыс при разных сроках ишемии. Построена регрессионная модель, аппроксимирующая эту зависимость в разных условиях жизнедеятельности организма. Представляется возможность прогнозировать каталитические свойства КК по уровню АТР.

Ключевые слова: креатинкиназа, АТР, мозг, ишемия, функция.

ВВЕДЕНИЕ. Молекулярные механизмы развития острой ишемии дают представление о фундаментальных основах регуляции хода важнейших метаболических реакций, позволяющих поддерживать жизнедеятельность клеток при снижении кровообращения мозга [1]. Решающее значение при церебральной ишемии имеет состояние энергетического метаболизма [2, 3]. Одним из главных направлений исследования ткани мозга является выяснение механизмов действия ишемии на интегральные системы энергетического обмена нервных клеток, оценка метаболизма мозга по характеристике ферментативных реакций и изучение свойств ключевых ферментов. В условиях острой ишемии головного мозга особо важное значение приобретает процесс образования энергетических эквивалентов [4-8].

* - адресат для переписки

Одним из возможных путей стабилизации уровня макроэргических соединений аденинового пула является креатинкиназная система. За счёт осуществления креатинкиназной реакции в клетке поддерживается постоянный уровень АТФ [9]. Креатинкиназа рефосфорилирует АТФ из АДФ и креатинфосфата (КФ) со скоростью в 15-20 раз превышающей скорость синтеза АТФ в процессе окислительного фосфорилирования [10, 11].

В работе представляются данные по изучению активности креатинкиназы в общей митохондриальной фракции и содержания АТФ в ткани мозга при различных сроках нарушения гемодинамики.

Целью настоящего исследования явилось:

1) Оценка зависимости активности креатинкиназы от уровня АТФ в ткани мозга.

2) Выбор математической модели для аппроксимации зависимости активности креатинкиназы от конечной концентрации АТФ с целью прогнозирования энергетического состояния мозга животных в условиях ишемии.

МЕТОДИКА. Работа проведена на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, содержащихся на общевиварном режиме. Моделирование ишемии головного мозга создавали путем билатерального двойного лигирования общих сонных артерий под наркозом (небутал, 30 мг/кг в/бр). Ткань мозга исследовали через 30 минут, 1,5 часа и 18 часов после оперативного вмешательства.

Выделение митохондриальной фракции головного мозга проводили методом дифференциального центрифугирования [12, 13]. Животных декапитировали, головной мозг быстро извлекали и отмывали в растворе сахарозы (0,32 М, рН 7,4). Все работы проводили при температуре окружающей среды 0-6°C. Большие полушария мозга отделяли и тщательно очищали от оболочек. Ткань измельчали в гомогенизаторе (стекло-тефлон) со скоростью 200 об/мин. В 10-ти кратном объеме среды выделения, содержащей 0,32 М сахарозу, 10 мМ трис-НСl и 10 мМ ЭДТА (рН 7,4). Полученный 10% гомогенат центрифугировали 10 минут на центрифуге ЦПР-1 при 1000 g. Надосадочную жидкость осторожно сливали и повторно центрифугировали 15 минут при 12500 g. Осадок промывали раствором сахарозы (0,32 М, рН 7,4), ресуспендировали и центрифугировали 15 минут при 16500 g. Полученный после центрифугирования осадок содержал фракцию митохондрий головного мозга. Полученная митохондриальная фракция служила объектом в независимых экспериментах по определению активности митохондриальной креатинкиназы и концентрации АТФ. Активность митохондриальной креатинкиназы (миКК) определяли потенциометрическим методом в модификации [14], основанном на том, что реакция взаимодействия АДФ с креатинфосфатом (КФ) протекает с поглощением H^+ . Скорость обратной креатинкиназной реакции измеряли по изменению рН инкубационной среды, содержащей 0,25 М сахарозу, 2,5 мМ трис-НСl, 12 мМ $MgCl_2$, 10 мМ KCl, 0,25 мМ дитиотреитола, 5 мМ КФ, 2 мМ АДФ.

Активность митохондриальной креатинкиназы выражали в мкг-экв. H^+ /мг белка в минуту.

Определение концентрации белка проводилось по методу Lowry и др. и Bradford [15, 16].

Содержание АТФ определяли методом колоночной хроматографии на эктеол-целлюлозе в Cl-форме [17]. С колонки АТФ элюировали 0,05 М раствором HCl. Затем конечную концентрацию HCl доводили до 1,0 М. Содержание АТФ выражали в мкмольях на 1 г сырой ткани. Все результаты экспериментов были обработаны методом вариационной статистики [18].

При подборе регрессионной модели использовали программу MS Excel. Коэффициенты функциональной зависимости между выбранными показателями находили методом наименьших квадратов, Ньютона или сопряженных градиентов. Близость линии тренда к фактическим данным оценивали квадратом смешанной корреляции R^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведенные исследования показали, что через 30 минут после двусторонней перевязки общих сонных артерий наблюдается существенное снижение содержания АТР по сравнению с интактными животными и угнетение функции креатинкиназы в митохондриях, что проявляется снижением общей ее активности. При увеличении времени выживания животных до 1,5 часов после операции восстановление содержания АТР до исходного уровня, а также повышение активности миКК по сравнению с предыдущей экспозицией в 1,4 раза, не достигая еще значения интактных животных. Через 18 часов после билатеральной перевязки сонных артерий общая активность креатинкиназы в митохондриальной фракции не меняется по сравнению с 1,5-часовой экспозицией, а концентрация АТР достоверно снижается (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация АТР и активность креатинкиназы при ишемии мозга животных разной продолжительности.

Сроки ишемии	АТР ммоль/г сырой ткани	КК мкг-эвН ⁺ /мг белка/мин
Интактные животные	2,08±0,07 (23)	2,79±0,13 (23)
30 минут	1,40±0,13 p<0,001 (12)	* 1,50±0,14 (12)
1,5 часа	2,08±0,07 (14)	* 2,09±0,06 (14)
18 часов	1,52±0,1 p<0,001 (14)	* 2,0±0,06 (14)

Примечание. * - достоверность по сравнению с интактными животными при p<0,05. В скобках - число исследованных животных.

Таким образом, анализ экспериментальных данных креатинкиназной системы показывает, что на ранних сроках ишемии и при увеличении её продолжительности происходит снижение активности миКК, а изменения уровня АТР имеют колебательный характер.

Была проведена попытка аппроксимации эмпирической зависимости активности миКК от концентрации АТР в ткани мозга интактных животных и в условиях ишемии разной экспозиции. В качестве независимой переменной “х” рассматривали содержание АТР, а зависимой переменной “у” являлась общая активность КК в митохондриальной фракции. Структура экспериментальных данных для каждой порции переменных представляла два массива, элементы которых обозначались x_i, y_i ($i = 1, 2, \dots, n$). Массивы экспериментальных показателей были объединены в эмпирические ряды. Рассматривали соответствие $x_i \rightarrow y_i$ с учётом их корреляции по времени проводимых экспериментов. С помощью табличного процессора Excel подбирали функции регрессии, сглаживающие значения x_i, y_i в каждом рассматриваемом эксперименте. Из множества регрессионных функций предпочтительнее оказалась линейная $y = a_0x + a_1$, которая давала меньший риск значительной ошибки прогноза (рис. 1-4). Значение коэффициентов a_0, a_1 , найденные методом наименьших квадратов, и квадрат смешанной корреляции RI представлены в таблице 2.

КРЕАТИНКИНАЗЫ И АТР ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА

X	Y	Yp
2,01	2,62	2,608391
2,03	2,64	2,636373
2,05	2,66	2,664355
2,07	2,68	2,692337
2,08	2,7	2,706328
2,09	2,72	2,720319
2,11	2,74	2,748301
2,12	2,76	2,762292
2,13	2,79	2,776283
2,15	2,81	2,804265

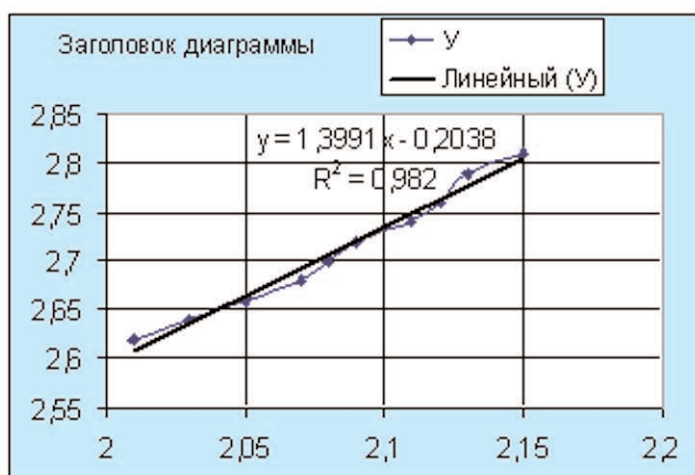


Рисунок 1.

Зависимость между АТР(х)-КК(у) в мозге интактных животных.

X	Y	Yp
1,27	1,36	1,360009
1,3	1,38	1,38001
1,33	1,4	1,400011
1,36	1,42	1,420012
1,39	1,44	1,440013
1,42	1,46	1,460014
1,45	1,48	1,480015
1,48	1,5	1,500016
1,51	1,52	1,520017
1,54	1,54	1,540018

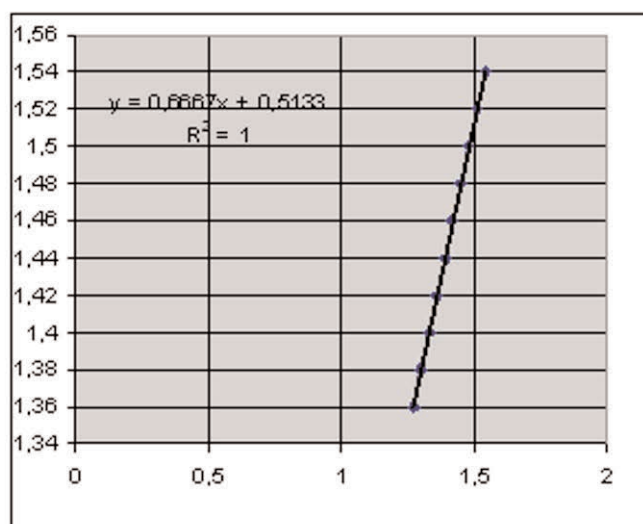


Рисунок 2.

Зависимость между АТР(х)-КК(у) при ишемии, продолжительностью 30 минут.

X	Y	Yp
2,01	2,03	2,025221
2,03	2,04	2,040463
2,05	2,05	2,055705
2,06	2,06	2,063326
2,07	2,07	2,070947
2,08	2,08	2,078568
2,09	2,09	2,086189
2,11	2,1	2,101431
2,12	2,11	2,109052
2,13	2,12	2,116673
2,15	2,13	2,131915

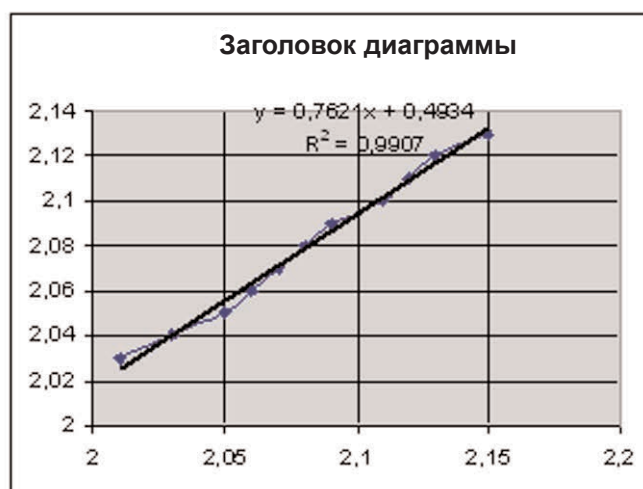


Рисунок 3.

Зависимость между АТР(х)-КК(у) при ишемии, продолжительностью 1,5 часа.

X	Y	Y _p
1,4	1,94	1,94
1,42	1,95	1,95
1,44	1,96	1,96
1,46	1,97	1,97
1,48	1,98	1,98
1,5	1,99	1,99
1,52	2	2
1,54	2,01	2,01
1,56	2,02	2,02
1,58	2,03	2,03
1,6	2,04	2,04
1,62	2,05	2,05
1,64	2,06	2,06



Рисунок 4.

Зависимость между АТР(х)-КК(у) при ишемии, продолжительностью 18 часов.

Таблица 2. Значения коэффициентов a_0 , a_1 линейной регрессионной модели $y = a_0x + a_1$ в разных условиях нарушения мозгового кровообращения.

Сроки ишемии	Коэффициенты		Значение R^2
	a_0	a_1	
Интактные животные	1,3991	-0,2038	0,98
30 минут	0,6667	0,5133	1,0
1,5 часа	0,7521	0,4934	0,99
18 часов	0,5	1,24	1,0

Соответствие функции $y = a_0x + a_1$ поставленной задаче доказывалось сравнением аналитически рассчитанной активности миКК с экспериментально установленной. Критерием оценки служила относительная ошибка формулы, которая не должна была превышать 20%. Возможность использования функции при других экспозициях проверялась на эксперименте 4-часовой ишемии. С этой целью была установлена концентрация АТР ($2,13 \pm 0,09$ мкмоль/г ткани) в этих условиях. Активность миКК рассчитывали аналитически. Расчетное значение активности миКК соответствовало экспозиции выживания животных в условиях 1,5 и 18-часовой ишемии (табл. 3).

Проведён расчёт активности миКК в мозге агонирующих животных. При 18-часовой ишемии смертность животных составляла 38%.

Экспериментально было установлено, что концентрация АТР в мозге агонирующих животных составляла $0,06 \pm 0,01$ мкмоль/г сырой ткани.

Расчетная активность КК общей митохондриальной фракции этой группы животных составляла 1,077-1,279 мкг-эквН⁺/мг белка/мин (табл. 3).

КРЕАТИНКИНАЗЫ И АТР ПРИ ИШЕМИИ МОЗГА

Таблица 3. Сравнение расчетной и экспериментальной активности КК общей митохондриальной фракции мозга животных в разных сроках ишемии.

Сроки ишемии	Экспериментальная активность КК мкг-эквH ⁺ /мг белка/мин	Рассчитанная активность КК мкг-эквH ⁺ /мг белка/мин, соотнесенная к мкмольм/г сырой ткани	Относительная ошибка формулы
Интактные животные	2,79±0,13	2,71	2,998%
30 минут	1,50±0,14	1,46	2,665%
1,5 часа	2,09±0,06	2,08	0,545%
4 часа	–	2,12	
18 часов (удовл. группа)	2,0±0,06	2,0	0%
18 часов (агонизирующая группа)		1,077-1,279	

Из таблицы 3 видно, что функция $y = a_0x + a_1$ хорошо объединяет показатели рассмотренных экспериментов, так как дает незначительную ошибку расчетной активности миКК по сравнению с экспериментальной. Построенная регрессионная модель удачно выполняет прогностическую функцию, поэтому рассчитанная общая активность КК в митохондриальной фракции в этом случае сопоставима с реально существующими результатами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведено исследование зависимости общей активности митохондриальной креатинкиназы от содержания АТР в мозге животных при ишемии разной продолжительности. Установлено, что на ранних сроках нарушения мозгового кровообращения и при увеличении времени после операции наблюдается угнетение активности креатинкиназы, а изменение уровня АТР имеет немонотонный характер. Использование числовых методов анализа дало возможность аппроксимировать эмпирическую зависимость активности миКК от концентрации АТР в условиях ишемии с разной продолжительностью. Установлено, что линейная функция $y = a_0x + a_1$ достаточно точно объединяет эти показатели и позволяет расчетным способом прогнозировать каталитические свойства митохондриальной креатинкиназы в зависимости от содержания энергетического фонда мозга при нарушении кровообращения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукьянова Л.Д. (2004) Патол. физиол. exper. тер., №2, 2-11.
2. Хватова Е.М. (1992) В кн.: "Гипоксия и окислительные процессы". Нижний Новгород, 121-126.

3. Дудченко А.М., Лукьянова Л.Д. (2004) Проблемы гипоксии: молекулярные, физиологические и медицинские аспекты, Истоки, М., с. 51-53.
4. Лукьянова Л.Д. (2002) Нур. Мед. J., **10**(3,4), 30-43.
5. Ерлыкина Е.И. (2006) Нейрохимия, **23**(4), 50-55.
6. Мошкова А.Н., Хватова Е.М. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 605-608.
7. Moshkova A.N., Khvatova E.M., Rusakova I.A. (2007) Neurochem. J., **1**(3), 240-243.
8. Saks V.A., Ventura-Clapier R., Aliev M.K. (1996) Biochim. Biophys. Acta, **1274**(3), 81-82.
9. Brdiczka D., Beutner G., Ruck A. et al (1998) Biofactors, **1061**, 215-225.
10. Vendelin M., Lemba M., Saks V.A. (2002) Biophys J., **87**(1), 696-713.
11. Askenasy N., Koretsky A.P. (2002) Am. J. Physiol. Cell Physiol., **282**, 338-346.
12. Fonio A., Somogyi J. (1960) J. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., **8**(3), 191-198.
13. Дижее Г.П., Ещенко Н.Д., Красовская И.Е. (2003) Введение в технику биохимического эксперимента, СПбГУ, 80-81.
14. Белоусова Л.В., Федосов С.Н., Москвитина Е.А. и др. (1987) Вопр. мед. химии, **1**, 138-142.
15. Lowry O., Rasebrough N., Farr A., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
16. Bradford M.M. (1976) J. Anal. Biochem, **72**, 248-254.
17. Северин С.Е., Соловьева Г.А. (1989) Практикум по биохимии, с. 190.
18. Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. (1985) Прикладная статистика, Финансы и статистика, М., 25-41.

Поступила: 02. 09. 2008.

DEPENDENCE BETWEEN MITOCHONDRIAL CREATINE KINASE ACTIVITY AND ATP LEVEL IN THE BRAIN ISCHEMIA

A.N. Moshkova¹, E.I. Yerlykina², E.M. Khvatova²

¹Nizhnii Novgorod State Technical University, Minina 24, Nizhnii Novgorod, 603950 Russia;
e-mail: ria_nn@mail.ru

²Nizhnii Novgorod State Academy of Medicine, Minina and Pozharskogo sq. 10/1, Nizhnii Novgorod,
603005 Russia; e-mail: e_erlyk@hotmail.ru

The disturbances of blood circulation changes metabolism and energy reactions in the brain. The method of mathematical analysis is used for the study of the dependence between the activity mitochondrial creatine kinase (CK) and ATP level the brains of rats subjected to acute and chronic ischemia. A model describing this dependence under different conditions of the activity of organisms has been proposed. Thus it is possible to predict catalytic properties of CK based on ATP level.

Key words: creatine kinase, ATP, brain, ischemia, function.